

## ПРИМЕНЕНИЕ МОДЕЛЕЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С ИНТЕРЛЕЙКИНОМ-7 *IN VITRO* ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ

© 2019 г. В. А. Шмаров\*, А. Г. Гончаров

\*E-mail: enant@list.ru

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»,  
Минобрнауки России, Калининград, Россия

Поступила: 25.07.2019. Принята: 28.08.2019

В настоящее время исследования по изучению действия цитокинов на функциональную активность иммунокомпетентных клеток вызывают большой научный интерес. Наиболее показательным является использование различных моделей культивирования клеток иммунной системы. В данной работе описываются две клеточных модели, используемые для изучения прямого влияния интерлейкина-7 на функциональные свойства Т-лимфоцитов. Интерлейкин-7 (IL-7) участвует в основных этапах жизненного цикла Т-клетки: проведение необходимых для выживания сигналов, дифференцировка, пролиферативная активность, защита от апоптотической гибели, гомеостатическое поддержание численности Т-лимфоцитов. Направленность и выраженность эффектов IL-7 оценивали на предложенных гомеостатической и активационной Т-клеточных моделях *in vitro*.

**Ключевые слова:** Т-лимфоциты, интерлейкин-7, инкубация, проточная цитометрия

DOI: 10.31857/S102872210007087-0

Адрес: 236016 Калининград, ул. А. Невского, д. 14, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Центр медицинских биотехнологий. Шмаров Вячеслав Анатольевич. Тел. 89850800243 (моб.).

E-mail: enant@list.ru

Авторы:

**Шмаров В. А.**, младший научный сотрудник Центра медицинских биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Минобрнауки России, Калининград, Россия;

**Гончаров А. Г.**, к. м. н., заместитель директора медицинского института по научной работе, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Минобрнауки России, Калининград, Россия.

Исследования по изучению действия цитокинов на различные компоненты иммунной системы вызывают большой научный интерес. Использование культуральных моделей для оценки функциональной активности иммунокомпетентных клеток является наиболее показательным. Активация и пролиферация Т-лимфоцитов, их дифференцировка во многом определяют силу и направленность иммунного ответа. IL-7 стимулирует лимфопоэз, является ключевым цитокином, поддерживающим гомеостатиче-

скую пролиферацию лимфоцитов, в том числе и Т-клеток памяти, обеспечивает своевременное восполнение Т-клеточного пула тремя способами: тимопоэз, гомеостатическая пролиферация, антиапоптотический эффект [2]. IL-7 играет критическую роль в гомеостазе периферических Т-клеток, является незаменимым фактором выживаемости наивных Т-лимфоцитов. IL-7 способен выступать в качестве цитокинового костимулятора при антигенной (особенно субпороговой) стимуляции Т-лимфоцитов, обеспечивая, таким образом, их рост, а также синтез и секрецию ими цитокинов. IL-7 поддерживает баланс между процессами апоптоза и пролиферации тимоцитов, наивных Т-лимфоцитов и клеток памяти [3, 4]. В зависимости от экспрессии молекул CD45RA и CD197, хелперные и цитотоксические Т-лимфоциты подразделяются на наивные (N), клетки центральной памяти (CM), клетки эффекторной памяти (EM), а также терминально-дифференцированные эффекторы (TEMRA). Дифференцировку Т-клеток от более ранних к более поздним стадиям зрелости можно обозначить следующим образом: N→CM→EM→TEMRA [1].

**Цель работы** – исследовать действие ИЛ-7 на функциональную активность Т-лимфоцитов человека *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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. 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). 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.

Гомеостатическая и активационная модели культивирования *in vitro* основаны на использовании монокультур CD3<sup>+</sup> клеток, выделенных методом позитивной магнитной колоночной сепарации из мононуклеарных клеток цельной крови у 42 условно здоровых доноров. CD3<sup>+</sup> клетки были распределены по 1,0–1,5 × 10<sup>6</sup> клеток/мл на лунку 24-луночного планшета вместе с бессывороточной средой. В активационной модели культивирования использовали микросферы, конъюгированные с анти-CD2/CD3/CD28 антителами, имитирующие действие антигенпрезентирующих клеток. Рекомбинантный ИЛ-7 добавляли в концентрации 10 нг/мл. Инкубация проводилась во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>, при 37 °С в течение 48 часов. Оценку функциональной активности различных популяций Т-клеток и степени дифференцировки проводили на проточном цитофлуориметре – определяли количество CD4<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD197<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> клеток. Анализ этих маркеров на Т-клетках позволяет отнести их к хелперной или цитотоксической популяции, четко различать их по функциональным признакам, они отражают степень их зрелости, способность к миграции во вторичные лимфоидные органы. CD25<sup>+</sup> молекула представляет собой α-цепь рецептора ИЛ-2 и является общепринятым маркером лимфоидной активации,

