

Функциональный потенциал клеток памяти CD8⁺ в условиях лимфопении, вызванной введением гидрокортизона

Д. Б. Казанский, М. С. Вагида, Ю. Ю. Силаева, А. А. Калинина, М. А. Замкова, Л. М. Хромых,
Н. А. Персиянцева, Л. Х. Джолахав

НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Дмитрий Борисович Казанский kazansky1@yandex.ru

Введение. Широкое применение глюкокортикоидов в терапии онкологических, аутоиммунных и аллергических заболеваний сопряжено с подавлением функций адаптивного иммунитета и ставит задачу углубленного исследования их иммунорегуляторных свойств и иммунотоксичности.

Результаты. Используя разработанную нами модель селективной активации мышиных клеток памяти CD8⁺ в смешанной культуре лимфоцитов (*mixed lymphocyte reaction, MLR*) *in vitro*, в этой работе мы впервые показали, что внутрибрюшинное введение мышам гидрокортизона в высокой дозе (2,5 мг на 1 животное) позволяет обнаружить Т-клетки памяти в тимусе животных, иммунизированных клетками аллогенной опухоли. Как и клетки памяти из других лимфоидных органов, лимфоциты тимуса иммунных животных, резистентные к гидрокортизону, отвечают пролиферацией на аллогенные стимуляторы, подвергнутые острому тепловому шоку и иммунологически специфичны к иммунизирующему аллоантигену. Таким образом, кортизонрезистентные тимоциты частично или полностью представлены клетками памяти. Также мы показали, что у гетерозигот по нокауту α -цепи TCR (генетически неспособных ко вторичной реарранжировке α -цепей) ответы клеток памяти значительно усилены по сравнению с ответами клеток памяти мышей дикого типа.

Заключение. Полученные данные позволяют выдвинуть гипотезу, согласно которой клоны Т-клеток памяти, размножившиеся в первичном иммунном ответе, мигрируют в тимус, обеспечивающий микроокружение, необходимое для реэкспрессии ими рекомбиназ. После завершения редактирования α -цепей TCR такие Т-лимфоциты могут вернуться в периферический репертуар, подерживая его широту.

Ключевые слова: аллоантиген, противоопухолевый иммунитет, глюкокортикоид, Т-клеточный рецептор, иммунологическая память

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-4-42-49

Functional capacity of memory cells CD8⁺ under lymphopenia induced by injection of hydrocortisone

D. B. Kazansky, M. S. Vagida, Yu. Yu. Silaeva, A. A. Kalinina, M. A. Zamkova, L. M. Khromykh, N. A. Persiyantseva, L. Kh. Jolokhava

Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. Wide use of glucocorticoids therapy for neoplasms, autoimmune diseases and allergies is associated with suppression of adaptive immunity that requires profound study of their immunoregulatory properties and immunotoxicity.

Results. In this work, using our model of selective activation of mouse CD8⁺ memory cells in the mixed lymphocyte reaction (MLR) *in vitro*, we show for the first time that intraperitoneal injection of high dose hydrocortisone (2.5 mg per animal) allows to detect memory cells in the thymus of animals immunized with allogeneic tumor cells. Similar to memory cells from other lymphoid organs, hydrocortisone-resistant thymic lymphocytes from immune animals respond on allogeneic stimulators subjected to severe heat shock and are immunologically specific to immunizing alloantigen. Thus, cortisone-resistant thymocytes are partially or completely represented by memory cells. We also show here that memory responses of heterozygotes on TCR α -chain knock-out (genetically incapable to secondary rearrangement of TCR α -chains) are significantly enhanced as compared with the ones of wild type mice.

Conclusion. These findings allows to suggest the hypothesis according to which memory T cell clones proliferating in primary immune response migrate into thymus providing necessary microenvironment for reexpression of recombinaes. After editing of genes encoding TCR α -chains, such T lymphocytes can return to peripheral repertoire maintaining its wideness.

Key words: alloantigen, anti-tumor immunity, glucocorticoid, T cell receptor, immunological memory

Введение

В течение ряда лет мы занимаемся разработкой и приложениями простого варианта тестирования активности Т-клеток памяти CD8⁺, специфичных к аллогенным молекулам МНС класса I опухолевых клеток. Метод основан на измерении их пролиферации в ответе на мононуклеары селезенки и клетки аллогенных

опухолей *in vitro*, подвергнутые острому (45 °С, 1 ч) тепловому шоку [1]. В этих условиях первичный пролиферативный ответ Т-лимфоцитов неиммунизированных животных в культуре *in vitro* не развивается, хотя Т-клетки памяти CD8⁺, индуцированные предварительной иммунизацией *in vivo*, способны к пролиферативному ответу на прогретые аллогенные

стимуляторы, несущие иммунизирующий аллоантиген. Такой ответ клеток памяти иммунологически специфичен и может быть воспроизведен на различных линиях мышей и опухолевых клеток, включая их комбинации, различающиеся лишь по одному белку главного комплекса гистосовместимости [2].

