

УДК 612.014:577.27

ВЛИЯНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА-7 НА СОЗРЕВАНИЕ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

В.А. Шмаров, В.В. Малащенко, А.Г. Гончаров, М.Е. Меняйло

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград

Исследовали прямое влияние интерлейкина-7 (interleukin-7, IL-7) на созревание выделенных Т-лимфоцитов человека. Культивирование Т-клеток с активатором приводило к достоверному снижению числа Т-хелперов эффекторной памяти и увеличению числа клеток более зрелых субпопуляций в сравнении с интактной пробой. Добавление IL-7 к клеткам в активационной модели приводило к истощению пула Т-хелперов центральной памяти, менее дифференцированных по сравнению с Т-хелперами эффекторной памяти, на фоне увеличения числа более зрелых клеток. В гомеостатической модели культивирования IL-7 также снижал число Т-хелперов центральной памяти при увеличении пула терминально дифференцированных Т-клеток. Исходя из того, что аппликация IL-7 приводила к снижению численности менее зрелых клеток при возрастании числа клеток, утративших свой пролиферативный потенциал вследствие терминальной дифференцировки, мы предполагаем роль IL-7 в качестве индуктора созревания в системе покоящихся Т-клеток. Вместе с тем, действие IL-7 на менее дифференцированную субпопуляцию Т-клеток в активационной модели позволяет рассматривать его в качестве акселератора созревания в системе активированных Т-клеток. В обоих используемых моделях созревание Т-лимфоцитов начиналось со стадии клеток центральной памяти.

Ключевые слова: *Т-лимфоцит, интерлейкин-7, созревание, дифференцировка, активация, гомеостатическая пролиферация.*

Введение. Приоритетной задачей физиологии иммунного ответа является исследование цикла функциональных преобразований иммунокомпетентных клеток в ответ на антигенную стимуляцию под влиянием цитокинового окружения. Интерлейкин-7 является лимфопоэтическим фактором роста, основными клеточными мишенями которого являются Т- и В-лимфоциты, а также натуральные киллеры (Ярилин, 2010). Являясь незаменимым фактором выживаемости наивных Т-лимфоцитов, IL-7 поддерживает также

гомеостаз антигенспецифичных Т-клеток памяти, регулирует уровни их апоптоза и гомеостатической пролиферации (Surh, Sprent, 2008). В зависимости от наличия на клеточной мембране Т-хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов молекул CD45RA и CD197 они подразделяются на субпопуляции наивных клеток (N, CD45RA⁺CD197⁺), центральных (CM, CD45RA⁻CD197⁺) и эффекторных (EM, CD45RA⁻CD197⁻) клеток памяти, а также терминально-дифференцированных эффекторных клеток (TEMRA, CD45RA⁺CD197⁻), определяя гетерогенность Т-клеточного пула (Zaph et al., 2006). Дифференцировка Т-лимфоцитов, ассоциированная со степенью зрелости клеток, идет в направлении N→ CM→ EM→ TEMRA (Koch et al., 2008).

В отсутствие антигена, численность периферических Т-лимфоцитов поддерживается сложными механизмами гомеостатической пролиферации, обусловленной действием ИЛ-7, что относится как к наивным, так и к Т-клеткам памяти (Surh, Sprent, 2008). В присутствии антигена, в процессе его распознавания, образуется синаптическое взаимодействие между молекулами мембраны антигенпрезентирующей клетки и Т-лимфоцита. В ключевые события формирования иммунного синапса вовлечены такие структуры Т-клетки, как молекула CD3 (линейный Т-лимфоцитарный антиген), CD2 и CD28 (костимуляторные молекулы) (Ярилин, 2010). CD2/CD3/CD28 – стимуляция индуцирует запуск функциональной активности Т-клетки, на ранних этапах выражающейся в активационных процессах. Вышеописанные условия воспроизведены в эксперименте в гомеостатической и активационной моделях культивирования.

Целью настоящей работы является оценить влияние ИЛ-7 на дифференцировку Т-лимфоцитов, ассоциированную со степенью зрелости клеток, в гомеостатической и активационной моделях.

Методика. В исследование были включены 19 условно здоровых доноров обоих полов в возрасте от 21 до 40 лет. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности (Ficoll-Paque™, GE Healthcare, США). Позитивную селекцию CD3⁺ клеток проводили методом колоночной магнитной сепарации (MS Columns, Miltenyi Biotec, Германия) с использованием частиц MACS MicroBeads, конъюгированных с моноклональными антителами (МКАТ) к молекуле CD3 (CD3 MicroBeads human, Miltenyi Biotec). Подсчет клеток осуществляли на автоматическом счётчике частиц (Z2 COULTER COUNTER, Beckman coulter, США). Для определения чистоты выделенной популяции клетки инкубировали с PE-конъюгированными МКАТ против CD3 (eBioscience, США) и

анализировали на проточном цитофлуориметре BD Accuri[®] C6 Flow Cytometer. В эксперименте использовали клеточные культуры, содержание Т-клеток в которых составляло в среднем $99,0 \pm 0,9\%$.