ассоциированной с ИЛ-2-зависимой пролиферацией лимфоцитов [4]. Статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для зависимых выборок. Чистота и жизнеспособность монокультуры CD3<sup>+</sup> клеток была на уровне 95%, что подтверждает правильность выбора данной модели культивирования клеток.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Добавление к Т-клеткам ИЛ-7 в гомеостатической модели приводило к достоверному увеличению количества CD25<sup>+</sup> клеток, как среди хелперных, так и среди цитотоксических Т-лимфоцитов. Наблюдаемый прирост CD25<sup>+</sup> клеток в обеих популяциях почти всецело обеспечивали Т-клетки эффекторной памяти. Полученные данные указывают на вовлеченность ИЛ-7 в прямую позитивную регуляцию ростовой и функциональной активности Т-клеток человека в условиях отсутствия антигенного стимула и относительного дефицита костимуляторных воздействий.

В активационной модели культивирования также наблюдалось достоверное увеличение количества CD25<sup>+</sup> клеток, как среди хелперных, так и среди цитотоксических Т-лимфоцитов. Но в этом случае среди хелперных клеток активировались лишь клетки памяти (СМ и ЕМ), а среди цитотоксических Т-лимфоцитов активировались все субпопуляции. Таким образом, на фоне стимуляции Т-клеточного рецептора интерлейкин-7 способствует сбалансированной активации почти всех субпопуляций Т-клеточного пула, создавая условия для мощного иммунного ответа.

В гомеостатической модели культивирования добавление ИЛ-7 приводило к повышению количества наиболее зрелых – терминально-дифференцированных эффекторных Т-клеток по сравнению с интактной пробой, что справедливо как для хелперных, так и для цитотоксических Т-лимфоцитов. Из этого следует, что в системе покоящихся Т-клеток ИЛ-7 выступает индуктором созревания. В активационной модели при использовании заявленной в эксперименте концентрации ИЛ-7 подобного эффекта не наблюдалось.

## ВЫВОДЫ

Были продемонстрированы активационные и индуцирующие созревание эффекты интерлейкина-7 в отношении хелперных и цитотоксических лимфоцитов разной степени дифферен-

цировки. Применение данных моделей *in vitro* позволит наиболее объективно оценивать всесторонние действия цитокинов на Т-лимфоциты.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Меньяло М. Е., Малащенко В. В., Шмаров В. А., Газатова Н. Д., Тодосенко Н. М., Мелашченко О. Б., Гончаров А. Г., Селецков В. И. Прямое влияние интерлейкина-8 на активацию Т-клеток. Российский иммунологический журнал. 2016, 2; 10(19), 174–178.
2. Belarif L., Vanhove B., Poirier N. Full antagonist of the IL-7 receptor suppresses chronic inflammation in non-human primate models by controlling antigen-specific memory T cells. *Cell Stress*. 2018; 2(12), 362–364.
3. Inokuma M. S., Maino V. C., Bagwell C. B. Probability state modeling of memory CD8<sup>+</sup> T-cell differentiation. *J Immunol Methods*. 2013; 397(1–2), 8–17.
4. Shmarov V. A., Malashchenko V. V., Meniailo M. E., Gazatova N. D., Todosenko N. M., Melashchenko O. B., Goncharov A. G., Seledtsov V. I. Direct effects of interleukin-7 on the function of human T cells *in vitro*. *Eur Cytokine Netw*. 2016; 27(4), 102–107.

### APPLICATION OF *IN VITRO* CULTURAL MODELS WITH INTERLEUKIN-7 FOR ESTIMATING THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF T-LYMPHOCYTES

© 2019 V. A. Shmarov\*, A. G. Goncharov

\*E-mail: enant@list.ru

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

Received: 25.07.2019. Accepted: 28.08.2019

Currently, studies on the action of cytokines on the functional activity of immunocompetent cells are of great scientific interest. The most significant is the use of various models of the immune system cells culture. This paper describes two cellular models used to study the direct effect of interleukin-7 on the functional properties of T-lymphocytes. Interleukin-7 (IL-7) is involved in the main stages of the T-cell life cycle: carrying out the signals necessary for survival, differentiation, proliferative activity, protection from apoptotic death, homeostatic maintenance of the number of T-lymphocytes. The directionality and severity of the effects of IL-7 was evaluated on the proposed homeostatic and activation T-cell models *in vitro*.

*Key words:* T-lymphocytes, interleukin-7, incubation, flow cytometry

#### Authors:

**Shmarov V. A.**, ✉ Junior research fellow, Center for Medical Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia. E-mail: enant@list.ru;

**Goncharov A. G.**, PhD, Deputy Director of the Medical Institute for Scientific Work, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia