

УДК 612.017.1:57.04

Адоптивный перенос сингенных спленоцитов подавляет иммунный ответ сублетально облученных мышей

А. А. Калинина¹, Л. М. Хромых¹, Д. Б. Казанский¹, А. В. Дейкин^{2,3}, Ю. Ю. Силаева^{2*}¹Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 115478 Россия²Центр коллективного пользования Института биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия³Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Института биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: silaeva@genebiology.ru, yulya.silaeva@gmail.com

Поступила в редакцию 05.11.2020

Принята к печати 20.01.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11252

РЕФЕРАТ Пул периферических Т-лимфоцитов состоит из нескольких функционально различных популяций CD8⁺ клеток. CD44 и CD62L – основные поверхностные маркеры, по которым можно идентифицировать популяции Т-клеток и экспрессия которых зависит от функционального состояния Т-лимфоцита. В условиях лимфопении периферические Т-лимфоциты гомеостатически пролиферируют и приобретают фенотип суррогатных клеток памяти (memory-like, T_{ML}) CD44^{hi}CD62L^{hi}. Однако информация о функциональной активности данных клеток остается противоречивой. Нами изучено влияние адоптивного переноса сингенных спленоцитов на процессы восстановления CD8⁺ Т-клеток сублетально облученных мышей. Показано, что в условиях лимфопении донорские лимфоциты формируют популяцию CD8⁺ Т-клеток с фенотипом CD122⁺CD5⁺CD49d^{hi}CXCR3⁺, который сочетает в себе фенотипические характеристики истинных клеток памяти и супрессорных CD8⁺ Т-клеток. В экспериментах *ex vivo* установлено, что после адоптивного переноса Т-лимфоциты облученных мышей не проявляют функциональной активности истинных эффекторов клеток или клеток памяти, а иммунные ответы на аллоантигены и бактериальные патогены у этих животных оказываются значительно подавленными.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА суррогатная Т-клетка памяти, лимфопения, гомеостатическая пролиферация, CD44, CD62L.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МНС – главный комплекс гистосовместимости; T_{ML} – суррогатные клетки памяти; MLR – смешанная культура лимфоцитов; cpm – импульсы в минуту; АП – адоптивный перенос; ТКР – Т-клеточный рецептор.

ВВЕДЕНИЕ

Пул периферических Т-лимфоцитов состоит из нескольких функционально различающихся популяций CD8⁺ Т-клеток. Основными поверхностными маркерами этих популяций являются CD44 и CD62L, экспрессия которых определяет активационный фенотип и особенности миграции Т-клетки. Молекула CD62L опосредует взаимодействие Т-лимфоцита с клетками венул с высоким эндотелием и его миграцию в лимфоидной системе. CD44, рецептор гиалуроновой кислоты во внеклеточном матриксе, позволяет Т-клетке покидать лимфоидную систему и мигрировать в периферические ткани [1]. Профиль экспрессии этих маркеров зависит от функционального состояния Т-лимфоцита. Наивные Т-клетки имеют фенотип CD62L^{hi}CD44^{lo}; клоны CD8⁺ клеток, активи-

рованные в ходе первичного иммунного ответа, теряют экспрессию CD62L и приобретают фенотип CD62L^{lo}CD44^{hi}. Большинство CD8⁺ эффекторов погибает по завершении иммунного ответа, небольшая их доля формирует пул долгоживущих Т-клеток памяти, способных поддерживать стабильный пул и ускоренно отвечать на специфический антиген.

Долгоживущие CD8⁺ Т-клетки памяти имеют фенотип CD44^{hi}CD62L^{hi}, который, однако, не всегда коррелирует с «антигенным опытом» Т-лимфоцита. Известно, что пул периферических Т-клеток неиммунизированных животных – гнотобионтов содержит виртуальные клетки памяти, специфичные к модельному антигену [2, 3]. В условиях лимфопении периферические Т-клетки гомеостатически пролиферируют и приобретают поверхностный фенотип

клеток памяти $CD44^+CD62L^+$ (T_{ML} , суррогатные клетки памяти) [4–7]. T_{ML} -клетки не способны подавить экспрессию поверхностных активационных молекул и вновь приобрести фенотип наивных клеток [8, 9]. Таким образом, данная популяция фенотипически аналогична истинным клеткам памяти.

Экспериментальные данные о функциональных особенностях T_{ML} -клеток остаются противоречивыми. В ряде работ показано, что адаптивный перенос наивных $CD8^+$ Т-клеток в условиях лимфопении приводит к формированию популяции Т-лимфоцитов с функциональными особенностями истинных клеток памяти [10, 11]. Тем не менее, локализация и профиль экспрессии хемокиновых рецепторов отличают данную популяцию от истинных клеток памяти [12]. Описана популяция T_{ML} -клеток с супрессорной активностью [13]. Кроме того, при лимфопении наблюдается гомеостатическая пролиферация клонов Т-клеток с высокой аффинностью Т-клеточного рецептора к собственным молекулам МНС (потенциально аутореактивных клонов), которые приобретают фенотип клеток памяти [14, 15]. В ряде исследований описана популяция $CD8^+CD44^+CD122^+$ Т-лимфоцитов с супрессорной активностью [13, 16–18].

Эти данные позволяют утверждать, что поверхностный фенотип Т-лимфоцитов не всегда отражает их истинный функциональный статус, и исследуемая популяция может быть ошибочно отнесена к долгоживущим $CD8^+$ Т-клеткам памяти. Мы проанализировали связь между экспрессией поверхностных маркеров $CD44$ и $CD62L$ и функциональными особенностями популяций $CD8^+$ Т-клеток в условиях лимфопении. Оказалось, что адаптивный перенос сингенных лимфоцитов сублетально облученным мышам приводит к подавлению иммунного ответа у этих животных, что может быть, по крайней мере отчасти, обусловлено действием T_{ML} $CD8^+$ Т-клеток с фенотипом $CD122^+CD5^+CD49d^{hi}CXCR3^+$, сформированных из популяции донорских лимфоцитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мыши

Мышей линий C57BL/6 ($K^bI-A^bD^b$), B10.D2(R101) ($K^dI-A^dI-E^dD^b$), FVB ($K^qI-A^qI-E^qD^q$) и C57BL/6-TgN(АСТbEGFP)10sb ($K^bI-A^bD^b$) (далее В6.GFP) получали из разведения вивария Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации. Экспериментальные протоколы одобрены этической комиссией НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина и Института биологии гена РАН (Москва, Россия).

Клеточные линии

Клетки лимфомы EL4 получены из коллекции НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. EL4 прививали внутрибрюшинно (в/б) сингенным мышам C57BL/6 ($3.0-5.0 \times 10^6$ клеток/мышь) и наращивали в асцитной форме в течение 10–14 дней. Опухолевые клетки стерильно отбирали из брюшного асцита и 3 раза отмывали в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7.4) центрифугированием (200 g) при 4°C. Жизнеспособные клетки подсчитывали в смеси трипанового синего и эозина в камере Горяева и использовали для иммунизации мышей.

Бактериальные штаммы и условия культивирования

Вирулентный штамм *Salmonella typhimurium* IE 147 и вирулентный штамм *Listeria monocytogenes* EGD получены из коллекции Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия). Штамм *S. typhimurium* выращивали в среде LB (Amresco, США) в течение ночи при 37°C, затем высевали серийные 10-кратные разведения культуры на SS-agar (Condalab, Испания) и подсчитывали количество колоний по стандартной методике. Штамм *L. monocytogenes* выращивали в среде ВНИ (BD, США) в течение ночи при 37°C в термостатируемом шейкере (Shaker-thermostat ES 20 Biosan, Латвия) при 185 об/мин. Полученную культуру разводили в соотношении 1 : 100 в 200 мл среды ВНИ и инкубировали в термостатируемом шейкере при 37°C и 85 об/мин до достижения оптической плотности культуры (OD_{600}) 1.5–1.8. Титр бактерии (КОЕ/мл) определяли на спектрофотометре ULTROSPEC 10 (General Electric, США). Свежие культуры *S. typhimurium* и *L. monocytogenes* инактивировали нагреванием (1 ч, 60°C и 90 мин, 74°C соответственно) и использовали в *in vitro* экспериментах.

Иммунизация

Мышей линии B10.D2(R101) иммунизировали в/б 2.0×10^7 клеток EL4/мышь. Контрольным неиммунизированным животным вводили PBS. Через 60 дней мышей умерщвляли цервикальной дислокацией, извлекали селезенки и готовили суспензии клеток.

Облучение мышей

Самок мышей линий B10.D2(R101) и C57BL/6 сублетально облучали в дозе 4.5 Гр (терапевтический аппарат «Агат-Р» (Россия), источник γ -излучения Co^{60} с начальной мощностью 1.9×10^{14} Бк). Мышей умерщвляли на 10 день после облучения, и их спленоциты анализировали методом проточной цитофлуориметрии и функциональных тестов *ex vivo*.

Подготовка суспензии клеток

Селезенки гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера с коническим пестиком в PBS при 4°C, спленоциты осаждали центрифугированием (200 g, 5 мин). Эритроциты лизировали в лизирующем буфере (BD Pharmingen, США). Мононуклеары 3 раза промывали PBS центрифугированием при 4°C. Клетки ресуспендировали в PBS для окрашивания моноклональными антителами и адоптивного переноса или в полной ростовой среде для *in vitro* тестов.

Адоптивный перенос

Неиммунизированных мышей линии B10.D2(R101) облучали в дозе 4.5 Гр. Через 24 ч после облучения мышам внутривенно (в/в) вводили 1.5×10^7 спленоцитов неиммунизированных и иммунизированных сингенных животных. Контрольным облученным мышам вводили PBS в качестве плацебо. Через 10 дней после адоптивного переноса спленоциты мышей-реципиентов использовали как респондеры в *in vitro* тестах. Аналогичным образом облучали мышей C57BL/6 и в/в вводили спленоциты неиммунизированных мышей B6.GFP. Через 10 дней после адоптивного переноса спленоциты этих мышей использовали для цитофлуориметрического анализа. На 10 день после адоптивного переноса в селезенке облученных мышей-реципиентов обнаруживали около 5% GFP⁺ клеток (рис. 1).

Смешанная культура лимфоцитов (MLR)

Клетки селезенки мышей FVB (K^qI-A^qI-E^qD^q) и C57BL/6 (K^bI-A^bD^b) использовали в качестве неспецифических и специфических стимуляторов

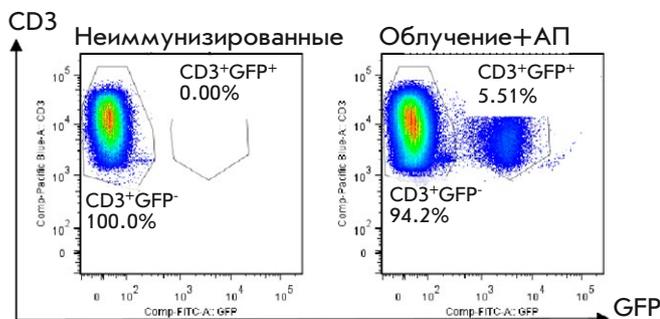


Рис. 1. Относительное количество GFP^{hi} CD3⁺ донорских клеток в селезенке сублетально облученных мышей-реципиентов. Цитофлуориметрический анализ GFP^{hi} CD3⁺ клеток в селезенке мышей-реципиентов линии C57BL/6 на 10 день после адоптивного переноса. Относительное количество GFP^{hi} CD3⁺ (GFP⁺) клеток в селезенке облученных мышей (слева) и облученных мышей после адоптивного переноса спленоцитов сингенных мышей BL6.GFP (справа). Данные представлены для 2.5×10^6 событий. Представлены данные одного из трех независимых репрезентативных экспериментов, три мыши в группе

соответственно. Спленоциты мышей B10.D2(R101) использовали в качестве сингенного контроля. Клетки-стимуляторы обрабатывали митомицином С (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Япония) (25 мкг/мл, 37°C, 30 мин) и 3 раза отмывали PBS центрифугированием (200 g, 5 мин, 4°C). Респондеры (3.0×10^5 клеток/лунку) и стимуляторы (5.0×10^5 клеток/лунку) помещали (3 : 5) в 96-луночные круглодонные планшеты (Corning Costar, Sigma Aldrich, США) и культивировали в 200 мкл среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), обогащенной 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, GE Healthcare, США), 0.01 мг/мл ципрофлоксацина (KRKA, Novo Mesto, Словения), 0.01 М HEPES («ПанЭко») и 10 мМ 2-меркаптоэтанола (Merck, Германия) при 37°C, 5% CO₂ в течение 72 ч. Уровень пролиферации клеток измеряли по включению ³H-тимидина («Изотоп», Россия), который вносили за 8 ч до окончания культивирования. Уровень пролиферативной активности клеток выражали в количестве импульсов в минуту (срм).

Ex vivo иммунный ответ на патогены

5.0×10^5 спленоцитов облученных мышей B10.D2(R101) и облученных мышей B10.D2(R101) через 10 дней после адоптивного переноса сингенных спленоцитов от неиммунизированных мышей помещали в 96-луночные круглодонные планшеты (Corning Costar, Sigma Aldrich) с 10^6 – 10^7 КОЕ/мл прогретых клеток *L. monocytogenes* (штамм EGD) или 10^5 КОЕ/мл прогретых клеток *S. typhimurium* (штамм IE 147), подготовленных как описано выше. Клетки культивировали в 200 мкл среды RPMI-1640 («ПанЭко»), обогащенной как описано выше, при 37°C, 5% CO₂ в течение 72 ч. Для оценки фоновой пролиферации спленоциты культивировали без бактерий. Уровень пролиферации клеток определяли описанным выше образом. Индекс патоген-индуцированной пролиферации вычисляли как соотношение уровня пролиферации клеток в присутствии бактерий к фоновой пролиферации.

Динамика роста и отторжения клеток лимфомы EL4 *in vivo*

Сублетально облученным мышам B10.D2(R101) (с или без адоптивного переноса сингенных спленоцитов) прививали подкожно 0.25 мл суспензии клеток лимфомы EL4 (8.0×10^7 кл/мл). Опухоль измеряли на 7, 14 и 21 день после прививки. Полное отторжение лимфомы EL4 устанавливали по отсутствию подкожных опухолевых узлов при пальпации.

Антитела

В работе использовали моноклональные антитела: анти-CD8α – Перср-Су5.5 (клон 53–6.7, BD

Biosciences, США), анти-CD62L – APC-Cy7 (клон MEL-14, eBioscience, США), анти-CD44 – APC (клон IM7, eBioscience), анти-CD3 – PE-Cy7 (клон 145-2C11, eBioscience), анти-CD122 – PE (клон TM-β1, BD Biosciences), анти-CD49d – PE (R1-2, BD Biosciences), анти-CD5 – BV421 (клон 53-7.3, BD Biosciences) и анти-CXCR3 – BV421 (клон CXCR3-173, BD Biosciences).

Цитофлуориметрический анализ

Пробы клеток (3.0×10^6) инкубировали с блокирующими антителами Fc block (клон 2.4G2, BD Pharmingen, США) (10 мин, 4°C) и окрашивали флуоресцентно меченными антителами (40 мин, 4°C). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Biosciences) в программе FACSDiva 6.0 (BD Bioscience). Мертвые клетки исключали из анализа по параметрам прямого и бокового светорассеяния и по включению пропидий йодида (BD Bioscience) или 7-AAD (BioLegend, США). Минимум 10^6 событий/образец анализировали при характеристике популяций периферических Т-клеток. Данные обрабатывали в программе Flow Jo 7.6 (TreeStar Inc., США).

Статистический анализ

Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Статистический анализ проводили с использованием непарного критерия Стьюдента. Различия признавали значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Адоптивный перенос сингенных спленоцитов подавляет иммунный ответ сублетально облученных мышей

В исследовании влияния адоптивного переноса сингенных спленоцитов на функциональное состояние иммунной системы сублетально облученных мышей в качестве доноров спленоцитов использовали неиммунизированных и иммунизированных животных (рис. 2А,Б). Облучение иммунизированных мышей приводит к незначительному (в 1.6 раза) подавлению специфического иммунного ответа по сравнению с контрольной группой иммунизированных необлученных мышей, при этом уровень неспецифического аллогенного иммунного ответа остается без изменений (рис. 2А). У облученных мышей с адоптивно перенесенными спленоцитами неиммунизированных или иммунизированных животных наблюдалось сильное подавление и специфического, и неспецифического аллогенного иммунного ответа *ex vivo* (рис. 2Б). В соответствии с этими данными, у облученных мышей после адоптивного переноса также

отмечена более длительная динамика отторжения лимфомы EL4 *in vivo* по сравнению со всеми контрольными группами (рис. 3).

Обнаружено также значительное подавление иммунного ответа на *L. monocytogenes* и *S. typhimurium* у сублетально облученных мышей после адоптивного переноса по сравнению с контрольной группой облученных мышей (рис. 2В). Стоит особо отметить, что *ex vivo* иммунный ответ на патогены у облученных мышей без адоптивного переноса не отличался от значений в группе необлученного контроля (рис. 2В).

Фенотипические характеристики CD3⁺CD8⁺ Т-клеток донора и реципиента у сублетально облученных мышей после адоптивного переноса

Мы предположили, что наблюдавшееся подавление иммунного ответа у сублетально облученных мышей после адоптивного переноса сингенных спленоцитов могло быть обусловлено снижением абсолютного количества клеток и относительного количества CD3⁺ Т-лимфоцитов в селезенке этих животных. Для проверки данной гипотезы мы перенесли спленоциты мышей B6.GFP сублетально облученным мышам C57BL/6 и проанализировали отдельно популяции Т-клеток реципиента (GFP⁻) и донора (GFP⁺). Доля GFP⁺-клеток донора в селезенке облученных реципиентов составляла 5% (рис. 1).

Абсолютное количество клеток в селезенке облученных мышей было снижено в 4.9 раза по сравнению с необлученными мышами (рис. 4А). При адоптивном переносе сингенных спленоцитов отмечено увеличение клеточности селезенки в 1.5 раза по сравнению с контрольными облученными мышами ($p \leq 0.01$; рис. 4А).

Сублетальное облучение привело к снижению относительного количества CD3⁺ клеток в селезенке по сравнению с необлученным контролем (рис. 4Б). На 10 день после адоптивного переноса относительное количество GFP⁻ CD3⁺ клеток в селезенке облученных мышей практически достигало уровня CD3⁺ клеток в селезенке необлученных животных (рис. 4Б). Доля CD3⁺ клеток донора (GFP⁺) в 2 раза превышала относительное количество GFP⁻ Т-клеток реципиента в селезенке облученных мышей после адоптивного переноса (рис. 4Б).

Популяция CD8⁺ Т-клеток у облученных мышей и среди лимфоцитов реципиента (GFP) облученных мышей после адоптивного переноса не была изменена по сравнению с необлученным контролем (рис. 4В). Однако популяция донорских (GFP⁺) Т-лимфоцитов в селезенке облученных мышей после адоптивного переноса на 70% состояла из CD8⁺ клеток, что в 1.8 раза превышало относительное количество CD3⁺CD8⁺ клеток реципиента (рис. 4В). Мы предположили, что при адоптивном переносе то-

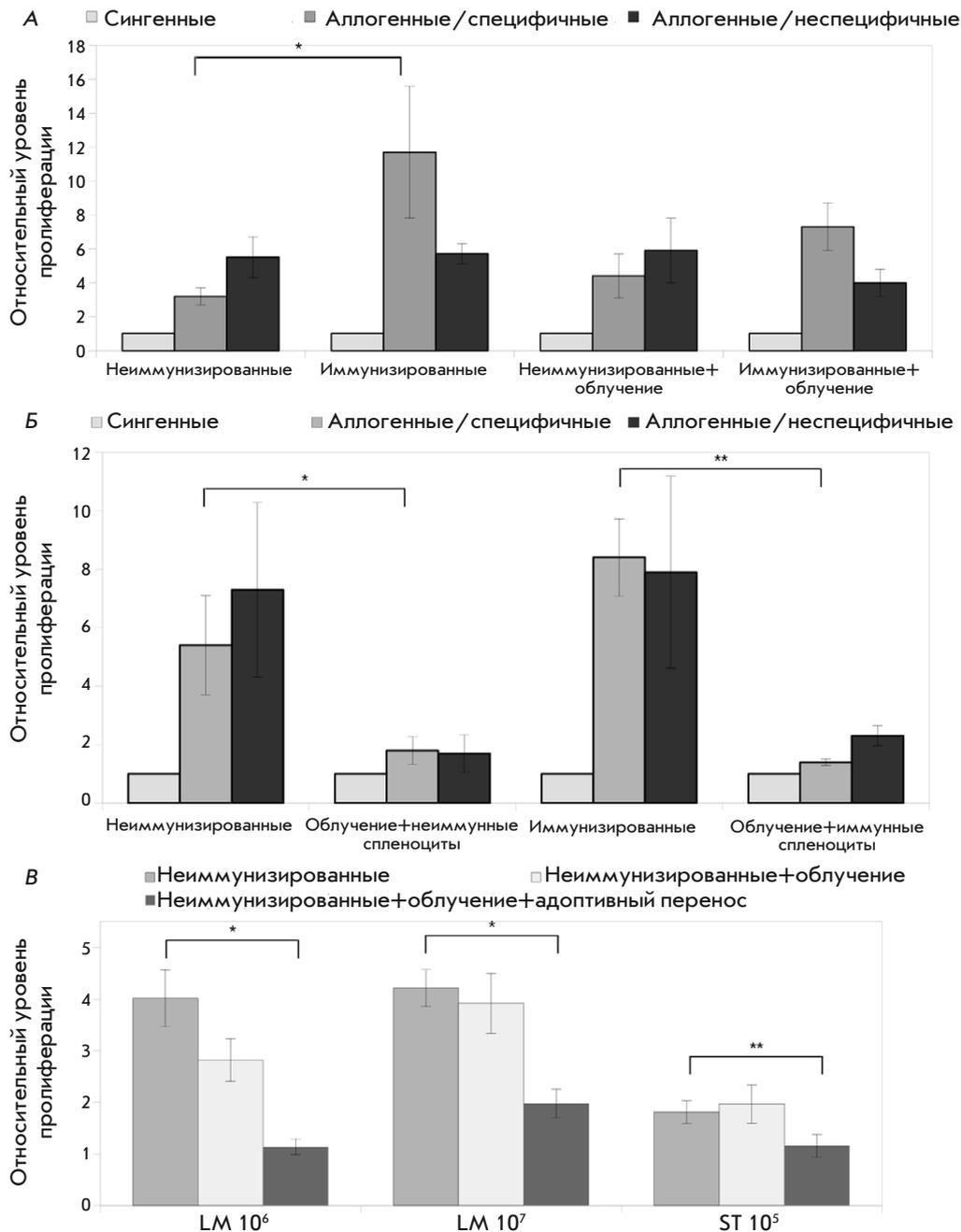


Рис. 2. Анализ функциональной активности *ex vivo* спленоцитов мышей в условиях лимфопении. А – уровень пролиферации *in vitro* спленоцитов сублетально облученных мышей в MLR. Мышей B10.D2(R101) – неиммунизированных (Неиммунизированные облученные) или иммунизированных (Иммунизированные облученные) – сублетально облучали. Через 10 дней спленоциты этих мышей использовали в качестве респондеров в MLR. Спленоциты мышей B10.D2(R101) (KdDb) (Сингенные стимуляторы), C57BL/10 (KbDb) (Аллогенные/специфические стимуляторы) и FVB (H-2q) (Аллогенные/неспецифические стимуляторы), обработанные митомицином С, использовали в качестве стимуляторов. Клетки культивировали *in vitro* в течение 72 ч. Пролиферативную активность спленоцитов оценивали по включению ³H-тимидина, внесенного в культуру за последние 8 ч. Относительный уровень пролиферации определяли как соотношение аллогенного и сингенного ответа. Относительный уровень пролиферации Неиммунизированных необлученных и Иммунизированных необлученных мышей использовали в качестве референсного. Данные получены в трех независимых экспериментах, три мыши в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (**p* ≤ 0.05). Б – уровень пролиферации *in vitro* спленоцитов сублетально облученных мышей после адоптивного переноса. Неиммунизированных мышей B10.D2(R101) облучали сублетально и в/в вводили спленоциты неиммунизированных (Облученные + Неиммунизированные клетки) или иммунизированных

ванных (Облученные + Иммунизированные клетки) сингенных мышей. Через 10 дней после адоптивного переноса спленоциты этих мышей использовали в качестве респондеров в MLR. Спленоциты мышей B10.D2(R101) (KdDb) (Сингенные стимуляторы), C57BL/10 (KbDb) (Аллогенные/специфические стимуляторы) и FVB (H-2q) (Аллогенные/неспецифические стимуляторы), обработанные митомицином С, использовали в качестве стимуляторов. Клетки культивировали *in vitro* в течение 72 ч. Проллиферативную активность спленоцитов оценивали по включению ³H-тимидина, внесенного в культуру за последние 8 ч. Относительный уровень пролиферации определяли как соотношение аллогенного и сингенного ответа. Относительный уровень пролиферации Неиммунизированных необлученных и Иммунизированных необлученных мышей использовали в качестве референсного. Данные получены в трех независимых экспериментах, три мыши в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$). В – уровень патоген-индуцированной пролиферации *in vitro* спленоцитов сублетально облученных мышей после адоптивного переноса. Неиммунизированных мышей B10.D2(R101) сублетально облучали и в/в вводили тотальные спленоциты неиммунизированных сингенных мышей. Через 10 дней после адоптивного переноса спленоциты этих мышей помещали в культуру *in vitro* с 10^6 КОЭ/мл (LM 10^6) или 10^7 КОЭ/мл (LM 10^7) инактивированных прогреванием клеток бактерии *Listeria monocytogenes* (штамм EGD) или с 10^5 КОЭ/мл (ST 10^5) инактивированных прогреванием клеток бактерии *Salmonella typhimurium* (штамм IE 147) на 72 ч. Проллиферативную активность спленоцитов оценивали по включению ³H-тимидина, внесенного в культуру за последние 8 ч. Индекс патоген-индуцированной пролиферации определяли как отношение уровня пролиферации клеток в присутствии бактерии к фоновой пролиферации. Относительный уровень пролиферации Неиммунизированных необлученных и Неиммунизированных облученных мышей B10.D2(R101) использовали в качестве референсного. Данные получены в трех независимых экспериментах, 3–6 мышей в группе

тальных спленоцитов облученному реципиенту вызывают и гомеостатически пролиферируют преимущественно CD8⁺ Т-клетки донора. Это согласуется с результатами ранних работ, в которых показано, что CD8⁺ клетки нуждаются в меньшем наборе стимулов для гомеостатической пролиферации по сравнению с CD4⁺ Т-лимфоцитами [19].

При сублетальном облучении в популяции CD8⁺ Т-клеток реципиента (GFP⁻) снизилось относительное количество наивных клеток и увеличилась доля клеток памяти и эффекторных клеток по сравнению с необлученным контролем (рис. 4Г). Среди донорских (GFP⁺) CD8⁺ Т-лимфоцитов в селезенке облученных мышей после адоптивного переноса 60% клеток имели фенотип клеток памяти (рис. 4Г).

В ряде исследований обнаружены регуляторные CD8⁺CD122⁺ Т-клетки с супрессорной активностью [15]. Мы проанализировали экспрессию маркера CD122 в популяции CD8⁺ Т-лимфоцитов реципиента (GFP⁻) и донора (GFP⁺) в селезенке облученных мышей после адоптивного переноса (рис. 4Д,Е). Более 97% донорских CD8⁺ Т-лимфоцитов приобрели фенотип CD8⁺CD122⁺ (рис. 4Д), при этом относительное количество CD8⁺CD122⁺ Т-клеток среди лимфоцитов реципиента не отличалось от контрольных значений в группах облученных и необлученных мышей (рис. 4Д). Уровень экспрессии CD122 в субпопуляциях клеток памяти (CD44⁺CD62L⁺) и эффекторных клеток (CD44⁺CD62L⁻) среди Т-лимфоцитов донора (GFP⁺) был значимо выше, чем в данных субпопуляциях среди клеток реципиента (GFP⁻) (рис. 4Е).

Для определения потенциально аутореактивных Т-клеток среди донорских лимфоцитов мы проанализировали экспрессию маркера CD5 в популяции CD8⁺CD44⁺ Т-клеток (рис. 5 А,Б,В). Практически все

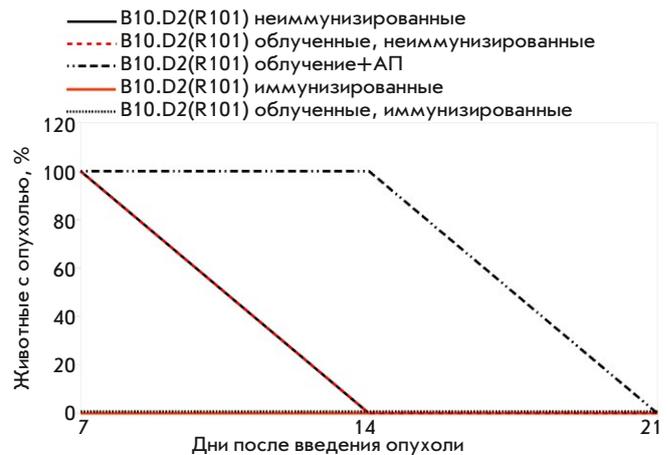


Рис. 3. Динамика отторжения лимфомы EL4 у сублетально облученных мышей B10.D2(R101) после адоптивного переноса. Неиммунизированных мышей B10.D2(R101) сублетально облучали и через 10 дней прививали подкожно 20.0×10^6 клеток EL4. Одновременно с прививкой опухоли проводили адоптивный перенос сингенных спленоцитов. Экспериментальные группы: неиммунизированные необлученные мыши B10.D2(R101) (неиммунизированные), иммунизированные необлученные мыши B10.D2(R101) (иммунизированные), неиммунизированные облученные мыши B10.D2(R101) (неиммунизированные облученные), иммунизированные облученные мыши B10.D2(R101) (иммунизированные облученные) и неиммунизированные облученные мыши с адоптивным переносом B10.D2(R101) (облученные + АП). Представлены данные одного репрезентативного эксперимента, три мыши в группе

GFP⁺ CD8⁺CD44⁺ Т-клетки экспрессировали CD5 (рис. 5А), при этом соотношение CD5⁺/CD5⁻ клеток в популяции CD8⁺CD44⁺ лимфоцитов реципиента (GFP⁻) не было изменено по сравнению со значени-

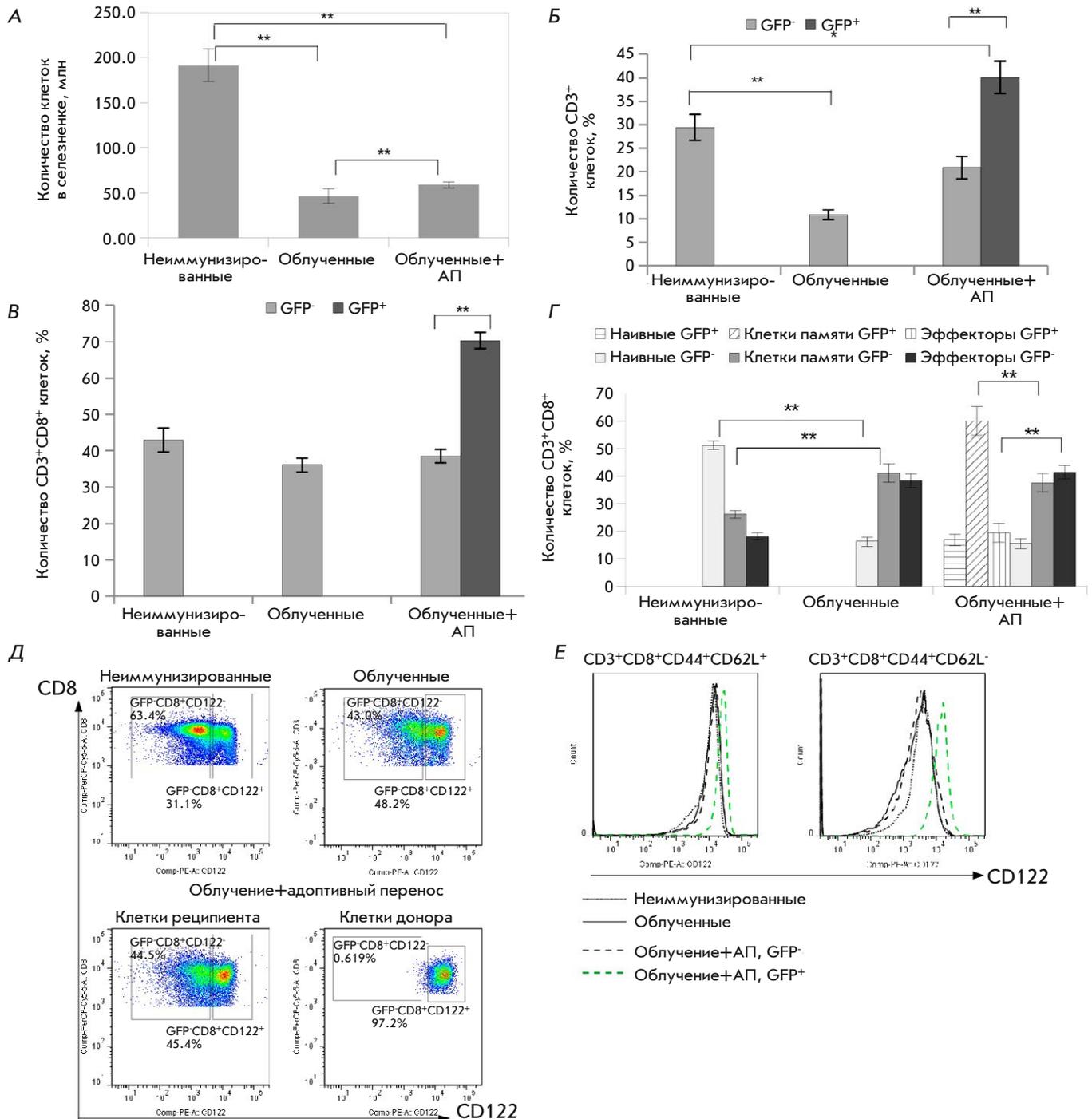


Рис. 4. Абсолютное количество клеток и профиль экспрессии активационных маркеров в популяции CD8⁺ Т-клеток донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻) у сублетально облученных мышей после адоптивного переноса. А – абсолютное количество лейкоцитов в селезенке необлученных мышей (Необлученные мыши), мышей через 10 дней после сублетального облучения (Облученные мыши) и мышей через 10 дней после сублетального облучения и адоптивного переноса (Облученные мыши + АП). Данные получены в трех независимых экспериментах, 6–9 мышей в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$). Б – относительное количество CD3⁺ клеток в селезенке необлученных мышей (Необлученные мыши), мышей через 10 дней после сублетального облучения (Облученные мыши) и мышей через 10 дней после сублетального облучения и адоптивного переноса (Облученные мыши + АП). Данные получены в трех независимых экспериментах, 4–6 мышей в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$). В – относительное количество CD3⁺CD8⁺ клеток в селезенке необлученных мышей (Не-

облученные мыши), мышей через 10 дней после сублетального облучения (Облученные мыши) и мышей через 10 дней после сублетального облучения и адоптивного переноса (Облученные мыши + АП). Данные получены в трех независимых экспериментах, 4–6 мышей в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (** $p \leq 0.01$). Г – относительное количество CD8⁺ Т-клеток с фенотипом наивных клеток (Naive, CD44⁺CD62L⁺), эффекторных клеток памяти (EM, CD44⁺CD62L⁻) и центральных клеток памяти (CM, CD44⁺CD62L⁺) в селезенке необлученных мышей (Необлученные мыши), мышей через 10 дней после сублетального облучения (Облученные мыши) и мышей через 10 дней после сублетального облучения и адоптивного переноса (Облученные мыши + АП). Данные получены в трех независимых экспериментах, шесть мышей в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (** $p \leq 0.01$). Д – относительное количество CD8⁺CD122⁺ Т-клеток в селезенке необлученных мышей (верхняя левая панель), мышей через 10 дней после сублетального облучения (верхняя правая панель) и мышей через 10 дней после сублетального облучения и адоптивного переноса (популяция лимфоцитов донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)) (нижние панели). Представлены данные одного репрезентативного эксперимента. Данные получены в трех независимых экспериментах, шесть мышей в группе. Е – уровень экспрессии CD122 в популяции CD8⁺CD44⁺CD62L⁺ клеток (левая панель) и CD8⁺CD44⁺CD62L⁻ клеток (правая панель) в селезенке необлученных мышей (Необлученные мыши), мышей через 10 дней после сублетального облучения (Облученные мыши) и мышей через 10 дней после сублетального облучения и адоптивного переноса (Облученные мыши + АП; популяция лимфоцитов донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)). Данные получены в трех независимых экспериментах, шесть мышей в группе. Представлены данные одного репрезентативного окрашивания

ями в группах облученных и необлученных мышей (рис. 5А,Б). Уровень экспрессии CD5 в субпопуляции CD44⁺CD62L⁺ клеток был сопоставимым во всех экспериментальных группах (рис. 5В).

В отдельных работах обнаружены супрессорные функции CD8⁺CD122⁺CD49d^{low} Т-клеток [18]. Мы оценили экспрессию маркера CD49d в популяции CD8⁺CD44⁺ Т-клеток реципиента (GFP⁻) и донора (GFP⁺) в селезенке облученных мышей после адоптивного переноса (рис. 5Г,Д,Е). Практически 100% донорских CD8⁺CD44⁺ лимфоцитов приобрели фенотип CD49d^{hi} (рис. 5Г,Д), при этом соотношение CD49d^{low}/CD49d^{hi} клеток среди CD8⁺CD44⁺ лимфоцитов реципиента было таким же, как в этой популяции Т-клеток облученных и необлученных мышей (рис. 5Г,Д). Выявлено значительное повышение уровня экспрессии данного маркера в субпопуляции CD44⁺CD62L⁺ донорских GFP⁺CD8⁺ Т-клеток (рис. 5Е).

Кроме того, более 85% донорских CD8⁺CD44⁺ Т-клеток имели фенотип CXCR3⁺ (рис. 5Ж,З). Уровень экспрессии CXCR3 в субпопуляции CD44⁺CD62L⁺ был сопоставимым во всех экспериментальных группах, а в субпопуляции донорских CD44⁺CD62L⁻ Т-клеток он соответствовал значениям в группе необлученных животных (рис. 5И).

Таким образом, при адоптивном переносе сингенных спленоцитов реципиенту с лимфопенией наблюдается преимущественная гомеостатическая пролиферация CD8⁺ клеток донора, большая часть которых приобретает фенотип клеток памяти CD44⁺CD62L⁺, при этом большинство донорских CD44⁺ Т-клеток имеет фенотип CD122⁺CD5⁺CD49d^{hi}CXCR3⁺.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования последних лет показали, что нет строгой корреляции между поверхностным фено-

типом и функциональными свойствами Т-клетки памяти (способность к длительному самоподдержанию, устойчивость к апоптозу, упрощенные условия активации, усиленная пролиферация и приобретение эффекторных функций в ответ на специфический антиген). Известно, что популяция CD8⁺CD44⁺CD62L⁺CD122⁺ клеток может проявлять иммуносупрессорные свойства [13, 16–18, 20]. Для этой популяции характерны высокий уровень экспрессии рецептора хемокинов CXCR3 [17] и низкий – молекулы CD49d (CD8⁺CD122⁺CD49d^{low}) [18]. Аналогичные популяции супрессорных CD8⁺ Т-клеток обнаружены у человека [21].

Мы показали, что адоптивный перенос сингенных лимфоцитов облученным мышам приводит к подавлению иммунного ответа на аллоантигены и бактериальные патогены. Данный эффект может быть обусловлен гомеостатической пролиферацией клонов Т-клеток, отличных от клонотипов, вовлеченных в эти иммунные ответы. Это подтверждается тем, что сниженный ответ *ex vivo* на аллоантигены наблюдался у Т-лимфоцитов облученных мышей независимо от адоптивного переноса спленоцитов неиммунизированных или иммунизированных мышей (рис. 2Б).

Лимфопения может индуцировать гомеостатическую пролиферацию потенциально аутореактивных клонов. Стоит особо отметить, что в наших исследованиях практически все донорские CD8⁺CD44⁺ Т-клетки экспрессировали маркер CD5. В ряде работ показано, что уровень экспрессии CD5 коррелирует с аффинностью Т-клеточного рецептора (ТКР) к собственными МНС/пептидным комплексам [22–24]. Взаимодействие Т-клеток с собственными МНС необходимо для их пролиферации в условиях лимфопении [25, 26], и Т-лимфоциты с самым высоким уровнем экспрессии CD5 (т.е., наивные Т-клетки) об-

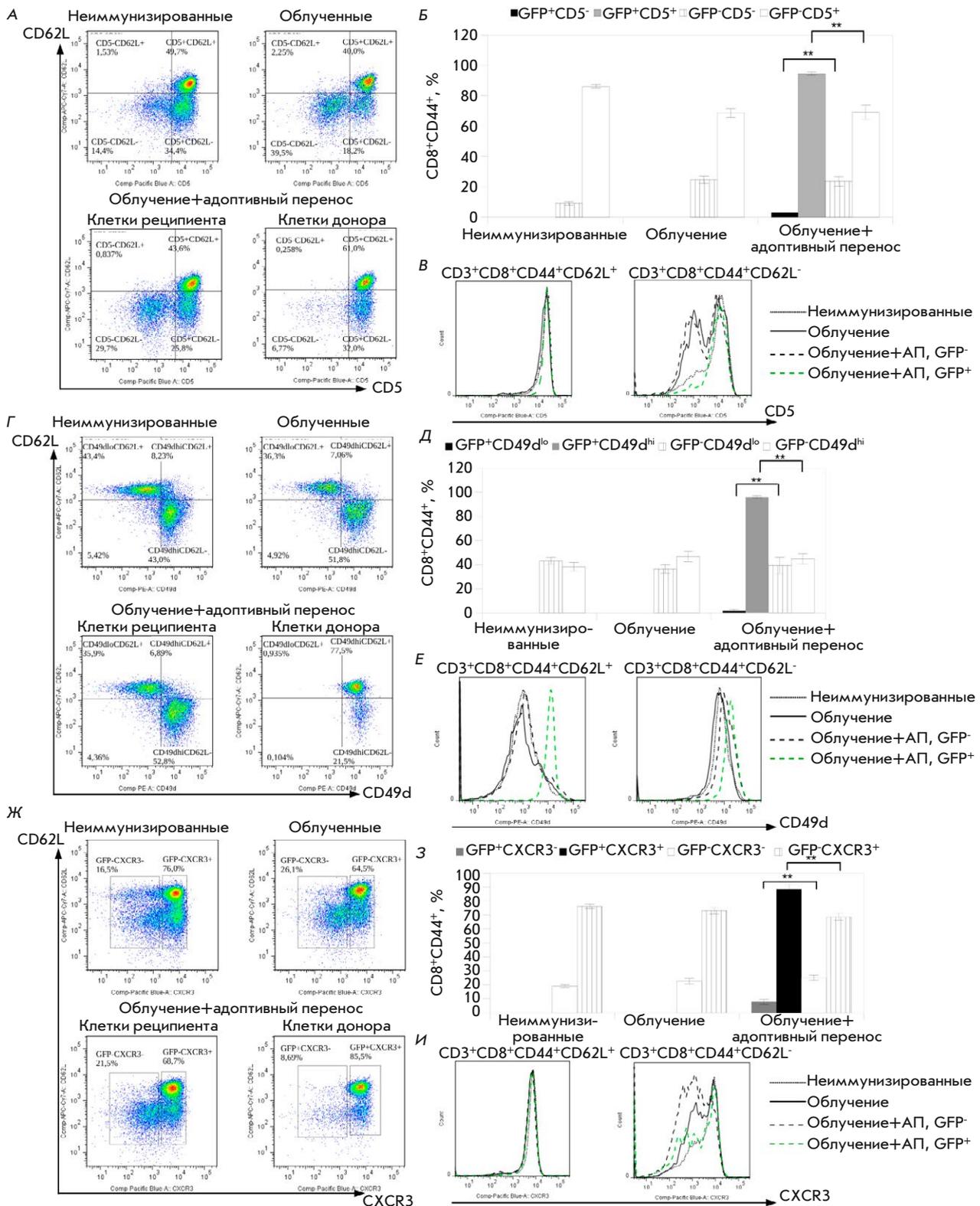


Рис. 5. Относительное количество и профиль экспрессии маркеров CD49d, CD5 и CXCR3 в популяции CD8⁺CD44⁺ Т-клеток селезенки необлученных мышей (Необлученные мыши), мышей через 10 дней после сублетального облучения (Облученные мыши) и мышей через 10 дней после сублетального облучения и адоптивного переноса (Облученные мыши + АП). А – профиль экспрессии CD5 в популяции CD8⁺CD44⁺ Т-клеток селезенки Необлученных мышей (верхняя левая панель), Облученных мышей (верхняя правая панель) и Облученных мышей + АП (среди лимфоцитов донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)) (нижние панели). Представлены данные одного

репрезентативного окрашивания. Данные получены в трех независимых экспериментах, 4–6 мышей в группе. *Б* – относительное количество CD8⁺CD44⁺ Т-клеток с фенотипов CD5^{low} и CD5^{hi} в селезенке Необлученных мышей, Облученных мышей и Облученных мышей + АП (клетки донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)). Данные получены в трех независимых экспериментах, 4–6 мышей в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (***p* ≤ 0.01). *В* – профиль экспрессии CD5 в популяции CD8⁺CD44⁺CD62L⁺ (слева) и CD8⁺CD44⁺CD62L⁻ (справа) Т-клеток селезенки Необлученных мышей, Облученных мышей и Облученных мышей + АП (клетки донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)). Данные получены в трех независимых экспериментах, 4–6 мышей в группе. Представлены данные одного репрезентативного окрашивания. *Г* – профиль экспрессии CD49d в популяции CD8⁺CD44⁺ Т-клеток селезенки Необлученных мышей (левая верхняя панель), Облученных мышей (верхняя правая панель) и Облученных мышей + АП (клетки донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)) (нижние панели). Представлены данные одного репрезентативного окрашивания. Данные получены в трех независимых экспериментах, 5–6 мышей в группе. *Д* – относительное количество CD8⁺CD44⁺ Т-клеток с фенотипом CD49d⁻ и CD49d⁺ в селезенке Необлученных мышей, Облученных мышей и Облученных мышей + АП (клетки донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)). Данные получены в трех независимых экспериментах, 5–6 мышей в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (***p* ≤ 0.01). *Е* – профиль экспрессии CD49d в популяции CD8⁺CD44⁺CD62L⁺ (слева) и CD8⁺CD44⁺CD62L⁻ (справа) Т-клеток селезенки Необлученных мышей, Облученных мышей и Облученных мышей + АП (клетки донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)). Данные получены в трех независимых экспериментах, 5–6 мышей в группе. Представлены данные одного репрезентативного окрашивания. *Ж* – профиль экспрессии CXCR3 в популяции CD8⁺CD44⁺ Т-клеток селезенки Необлученных мышей, Облученных мышей и Облученных мышей + АП (клетки донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)). Представлены данные одного репрезентативного окрашивания. Данные получены в трех независимых экспериментах, шесть мышей в группе. *З* – относительное количество CD8⁺CD44⁺ Т-клеток с фенотипом CXCR3⁻ и CXCR3⁺ в селезенке Необлученных мышей, Облученных мышей и Облученных мышей + АП (клетки донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)). Данные получены в трех независимых экспериментах, шесть мышей в группе. Для статистического анализа использовали непарный критерий Стьюдента (***p* ≤ 0.01). *И* – профиль экспрессии CXCR3 в популяции CD8⁺CD44⁺CD62L⁺ (слева) и CD8⁺CD44⁺CD62L⁻ (справа) Т-клеток селезенки Необлученных мышей, Облученных мышей и Облученных мышей + АП (клетки донора (GFP⁺) и реципиента (GFP⁻)). Данные получены в трех независимых экспериментах, шесть мышей на группу. Представлены данные одного репрезентативного окрашивания

ладают наибольшим потенциалом гомеостатической пролиферации [3]. Таким образом, наивные Т-клетки могут служить основным источником суррогатных клеток памяти (T_{ML}) при лимфопении [15, 27]. В соответствии с этими данными, в нашем исследовании наблюдалось повышенное относительное количество донорских CD8⁺CD44⁺CD62L⁺CD5⁺ Т-клеток, в 1.5 раза превышающее это значение во всех контрольных группах (рис. 5А,Б).

Наивные Т-лимфоциты обладают высокой радиочувствительностью [28], и полное облучение организма может сократить пул данных клеток (рис. 4Г). Поэтому мы предполагаем, что в условиях лимфопении в отсутствие конкуренции за собственные МНС/пептидные комплексы адаптивно перенесенные донорские наивные Т-клетки быстро получают тонические сигналы для пролиферации [29, 30] и приобретают фенотип центральных клеток памяти (рис. 4Г). Таким образом, в условиях лимфопении приобретение Т-лимфоцитом фенотипа клеток памяти может быть следствием взаимодействия ТКР с МНС/пептидными комплексами и гомеостатической пролиферации, а не отображением истинного антигенного опыта этого Т-лимфоцита. Так, ранее мы показали, что у мышей, трансгенных по β-цепи ТКР, Т-лимфоциты, несущие трансгенную β-цепь ТКР, преимущественно имеют фенотип наивных клеток из-за значительной конкуренции за взаимо-

действие с собственными комплексами МНС/пептид, а Т-клетки с эндогенными β-цепями ТКР обладают фенотипом эффекторов и клеток памяти вследствие избытка лигандов, доступных для распознавания [31].

Интересно, что в реципиенте с лимфопенией донорские CD8⁺ Т-клетки приобретают фенотип, значительно отличающийся от фенотипа CD8⁺ лимфоцитов хозяина. CD8⁺ Т-клетки составляют 70% донорских CD3⁺ лимфоцитов и имеют преимущественно фенотип центральных клеток памяти CD44⁺CD62L⁺. Кроме того, практически все CD8⁺ лимфоциты донора являются CD49d^{hi} и экспрессируют CD122. При этом уровень экспрессии этих маркеров в популяции донорских CD44⁺CD62L⁺ клеток значительно превышает значения в соответствующей популяции CD8⁺ лимфоцитов реципиента.

