

Федеральное медико-биологическое агентство

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научный центр «Институт иммунологии»
Федерального медико-биологического агентства
(ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России)**

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации

Группа 12. Требования к профилактике заболеваний, защите населения от повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья и оказанию медико-социальной помощи

**ЦИТОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И
КОНВЕРСИИ ФЕНОТИПА Т-КЛЕТОК ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ КАК
КРИТЕРИИ ПОСТРАДИАЦИОННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ**

Методические рекомендации

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России МР.12 № 1 –2024

Москва,

2024

Предисловие

1. Настоящие методические рекомендации разработаны в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России)

Директор – член-корр. РАН, д-р мед. наук, профессор Хаитов М.Р.

2. Исполнители:

заведующий лабораторией дифференцировки лимфоцитов, канд. мед. наук

Митин А.Н.

ведущий научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов, д-р мед. наук, доцент

Донецкова А.Д.

ведущий научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов, канд. биол. наук

Шарова Н.И.

ведущий научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов, канд. биол. наук

Никонова М.Ф.

старший научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов, канд. биол. наук

Литвина М.М.

старший научный сотрудник лаборатории дифференцировки лимфоцитов, канд. биол. наук

Комогорова В.В.

3. В настоящем документе реализованы требования Приказа Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» (рег. в Минюсте РФ 13.10.2010).

4. Введение в действие – с момента утверждения.

5. Введено впервые.

Содержание

Предисловие.....	2
Введение	4
1. Область применения.....	6
2. Нормативные ссылки.....	7
3. Термины и определения.....	8
4. Обозначения, сокращения.....	8
5. Методология.....	9
6. Динамика численности, субпопуляционного состава и фенотипических изменений Т-клеток у тимэктомированных сублетально облученных мышей.....	12
7. Пролиферативная активность Т-клеток тимэктомированных мышей после индукции лимфопении.....	13
8. Роль ИЛ-7 в поддержании гомеостаза и восстановлении численности Т-клеток после индукции лимфопении в отсутствие тимопоэза у мышей	15
9. Гомеостатические процессы популяции Т-лимфоцитов тимэктомированных мышей после индукции лимфопении в отсутствие молекул МНС-I.....	16
10. Динамика изменений численности, субпопуляционного состава, фенотипа и пролиферативной активности Т-клеток в лимфоидных органах линейных мышей.....	18
Заключение.....	21
Библиография.....	22

Введение

Известно, что радиационное воздействие оказывает отрицательное влияние на организм, вызывая лучевые поражения и повышая в последующем вероятность развития иммунопатологических процессов. При этом интенсивно делящиеся лимфоциты являются одними из наиболее радиочувствительных клеток организма [1]. Изучение клеточных механизмов, контролирующих репарационные процессы после действия радиации, открывает принципиально новую возможность прогнозирования рисков, связанных с облучением, и коррекции методов восстановительной терапии. На данный момент в распоряжении врачей имеется современный высокоинформативный метод исследования – проточная цитофлуориметрия, которая позволяет достаточно полно оценить параметры пострадиационного восстановления с использованием меченных моноклональных антител.

Устранение дефицита Т-клеток после воздействия облучения происходит за счет двух процессов: Т-лимфопоэза в тимусе и пролиферации периферических Т-лимфоцитов (гомеостатической пролиферации – ГП), что определяет адекватное заполнение лимфоцитарных ниш [2]. Процесс гомеостатической пролиферации приводит не только к восстановлению численности Т-клеток, но и к изменению их фенотипических и миграционных характеристик - конверсии фенотипа наивных Т-клеток в Т-клетки памяти [3–5]. Феномен конверсии состоит в том, что наивные клетки, не контактировавшие с антигеном и вступившие в деление, выходят из него измененными, высоко экспрессируя на поверхности молекулу CD44 - маркер Т-клеток памяти у мышей. Поскольку при этом наивные Т-клетки не утрачивают своего маркера CD62L, фенотипически – CD62L^{hi}CD44^{hi} - они оказываются идентичными центральным клеткам памяти. Однако в отличие от обычных Т-клеток памяти, эти лимфоциты не проходят стадию активированных и эффекторных клеток и являются «суррогатными» Т-клетками памяти [3, 6, 7]. Это превращение сопровождается функциональными изменениями: у «суррогатных» Т-клеток памяти снижен порог индукции эффекторных функций, они не выполняют защитных функций в силу поликлональности [8]. Накопление данных клеток может порождать

ряд серьезных проблем вплоть до повышения риска развития аутоиммунной и онкопатологии [8, 9].

В настоящих методических рекомендациях предложено исследование пролиферативной активности и конверсии фенотипа Т-клеток после облучения, определяемых с помощью проточной цитометрии, в качестве критериев пострадиационного восстановления. Для исключения влияния тимуса (тимопоэз) исследование было проведено на модели тимэктомированных мышей. Кроме того, пострадиационные изменения были сопоставлены с фенотипическими изменениями Т-клеточной субпопуляции у старых мышей, у которых отмечается возрастная инволюция тимуса.



УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУ «ГНЦ Институт
иммунологии» ФМБА России
член-корр РАН, д.м.н, профессор
М.Р. Хаитов

М.Р. Хаитов 2024 г.

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации

Группа 12. Требования к профилактике заболеваний, защите населения от повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья и оказанию медико-социальной помощи

Цитометрическая оценка пролиферативной активности и конверсии фенотипа Т-клеток после облучения как критерии пострадиационного восстановления
Методические рекомендации

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России МР.12 № 1 –2024

1. Область применения

1. Методические рекомендации распространяются на проблемы восстановления иммунной системы после радиационного поражения. Предложенные методы основаны на исследовании поверхностных и внутриклеточных маркеров Т-лимфоцитов с помощью проточной цитофлуориметрии.

2. Методические рекомендации устанавливают новые персонифицированные подходы к оценке степени поражения иммунной системы и эффективности проводимой восстановительной терапии для лечения лучевой болезни, а также лечения лимфопении, индуцированной химио- или лучевой терапией.

3. Методические рекомендации предназначены для специалистов медицинских учреждений, в том числе ФМБА России, занимающихся лечением больных с лучевыми поражениями, а также для студентов и преподавателей медицинских ВУЗов, ординаторов и аспирантов.

2. Нормативные ссылки

Настоящий документ разработан на основании требований следующих нормативных правовых актов и нормативных документов:

- Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» (рег. в Минюсте РФ 13.10.2010).

- ГОСТ Р 1.0-2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения» (утв. Приказом Ростехрегулирования 30.12.2004 N 152-ст);

- ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (утв. Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2 декабря 2009 г. N 544-ст);

- Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях ETS N123 (прин. 18.03.1986, Страсбург);

- Рекомендации Р ФМБА России от 28.06.2023 № 1-2023 «Порядок разработки, изложения, представления на согласование и утверждение нормативных документов, разрабатываемых научными организациями по заказу ФМБА России, в Комиссию Федерального медико-биологического агентства по рассмотрению нормативных и методических документов, разработанных при выполнении научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ, осуществлении научно-технической и инновационной деятельности».

- Положение о Комитете по этике ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, созданном в 1996 г., последняя редакция Положения о Комитете по этике ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, утверждена протоколом № 12 от 18.08.2022;

- Одобрение локального этического комитета ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России (протокол № 4 от 18.02.2021).

3. Термины и определения

В настоящем документе применены следующие термины с соответствующими им определениями:

Т-клетки – лимфоциты, проходящие иммунопоз в тимусе.

Тимоциты – незрелые Т-клетки, находящиеся в процессе антиген-независимой дифференцировки в тимусе.

Наивные Т-клетки – Т-лимфоциты, которые не были активированы антигеном, экспрессирующие CD62L и CCR7 и рециркулирующие между кровью и вторичными лимфоидными органами.

Центральные клетки памяти (Т-клетки центральной памяти) – Т-лимфоциты памяти, экспрессирующие CD62L и CCR7, находящиеся во вторичных лимфоидных органах аналогично наивным Т-клеткам; при рестимуляции становятся зрелыми эффекторными Т-лимфоцитами.

Эффекторные Т-клетки памяти – Т-лимфоциты памяти, находящиеся преимущественно в барьерных тканях.

Регуляторные Т-лимфоциты – Т-клетки, подавляющие иммунный ответ и аутоиммунные реакции.

4. Обозначения и сокращения

Гр – грэй, единица измерения поглощенной дозы радиации (системная единица СИ)

МАТ – моноклональные антитела

НИР – научно-исследовательская работа

ЦТЛ – цитотоксические лимфоциты

BSA – бычий сывороточный альбумин

CD62L – L-селектин

CCR7 – хемокиновый рецептор наивных Т-клеток

DN – двойные негативные тимоциты

FOXP3 – транскрипционный фактор forkhead box P3

PBS – забуференный физиологический раствор

T _{cm}	– центральные Т-клетки памяти
T _{emra}	– эффекторные Т-клетки памяти
T _{naive}	– наивные Т-клетки
T _{td}	– терминально-дифференцированные Т-клетки
T _{reg}	– регуляторные Т-лимфоциты

5. Методология

Для анализа пострадиационного восстановления Т-лимфоцитов использован метод проточной цитофлуориметрии с исследованием гомеостатической пролиферации и возрастного фенотипа Т-клеток.

Процессы регенерации Т-клеточного звена иммунной системы на периферии обусловлены активацией гомеостатической пролиферации, уровень которой удобно оценивать с помощью цитофлуориметрии по проценту Т-клеток, экспрессирующих внутриклеточный маркер пролиферации – молекулу Ki-67 (процент пролиферирующих клеток). Преимуществом данного подхода является возможность дифференцировать субпопуляции пролиферирующих клеток по фенотипу: CD3⁺Ki-67⁺ (Т-лимфоциты), CD3⁺CD4⁺Ki-67⁺ (Т-хелперы), CD3⁺CD8⁺Ki-67⁺ (ЦТЛ), CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Ki-67⁺ (Treg).

Для оценки конверсии фенотипа Т-клеток после облучения необходимо определить «возрастной» фенотип Т-лимфоцитов – по экспрессии CD44 и CD62L/CCR7:

- наивные Т-клетки (T_{naive}) – CD62L⁺/CCR7⁺CD44^{lo};
- центральные клетки памяти (T_{cm}) – CD62L⁺/CCR7⁺CD44^{hi};
- эффекторные Т-клетки памяти (T_{em}) – CD62L⁻/CCR7⁻CD44^{hi};
- терминально-дифференцированные Т-клетки (T_{td}) – CD62L⁻/CCR7⁻CD44^{lo}.

5.1. Реагенты и оборудование

Реагенты:

- 10 % раствор золетила;
- 2 % раствор ксилы;
- 0,1 % раствор трипанового синего;

- PBS (фосфатно-солевой буфер) ;
- BSA (бычий сывороточный альбумин);
- NaN₃ (азид натрия);
- Лизирующий буфер («eBioscience»);
- Буфер Foxp3 Fixation/Permeabilization Buffer («eBioscience»);
- Анти-мышинные МАТ к CD3-FITC, CD4-PerCP-Cy5.5, CD8-APC-eFluor780, CD44-PE-Cy7, CCR7/CD62L-PE, CD25-APC, Foxp3-PE, Ki-67-APC.

Оборудование:

- Аппарат для облучения рентгеновскими лучами «АРДОК-1»;
- Проточный цитофлюориметр BD FACS Canto™ II;
- Центрифуга «Joan CR3i» с ротором для пробирок типа «Эппендорф» (до 13000g);
- Вакуумный отсос;
- Пестиковый гомогенизатор Поттера–Эльвегейма;
- Вортекс;
- Набор автоматических дозаторов переменного объема со сменными наконечниками;
- Камера Горяева.

5.2. Работа с животными и клетками

5.2.1. Животные. Тимэктомия. Облучение

Исследование проводилось на мышах линии C57BL/6, самках весом 18–20 г, полученных из питомника «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. В возрасте 7–8 недель мыши были тимэктомированы. Тимэктомия проводилась с помощью вакуумного отсоса под общей анестезией. Для анестезии мышам внутривенно вводили 10 мкл 10% раствора золетила и 5 мкл 2 % раствора ксилы в 185 мкл стерильной дистиллированной воды. Через 30 дней после тимэктомии мышей облучали рентгеновскими лучами в сублетальной дозе (4 Гр) на аппарате «АРДОК-1». Эвтаназию мышей методом цервикальной дислокации проводили через 5, 10, 12, 20, 30 и 60 суток после облучения (при исследовании возрастных особенностей – в возрасте 12, 21, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600, 660, 720

дней). Контролем к облученным мышам служили мыши соответствующего возраста и того же помета.

5.2.2. Выделение клеток из лимфоидных органов

У мышей извлекали селезенку и лимфоузлы (по 2 подмышечных и 2 паховых), тимус (при наличии), освобождали от соединительной ткани, измельчали, ресуспензировали в PBS с добавлением 0,2 % BSA и 0,1 % NaN₃, лизировали эритроциты с помощью лизирующего буфера («eBioscience»), дважды отмывали PBS. Количество клеток в органах определяли путем подсчета в камере Горяева. Жизнеспособность клеток после выделения была выше 95 % (методом исключения 0,1 % раствора трипанового синего).

5.3. Проточная цитометрия

Для проведения проточной цитометрии клетки в концентрации $5 \cdot 10^6$ /мл в растворе PBS с 0,2 % BSA и 0,1 % NaN₃ инкубировали с моноклональными антителами к поверхностным маркерам в течение 30 мин при +4°C. При определении экспрессии внутриклеточных маркеров после постановки поверхностных моноклональных антител клетки отмывались и пермеабилizировались в течение 40 мин буфером фирмы «eBioscience» («Foxp3 Fixation/Permeabilization Buffer») согласно методическим указаниям фирмы. Затем клетки отмывались и инкубировались в течение 30 мин при +4°C в темноте с МАТ против FOXP3 и Ki-67, снова отмывались и сразу анализировались на проточном цитометре (без фиксации). Учитывая минорность фракции регуляторных клеток, для уменьшения ошибки анализировали не менее 10^5 клеток, попадающих в гейт лимфоцитов. Лазерную цитофлуориметрию клеток осуществляли на проточном цитометре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson) в стандартном режиме. Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения BD FACSDiva и FCS Express или FlowJo.

Использовали следующие комбинации моноклональных антител фирмы «eBioscience» (США) (препараты для изотипических контролей той же фирмы):

- Анти-CD3-FITC + анти-CD4-PerCP-Cy5.5 + анти-CD8-APC-eFluor780 + анти-CD44-PE-Cy7 + анти-CCR7/CD62L-PE + анти-Ki-67-APC;

- Анти-CD3-FITC + анти-CD4-PerCP-Cy5.5 + анти-CD25-APC + анти-Foxp3-PE.