С помощью линий мышей, нокаутированных по генам, кодирующим белки TAP и β_2 -микроглобулин, мы показали, что в этой экспериментальной системе Т-клеточные рецепторы (T cell receptor, TCR) клеток памяти прямо распознают аллогенные молекулы МНС класса I прогретых клеток [3]. Используя смеси отвечающих лимфоцитов мышей дикого типа и лимфоцитов животных, экспрессирующих трансген зеленого флуоресцентного белка (GFP), мы показали, что в ответе на прогретые стимуляторы избирательно пролиферируют клетки памяти, индуцированные в первичном иммунном ответе на опухолевые клетки *in vivo*, но не наивные Т-лимфоциты (не встречавшие ранее данный антиген) [4]. Используя избирательность активации клеток памяти в таком ответе, мы получили их клоны и гибридомы, что открыло пути молекулярного клонирования цепей их TCR [5], а также создания трансгенных линий животных [6].

Результаты исследования особенностей иммунного статуса, Т-клеточного репертуара и иммунных ответов полученных нами трансгенных линий животных с трансгенной экспрессией α - и β -цепей Т-клеток памяти [7–9] позволили нам провести исследования функционального потенциала Т-клеток памяти в условиях экспериментальной лимфопении, вызванной введением гидрокортизона.

Актуальность данной работы диктуется широким применением глюкокортикоидов и их аналогов в терапии онкологических, аутоиммунных и аллергических заболеваний, а также тем, что нарушения функций клеток памяти, как правило, вовлечены в развитие этих патологических процессов, а Т-лимфоциты с их метаболическими свойствами рассматриваются как действенное средство иммунотерапии онкологических заболеваний [10, 11].

Материалы и методы

Животные. В работе были использованы линии мышей C57BL/6 ($K^bI-A^bD^b$), C57BL/10 ($K^bI-A^bD^b$), B10.D2 (R101) ($K^dI-A^dI-E^dD^d$), B10.D2 ($K^dI-A^dI-E^dD^d$) и FVB ($K^qI-A^qI-E^qD^q$) разведения вивария ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Гетерозиготы по нокауту α -цепи TCR – B6.129S2-*Tcr α ^{tm1Mom}*/J (H-2^b) – на генетической основе C57BL/6 исходно были получены из Jackson Laboratory. Далее их поддерживали и генотипировали в нашей лаборатории в соответствии с рекомендациями производителя [https://www2.jax.org/protocolsdb/f?p=116:5:0::NO:5:P5_MASTER_PROTOCOL_ID,P5_JRS_CODE:26621,002116].

Клеточные линии. Клетки мастоцитомы P815 (H-2^d) культивировали *in vitro* в ростовой среде RPMI 1640

с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 5×10^{-5} М 2-меркаптоэтанола, 2мМ L-глутамин и антибиотика ципрофлоксацина (KRKA, Словения) при температуре 37 °С в атмосфере с 5 % CO₂ и абсолютной влажностью. В эксперименте использовали клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста. Клетки лимфомы EL-4 (H-2^b) получали в асцитной форме, трансплантируя их в количестве $(3-5) \times 10^6$ мышам сингенной линии C57BL/6 ($K^bI-A^bD^b$). Через 10–14 сут собирали асцит, трижды отмывали центрифугированием (200 g, 5 мин) в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) и использовали для иммунизации мышей.

Приготовление клеточных суспензий. Мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации и извлекали селезенку, тимус и мезентериальные лимфатические узлы. Селезенку помещали в гомогенизатор Поттера с 3 мл питательной среды RPMI-1640 (ПанЭко, Россия). После гомогенизации органа полученную суспензию клеток переносили в центрифужную пробирку и осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин при температуре 4 °С. Надосадочную жидкость удаляли, осадок клеток ресуспендировали и проводили гипотонический лизис эритроцитов. Для этого к осадку спленоцитов добавляли 360 мкл стерильной дистиллированной воды, пробирку встряхивали в течение 10–20 с и добавляли 40 мкл 10-кратного фосфатно-солевого буфера и 6–7 мл 1-кратного фосфатно-солевого буфера. Затем клетки осаждали центрифугированием при 200g в течение 5 мин при температуре 4 °С, удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали осадок в 3 мл питательной среды RPMI-1640 (ПанЭко, Россия). Тимус и лимфатические узлы гомогенизировали описанным выше образом, осаждали центрифугированием при 200g в течение 5 мин при температуре 4 °С и осадок клеток ресуспендировали в 3 мл питательной среды RPMI-1640 (ПанЭко, Россия). Затем подсчитывали количество клеток в полученной суспензии в камере Горяева в присутствии смеси красителей трипанового синего и эозина.

Иммунизацию мышей проводили, вводя внутривентриально животным каждой линии 0,5 мл суспензии опухолевых клеток (концентрация 4×10^7 млн/мл). Контрольной группе мышей вводили внутривентриально 0,5 мл 1 × PBS (ПанЭко, Россия). Через 2 мес после иммунизации спленоциты этих мышей использовали в экспериментах как источник долгоживущих клеток памяти.

Реакция MLR (mixed lymphocyte reaction). В плоскодонные 96-луночные планшеты добавляли 2×10^6 спленоцитов мышей C57BL/6, обработанных митомицином С и ресуспендированных в полной среде. Через 2 ч инкубации при температуре 37 °С в атмосфере с 5 % CO₂ и абсолютной влажностью неприкрепившиеся клетки удаляли из лунок промывкой средой, подогретой до 37 °С. Полученные монослои адгезивных спленоцитов, содержащие дендритные клетки селезенки, использовали для дальнейшей постановки MLR.

Для постановки MLR 4×10^5 отвечающих мононуклеаров лимфатических узлов, селезенки и тимуса (репондеров) инкубировали в присутствии аллогенных или сингенных стимулирующих спленоцитов (стимуляторов), обработанных митомицином С (Киова Хакко Когио Ко., Лтд., Япония) (25 мкг/мл, 37 °С, 30 мин), в количестве 4×10^5 клеток на лунку 96-луночного планшета. Для избирательной активации клеток памяти стимуляторы подвергали острому тепловому шоку (инкубация спленоцитов при температуре 45 °С в течение 60 мин), затем их добавляли в культуру в количестве 4×10^5 на лунку. Клетки инкубировали в полной ростовой среде: RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 5 % сыворотки человека, 0,01 мг/мл ципрофлоксацина (KRKA, Словения), 4 ммоль L-глутамин (Sigma), 20 ммоль HEPES (ПанЭко, Россия) и 5×10^{-5} М 2-меркаптоэтанола (Merck) при температуре 37 °С в атмосфере с 5 % CO₂ и абсолютной влажностью в течение 72 ч. Пролиферацию клеток оценивали по включению ³H-тимидина в течение последних 8 ч культивирования.

Антитела. Для анализа и обнаружения опухолевых клеток на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) использовали анти-D^d-антитела (клон 34-2-12) для выявления клеток мастоцитомы P815 и анти-K^b (клон Y-3) (BD Bioscience, США) для обнаружения клеток лимфомы EL4. Для окрашивания мертвых клеток использовали пропидия йодид (PI) $7,5 \times 10^{-5}$ М (Sigma, США) или 7AAD Viability Staining Solution в соответствии с рекомендациями производителя (BioLegend, США).

Окрашивание антителами и анализ на проточном цитофлуориметре. Окрашивание антителами выполняли при температуре 4 °С в течение 30–50 мин. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с использованием программы BD FACSDiva 6.0. Погибшие клетки исключали из анализа по окрашиванию PI (в ряде экспериментов – 7AAD) и по показателям рассеивания. Анализировали не менее 100 тыс. событий для характеристики периферических популяций Т-лимфоцитов. Для анализа результатов использовали программу Flow Jo 7.6.

Статистический анализ. Все эксперименты были выполнены в 3 повторах. Статистический анализ проводили с использованием программы Microsoft Excel. Для оценки достоверности различий применяли *t*-критерий Стьюдента. Значение $p \leq 0,05$ считали статистически достоверным.

Результаты

Способность гидрокортизона в высоких дозах вызывать глубокую лимфопению давно и хорошо известна [12]. Как нами было показано ранее, введение гидрокортизона мышам приводило к глубокому (на 95–98 %) снижению клеточности тимуса и умеренному (на 25–30 %) снижению клеточности селезенки и лимфатических узлов на 2-е сутки после введения. Состав

основных субпопуляций тимуса претерпевал существенные изменения, которые выражались в значительном (с 95 до 5 %) снижении доли незрелых клеток CD4⁺CD8⁺ и увеличении долей клеток CD4⁺CD8⁻ (с 8–10 до 70 %) и CD4⁻CD8⁺ (с 3–5 до 18 %) [13].

Иммунизация мышей C57BL/10 клетками мастоцитомы P815 и мышей B10. D2 (R101) клетками лимфомы EL4 проводилась с последующей детекцией опухолевых клеток в лимфоидных органах реципиентов методом проточной цитофлуориметрии с антителами к молекулам D^d и K^b соответственно. Такой подход позволял выявить лишь минорное присутствие опухолевых клеток в периферических лимфоидных органах реципиентов на 3–6-е сутки после иммунизации. В тимусе реципиентов не обнаруживалось даже единичных опухолевых клеток (данные не представлены).

В присутствии спленоцитов, способных к адгезии к пластику (субпопуляция, обогащенная дендритными клетками миелоидного происхождения), клетки памяти пролиферируют в ответ на специфические аллогенные стимуляторы, подвергнутые острому тепловому шоку. Поскольку различные лимфоидные органы различаются в процентном содержании клеток этого типа, для выявления клеток памяти в различных лимфоидных органах мы использовали вариант MLR, в котором перед постановкой реакции на дно лунки помещали 2×10^6 мышинных спленоцитов, обработанных митомицином С, сингенных отвечающим клеткам. Через 2 ч инкубации в CO₂-инкубаторе неприкрепившиеся клетки отмывали средой, подогретой до температуры 37 °С, и саму реакцию MLR ставили на подложке из прикрепившихся клеток. В качестве респондеров применяли мононуклеары мезентериальных лимфатических узлов, селезенки и тимуса мышей C57BL/10 (H-2^b), интактных и предварительно иммунизированных 2×10^7 клеток мастоцитомы P815 (H-2^d). Части мышей каждой группы за 2 сут до постановки реакции вводили гидрокортизон в дозе 2,5 мг на 1 животное. В качестве стимуляторов использовали спленоциты мышей линий C57BL/10 (H-2^b – сингенные), B10. D2 (R101) (K^dI^dD^b – аллогенные) и FVB (H-2^a – посторонние), обработанные митомицином С или прогреванием (45 °С, 1 ч). На рис. 1 и 2 представлены результаты, показывающие, что в лимфатических узлах иммунизированных животных присутствуют клетки памяти, специфически отвечающие на прогретые стимуляторы мышей R101, несущие на своей поверхности молекулу H-2^d, общую с иммунизирующими клетками мастоцитомы P815, и что введение гидрокортизона в высокой дозе приводит к неспецифическому усилению пролиферации в культурах, которое может быть отнесено к регенерации органа. Как и следовало ожидать, у интактных неиммунизированных животных пролиферация в ответ на аллогенные стимуляторы, подвергнутые острому тепловому шоку, находится на уровне фоновой пролиферации в ответ на сингенные клетки.

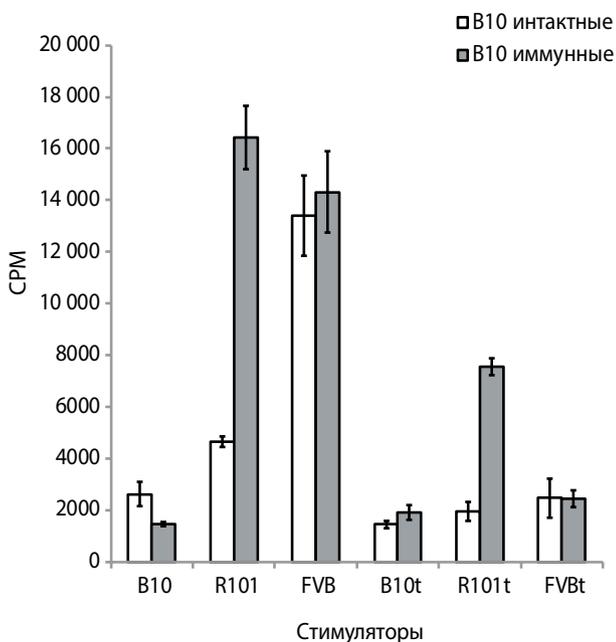


Рис. 1. Пролiferация наивных клеток и клеток памяти лимфатических узлов мышей C57BL/10 в ответе на аллогенные стимуляторы в 3-дневной смешанной культуре лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR). Пролiferацию оценивали по включению ^3H -тимидина. В качестве отвечающих клеток использовали клетки лимфатических узлов (LN) мышей C57BL/10, интактных и иммунизированных аллогенной мастоцитомой P815. Здесь и на рис. 2–7: в качестве стимуляторов – спленциты мышей C57BL/10 (H-2^b), B10. D2 (R101) (K^dI^d) и FVB (H-2^k), обработанные митомицином С или прогреванием (45 °С, 1 ч) – (t). CPM (counts per minute) – количество импульсов/мин на 4×10^5 клеток

Аналогично в селезенке интактных животных (рис. 3) отсутствует пролиферация в ответ на аллогенные стимуляторы, подвергнутые острому тепловому шоку. У иммунизированных животных выявляется интенсивный антигенспецифический ответ на прогретые стимуляторы мышей R101. Введение гидрокортизона интактным и иммунизированным животным приводит к неспецифическому снижению пролиферативного ответа с прекращением ответа клеток памяти селезенки (рис. 4).

Неожиданным оказалось то, что клетки памяти обнаруживаются в тимусе (рис. 5, 6) и введение гидрокортизона позволяет увидеть их ответ многократно усиленным, вероятно, за счет обогащения клетками, устойчивыми к действию гидрокортизона. Из этих экспериментов следуют 3 важных вывода. Во-первых, лимфопения, вызванная введением гидрокортизона, не «превращает» наивные клетки в клетки памяти, так как они не начинают пролиферировать в ответ на прогретые аллогенные стимуляторы. Кажущаяся повышенной интенсивность ответа лимфоцитов неиммунизированных животных с лимфопенией на прогретые аллогенные стимуляторы увеличивается пропорционально ответу на сингенные стимуляторы и почти не отличается от них. Во-вторых, обнаружено новое, ранее неизученное свойство клеток памяти – способность

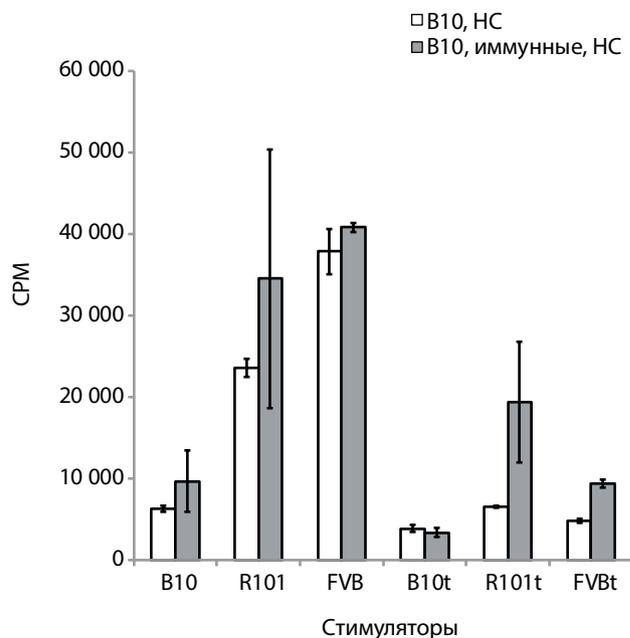


Рис. 2. Пролiferация наивных клеток и клеток памяти лимфатических узлов мышей C57BL/10 в ответе на аллогенные стимуляторы в 3-дневной смешанной культуре лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR). Пролiferацию оценивали по включению ^3H -тимидина. В качестве отвечающих клеток использовали клетки лимфатических узлов (LN) мышей C57BL/10, интактных и иммунизированных аллогенной мастоцитомой P815, с введением гидрокортизона (HC) за 2 сут до постановки эксперимента