Выделенные CD3⁺ Т-клетки культивировали в концентрации $1,0-1,5 \times 10^6$ Кл/мл, в 24-луночных планшетах в объеме 1 мл в бессывороточной среде TexMACS (Miltenyi Biotech) с добавлением $5,0 \times 10^{-5}$ М 2-Меркаптоэтанола (Acros Organics, США) в течение 48 часов при 37⁰С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. В эксперименте были использованы различные концентрации (0,01 нг/мл; 0,10 нг/мл; 1,00 нг/мл; 10,00 нг/мл) рекомбинантной формы IL-7 (Human IL-7, research grade, Miltenyi Biotech). В гомеостатической модели варианты культивирования включали в себя интактную пробу (отрицательный контроль – без добавления IL-7) и пробы с добавлением диапазона концентраций IL-7. В активационной модели культивирования использовали Т-клеточный активатор T-Cell Activation/Expansion Kit human (Miltenyi Biotech), который представляет собой антибиотинные частицы MACSiBead[™] с биотинилированными МКАТ против CD2, CD3 и CD28. Варианты культивирования в активационной модели включали в себя интактную пробу (отрицательный контроль), пробу с добавлением активатора (положительный контроль), пробы с добавлением диапазона концентраций IL-7 и активатора.

Иммунофенотипирование CD3⁺ лимфоцитов проводили с использованием блокатора Fc-рецепторов (Miltenyi Biotech) и коктейля МКАТ, конъюгированных с флуоресцентной меткой, приготовленного *ex tempore*: CD4-FITC (eBioscience, США), CD197-PE (BioLegend, США), CD45RA-APC (BD Pharmingen, США).

Внутри общего пула Т-клеток на основании экспрессии/отсутствия экспрессии молекулы CD4 Т-клетки относили к Т-хелперным (Th, CD4⁺) или цитотоксическим Т-лимфоцитам (CTL, CD4⁻). Внутри популяций Th и CTL по уровню экспрессии молекул CD45RA и CD197 клетки относили к субпопуляциям наивных клеток (N, CD45RA⁺CD197⁻), клеток центральной (CM, CD45RA⁻CD197⁺) и эффекторной памяти (EM, CD45RA⁻CD197⁻), а также терминально-дифференцированных эффекторных клеток (TEMRA, CD45RA⁺CD197⁻).

Таким образом, в эксперименте анализировалось влияние диапазона концентраций IL-7 на количество Th и CTL лимфоцитов, процентный состав субпопуляций N, CM, EM и TEMRA в популяциях Th и CTL лимфоцитов.

Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения IBM SPSS Statistics v21 (Statistical Package for the Social Sciences, США). При анализе имеющихся выборок

данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова-Смирнова). Для каждой выборки вычисляли средневыборочные характеристики: медиану (Me), первый и третий квартили (25; 75). Для оценки достоверности различий выборок использовали парный критерий для зависимых выборок Вилкоксона. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Культивирование Т-клеток с активатором приводило к снижению числа Th EM на фоне увеличения количества клеток более зрелых субпопуляций (Th TEMRA, CTL TEMRA) в сравнении с интактной пробой. Внесение диапазона концентраций IL-7 в систему активированных клеток приводило к снижению числа Th CM при одновременном увеличении клеток более зрелых субпопуляций (Th TEMRA, CTL EM) в сравнении положительным контролем (табл. 1).

Таблица 1

Количественный состав основных Т-клеточных субпопуляций в культурах CD3⁺ лимфоцитов в условиях инкубации с IL-7 с использованием активационной модели (Me(Q₁ – Q₃))

Т-клеточная субпопуляция	без активатора	Т-клетки с активатором + IL-7 (нг/мл)				
		0	0,01	0,10	1,00	10,00
Th	59,9 (46,4-63,1)	57,9 (48,5-62,8)	55,5 (47,4-65,5)	54,4 (43,8-66,6)	55,6 (45,2-73,2)	57,8 (46,7-71,3)
Th N	20,6 (12,1-31,6)	24,5 (17,8-43,6)	23,5 (17,9-40,1)	25,0 (19,7-45,1)	25,1 (20,1-44,7)	29,3 (26,3-42,3)
Th CM	33,5 (29,7-50,1)	38,6 (25,3-47,2)	35,5 (23,2-48,4)	29,9** (22,1-45,5)	32,0 (25,0-42,9)	30,0 (25,1-38,9)
Th EM	36,7 (28,3-48,5)	24,5* (14,3-34,5)	22,4 (16,1-42,3)	25,9 (13,8-41,3)	26,3 (14,9-43,5)	25,2 (19,0-32,4)
Th TEMRA	2,1 (1,1-4,1)	4,9* (3,4-8,9)	6,0 (3,6-11,5)	5,9 (4,7-11,5)	6,0** (5,1-10,9)	7,7 (6,7-10,8)
CTL	40,2 (36,9-53,6)	42,2 (37,3-51,6)	44,6 (34,5-52,6)	45,6 (33,5-56,2)	44,4 (26,9-54,8)	42,3 (28,7-53,3)
CTL N	46,4 (36,0-56,6)	39,1 (24,8-51,6)	31,3 (24,9-40,7)	30,2 (27,2-49,2)	35,6 (24,2-47,4)	38,5 (30,9-47,9)
CTL CM	16,6 (3,3-39,2)	12,9 (7,7-28,6)	12,0 (6,3-28,5)	10,8 (6,1-25,4)	12,7 (7,1-20,2)	10,6 (7,1-27,4)
CTL EM	22,1 (13,9-31,4)	25,0 (10,9-38,4)	31,8** (13,0-44,4)	29,0 (12,0-42,5)	32,8** (12,9-40,0)	25,4 (11,5-41,7)
CTL TEMRA	8,7 (5,5-12,1)	12,4* (9,5-20,8)	17,5 (12,6-22,0)	17,0 (10,5-24,5)	18,1 (11,7-24,3)	16,6 (14,2-20,8)

Примечание. * $p < 0,05$ - в сравнении с Т-клетками, культивированными без активирующих частиц; ** $p < 0,05$ - в сравнении с Т-клетками, культивированными с активирующими частицами без IL-7.

Ввиду того, что субпопуляция Th CM является менее зрелой по сравнению с Th EM, истощение ее пула в ответ на действие IL-7 может определять IL-7 в качестве акселератора созревания активированных Th клеток, запуская дифференцировочный процесс в направлении Th CM → Th EM → Th TEMRA. При постоянстве количества Th (CD4⁺) клеток нарастание Th TEMRA (не способных к пролиферации) на фоне

снижения Th CM подтверждает факт IL-7 опосредованного созревания Th. Мы не обнаружили значимого изменения числа Th EM, что можно объяснить одновременно идущими разнонаправленными процессами пополнения (Th CM→Th EM) и истощения пула (Th EM→Th TEMRA) этих клеток.

Таблица 2

Количественный состав основных Т-клеточных субпопуляций в культурах CD3⁺ лимфоцитов в условиях инкубации с IL-7 с использованием гомеостатической модели (Me(Q₁ – Q₃))

Т-клеточная субпопуляция	Т-клетки + IL-7 (нг/мл)				
	0	0,01	0,10	1,00	10,00
Th	68,2 (61,8-73,1)	72,1 (61,1-75,7)	71,7 (60,0-74,5)	69,2 (58,3-75,2)	68,2 (59,2-73,3)
Th N	19,4 (10,6-24,9)	22,5 (12,5-28,4)	22,0 (11,4-28,5)	27,6 (12,5-32,2)	27,6 (12,4-29,4)
Th CM	35,2 (30,0-41,3)	27,7* (24,2-34,1)	28,1 (24,7-41,2)	37,0 (27,8-42,8)	35,9 (20,1-39,0)
Th EM	44,9 (40,9-47,8)	46,1 (41,3-51,5)	43,0 (39,1-53,5)	31,6 (29,6-51,4)	33,8 (26,9-53,7)
Th TEMRA	1,8 (0,6-4,5)	3,5 (1,2-5,5)	3,8 (1,3-6,4)	3,4 (1,3-5,9)	4,6* (3,6-12,9)
CTL	31,8 (26,9-38,2)	27,9 (24,3-39,0)	28,3 (25,5-40,0)	30,8 (24,8-41,7)	31,9 (26,7-40,9)
CTL N	41,2 (23,3-55,6)	43,2 (26,0-54,3)	44,9 (21,9-54,0)	44,8 (24,2-54,0)	41,6 (24,5-52,8)
CTL CM	8,2 (2,7-15,9)	5,6 (5,0-8,5)	6,5 (5,8-7,7)	6,0 (4,6-7,0)	5,0 (3,3-8,1)
CTL EM	37,1 (28,1-44,5)	36,6 (32,1-46,6)	37,3 (30,3-49,7)	35,4 (28,6-47,4)	34,8 (27,0-42,6)
CTL TEMRA	15,2 (11,4-17,7)	13,8 (7,8-20,8)	12,1 (8,9-17,4)	14,6 (11,2-21,1)	18,9* (15,8-24,4)

Примечание. * p<0,05 - в сравнении с Т-клетками, культивированными без IL-7.

Апликация IL-7 в среду с активированными клетками приводила к накоплению менее зрелой субпопуляции CTL EM, тогда как в положительном контроле наблюдалось накопление CTL TEMRA, что может говорить об IL-7 опосредованной дифференцировке более ранних субпопуляций до CTL EM, определяя IL-7 в качестве акселератора созревания также и активированных CTL клеток.

В гомеостатической модели культивирования (табл. 2) IL-7 также снижал число Th CM при повышении количества более зрелых Th TEMRA и CTL TEMRA клеток по сравнению с интактной пробой.

Наличие процесса дифференцировки клеток, ассоциированной с созреванием, в условиях отсутствия активатора говорит о роли IL-7 в качестве индуктора созревания в системе покоящихся Т-клеток. В обеих используемых моделях созревание Т-лимфоцитов начиналось со стадии клеток центральной памяти. IL-7 во всем диапазоне

концентраций поддерживал численность хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов на постоянном уровне (табл. 1, табл. 2), что может быть связано с IL-7 зависимыми гомеостатическими механизмами контроля пролиферации и апоптотической гибели Т-клеток.

Выводы. 1. IL-7 обеспечивает созревание хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов, поддерживая их численность на постоянном уровне.

2. В системе покоящихся Т-клеток IL-7 выступает индуктором созревания, в системе активированных – акселератором.

3. IL-7 опосредованное созревание Т-лимфоцитов обусловлено переходом Т-клеток центральной и эффекторной памяти в более поздние стадии дифференцировки.

Список литературы

- Ярилин А.А.* 2010. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа. 752 с.
- Koch S., Larbi A., Derhovanessian E., Ozelik D., Naumova E., Pawelec G.* 2008. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people // *Immun Ageing*. V. 5. № 6. P. 525-535.
- Surh CD, Sprent J.* 2008. Homeostasis of naive and memory T cells // *Immunity*. V. 29. № 6. P. 848-862.
- Zaph C., Rook K., Goldschmidt M., Mohrs M., Scott Ph., Artis D.* 2006. Persistence and Function of Central and Effector Memory CD4⁺ T Cells following Infection with a Gastrointestinal Helminth // *J. Immunol.* № 177. P. 511-518.

EFFECTS OF INTERLEUKIN-7 ON THE MATURATION OF HUMAN T-LYMPHOCYTES *IN VITRO*

V.A. Shmarov, V.V. Malashchenko, A.G. Goncharov, M.E. Meniailo

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad

We investigated the direct effect of interleukin-7 (IL-7) on the maturation of isolated human T-lymphocytes. Homeostatic model reflects the IL-7-mediated self-maintenance of the T-cell pool under physiological conditions. Activation model mimics the immune synapse formation with signal transmission from antigen-presenting cell to T lymphocyte under antigenic load. Culturing T-cell with activator resulted in a significant reduction in the number of T-helper effector memory cells and increased number of more mature subpopulations as compared to the intact probe. Administering of IL-7 to cells in the activation model resulted in the depletion of the pool of T-helper central memory cells, less differentiated

compared to the T-helper effector memory cells, with increased number of more mature cells. In homeostatic culturing model IL-7 also reduces the number of T-helper central memory cells with an increase of terminally differentiated T-cells pool. Based on the fact that the addition of IL-7 leads to a decrease in the number of less mature cells with an increase in the number of cells that have lost their proliferative potential (as a result of terminal differentiation), we assume the role of IL-7 as maturation inducer for resting T-cells. At the same time, IL-7 effect on less differentiated subpopulation of T-cells in activation model allows us to consider IL-7 as the maturation accelerator for activated T-cells. In both experimental models the maturation of T-lymphocytes began from the stage of central memory cells.

Keywords: *T-cell, interleukin-7, maturation, differentiation, activation, homeostatic proliferation.*

Об авторах:

ШМАРОВ Вячеслав Анатольевич – аспирант Центра медицинских биотехнологий, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта». 236016, Калининград, ул. А. Невского, д.14, e-mail: enant@list.ru

МАЛАЩЕНКО Владимир Владимирович – аспирант Центра медицинских биотехнологий, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта», 236016, Калининград, ул. А. Невского, д.14.

ГОНЧАРОВ Андрей Геннадьевич – кандидат медицинских наук, доцент, старший научный сотрудник Центра медицинских биотехнологий, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта», 236016, Калининград, ул. А. Невского, д.14.

МЕНЯЙЛО Максим Евгеньевич – аспирант Центра медицинских биотехнологий, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта», 236016, Калининград, ул. А. Невского, д.14.

Шмаров В.А.А. Влияние интерлейкина-7 на созревание Т-лимфоцитов человека *in vitro* / В.А. Шмаров, В.В. Малащенко, А.Г. Гончаров, М.Е. Меняйло // Вестн. ТвГУ. Сер.: Биология и экология. 2016. № 4. С. 75-81.