Таким образом, нами показано, что при гомеостатической пролиферации в облученном организме донорские CD8⁺ Т-клетки приобретают фенотип CD44⁺CD62L⁺ CD122⁺CD49d^{hi}, который сочетает фенотипические характеристики истинных клеток памяти (CD44⁺CD62L⁺CD49d^{hi}) и супрессорных CD8⁺ Т-лимфоцитов (CD44⁺CD62L⁺CD122⁺) [18]. Более того, донорские Т-клетки также экспрессируют рецептор хемокинов CXCR3 – еще один маркер супрессорных CD8⁺CD122⁺ клеток [17]. Учитывая полученные данные, мы предполагаем, что в условиях лимфопении при адаптивном переносе сингенных лимфоцитов мо-

жет формироваться уникальная популяция донорских CD8⁺ клеток с супрессорной активностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе получено новое подтверждение того, что экспрессия CD44 на поверхности Т-клеток не всегда отображает их истинный антигенный опыт и не обязательно приводит к приобретению функциональных свойств истинных Т-клеток памяти. Следовательно, некорректно идентифицировать популяцию CD8⁺ клеток памяти исключительно по их поверхностному фенотипу без проведения подтверждающих функциональных тестов. В данной работе при адоптивном переносе сингенных лимфоцитов в облученный организм с лимфопенией происходила конверсия донорских CD8⁺ Т-клеток в T_{ML}-клетки, которые сочетали фенотипические характеристики истинных клеток памяти и супрессорных CD8⁺ Т-лимфоцитов. При этом наблюдалось значительное ухудшение функционального состояния иммунной системы реципиента, Т-лимфоциты которого слабо отвечали на аллоантигены и бактериальные антигены. Показано, что в организме человека существуют T_{ML} CD8⁺ Т-клетки [32] и супрессорные CD8⁺CD44⁺CXCR3⁺ Т-лимфоциты

[17]. Таким образом, проведение адоптивного переноса с целью восстановления клеточности периферических лимфоидных органов может иметь клинически неблагоприятный побочный эффект – повышение предрасположенности или чувствительности к инфекционным заболеваниям вследствие ухудшения иммунного ответа на антигены. ●

Данное исследование проведено при финансовой поддержке Мегагранта (договор № 14.W03.31.0020 между Министерством науки и высшего образования Российской Федерации и Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Институт биологии гена» Российской академии наук). Работу проводили с использованием оборудования Центра коллективного пользования ФГБУН ИБГ РАН при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Авторы выражают благодарность Нестеренко Л.М. и Ермолаевой С.А. (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва) за предоставление вирулентных штаммов сальмонеллы и листерии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhang Q., Lakkis F.G. // Front. Immunol. 2015. V. 5. P. 504–509.
- Haluszcak C., Akue A.D., Hamilton S.E., Johnson L.D.S., Pujanauski L., Teodorovic L., Jameson S.C., Kiedl R.M. // J. Exp. Med. 2009. V. 206. № 2. P. 435–448.
- White J.T., Cross E.W., Kiedl R.M. // Nat. Rev. Immunol. 2017. V. 17. № 6. P. 391–400.
- Cho B.K., Rao V.P., Ge Q., Eisen H.N., Chen J. // J. Exp. Med. 2000. V. 192. P. 549–556.
- Goldrath A.W., Bogatzki L.Y., Bevan M.J. // J. Exp. Med. 2000. V. 192. P. 557–564.
- Murali-Krishna K., Ahmed R. // J. Immunol. Baltim. Md. 1950. 2000. V. 165. P. 1733–1737.
- Jameson S.C., Lee Y.J., Hogquist K.A. // Adv. Immunol. 2015. P. 173–213.
- Ge Q., Hu H., Eisen H.N., Chen J. // Microbes Infect. 2002. V. 4. P. 555–558.
- Tanchot C., Le Campion A., Martin B., Léaument S., Dautigny N., Lucas B. // J. Immunol. Baltim. Md. 1950. 2002. V. 168. P. 5042–5046.
- Moxham V.F., Karegli J., Phillips R.E., Brown K.L., Tapmeier T.T., Hangartner R., Sacks S.H., Wong W. // J. Immunol. Baltim. Md. 1950. 2008. V. 180. P. 3910–3918.
- Oghumu S., Terrazas C.A., Varikuti S., Kimble J., Vadia S., Yu L., Seveau S., Satoskar A.R. // FASEB J. 2015. V. 29. P. 1019–1028.
- Cheung K.P., Yang E., Goldrath A.W. // J. Immunol. 2009. V. 183. P. 3364–3372.
- Wang L.-X., Li Y., Yang G., Pang P., Haley D., Walker E.B., Urba W.J., Hu H.-M. // Eur. J. Immunol. 2010. V. 40. P. 1375–1385.
- Le Campion A., Gagnerault M.-C., Auffray C., Becourt C., Poitrasson-Riviere M., Lallemand E., Bienvenu B., Martin B., Lepault F., Lucas B. // Blood. 2009. V. 114. P. 1784–1793.
- White J.T., Cross E.W., Burchill M.A., Danhorn T., McCarter M.D., Rosen H.R., O'Connor B., Kiedl R.M. // Nat. Commun. 2016. V. 7. P. 11291.
- Suzuki H., Shi Z., Okuno Y., Isobe K. // Hum. Immunol. 2008. V. 69. P. 751–754.
- Liu J., Chen D., Nie G.D., Dai Z. // Front. Immunol. 2015. V. 6. P. 494.
- Akanea K., Kojimab S., Mak T.W., Shikud H., Suzuki H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. № 9. P. 2460–2465.
- Hickman S.P., Turka L.A. // Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci. 2005. V. 360. № 1461. P. 1713–1721.
- Wan N., Dai H., Wang T., Moore Y., Zheng X.X., Dai Z. // J. Immunol. 2008. V. 180. № 1. P. 113–121.
- Shi Z., Okuno Y., Rifa'i M., Endharti A.T., Akane K., Isobe K., Suzuki H. // Eur. J. Immunol. 2009. V. 39. № 8. P. 2106–2119.
- Mandl J.N., Monteiro J.P., Vriscenko N., Germain R.N. // Immunity. 2013. V. 38. P. 263–274.
- Persaud S.P., Parker C.R., Lo W.L., Weber K.S., Allen P.M. // Nat. Immunol. 2014. V. 15. P. 266–274.
- Fulton R.B., Hamilton S.E., Xing Y., Best J.A., Goldrath A.W., Hogquist K.A., Jameson S.C. // Nat. Immunol. 2015. V. 16. № 1. P. 107–117.
- Goldrath A.W., Bevan M.J. // Immunity. 1999. V. 11. P. 183–190.
- Kieper W.C., Jameson S.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 13306–13311.
- Sosinowski T., White J.T., Cross E.W., Haluszcak C., Marrack P., Gapin L., Kiedl R.M. // J. Immunol. 2013. V. 190. P. 1936–1947.
- Yao Z., Jones J., Kohrt H., Strober S. // J. Immunol. 2011. V. 187. P. 4100–4108.
- Cho J.H., Kim H.O., Surh C.D., Sprent J. // Immunity. 2010. V. 32. P. 214–226.
- Takada K., Jameson S.C. // J. Exp. Med. 2009. V. 206. P. 2253–2269.
- Силаева Ю.Ю., Калинина А.А., Вагида М.С., Хромых Л.М., Дейкин А.В., Ермолаевич Т.Г., Садчикова Е.Р., Гольдман И.Л., Казанский Д.Б. // Биохимия. 2013. Т. 78. № 5. С. 714–726.
- van Kaer L. // Eur. J. Immunol. 2015. V. 45. P. 1916–1920.