

К. А. Юрова¹, Д. Д. Лигатюк¹, Д. А. Семенова², Л. С. Литвинова¹

ЦИТОКИН-ИНДУЦИРОВАННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СОЗРЕВАНИЯ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И АПОПТОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ИММУННОЙ ПАМЯТИ

¹Балтийский федеральный университет им. И. Канта,
Калининград, Россия

²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский
университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 19.04.2022 г.

Принята к публикации 05.06.2022 г.

doi: 10.5922/gikbfu-2022-3-7

106

Для цитирования: Юрова К. А., Лигатюк Д. Д., Семенова Д. А., Литвинова Л. С. Цитокин-индуцированная регуляция созревания, дифференцировки и апоптотической гибели Т-лимфоцитов иммунной памяти // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Сер.: Естественные и медицинские науки. 2022. №3. С. 106–119. doi: 10.5922/gikbfu-2022-3-7.

Поддержание иммунной системы в состоянии физиологического равновесия требует строгой регуляции процессов клеточной пролиферации и апоптотической гибели для предотвращения развития аутоиммунных и неопластических реакций. В связи с этим Т-лимфоциты иммунной памяти находятся под постоянным контролем со стороны иммунной системы.

В проведенном исследовании оценена роль $\gamma\delta$ -цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) в регуляции процессов созревания, пролиферации, дифференцировки и апоптотической гибели Т-лимфоцитов памяти в условиях культивирования in vitro.

Выявлено, что $\gamma\delta$ -цитокины способны увеличивать количество CD3+HLA-DR+CD95+ Т-клеток в популяции эффекторных цитотоксических лимфоцитов иммунной памяти. Описанные особенности воздействия цитокинов могут свидетельствовать об участии IL-2, IL-7 и IL-15 в процессах клеточного созревания и дифференцировки. Также отмечается, что CD3+CD4+CD45RO+ Т-клетки могут иметь относительную резистентность к влиянию исследуемых цитокинов по сравнению с популяцией цитотоксических CD45RO+ Т-клеток.

Таким образом, поддержание гомеостатических концентраций $\gamma\delta$ -цитокинов играет важнейшую роль в сохранении нормального функционирования иммунной системы путем поддержания баланса клеточной пролиферации и апоптоза. Установлено, что нарушение цитокинового баланса инициирует рост поверхностной экспрессии молекул поздней активации (HLA-DR) и апоптоза (CD95), что является необходимым для регуляции повышенной пролиферации лимфоцитов и в конечном итоге препятствует срыву механизмов иммунной толерантности и развитию гиперпролиферативных патологий иммунной системы.

Ключевые слова: Т-лимфоциты памяти, $\gamma\delta$ -цитокины, апоптоз, дифференцировка, созревание



Введение

В научной литературе широко используются данные, свидетельствующие о регуляции гомеостатических механизмов клеточной генерации, созревания и пролиферации, опосредованной цитокинами, в том числе плейотропными цитокинами с общей γ -цепью — IL-2, IL-7 и IL-15 [8]. Гомеостатическая пролиферация является определяющей для поддержания эффективной иммунологической памяти за счет сохранения пула Т-клеток памяти [18]. Исследования показали, что Т-лимфоциты пролиферируют в ответ на цитокины с общей γ -цепью независимо от активации Т-клеточного рецептора (TCR). Важно отметить, что пролиферативный процесс должен быть сбалансирован клеточной гибелью. Способность некоторых цитокинов ингибировать апоптоз приводит к дисрегуляции гомеостатической пролиферации Т-клеток и развитию аутоиммунных и гиперпролиферативных заболеваний [21].

Целью настоящей работы было выяснение роли цитокинов с общей γ -цепью (IL-2, IL-7 и IL-15) в контроле созревания, дифференцировки и апоптотической гибели Т-лимфоцитов иммунной памяти в условиях их культивирования *in vitro*.

107

Материалы и методы

Настоящее исследование было проведено в соответствии с протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999) и Хельсинкской декларацией ВМА (2000). На проведение экспериментальных работ было получено разрешение в ЛЭК Балтийского федерального университета им. И. Канта (г. Калининград) №5 от 05.11.2013 г.

В исследовании были использованы популяции Т-клеток памяти (CD45RO⁺). Т-лимфоциты иммунной памяти получали из мононуклеарных лейкоцитов венозной крови условно здоровых доноров в возрасте от 22 до 35 лет (29 мужчин и 29 женщин). Мононуклеарные лейкоциты были выделены из венозной крови здоровых доноров с использованием метода центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина (1,077 г/см³; Pharmacia, Швеция).

Выделение фракции Т-лимфоцитов иммунной памяти проводили методом иммуномагнитной сепарации. Сепарация производилась с использованием моноклональных антител (МАТ) CD45RO⁺, конъюгированных с магнитными частицами (MicroBeads human, Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с протоколом производителя, при помощи автоматического магнитного сепаратора AutoMACS Pro Separator Instrument (Miltenyi Biotec, Германия). Оценка чистоты популяции CD45RO⁺-клеток проводилась с применением МАТ, которые были конъюгированы с фикоэритрином (PE) или флюоресцеинизотиоцианатом (FITC) (Abcam, Cambridge, Великобритания). Отсутствие В-лимфоцитов (CD19⁺) и моноцитов (CD14⁺) в культурах CD45RO⁺-клеток до и после культивирования подтверждалось методом проточной цитофлуориметрии с применением МАТ (e-Bioscience, США). Оценка поверхностных молекул была проведена на проточном цитофлуориметре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия) согласно протоколу производителя. В проведенном исследовании были использованы культуры клеток, в которых



содержание CD3+CD45RO+CD14-CD19- лимфоцитов составило в среднем $98,5 \pm 1,5$ %. Присутствие целевой фракции CD45RO+-лимфоцитов в исследуемых образцах составляло более 95 %.

В исследование не включали людей младше 18 и старше 35 лет, а также людей с обострениями хронических воспалительных заболеваний, с аутоиммунными и эндокринными нарушениями, инфекционными и онкологическими патологиями.

Клетки с фенотипом CD45RO+ (1×10^6 кл./мл) культивировали в 48-луночной планшете в бессывороточной среде Искова (Sigma, США), при добавлении 0,5 % сывороточного альбумина человека (Микроген, Россия), 5×10^{-5} М β -меркаптоэтанола (Acros Organics, США) и 30 мкг/мл гентамицина в присутствии рекомбинантных форм цитокинов IL-2, IL-7, IL-15 (Miltenyi Biotec, Германия) в исследуемых концентрациях или без цитокинов (контрольные пробы) в течение 48 ч при 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂.

Варианты культивирования:

- 1) контрольные пробы без добавления цитокинов;
- 2) пробы с добавлением rIL-2 в исследуемых концентрациях (0,1 нг/мл; 0,5 нг/мл; 1,0 нг/мл);
- 3) пробы с добавлением rIL-7 в исследуемых концентрациях (0,1 нг/мл; 0,5 нг/мл; 1,0 нг/мл);
- 4) пробы с добавлением rIL-15 в исследуемых концентрациях (0,1 нг/мл; 0,5 нг/мл; 1,0 нг/мл).

По истечении времени культивирования (48 ч) проводили оценку количества лимфоцитов и процентное содержание жизнеспособных клеток в исследуемых культурах с использованием ViaCount Reagent (Millipore, США) методом проточной лазерной цитометрии на проточном цитометре «Guava EasyCite Plus» (Millipore, США), в соответствии с протоколом производителя.

Количество CD45RO+-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы CD45RO+, CD3+, CD4+, CD8+, CD62L+, HLA-DR+, CD95+, было определено с использованием проточного цитофлюориметра с применением коктейля МАТ (eBioscience, США; Abcam, Великобритания; Miltenyi Biotec, Германия), приготовленных *ex tempore* в соответствии с протоколом производителя:

CD3-Viablue/CD4-PE/CD8-FITC/CD45RO-APC/CD62L-PerCp.

CD3-Viablue/-CD4-PE/CD8-FITC/CD95-APC/-HLA-DR-PerCp.

Результаты были зарегистрированы с использованием проточного цитофлюориметра MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия). Цитометрический анализ производился с использованием программы KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США).

Статистический анализ. Анализ полученных результатов осуществляли с использованием пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). Для оценки выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова — Смирнова). Полученные выборки не подчинялись нормальному закону распределения. Для каждой выборки вычисляли медиану (Me), первый и третий квартили (Q1, Q3). Статистически достоверных гендерных различий выявлено не было. С целью выявления достоверности различий между выборками был использован критерий Вилкоксона



для зависимых выборок. Для обнаружения связи между исследуемыми показателями был проведен корреляционный анализ Спирмена. Статистически значимыми различия считались при $P < 0,05$.

Результаты

Число CD3+CD45RO+ клеток в контрольных культурах по окончании времени культивирования (48 ч) составило в среднем $1,08 \pm 0,09 \times 10^6$ кл/мл, число жизнеспособных Т-клеток было равно $87,56 \pm 7,98$ %.

Количество Т-хелперов центральной (ТСМ) памяти, экспрессирующей молекулу CD95, составило 25,18 (23,86–26,15)%, тогда как в популяции Т-клеток эффекторной памяти их число достигало 79,53 (74,13–82,26)% (табл. 1).

Таблица 1

Относительное содержание (%) CD3+CD4+CD95+ и CD3+CD8+CD95+ клеток в CD62L+ и CD62L- популяциях CD45RO- культуры, в условиях гомеостатической модели культивирования *in vitro*, с добавлением разных концентраций γ -цитокинов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15)

Вариант культивирования	CD45RO+CD3+CD95+			
	CD4+CD62L-	CD4+CD62L+	CD8+CD62L-	CD8+CD62L+
Контрольная проба	79,53 (74,13–82,26)	25,18 (23,86–26,15)	84,21 (80,18–89,61)	72,54 (69,87–76,98)
IL-2 (0,1 нг/мл)	83,15 (80,04–89,71)	27,96 (26,12–29,46)	87,43 (83,21–89,42)	84,03 (79,02–86,67) $p^0 \leq 0,05$
IL-2 (0,5 нг/мл)	83,26 (79,98–89,53)	26,84 (26,35–29,43)	89,51 (86,47–96,18)	85,21 (79,95–87,34) $p_0 \leq 0,05$ $p_1 \leq 0,05$ $p_3 \leq 0,05$
IL-2 (1,0 нг/мл)	85,41 (81,05–91,17)	31,94 (28,76–31,31)	88,22 (85,33–95,62)	89,82 (83,81–93,14) $p_0 \leq 0,05$ $p_1 \leq 0,05$ $p_2 \leq 0,05$
IL-7 (0,1 нг/мл)	82,68 (78,21–88,74)	30,08 (29,71–32,21)	86,54 (82,15–89,66)	76,45 (75,12–79,76)
IL-7 (0,5 нг/мл)	78,16 (76,29–87,11)	24,81 (24,26–29,78)	84,42 (79,87–87,93)	78,94 (77,36–80,05)
IL-7 (1,0 нг/мл)	82,54 (77,89–89,03)	27,56 (27,12–31,05)	86,41 (82,03–89,54)	86,60 (82,38–92,19) $p_0 \leq 0,05$
IL-15 (0,1 нг/мл)	83,97 (78,08–89,97)	30,84 (30,21–32,14)	85,72 (79,82–90,13)	79,40 (76,23–81,54)
IL-15 (0,5 нг/мл)	85,27 (79,93–91,42)	26,48 (26,35–29,76)	87,31 (81,94–91,22)	77,69 (75,58–80,47)
IL-15 (1,0 нг/мл)	78,41 (76,23–87,91)	27,73 (27,28–29,61)	90,96 (83,24–94,75)	84,56 (81,55–90,53) $p_0 \leq 0,05$



Вариант культивирования	CD45RO+CD3+CD95+			
	CD4+CD62L-	CD4+CD62L+	CD8+CD62L-	CD8+CD62L+
IL-15 (0,1 нг/мл)	83,97 (78,08—89,97)	30,84 (30,21—32,14)	85,72 (79,82—90,13)	79,40 (76,23—81,54)
IL-15 (0,5 нг/мл)	85,27 (79,93—91,42)	26,48 (26,35—29,76)	87,31 (81,94—91,22)	77,69 (75,58—80,47)
IL-15 (1,0 нг/мл)	78,41 (76,23—87,91)	27,73 (27,28—29,61)	90,96 (83,24—94,75)	84,56 (81,55—90,53)
				$p_0 \leq 0,05$

110

Примечание (здесь и в табл. 2, 3): $p_0 \leq 0,05$ — достоверные различия с контрольной пробой;

$p_1 \leq 0,05$ — достоверные различия с пробой при добавлении цитокина в концентрации 0,1 нг/мл;

$p_2 \leq 0,05$ — достоверные различия с пробой при добавлении цитокина в концентрации 0,5 нг/мл;

$p_3 \leq 0,05$ — достоверные различия с пробой при добавлении цитокина в концентрации 1,0 нг/мл.

В культуре цитотоксических Т-лимфоцитов памяти число CD62L+CD95+ и CD62L-CD95+ клеток составило 72,54 (69,87—76,98)% и 84,21 (80,18—89,61)% соответственно. Таким образом, проведенное исследование убедительно доказывает, что цитотоксические лимфоциты памяти и хелперные популяции эффекторной памяти конститутивно экспрессируют на своей поверхности молекулу CD95.

Присутствие в среде культивирования CD3+CD45RO+ Т-клеток рекомбинантного IL-2 приводило к увеличению числа клеток (в среднем на 20 %) во всем диапазоне концентраций. Число CD95+ Т-клеток статистически значимо увеличилось при культивировании с rIL-2 (0,5 нг/мл; 1,0 нг/мл) по сравнению с контрольными значениями ($p \leq 0,05$) (табл. 2).

Стоит отметить, что изменения наблюдались, преимущественно, в цитотоксической популяции CD45RO+лимфоцитов (табл. 2).

Таблица 2

Содержание CD4+ и CD8+ Т-клеток (%)
в культурах CD45RO+ Т-лимфоцитов, экспрессирующих мембранную
молекулу апоптоза — CD95, в условиях инкубации с цитокинами,
имеющими общую γ -цепь рецепторов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15),
в гомеостатической модели культивирования *in vitro* (Me (Q1-Q3))

Вариант культивирования	CD45RO+CD3+		
	CD95	CD4/95	CD8/95
Контрольная проба	20,84 (16,22—25,60)	12,01 (10,96—14,67)	7,43 (6,11—9,96)
IL-2 (0,5 нг/мл)	28,02 (25,14—31,54) $p_0 < 0,05$ $p_1 < 0,05$	12,75 (10,24—13,22)	15,56 (13,79—18,09) $p_0 < 0,05$ $p_1 < 0,05$