Предложенная методика для оценки пролиферативной активности и конверсии фенотипа Т-клеток после облучения апробирована при экспериментально-индуцированной лимфопении у тимэктомированных мышей (для исключения вклада тимуса).

6. Динамика численности, субпопуляционного состава и фенотипических изменений Т-клеток у тимэктомированных сублетально облученных мышей

Восстановление Т-клеток у тимэктомированных в возрасте 7–8 недель сублетально облученных мышей отстает от восстановления облученных нетимэктомированных мышей. Наиболее заметным это отставание отмечается с 30 суток после облучения, когда активно включается тимопоэз, и темп восстановления у мышей с тимусом резко усиливается.

Восстановление Т-клеток осуществляется за счет регенерации лимфоидных клеток селезенки: статистически значимый максимум восстановления числа Т-клеток в селезенке определяется на 10 сутки с последующим снижением к 20 суткам. Это соответствует пикам экстренной регенерации и вторичной атрофии тимуса в эти же сроки у мышей с тимусом. Восстановление Т-лимфоцитов в лимфатических узлах отсутствует. К 30 суткам число Т-клеток в селезенке тимэктомированных мышей составляет 51 % (двукратное увеличение от минимума на 5 сутки), а в лимфатических узлах – лишь 12 % по отношению к контрольным мышам того же возраста. Восстановление Т-клеток в периферических лимфоидных органах тимэктомированных мышей после сублетального облучения не является полным: даже через 2 месяца (60 суток) после сублетального облучения полного восстановления Т-клеток в периферических лимфоидных органах тимэктомированных мышей не наблюдается.

Восстановление численности основных субпопуляций Т-лимфоцитов (Т-хелперов, ЦТЛ, DN-клеток) происходит одинаково, однако восстановление цитотоксических лимфоцитов несколько отстает от восстановления Т-хелперов и

CD4⁻CD8⁻ клеток. Динамика изменения численности всех «возрастных» субпопуляций Т-клеток (наивных Т-клеток, центральных и эффекторных клеток памяти, терминально-дифференцированных Т-клеток), а также регуляторных Т-клеток характеризуется отсутствием статистически достоверных колебаний вплоть до 60 суток в отличие от нетимэктомированных облученных мышей, у которых идет медленное восстановление до 30 суток, а затем – резкое усиление регенерации, заканчивающейся полным восстановлением всех субпопуляций до уровня контрольных мышей к 60 дню после облучения. Восстановление регуляторных Т-клеток практически полностью повторяет динамику регенерации численности данной субпопуляции у нетимэктомированных облученных мышей, достигая 80 % от количества Treg у контрольных мышей на 60 сутки после облучения.

Отмечается конверсия фенотипа наивных Т-клеток в Т-клетки памяти, которая у тимэктомированных облученных мышей в отличие от облученных мышей с тимусом носит необратимый характер. Соотношение наивных и Т-клеток памяти (Tnaive/Tcm) в лимфоузлах меняется в пользу Т-клеток памяти, изначально составляя 6:1 (контрольные мыши), достигая минимального значения 1,6:1 на 20 сутки, и 4,5:1 на 60 сутки после облучения. Соотношение Tnaive/Tcm в селезенке тимэктомированных облученных мышей претерпевает следующую динамику: 3,2:1 у контрольных мышей, 0,8:1 на 10 сутки (пик гомеостатической пролиферации) и 1,1:1 на 60 сутки после облучения.

7. Пролиферативная активность Т-клеток тимэктомированных мышей после индукции лимфопении

Гомеостатическая пролиферация у тимэктомированных мышей является основным процессом, в результате которого происходит изменение численности Т-лимфоцитов во вторичных лимфоидных органах, поскольку у данных мышей отсутствует пополнение пула Т-клеток за счет тимопоэза. В настоящем исследовании было выявлено, что процент пролиферирующих Т-лимфоцитов (CD3⁺Ki-67⁺-клеток) статистически значимо увеличивается после облучения как в лимфатических узлах, так и в селезенке: отмечается статистически значимый

максимум пролиферации Т-клеток на 10 сутки с последующим снижением числа Т-лимфоцитов. Уровень гомеостатической пролиферации Т-клеток остается повышенным на протяжении всего периода восстановления – до 60 суток. В условиях тимэктомии подобный пик нельзя объяснить экстренным восстановлением тимуса на 10 сутки. По-видимому, феномен усиления пролиферативной активности имеет общую природу во всех органах иммунной системы при развитии дефицита Т-клеток и обусловлен наличием клеток, способных к пролиферации в условиях дефицита периферических Т-лимфоцитов.

Пик пролиферации на 10 сутки в лимфоузлах и селезенке сопровождается одновременным ростом процента пролиферирующих наивных Т-клеток (CD44^{lo}) и Т-клеток памяти (CD44^{hi}) с преимущественным увеличением процента пролиферирующих наивных Т-лимфоцитов. В дальнейшем процент пролиферирующих наивных Т-клеток снижается, но остается повышенным в сравнении с данным показателем у контрольных мышей. Однако при подсчете абсолютного количества пролиферирующих наивных и Т-клеток памяти обнаруживается, что только в селезенке пик пролиферации на 10 сутки сопровождается одновременным ростом абсолютного числа пролиферирующих наивных Т-клеток до уровня контрольных мышей. К тому же выявлен их высокий уровень пролиферации в селезенке на всем протяжении восстановления после сублетального облучения. В лимфатических узлах абсолютное содержание пролиферирующих наивных Т-лимфоцитов даже на 10 сутки остается крайне низким и составляет лишь 30,9 % относительно контроля. Аналогичная картина наблюдается и с абсолютным количеством пролиферирующих Т-клеток памяти: динамика изменения числа пролиферирующих Т-клеток памяти в селезенке в сравнении с лимфатическими узлами характеризуется более высоким числом пролиферирующих клеток почти на всем протяжении периода восстановления после сублетального облучения при соблюдении тех же закономерностей и обусловлена более высокой представленностью Т-клеток памяти в селезенке и зависит от уровня заполненности ниши для Т-клеток памяти.

Пролиферативная активность CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток во вторичных лимфоидных органах имеет сходную динамику. Максимальная пролиферативная активность Т-киллеров в лимфоузлах и селезенке, а также Т-хелперов в лимфоузлах отмечается на 10 сутки. Однако отмечается смещение по времени пика пролиферативной активности Т-хелперов селезенки с 10-х на 20-е сутки после сублетального облучения (на ранних этапах статистически значимое увеличение пролиферативной активности CD4⁺ Т-клеток отсутствует).

Таким образом, значимое усиление гомеостатической пролиферации у тимэктомированных мышей наступает только на 10 сутки после воздействия радиации. По-видимому, это обусловлено инертностью молекулярных механизмов, отвечающих за включение механизма гомеостатической пролиферации. Можно констатировать, что при индуцированной лимфопении (снижении числа Т-клеток - как наивных, так и клеток памяти) в отсутствие тимуса восстановления клеточности вторичных лимфоидных органов не происходит вследствие отсутствия поступления новых Т-клеток из тимуса, а гомеостатическая пролиферация после пика на 10 сутки снижается вследствие истощения клеток, способных к пролиферации. Следовательно, гомеостатическая пролиферация сама по себе (без тимопоэза) неспособна восстановить недостаток Т-клеток.

8. Роль ИЛ-7 в поддержании гомеостаза и восстановлении численности

Т-клеток после индукции лимфопении в отсутствие тимопоэза у мышей

ИЛ-7 является основным лимфопоэтическим фактором, а также гомеостатическим фактором, необходимым для поддержания выживаемости Т-лимфоцитов. Еженедельное введение ИЛ-7 тимэктомированным сублетально облученным мышам существенно не изменяло динамику восстановления Т-клеток в лимфатических узлах. Несмотря на значимые отличия на 10 сутки для Т-хелперов и ЦТЛ (одинаковое увеличение в 1,7 раза) и на 30 сутки только для ЦТЛ (увеличение в 1,4 раза), к 60 суткам после облучения численность Т-клеточных субпопуляций в обеих группах не имела статистически значимых отличий. В то же время в селезенке введение ИЛ-7, статистически значимо не влияя на динамику

восстановления обеих субпопуляций Т-клеток, приводило к еще более выраженному их дефициту на 60 сутки после облучения.

При введении ИЛ-7 в лимфатических узлах на 10 сутки отмечалось увеличение численности наивных ЦТЛ, а на 30 сутки уменьшение численности Т-хелперов с фенотипом центральных Т-клеток памяти, в селезенке на 10 сутки – одновременное уменьшение количества наивных Т-хелперов и Т-хелперов с фенотипом центральных Т-клеток памяти. Кроме того, введение ИЛ-7 приводило к выраженному усилению гомеостатической пролиферации на 30 сутки. Отличия по численности Ki-67-позитивных клеток при сравнении с мышами, не получавшими ИЛ-7, на 30 сутки были статистически значимыми для суммарных популяций Т-хелперов и ЦТЛ во всех вторичных лимфоидных органах, а также всех возрастных субпопуляций ЦТЛ за исключением наивных ЦТЛ в селезенке. К 60 суткам численность пролиферирующих Т-лимфоцитов снижалась до уровня мышей, не получавших ИЛ-7, а в случае ЦТЛ селезенки – даже ниже этого уровня.

Следовательно, введение ИЛ-7 в отсутствие тимопоэза неспособно компенсировать недостаточную регенерацию периферического отдела Т-клеточного звена иммунной системы при лимфопении, индуцированной сублетальным облучением. Повышение уровня гомеостатической пролиферации на фоне введения рекомбинантного ИЛ-7 в отсутствие поступления наивных Т-клеток ведет к усилению феномена конверсии фенотипа оставшихся наивных Т-лимфоцитов в центральные Т-клетки памяти и относительному накоплению последних, возможно, гибели части активно пролиферирующих Т-клеток и, как следствие, к более выраженному дефициту основных Т-клеточных популяций в селезенке через 2 месяца после облучения.

9. Гомеостатические процессы популяции Т-лимфоцитов тимэктомированных мышей после индукции лимфопении в отсутствие молекул МНС-I

Известно, что помимо влияния ИЛ-7, выживаемость Т-лимфоцитов поддерживается сигналами, поступающими от Т-клеточного рецептора в результате распознавания молекул МНС и аутологических пептидов. Методом ПЦР был

проведен отбор мышей-гомозигот, нокаутных по гену *бета2-микроглобулина (b2m)*, без которого невозможна экспрессия МНС I класса, и, соответственно, нормальная дифференцировка CD8⁺ Т-клеток в тимусе.

Сублетальное облучение тимэктомированных нокаутных по *b2m* мышей приводило к выраженному снижению всех клеток во вторичных лимфоидных органах, в том числе и Т-лимфоцитов, с наиболее низким их уровнем на 5 сутки после воздействия радиации. Динамика восстановления Т-клеток в селезенке носила волнообразный характер с повышением к 20 суткам и некоторым снижением к 30 суткам, однако это повышение не достигало содержания Т-лимфоцитов у необлученных тимэктомированных нокаутных по *b2m* мышей ($P=0,03$). Выраженная пострadiационная Т-лимфопения в большей степени затрагивала лимфатические узлы, чем селезенку, а последующее восстановление было малоэффективным и в основном происходило в селезенке.

Развившаяся Т-лимфопения в равной степени затрагивала все основные Т-клеточные субпопуляции: Т-хелперы, ЦТЛ и Treg. Полного восстановления клеточности, Т-клеток и их основных субпопуляций у этих мышей во вторичных лимфоидных органах в течение 30 дней не происходило.

Изменение возрастного фенотипа субпопуляций Т-хелперов (наивных и центральных клеток памяти) у тимэктомированных нокаутных по *b2m* сублетально облученных мышей характеризовалось снижением как наивных Т-хелперов, так и лимфоцитов с фенотипом центральных Т-клеток памяти, но с изменением соотношения в пользу последних – конверсией фенотипа Т-хелперов и относительным накоплением «суррогатных» Т-хелперов памяти преимущественно в селезенке.

После сублетального облучения тимэктомированных нокаутных по *b2m* мышей уровень гомеостатической пролиферации субпопуляций Т-хелперов возрастал как в лимфатических узлах, так и в селезенке, несколько снижаясь для большинства исследованных субпопуляций к 30 суткам восстановительного периода, но оставаясь статистически значимо выше уровня пролиферации до облучения. Таким образом, наивные Т-хелперы лимфатических узлов и селезенки

нокаутных по *b2m* сублетально облученных мышей активно пролиферируют в условиях лимфопении, изменяя экспрессию поверхностных маркеров (конверсия фенотипа наивных Т-клеток, не контактировавших с антигеном) и пополняют пул лимфоцитов с фенотипом центральных Т-хелперов памяти («суррогатные» Т-клетки памяти).

10. Динамика изменений численности, субпопуляционного состава, фенотипа и пролиферативной активности Т-клеток в лимфоидных органах линейных мышей

Т-клеточное звено иммунной системы мышей характеризуется наличием двух периодов – бурного роста численности Т-клеток, продолжающегося до 30 суток в тимусе и до 60 суток во вторичных лимфоидных органах и постепенного угасания, продолжающегося до конца жизни. В первые 30 дней жизни мышей происходит увеличение количества тимоцитов. Оно происходит за счет роста всех субпопуляций тимоцитов, находящихся на разных стадиях дифференцировки: дубль-негативных (DN) – в 3 раза, дубль-позитивных (DP) – в 2,2 раза; сингл-позитивных CD4⁺ (SP CD4⁺) – в 2,5 раза; SP CD8⁺ – в 4 раза. Анализ клеточного состава тимуса мышей в первый месяц жизни указывает на продолжающееся формирование органа в постнатальный период и усиление тимопоэза в этот период. Начиная с 30 дня, и до конца жизни происходит постепенная инволюция тимуса, которая сопровождается уменьшением числа всех субпопуляций тимоцитов: DN – в 5 раз; DP – в 11 раз; SP CD4⁺ – в 14 раз; SP CD8⁺ – в 8 раз. Интересным наблюдением представляется обнаруженная разница в динамике субпопуляций DN-timoцитов. Так, изменение числа DN1-timoцитов, эмигрантов пре-Т-клеток из костного мозга, в наименьшей мере зависит от возраста, что говорит об опережающих темпах инволюции тимуса в сравнении с ослаблением функции костного мозга.

Анализ данных по числу основных субпопуляций Т-клеток и их «возрастного» фенотипа показал, что для всех популяций характерен бурный рост в первые 60 дней. Затем в лимфатических узлах наблюдается постоянное снижение всех

субпопуляций за исключением CD4-8- Т-лимфоцитов, численность которых даже увеличивается к концу жизни. В селезенке же снижение численности основных субпопуляций начинается только на втором году жизни после стадии плато и даже роста для регуляторных Т-клеток, а динамика CD4-8- Т-лимфоцитов носит волнообразный характер. Таким образом, возрастные изменения периферического звена Т-клеточного иммунитета наиболее выражены в лимфатических узлах, что обусловлено преимущественной локализацией в них наивных Т-клеток, численность которых в наибольшей мере подвержена возрастной инволюции. Исследование содержания регуляторных Т-клеток показало, что, несмотря на уменьшение с возрастом числа регуляторных Т-клеток, доля их среди CD4+ Т-клеток растет в течение всей жизни как в лимфатических узлах (с 10 до 26 %), так и в селезенке (с 13 до 19 %), что свидетельствует о меньшей зависимости данной субпопуляции от возрастных изменений Т-клеточных ниш. В наименьшей же мере от возраста зависит динамика числа CD4-8- Т-клеток, за исключением первых двух месяцев жизни, когда происходит формирование периферической иммунной системы, что позволяет предположить меньшую зависимость данной субпопуляции от функции тимуса.

В первые два месяца жизни и в селезенке, и в лимфатических узлах отмечалось увеличение численности как наивных Т-клеток, так и центральных Т-клеток памяти среди хелперных (CD4+) и цитотоксических (CD8+) субпопуляций. Рост числа наивных Т-клеток более выражен и обусловлен усилением тимопоэза, увеличение числа центральных Т-клеток памяти объясняется повышенным уровнем гомеостатической пролиферации Т-клеток в данный период времени, которая в случае наивных Т-клеток приводит к конверсии фенотипа в Т-клетки памяти без контакта с антигеном. Начиная с 60 дня во всех вторичных лимфоидных органах происходит неуклонное снижение числа наивных Т-клеток как хелперных (в 14–17 раз), так и цитотоксических (в 6 раз) субпопуляций, что соответствует уровню снижению числа SP CD4+ и SP CD8+ тимоцитов и говорит о связи наблюдаемого снижения с процессом инволюции тимуса. Численность же центральных CD4+ Т-клеток памяти остается неизменной, а центральных CD8+ Т-клеток памяти даже

увеличивается в лимфатических узлах в 2 раза и в селезенке почти в 5 раз. Нужно отметить, что с возрастом соотношение наивных Т-клеток и центральных Т-клеток памяти меняется в пользу последних.

Динамика уровня пролиферации имела одинаковую возрастную зависимость и в лимфатических узлах, и в селезенке. Высокий уровень пролиферации в первые дни жизни, от 30 до 50 % Ki-67+ наивных Т-клеток и от 50 до 70 % Ki-67+ Т-клеток памяти, снижался к 60 суткам до 5 % среди наивных Т-клеток и 15–30 % среди Т-клеток памяти, далее оставаясь неизменным на протяжении всей жизни.

Итак, возрастные изменения Т-клеточного звена иммунной системы у мышей характеризуются наличием периодов ранней и поздней Т-лимфопении, при этом возрастная динамика Т-лимфоцитов, начиная с периода полового созревания, сходна с восстановительными процессам после воздействия радиации. Период ранней Т-лимфопении обусловлен становлением Т-клеточного звена иммунной системы в первые два месяца жизни мыши, является обратимым, характеризуется усилением тимопоэза и повышенным уровнем гомеостатической пролиферации. Формирование центральных Т-клеток памяти в ходе устранения лимфопении раннего периода обусловлено конверсией фенотипа наивных Т-клеток, но при этом соотношение наивных Т-клеток и центральных Т-клеток памяти постепенно меняется в пользу первых за счет преобладания уровня тимопоэза над пролиферацией. Т-лимфопения позднего периода начинает развиваться с 60 дня жизни мыши, является необратимой, характеризуется низким уровнем гомеостатической пролиферации и обусловлена инволюцией тимуса и возрастными изменениями Т-клеточных ниш. Причем уменьшение численности Т-клеток происходит в основном за счет снижения численности наивных Т-клеток с изменением соотношения наивных Т-клеток и центральных Т-клеток памяти в пользу последних. Успешность устранения Т-лимфопении разного генеза обусловлено сохранностью тимопоэза и гомеостатической пролиферации, как одного из факторов, определяющих понятие клеточной ниши.

Заключение

В методических рекомендациях представлены данные, показывающие необходимость исследования пролиферативной активности и «возрастного» фенотипа Т-клеток после облучения, от которых напрямую зависит регенерация Т-клеточной популяции в период пострадиационного восстановления, а также предложена адаптированная методика для оценки этих процессов.

Показано, что одни и те же механизмы поддержания гомеостаза Т-клеток приводят к различным последствиям в случае пострадиационной Т-лимфопении, пострадиационной Т-лимфопении в отсутствие тимопоэза и возрастных лимфопений раннего и позднего периода. Разница эта определяется вкладом тимопоэза и гомеостатической пролиферации в регенерацию Т-клеточного звена иммунной системы. В частности, периферические механизмы восстановления численности Т-клеток носят кратковременный эффект, приводят к накоплению «суррогатных» Т-клеток памяти и оказываются совершенно неэффективны в отсутствие поступления наивных Т-клеток из тимуса. Только адекватное функционирование центральных и периферических лимфоидных органов способно обеспечить качественное и количественное постоянство периферических Т-клеток. И в контексте возможной коррекции возрастных иммунодефицитов видится малоперспективным использование трансплантации центральных органов иммунной системы (костный мозг и тимус) без коррекции периферических Т-клеточных ниш, в частности клеточной стромы в лимфатических узлах и селезенке, гормонального и цитокинового фона.

Предложенные методы могут быть рекомендованы для более детального анализа событий, происходящих на клеточном и молекулярном уровнях в период регенерации лимфоидной ткани при восстановлении Т-клеточного звена иммунной системы после действия ионизирующей радиации.

Библиография

- [1] Andreson, R.E. Radiosensitivity of T and B lymphocytes. I. Effect of irradiation on cell migration / R.E. Andreson, J. Sprent, J.F. Miller // *Eur.J.Immunol.*- 1974.- V. 4 (3).- P. 199-203.
- [2] Sprent, J. T cell homeostasis / J. Sprent, J.-H. Cho, O. Boyman, C.D. Surh // *Immunology and Cell Biology.* – 2008. – V. 86. – P. 312–319.
- [3] Cho, B.K. Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells / B.K. Cho, V.P. Rao, Q. Ge, et al. // *J. Exp. Med.* - 2000. - Vol.192. - P. 549-556.
- [4] Kieper, W.C. Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naive T cells in response to self peptide/MHC ligands / W.C. Kieper, S.C. Jameson // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1999. - Vol.96. - P. 13306-13311.
- [5] Sprent, J. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells / J. Sprent, C.D. Surh // *Nature. Immunology.* - 2011. - Vol.12. - P. 478-484.
- [6] Goldrath, A.W. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis driven proliferation / A.W. Goldrath, L.Y. Bogatzki, M.J. Bevan // *J Exp Med.* 2000. - Vol. 192.- P. 557–564.
- [7] Sallusto, F. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance / F. Sallusto, J. Geginat, A. Lanzavecchia // *Annu. Rev. Immunol.* - 2004. – Vol. 22. - P. 745–763.
- [8] Ярилин, А.А. Гомеостатические процессы в иммунной системе. Контроль численности лимфоцитов / А.А. Ярилин // *Иммунология.* – 2004. – Т. 25. - № 5. - С. 312-320.
- [9] Gleeson, P.A. Organ-specific autoimmunity induced by lymphopenia / P.A. Gleeson, B.H. Toh, I.R. van Driel // *Immunol. Rev.* - 1996. - Vol. 149. - P. 97–125.

Библиографические данные

УДК 612.017.1:576.3

МКС 11.100; 13.280

Ключевые слова: ионизирующая радиация, лимфопения, гомеостатическая пролиферация, восстановление иммунной системы.

Список исполнителей**Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии»
Федерального медико-биологического агентства
(ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России)**

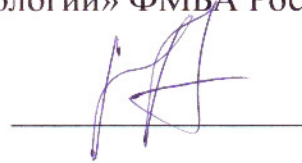
Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации

Группа 12. Требования к профилактике заболеваний, защите населения от повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья и оказанию медико-социальной помощи

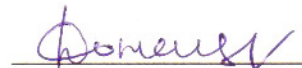
Цитометрическая оценка пролиферативной активности и конверсии фенотипа**T-клеток после облучения как критерии пострadiационного восстановления**

Методические рекомендации

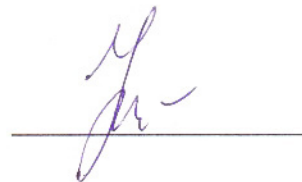
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России МР.12 № 1 –2024

Заведующий лабораторией
дифференцировки
лимфоцитов, канд. мед. наук

Митин А.Н.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории дифференцировки
лимфоцитов, д-р мед. наук, доцент

Донецкова А.Д.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории дифференцировки
лимфоцитов, канд. биол. наук

Шарова Н.И.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории дифференцировки
лимфоцитов, канд. биол. наук

Никонова М.Ф.

Старший научный сотрудник
лаборатории дифференцировки
лимфоцитов, канд. биол. наук

Литвина М.М.

Старший научный сотрудник
лаборатории дифференцировки
лимфоцитов, канд. биол. наук

Комогорова В.В.