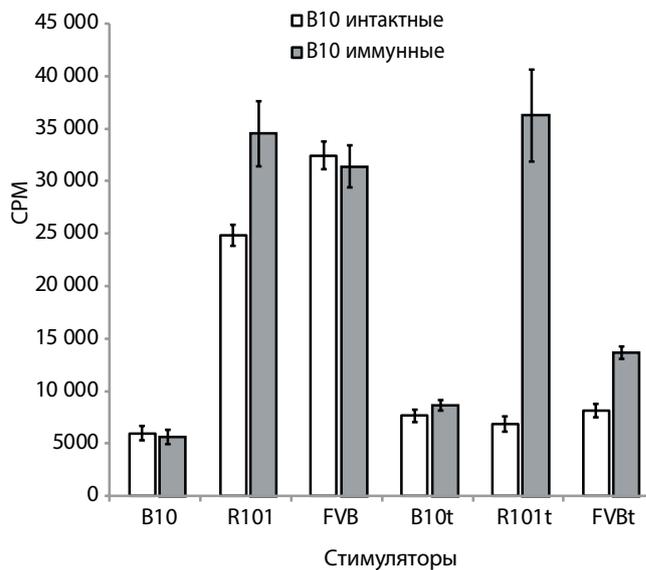


Рис. 3. Пролiferация наивных клеток и клеток памяти селезенки мышей C57BL/10 в ответе на аллогенные стимуляторы в 3-дневной смешанной культуре лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR). Пролiferацию оценивали по включению ^3H -тимидина. В качестве отвечающих клеток использовали мононуклеары селезенки мышей C57BL/10, интактных и иммунизированных аллогенной мастоцитомой P815

к реиммиграции в тимус. В-третьих, мы впервые получили прямое указание на то, что кортизонрезистентные тимоциты, известные в течение многих лет, могут быть частично или полностью представлены клетками памяти.

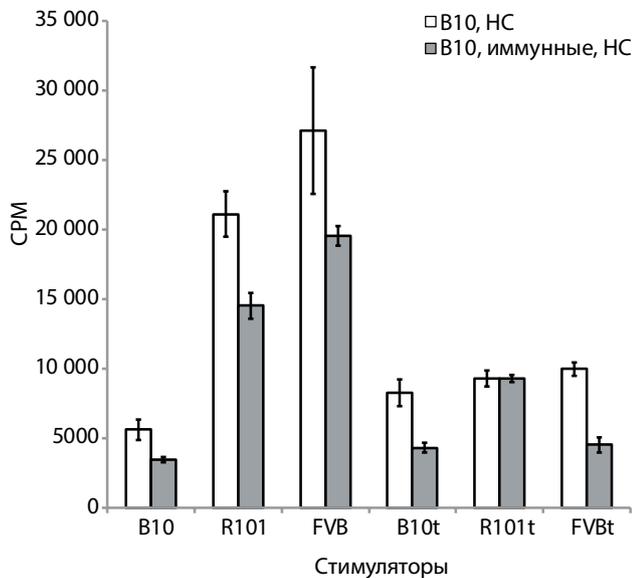


Рис. 4. Проплиферация наивных клеток и клеток памяти селезенки и мышей C57BL/10 в ответе на аллогенные стимуляторы в 3-дневной смешанной культуре лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR). Проплиферацию оценивали по включению ³H-тимидина. В качестве отвечающих клеток использовали мононуклеары селезенки мышей C57BL/10, интактных и иммунизированных аллогенной мастоцитомой P815, с введением гидрокортизона (HC) за 2 сут до постановки эксперимента

Нами также был получен результат, который может объяснить смысл появления в тимусе клеток памяти. У мышей – гетерозигот по нокауту α -цепи TCR – B6.129S2-*Tcr^{tm1Mom}/J* (H-2^b) – на генетической основе C57BL/6 с ограниченной способностью к реаранжировкам генов α -цепей TCR вторичные иммунные ответы оказались существенно повышенными (рис. 7), что свидетельствует о связи гомеостаза клеток памяти с гипотетическим процессом редактирования TCR в зрелых периферических Т-лимфоцитах. При этом первичные ответы Т-лимфоцитов неиммунизированных мышей дикого типа и гетерозигот вполне сопоставимы по величине.

Обсуждение

В этой работе нами получен новый и неожиданный результат – устранение незрелых клеток тимуса введением высокой дозы гидрокортизона позволило обнаружить в кортизонрезистентной фракции тимоцитов клетки памяти, специфичные к аллоантигенам иммунизирующих клеток. Интенсивность их ответа на иммунизирующий аллоантиген, представленный на клетках-стимуляторах, подвергнутых острому тепловому шоку, вполне сопоставима с интенсивностью ответа клеток памяти, локализованных в периферических лимфоидных органах. Традиционно тимус рассматривается как лимфоидный орган, способный только к экспорту лимфоидных клеток, но не к проникновению в него периферических Т-лимфоцитов, за исключением редких случаев тимусов мышей с врожденной лимфопенией [14]. Это убеждение противоречит результатам работ С.С. King и соавт., показавших, что вертикальное

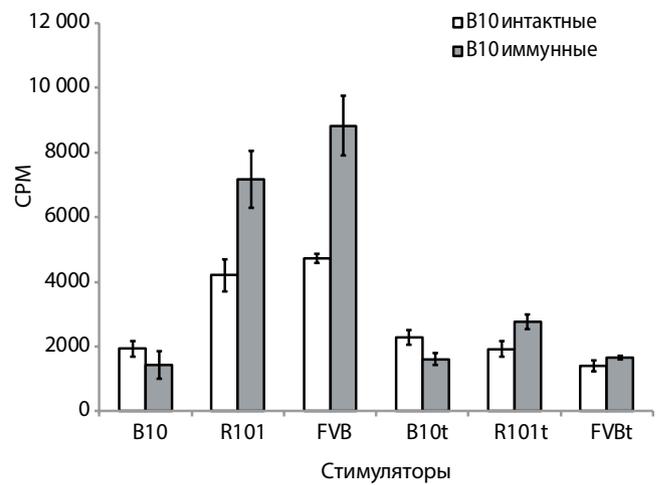


Рис. 5. Проплиферация наивных клеток и клеток памяти тимуса мышей C57BL/10 в ответе на аллогенные стимуляторы в 3-дневной смешанной культуре лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR). Проплиферацию оценивали по включению ³H-тимидина. В качестве отвечающих клеток использовали тимоциты мышей C57BL/10, интактных и иммунизированных аллогенной мастоцитомой P815

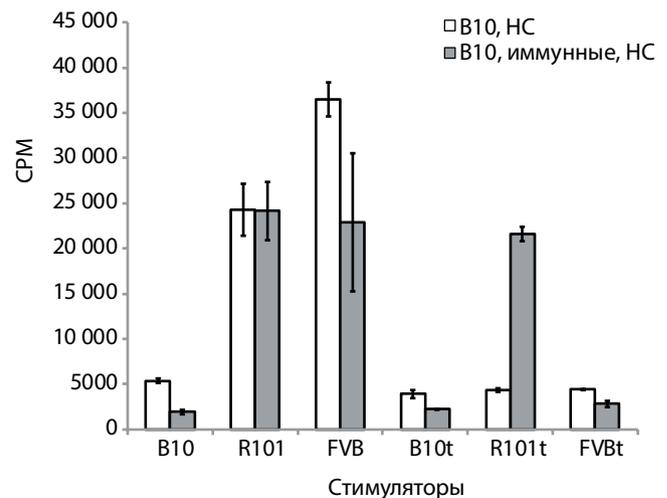


Рис. 6. Проплиферация наивных клеток и клеток памяти тимуса мышей C57BL/10 в ответе на аллогенные стимуляторы в 3-дневной смешанной культуре лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR). Проплиферацию оценивали по включению ³H-тимидина. В качестве отвечающих клеток использовали тимоциты мышей C57BL/10, интактных и иммунизированных аллогенной мастоцитомой P815, с введением гидрокортизона (HC) за 2 сут до постановки эксперимента

инфицирование вирусом лимфоцитарного хориоменингита ведет к носительству вируса клетками тимуса и неспособности реципиента развить иммунный ответ на него [15]. Введением STL из внешнего источника удалось снизить толерантность иммунной системы носителя к вирусу и добиться полной очистки организма от вирусных продуктов, в том числе их удаления из кортикальной и медуллярной зон тимуса [15]. Однако надо иметь в виду, что в этом случае речь идет об активном иммунном ответе и миграции эффекторных клеток в очаги локализации антигена. Очевидно, что в нашем случае это не так, поскольку нам никогда не удалось обнаружить сколько-нибудь значимого

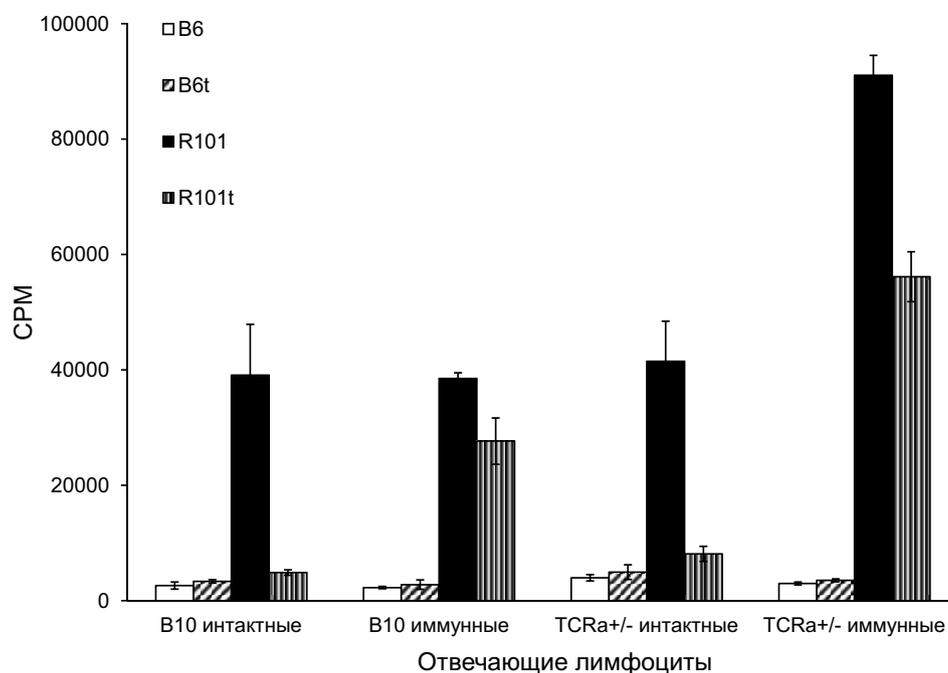


Рис. 7. Пролiferация наивных клеток и клеток памяти мышей C57BL/10 и гетерозигот по нокауту α -цепи TCR – B6.129S2-Tcratm1Mom/J (H-2^b) в ответе на аллогенные стимуляторы в 3-дневной смешанной культуре лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction, MLR). Пролiferацию оценивали по включению ³H-тимидина. В качестве отвечающих клеток использовали спленоциты мышей C57BL/10 и гетерозигот по нокауту α -цепи TCR, intactных и иммунизированных аллогенной мастоцитомой P815

присутствия введенных аллогенных опухолевых клеток в тимусе реципиента. Таким образом, наблюдаемый нами феномен имеет в своей основе более специфические особенности биологии клеток памяти, чем их миграция в сайт локализации антигена.

Пролить свет на эту загадку позволяет наш результат исследования ответов клеток памяти у животных с генетически ограниченной способностью к реаранжировкам α -цепей TCR. У генетических нокауты по α -цепи TCR формирование ее функционального гена невозможно. У гетерозигот по этому нокауту функциональная α -цепь TCR может сформироваться лишь в случае успешно прошедшей реаранжировки гена на 2-й хромосоме, тогда как 1-я несет нулевой аллель. Физиологически это будет соответствовать ситуации ограничения числа возможных реаранжировок, которым могут подвергнуться гены α -цепей в ходе формирования T-клеточного репертуара в тимусе. Именно в этом органе создается микроокружение, необходимое для экспрессии рекомбиназ RAG-1 и RAG-2, осуществляющих такую реаранжировку [16]. Мы обнаружили, что первичные иммунные ответы на аллоантиген у мышей дикого типа и у гетерозигот сопоставимы по величине, тогда как вторичные ответы у гетерозигот по нокауту резко усилены. Это может означать, что у гетерозигот нарушены гомеостатические механизмы регуляции размеров пула, которые занимают в репертуаре клетки памяти, а сами эти механизмы прямо связаны с возможностью повторной реаранжировки генов α -цепей TCR. Очевидно, что такой механизм должен заключаться в редактировании генов α -цепей, нацеленном

на устранение избыточного количества T-клеток памяти, возникших в ходе первичного иммунного ответа. Существование такого механизма позволило бы организму сохранять широту репертуара T-клеток для успешного иммунного ответа на другие антигены и могло бы дать рациональное объяснение появлению в тимусе клеток памяти. Такое объяснение вполне возможно ввиду накапливающихся данных о ревизии зрелого периферического репертуара T-лимфоцитов [17].

Заключение

В этой статье мы впервые показали, что лимфопения, вызванная введением мышам высокой (2,5 мг на животное) дозы гидрокортизона, позволяет обнаружить аллоспецифические клетки памяти в тимусе животных, иммунизированных клетками аллогенных опухолей. Мы продемонстрировали также, что у гетерозигот по нокауту α -цепи TCR ответы клеток памяти значительно усилены по сравнению с клетками памяти мышей дикого типа. Этот феномен указывает на существование в нормальном организме механизма утилизации клеток памяти, связанного со вторичной реаранжировкой (редактированием) их α -цепей TCR, протекание которой невозможно у гетерозигот по нокауту α -цепи. Поскольку тимус обеспечивает T-лимфоцитам микроокружение, необходимое для экспрессии рекомбиназ RAG-1 и RAG-2, мы высказываем гипотезу о том, что присутствие в тимусе клеток памяти связано с редактированием их TCR и, таким образом, возможностью их последующей реутилизации в иммунных ответах на другие антигены.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-01897).
Financing. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 14-04-01897).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Казанский Д.Б., Петришев В.Н., Штиль А.А. и др. Использование теплового шока антигенпрезентирующих клеток для функционального тестирования аллоспецифических Т-клеток памяти. *Биоорганическая химия* 1999;25(2):117–28. [Kazanskiy D.B., Petrishchev V.N., Shtil' A. A. et al. Use of heat shock of antigen-presenting cells for functional testing of allospecificity memory T-cells. *Bioorganicheskaya khimiya = Bioorganic Chemistry* 1999;25(2):117–28. (In Russ.)].
2. Казанский Д.Б., Чернышева А.Д., Сернова Н.В. и др. Природа эпитопов, распознаваемых Т-лимфоцитами в аллогенном иммунном ответе. *Молекулярная биология* 1998;32(4):692–702. [Kazanskiy D.B., Chernysheva A.D., Sernova N.V. et al. The nature of epitopes, recognized by T-lymphocytes in the allogenic immune response. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 1998;32(4):692–702. (In Russ.)].
3. Побезинская Е.Л., Побезинский Л.А., Силаева Ю.Ю. и др. Кросс-реактивность Т-клеточного рецептора клона клеток памяти CD8⁺, полученного в ответе на иммунизацию клетками аллогенной опухоли. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2004;137(5):493–8. [Pobezinskaya E.L., Pobezinskii L.A., Silaeva Y.Y. et al. Cross reactivity of T cell receptor on memory CD8⁺ cells isolated after immunization with allogeneic tumor cells. *Bulleten' experimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2004;137(5):493–8. (In Russ.)].
4. Гриненко Т.С., Побезинская Е.Л., Побезинский Л.А. и др. Подавление клетками памяти CD8⁺ первичного аллогенного ответа. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2005;140(5):545–9. [Grinenko T.S., Pobezinskaya E.L., Pobezinskii L.A. et al. Suppression of primary allogenic response by CD8⁺ memory cells. *Bulleten' experimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2005;140(5):545–9. (In Russ.)].
5. Звездова Е.С., Гриненко Т.С., Побезинская Е.Л. и др. Корецепторная функция CD4 в ответе на молекулу МНС класса I. *Молекулярная биология* 2008;42(4):662–72. [Zvezdova E.S., Grinenko T.S., Pobezinskaya E.L. et al. Coreceptor function of CD4 in response to MHC class I molecule. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2008;42(4):662–72. (In Russ.)].
6. Звездова Е.С., Силаева Ю.Ю., Вагида М.С. и др. Создание трансгенных животных, экспрессирующих α- и β-цепи аутореактивного TCR. *Молекулярная биология* 2010;44(2):311–22. [Zvezdova E.S., Silaeva Yu.Yu., Vagida M.S. et al. Generation of transgenic animals, expressing alpha and beta-chains of autoreactive TCR. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2010;44(2):311–22. (In Russ.)].
7. Силаева Ю.Ю., Калинина А.А., Вагида М.С. и др. Сокращение пула Т-лимфоцитов с поверхностным фенотипом эффекторов и клеток памяти под воздействием экспрессии трансгена β-цепи Т-клеточного рецептора. *Биохимия* 2013;78(5):714–26. [Silaeva Yu.Yu., Kalinina A.A., Vagida M.S. et al. Decrease in pool of T lymphocytes with surface phenotypes of effector and central memory cells under influence of TCR transgenic β-chain expression. *Biokhimiya = Biochemistry* 2013;78(5):714–26. (In Russ.)].
8. Силаева Ю.Ю., Гриненко Т.С., Вагида М.С. и др. Immune selection of tumor cells in TCR β-chain transgenic mice. *J Immunotoxicol* 2014;1(4):393–9.
9. Казанский Д.Б., Силаева Ю.Ю., Калинина А.А. и др. Трансплантационный и специфический противоопухолевый иммунитет в ретроспективе: новые модели, основанные на трансгенезе цепей Т-клеточного рецептора. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;3(1):14–27. [Kazanskiy D.B., Silaeva Yu.Yu., Kalinina A.A. Transplantation and specific antitumor immunity in retrospective view: new models based on transgenesis of individual chains of T-cell receptor. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2016;3(1):14–27. (In Russ.)].
10. Sukumar M., Kishon R.J., Restifo N.P. Metabolic reprogramming of anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2017;46:14–22.
11. Казанский Д.Б., Силаева Ю.Ю., Калинина А.А. и др. Метаболические аспекты адоптивной иммунотерапии опухолей. *Успехи молекулярной онкологии* 2017;4(3):21–6. [Kazanskiy D.B., Silaeva Yu.Yu., Kalinina A.A. Metabolic aspects of adoptive immunotherapy of tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2017;4(3):21–6. (In Russ.)].
12. Craddock C.G. Corticosteroid-induced lymphopenia, immunosuppression, and body defense. *Ann Intern Med* 1978;88(4):564–6.
13. Anfalova T.V., Khromykh L.M., Petrishchev V.N. et al. Characteristics of the cells producing thymic chemotactic factor for bone marrow stem cells. *Ontogenez* 2002;33(2):90–4.
14. Sprent J., Surh C.D. Re-entry of mature T cells to the thymus: an epiphenomenon? *Immunol Cell Biol* 2009;87(1):46–9.
15. King C.C., Jamieson B.D., Reddy K. et al. Viral infection of the thymus. *J Virol* 1992;66(5):3155–60.
16. Yehuda A.B., Friedman G., Wirtheim E. et al. Checkpoints in thymocytopoiesis in aging: expression of the recombination activating genes RAG-1 and RAG-2. *Mech Ageing Dev* 1998;102(2–3):239–47.
17. Higdson L.E., Deets K.A., Friesen T.J. et al. Receptor revision in CD4 T cells is influenced by follicular helper T cell formation and germinal-center interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(15):5652–7.

Статья поступила: 30.10.2017. **Принята в печать:** 09.11.2017.

Article received: 30.10.2017. **Accepted for publication:** 09.11.2017.