Вариант культивирования	CD45RO+CD3+		
	CD95	CD4/95	CD8/95
IL-2 (0,5 нг/мл)	28,02 (25,14–31,54) $p_0 < 0,05$ $p_1 < 0,05$	12,75 (10,24–13,22)	15,56 (13,79–18,09) $p_0 < 0,05$ $p_1 < 0,05$
IL-2 (1,0 нг/мл)	31,71 (28,93–35,23) $p_0 < 0,05$ $p_1 < 0,05$	11,33 (9,20–13,71)	18,72 (16,02–22,10) $p_0 < 0,05$ $p_1 < 0,05$
IL-7 (0,1 нг/мл)	18,78 (14,84–19,36)	11,91 (10,63–13,57)	6,53 (4,99–7,33)
IL-7 (0,5 нг/мл)	19,19 (15,23–23,41)	10,47 (8,41–13,47)	7,17 (6,28–9,73)
IL-7 (1,0 нг/мл)	20,96 (18,87–24,18)	12,22 (10,82–14,18)	7,99 (6,27–9,30)
IL-15 (0,1 нг/мл)	18,92 (15,59–23,10)	10,96 (7,72–13,46)	7,16 (5,30–9,18)
IL-15 (0,5 нг/мл)	21,27 (18,98–23,48)	11,25 (10,31–14,96)	9,57 (8,28–12,81)
IL-15 (1,0 нг/мл)	22,05 (20,18–25,35)	15,99 (13,23–18,23)	7,19 (4,48–12,53)

III

Количество Т-лимфоцитов эффекторной памяти CD8+CD62L- Т-лимфоцитов, напротив, повышалось в CD45RO- популяции Т-клеток, тогда как число CD95+лимфоцитов было сопоставимо с контрольными значениями (табл. 1).

Проведенное исследование показало, что rIL-7 не изменял количество и жизнеспособность клеток в CD3+CD45RO+ популяции Т-лимфоцитов. Добавление rIL-15 (1,0 нг/мл) приводило к достоверному увеличению общего числа (в мл) Т-лимфоцитов памяти.

Добавление rIL-7 и rIL-15 в культуру CD3+CD45RO+ Т-лимфоцитов не оказывало достоверного влияния на экспрессию CD95, однако было обнаружено повышение содержания CD8+CD62L+CD95+ клеток при внесении в среду культивирования исследуемых цитокинов в концентрации 1,0 нг/мл, что соответствует максимальной. Этот факт может свидетельствовать о цитокин-индуцированном созревании Т-клеток центральной памяти.

В ходе проведения настоящего исследования было выявлено, что в популяции CD3+CD45RO+ Т-клеток число хелперных HLA-DR+ Т-лимфоцитов было преобладающим. Количество HLA-DR+ клеток в популяции CD8+/CD4+CD62L+ лимфоцитов (TCM) составило 2,44 (2,38–3,15)% и 2,67 (2,64–3,18)% соответственно (табл. 3); в CD8+/CD4+CD62L- популяции (TEM) это процентное распределение было равно 15,57 (14,43–16,98) и 7,28 (7,68–8,78)% соответственно (табл. 3).

Таблица 3

Относительное содержание CD3+CD4+HLA-DR+ и CD3+CD8+HLA-DR+ клеток (%) в CD62L+ и CD62L- популяциях CD45RO+- культуры, в условиях гомеостатической модели культивирования *in vitro* с добавлением разных концентраций γ -цитокинов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15)

Вариант культивирования	CD45RO+CD3+CDHLA-DR+			
	CD4+CD62L-	CD4+CD62L+	CD8+CD62L-	CD8+CD62L+
Контрольная проба	7,28 (7,68–8,78)	2,67 (2,64–3,18)	15,57 (14,43–16,98)	2,44 (2,38–3,15)
IL-2 (0,1 нг/мл)	14,02 (13,67–14,91)	3,24 (2,87–3,54)	20,81 (19,21–22,42)	4,01 (3,87–4,45)
IL-2 (0,5 нг/мл)	14,76 (14,11–15,18)	3,69 (3,14–3,94)	24,14 (23,67–26,38)	4,68 (4,41–4,75)
IL-2 (1,0 нг/мл)	17,75 (16,34–18,98) $p_0 \leq 0,05$	3,97 (3,48–4,87)	27,61 (25,43–28,09) $p_0 \leq 0,05$	7,74 (7,51–8,23) $p_0 \leq 0,05$
IL-7 (0,1 нг/мл)	9,36 (8,24–10,38)	2,32 (2,14–2,45)	17,48 (16,82–18,84)	3,25 (3,13–3,75)
IL-7 (0,5 нг/мл)	8,15 (7,96–9,57)	3,86 (3,16–4,21)	23,14 (21,42–23,15)	4,18 (3,76–4,52)
IL-7 (1,0 нг/мл)	9,71 (8,44–10,81)	2,41 (2,21–3,28)	26,01 (24,13–27,55) $p_0 \leq 0,05$	3,76 (3,41–4,28)
IL-15 (0,1 нг/мл)	10,33 (9,65–11,12)	2,41 (2,04–2,76)	19,78 (18,51–22,17)	4,31 (4,01–4,59)
IL-15 (0,5 нг/мл)	12,48 (11,63–13,79)	3,79 (3,13–4,07)	20,34 (19,25–21,88)	3,89 (3,78–4,17)
IL-15 (1,0 нг/мл)	13,97 (13,28–14,67)	3,92 (3,35–4,19)	26,57 (24,79–27,53) $p_0 \leq 0,05$	4,76 (4,65–4,91)

Важно отметить, что в популяции Т-лимфоцитов с фенотипом [CD45RO+CD62L-] более 99% CD3+HLA-DR+ Т-клеток несли на своей поверхности молекулу CD95. Тем не менее не все Т-лимфоциты, экспрессирующие CD95, презентировали на клеточной мембране маркер «поздней активации» HLA-DR+.

В ходе проведения анализа по оценке действия исследуемых цитокинов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15) на экспрессию маркера HLA-DR цитотоксическими и хелперными Т-клетками в популяции CD45RO+-лимфоцитов *in vitro* было показано, что rIL-2 в концентрации 1,0 нг/мл способствовал увеличению количества HLA-DR+ Т-клеток как в CD62L+, так и в CD62L- субпопуляциях цитотоксических Т-лимфоцитов. При добавлении rIL-2 (1,0 нг/мл) в среду культивирования отмечалось увеличение содержа-



ния HLA-DR+T-клеток в хелперных субпопуляциях Т-лимфоцитов эффекторной памяти (TEM, CD62L-) ($p \leq 0,05$) и достоверно не влияло на Т-клетки с центральным фенотипом.

Цитокины rIL-7 и rIL-15 не оказывали статистически достоверного влияния на количество HLA-DR+ лимфоцитов памяти в популяции CD4+ Т-клеток. Максимальная концентрация rIL-7 и rIL-15 (1,0 нг/мл) инициировала повышение количества HLA-DR+CD95+ в популяции цитотоксических Т-клеток эффекторной памяти.

Обсуждение

Апоптотическая гибель клеток, инициированная активацией Fas (APO-1/CD95)-рецепторного механизма, играет важную роль в регуляции гомеостатической пролиферации Т-лимфоцитов иммунной памяти. Взаимодействие CD95 с его лигандом (FasL) в конечном итоге приводит к гибели клеток, однако повышенная экспрессия CD95 на поверхности клетки не является адекватным предиктором восприимчивости клетки к Fas-опосредованному апоптозу [17]. Полученные ранее данные убедительно доказали, что конститутивная экспрессия молекулы CD95 на Т-клетках памяти также является маркером их созревания и дифференцировки [2].

Т-лимфоциты памяти находятся в G1 фазе клеточного цикла, что способствует более эффективному их переходу в IL-2-зависимую стадию иммунного ответа, в результате чего активируется запуск сигнальных событий, индуцирующих процесс фосфорилирования/дефосфорилирования белка, который завершается ядерной транслокацией факторов транскрипции и в конечном итоге инициирует транскрипцию необходимого гена [24]. Активация рецептора IL-2R инициирует экспрессию FasL с участием IL-2-индуцибельной киназы Т-клеток (Itk). Дефицит IL-2, напротив, приводит к формированию аутоиммунной патологии [10].

Вариабельная чувствительность к цитокинам обусловлена дифференциальной экспрессией поверхностных молекул на разных субпопуляциях Т-клеток [3]. Таким образом, в поддержании гомеостатического равновесия и инициации функциональной активности разных популяций (CD4+/CD8+) Т-лимфоцитов центральной и эффекторной памяти участвуют разные стимулы.

Исследования, касающиеся анализа влияния цитокина IL-2 на гомеостаз цитотоксических CD8+ Т-клеток памяти, зачастую носят противоречивый характер. Так, эксперимент с участием трансгенных мышей позволил выявить проапоптотический эффект IL-2. Кроме того, авторы отмечают ингибирующее влияние IL-2 на пролиферативную активность CD8+Т-клеток памяти *in vivo* [14]. Е. В. Сазонова (2010) показала, что для инициации апоптозиндуцирующего эффекта IL-2 на Т-клетки в условиях *in vitro* важен установленный порог концентрации цитокина [1]. Зарегистрированное в эксперименте снижение уровня клеточной жизнеспособности на фоне роста числа CD8+CD95+ лимфоцитов в культуре CD3+CD45RO+ Т-клеток (в том числе в популяциях Т-лимфоцитов центральной памяти), обусловленное действием rIL-2, согласуется



с результатами исследования Д. Камимура и др. (2004), в котором было показано, что IL-2 (1,0 нг/мл) значительно усиливает апоптоз цитотоксических Т-лимфоцитов иммунной памяти в отсутствии антигенного стимула в условиях *in vivo* [14].

Сведения, касающиеся роли IL-2 в пролиферативной активности CD4⁺-Т-лимфоцитов, носят весьма разнородный характер [18; 22].

Нами также получены данные о положительном влиянии IL-2 на генерацию IL-7R α клеток памяти [13]. Чувствительная система IL-2/IL-7 регулирует циклы активации и подавления Т-клеточных ответов, что важно для сохранения баланса между реактивностью и толерантностью иммунной системы, так как изменение гомеостатического равновесия может инициировать развитие иммунопатологических состояний [15].

Мембранная экспрессия цепей рецептора IL-7 находится под контролем экзо- и эндогенных факторов. В условиях клеточной активации Т-лимфоцитов наблюдается утрата экспрессии IL-7R α [11]. Клетки, не экспрессирующие рецептор к IL-7, получают сигналы от IFN- γ и TNF- α , вследствие чего снижается их пролиферативная активность и повышается чувствительность к апоптотической гибели. Реэкспрессия IL-7R α наблюдается на Т-лимфоцитах иммунной памяти [11]. Высокий уровень экспрессии CD127 может быть детерминантой выживания CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов [9].

IL-15 обладает многими биологическими эффектами IL-2 в связи с использованием для трансдукции сигнала общих рецепторных субъединиц, однако у каждого цитокина есть уникальная рецепторная субъединица для высокоаффинного связывания, определяющая значительные различия в биологическом действии указанных медиаторов [4].

CD8⁺-Т-клетки памяти являются чувствительными к IL-15-индуцированной пролиферации, в отличие от CD4⁺-клеток различной степени зрелости [7], что может быть связано с низкой экспрессией молекулы CD122 на клеточной мембране Т-хелперов, а также обусловлено особенностями фундаментальных механизмов регуляции исследуемых субпопуляций Т-лимфоцитов иммунной памяти. Было показано, что деляция IL-15R α способствует уменьшению числа CD8⁺ Т-клеток памяти. Действие IL-15 не только потенцирует пролиферацию CD8⁺ Т-клеток памяти, но и увеличивает их эффекторную функцию путем индукции перфориновой экспрессии и цитотоксических свойств [16]. Исследования выявили связь повышенного уровня IL-15 с аутоиммунными заболеваниями, в том числе с хроническим прогрессирующим рассеянным склерозом, диабетом I типа, системной красной волчанкой [21].

Известно, что в отсутствие IL-7 или IL-15, функционально взаимозаменяемых для Т-лимфоцитов, любой из них может инициировать пролиферацию CD8⁺ Т-клеток иммунной памяти [19]. IL-7 и IL-15 также могут увеличивать в Т-клетках экспрессию антиапоптотических молекул, в частности, Bcl-1 и Bcl-2 – через PI3K/АКТ и JAK/STAT сигнальные пути [23], и дезактивировать апоптогенные факторы – Bad и Bax [6].

Активация рецептора Fas может регулироваться другими поверхностными молекулами, в том числе HLA-DR – маркером поздней и / или длительной активации Т-лимфоцитов. Предполагают, что



CD3+HLA-DR+ клетки *in vivo* могут являться частью нормальной иммунорегуляции [12]. В последнее десятилетие исследователи пересмотрели участие CD3+HLA-DR+ Т-лимфоцитов в механизмах поддержания гомеостатического равновесия на периферии. Вероятно, CD3+HLA-DR+ являются зрелыми регуляторными Т-лимфоцитами, обладающими высокой супрессивной активностью [5; 12], которая обеспечивается контактными межклеточными взаимодействиями, в том числе посредством CTLA-4-сигнализации [5].

Выявлено, что CD3+HLA-DR+ клетки, выделенные из периферической крови здоровых доноров, несут на своей поверхности в основном низкомолекулярную изоформу рецептора CD45-CD45RO (до 78 – 88 %) и характеризуются отсутствием молекул недавней TCR-активации в сравнении с HLA-DR-негативными Т-лимфоцитами [12].

Вероятно, высокая экспрессия поверхностных молекул HLA-DR и CD95 может свидетельствовать о конечной фазе дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов [12].

Мы предполагаем, что IL-2-опосредованное повышение содержания CD45RO+CD4+/CD8+HLA-DR+ Т-лимфоцитов в CD62L-негативной субпопуляции, индуцировано пополнением этого пула клеток прекурсорами – CD3+HLA-DR-. Подтверждением этому тезису явилось обнаружение взаимосвязи между содержанием цитотоксических TEM (CD62L-) клеток и CD8+HLA-DR+ лимфоцитов ($r = -0,80$, $p < 0,05$) при действии rIL-2 (1,0 нг/мл).

Увеличение количества CD3+HLA-DR+ цитотоксических лимфоцитов в субпопуляции Т-клеток центральной памяти может быть связано их пролиферацией. Л. Аррувито и др. (2014) показали, что CD8+ Т-клетки пуповинной крови новорожденных и периферической крови взрослых доноров, которые конститутивно экспрессируют молекулу HLA-DR, могут пролиферировать в условиях культивирования *in vitro*, сохраняя свои супрессивные свойства [5].

Мембранная экспрессия молекулы HLA-DR может инициировать один из механизмов реализации апоптотической гибели клеток, в том числе в отношении Т-лимфоцитов, которые могут экспрессировать Fas-антигена. Как отмечалось выше, высокие дозы IL-15 (1,0 нг/мл) могут способствовать развитию аутоиммунных патологий посредством активации пролиферативной активности CD8+ Т-лимфоцитов памяти и усиления их цитотоксических свойств [16]. Таким образом, повышенная мембранная экспрессия молекулы HLA-DR при добавлении нефизиологических концентраций IL-15 может приводить к инициации процесса клеточной гибели, обеспечивая тем самым ограничение иммунного ответа [16].

Таким образом, важно отметить, что поддержание физиологических концентраций γ с-цитокинов играет ключевую роль в сохранении гомеостаза иммунной системы посредством поддержания баланса процессов гомеостатической пролиферации и апоптотической гибели. Так, снижение концентрации IL-2 сопровождается формированием аутоиммунной патологии из-за нарушения функциональной активности Treg [10; 20]. Повышенная продукция цитокинов IL-7 и IL-15 также способствует раз-



виту аутоиммунитета вследствие нарушения механизмов апоптотической гибели. IL-15, в дополнение к антиапоптотическим эффектам, способен индуцировать пролиферативную активность цитотоксических лимфоцитов.

Проведенное исследование позволило установить, что дисбаланс цитокинов инициирует поверхностную экспрессию молекул апоптотической гибели CD95 и поздней активации HLA-DR для ограничения чрезмерной пролиферации лимфоцитов, происходящей без участия антигенного стимула, что необходимо для предотвращения формирования гиперпролиферативных патологий и срыва механизмов иммунной толерантности.

116

Финансирование: Авторы выражают благодарность за финансовую поддержку Программе стратегического академического лидерства «Приоритет-2030» в БФУ им. И. Канта.

Список литературы

1. Сазонова Е. В. Механизмы реализации регуляторного влияния интерлейкина-2 на апоптоз лимфоцитов крови : автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Кемерово, 2010.
2. Юрова К. А., Хазиахматова О. Г., Тодосенко Н. М. и др. Оценка влияния γ -цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) на экспрессию молекул поздней активации и апоптоза (CD95 и HLA-DR) CD4⁺/CD8⁺ Т-лимфоцитами в популяции CD45RA⁺ Т-клеток *in vitro* // Иммунология. 2018. Vol. 39, №1. P. 20–25.
3. Alves N. L., van Leeuwen E. M., Remmerswaal E. B. et al. A new subset of human naive CD8⁺ T cells defined by low expression of IL-7R alpha // J Immunol. 2007. Vol. 179, №1. P. 221–228. doi: 10.4049/jimmunol.179.1.221.
4. Amsen D., Backer R. A., Helbig C. Decisions on the road to memory // Adv Exp Med Biol. 2013. Vol. 785. P. 107–120.
5. Arruaito L., Payaslián F., Baz P. et al. Identification and clinical relevance of naturally occurring human CD8⁺HLA-DR⁺ regulatory T cells // J Immunol. 2014. Vol. 193, №9. P. 4469–4476. doi: 10.4049/jimmunol.1401490.
6. Cai K., Wei R. Interleukin-7 expression in tears and orbital tissues of patients with Graves' ophthalmopathy // Endocrine. 2013. Vol. 44, №1. P. 140–144. doi: 10.1007/s12020-012-9840-7.
7. Castillo E. F., Schluns K. S. Regulating the immune system via IL-15 transpresentation // Cytokine. 2012. Vol. 59, №3. P. 479–490. doi: 10.1016/j.cyt.2012.06.017.
8. Clénet M.-L., Gagnon F., Moratalla A. C. et al. Peripheral human CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes exhibit a memory phenotype and enhanced responses to IL-2, IL-7 and IL-15 // Sci Rep. 2017. Vol. 7. P. 11612.
9. Crawley A. M., Katz T., Parato K. et al. IL-2 receptor gamma chain cytokines differentially regulate human CD8⁺CD127⁺ and CD8⁺CD127⁻ T cell division and susceptibility to apoptosis // Int Immunol. 2009. Vol. 21, №1. P. 29–42. doi: 10.1093/intimm/dxn120.
10. Garg G., Tyler J. R., Yang J. H. et al. Type 1 diabetes-associated IL2RA variation lowers IL-2 signaling and contributes to diminished CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function // J Immunol. 2012. Vol. 188, №9. P. 4644–4653. doi: 10.4049/jimmunol.1100272.



11. Hoyer K. K., Dooms H., Barron L. et al. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease // *Immunol Rev.* 2008. Vol. 226. P. 19–28. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00697.x.
12. Imamichi H., Lempicki R. A., Adelsberger J. W. et al. The CD8+ HLA-DR+ T cells expanded in HIV-1 infection are qualitatively identical to those from healthy controls // *Eur J Immunol.* 2012. Vol. 42, №10. P. 2608–2620. doi: 10.1002/eji.201142046.
13. Kameyama K., Nemoto Y., Kanai T. et al. IL-2 is positively involved in the development of colitogenic CD4+ IL-7R alpha high memory T cells in chronic colitis // *Eur J Immunol.* 2010. Vol. 40, №9. P. 2423–2436. doi: 10.1002/eji.200939764.
14. Kamimura D., Ueda N., Sawa Y. et al. Evidence of a novel IL-2/15R beta-targeted cytokine involved in homeostatic proliferation of memory CD8+ T cells // *J Immunol.* 2004. Vol. 173, №10. P. 6041–6049. doi: 10.4049/jimmunol.173.10.6041.
15. Katzman S. D., Hoyer K. K., Dooms H. et al. Opposing functions of IL-2 and IL-7 in the regulation of immune responses // *Cytokine.* 2011. Vol. 56. P. 116–121. doi: 10.1016/j.cyto.2011.07.005.
16. Lenz D. C., Kurz S. K., Lemmens E. et al. IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4+ T cell memory // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2004. Vol. 101. P. 9357–9362. doi: 10.1073/pnas.0400640101.
17. Managlia E. Z., Landay A., Al-Harhi L. Interleukin-7 signalling is sufficient to phenotypically and functionally prime human CD4 naive T cells // *Immunology.* 2005. Vol. 114, №3. P. 322–335. doi: 10.1111/j.1365-2567.2004.02089.x.
18. McDonald P. W., Read K. A., Baker C. E. et al. Передача сигналов IL-7 подавляет Bcl-6 и программу гена TFH // *Nat Commun.* 2016. Vol. 7. P. 10285.
19. Prlic M., Lefrancois L., Jameson S. C. Multiple Choices: regulation of memory CD8 T cell generation and homeostasis by interleukin (IL)-7 and IL-15 // *J Exp Med.* 2002. Vol. 195, №12. P. F49–52. doi: 10.1084/jem.20020767.
20. Russell S. E., Moore A. C., Fallon P. G. et al. Soluble IL-2R α (sCD25) exacerbates autoimmunity and enhances the development of Th17 responses in mice // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, №10. doi: 10.1371/journal.pone.0047748.
21. Saligrama P. T., Fortner K. A., Secinaro M. A. et al. IL-15 maintains T-cell survival via S-nitrosylation-mediated inhibition of caspase-3 // *Cell Death Differ.* 2014. Vol. 21, №6. P. 904–914. doi: 10.1111/j.1524-475X.2009.00459.x.
22. Schluns K. S., Lefrancois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival // *Nat Rev Immunol.* 2003. Vol. 3, №4. P. 269–279. doi: 10.1038/nri1052.
23. Shenoy A. R., Kirschnek S., Häcker G. IL-15 regulates Bcl-2 family members Bim and Mcl-1 through JAK/STAT and PI3K/AKT pathways in T cells // *Eur J Immunol.* 2014. Vol. 44, №8. P. 2500–2507. doi: 10.1002/eji.201344238.
24. Zambricki E., Shigeoka A., Kishimoto H. et al. Signaling T-cell survival and death by IL-2 and IL-15 // *Am J Transplant.* 2005. Vol. 5, №11. P. 2623–2631. doi: 10.1111/j.1600-6143.2005.01075.x.

Об авторах

Кристина Алексеевна Юрова – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. Центра иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия.

E-mail: kristina_kofanova@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-6146-3330>

Денис Дмитриевич Лигатюк – инженер Центра иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия.



Дарья Александровна Семенова — студент лечебного факультета, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия.

Лариса Сергеевна Литвинова — д-р мед. наук, директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия.

E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0001-5231-6910>

K. A. Yurova¹, D. D. Ligatyuk¹, D. A. Semenova², L. S Litvinova¹

CYTOKINE-INDUCED REGULATION OF MATURATION, DIFFERENTIATION, AND APOPTOTIC DEATH OF IMMUNE MEMORY T-LYMPHOCYTES

¹Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

²Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

Received 19 April 2022

Accepted 05 June 2022

doi: 10.5922/gikbfu-2022-3-7

To cite this article: Yurova K. A., Ligatyuk D. D., Semenova D. A., Litvinova L. S. 2022, Cytokine-induced regulation of maturation, differentiation, and apoptotic death of immune memory T-lymphocytes, *Vestnik of Immanuel Kant Baltic Federal University. Series: Natural and Medical Sciences*, №3. P. 106–119. doi: 10.5922/gikbfu-2022-3-7.

To maintain the normal state of the immune system, the processes of cell proliferation must be strictly regulated and balanced by the processes of apoptotic death to prevent the development of autoimmune and neoplastic reactions. T-lymphocytes of immune memory are under strict control from the immune system.

The role of γ c-cytokines (IL-2, IL-7, and IL-15) in the regulation of maturation, differentiation, and apoptotic death of memory T-lymphocytes under in vitro cultivation conditions was evaluated.

The study revealed the ability of γ c-cytokines to increase the content of CD3+HLA-DR+CD95+ T cells in the effector populations of immune memory cytotoxic lymphocytes, which may indicate the processes of cell differentiation and maturation under the influence of γ c-cytokines.

The authors also showed that in CD3+CD4+CD45RO+ T-lymphocytes have a relative resistance to the action of γ c-cytokines, in comparison with cytotoxic CD45RO+ T-cells.

Thus, maintaining homeostatic concentrations of γ c-cytokines plays an important role in maintaining the normal functioning of the immune system by maintaining the balance of homeostatic proliferation and apoptotic death. We also noted that cytokine imbalance contributes to an increase in the surface expression of late activation molecules (HLA-DR) and apoptosis (CD95), which is necessary to control excessive proliferation of lymphocytes, and, ultimately, prevents the breakdown of immune tolerance mechanisms and the development of hyperproliferative pathologies of the immune system.



Keywords: memory T-lymphocytes, γ c-cytokines, apoptosis, differentiation, maturation

About authors

Kristina A. Yurova – Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher at the Center for Immunology and Cellular Biotechnologies of the IKBFU I. Kant, NTP Factory, Kaliningrad, Russia.

E-mail: kristina_kofanova@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-6146-3330>

Denis D. Ligatyuk – engineer at the Center for Immunology and Cellular Biotechnologies of the IKBFU. I. Kant, NTP Factory, Kaliningrad, Russia.

119

Daria A. Semenova – student of the medical faculty of the Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia.

Larisa S. Litvinova - Doctor of Medical Sciences, Director of the Center for Immunology and Cellular Biotechnologies of the IKBFU I. Kant, NTP Factory, Kaliningrad, Russia.

E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0001-5231-6910>