

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«НИЖЕГОРОДСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.Н. БЛОХИНОЙ»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

Воронина Елена Викторовна

**СОЗРЕВАНИЕ Т-ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ ХЕЛПЕРОВ В МОДЕЛЯХ IN
VITRO И ПРИ HELICOBACTER PYLORI-ИНФЕКЦИИ IN VIVO**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Специальность:

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор

В. Ю. Талаев

Нижний Новгород

2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ	9
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1. Субпопуляционный состав CD4 ⁺ Т-лимфоцитов.....	17
1.1.1. Т-хелперы 1 типа	18
1.1.2. Т-хелперы 2 типа	19
1.1.3. Т-хелперы 17.....	19
1.1.4. Т-регуляторные клетки.....	20
1.1.5. Т-хелперы 9.....	21
1.1.6. Т-хелперы 22.....	22
1.1.7. Фолликулярные Т-хелперы (краткая характеристика).....	22
1.2. Зона локализации Тфх и происходящие в ней процессы... ..	24
1.3. Созревание Тфх	28
1.4. Мембранные молекулы в созревании и функционировании Тфх.....	37
1.4.1. Молекулы костимуляции: CD80, CD86 и CD28; CD40 и CD40L	37
1.4.2. Молекулы ICOS и ICOSL.....	39
1.4.3. Молекулы OX40 и OX40L	41
1.4.4. Молекулы семейства SLAM и другие рецепторы.....	43
1.4.5. Негативные регуляторы функционирования Тфх.....	44
1.5. Цитокины в созревании и функционировании Тфх.....	45
1.6. Транскрипционные факторы, управляющие созреванием Тфх	49
1.6.1. Факторы, стимулирующие развитие Тфх.....	49
1.6.2. Факторы, угнетающие развитие Тфх.....	52
1.7. МикроРНК и созревание Тфх	53

1.8 Атипичная функция Тфх при инфекции, обусловленной <i>H. pylori</i>	54
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	57
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	76
3.1. Характеристика использованных в работе клеточных популяций.....	76
3.1.1. Характеристика наивных CD4 ⁺ Т лимфоцитов	76
3.1.2. Сравнительная характеристика фенотипа CD4 ⁺ CD45RO ⁻ CXCR5 ⁺ Т-клеток	81
3.1.3. Характеристика дендритных клеток, использованных для создания смешанных культур... ..	86
3.1.4. Характеристика В-лимфоцитов, использованных для создания смешанных культур	90
3.2 Созревание фолликулярных Т-хелперов при стимуляции наивных Т-лимфоцитов различными антигенпрезентирующими клетками in vitro	92
3.2.1. Морфологические и фенотипические проявления созревания CD4 ⁺ Т-лимфоцитов in vitro	92
3.2.2. Экспрессия хемокиновых рецепторов на CD4 ⁺ Т-клетках смешанных культур с различными АПК.....	96
3.2.3. Фенотипическая характеристика групп Т-хелперов с различными наборами хемокиновых рецепторов.....	104
3.2.4. Экспрессия ядерного фактора транскрипции Bcl-6 в CD4 ⁺ лимфоцитах и лимфобластах, созревших с антигенпрезентирующими клетками.....	109
3.2.5. Влияние ингибирования ядерного фактора транскрипции Bcl-6 на созревание Т-клеток в смешанных культурах с В-лимфоцитами.....	117
3.3. Изменение свойств В-лимфоцитов при взаимодействии с	

Т-хелперами in vitro.....	120
3.3.1. Индукция экспрессии ядерного фактора транскрипции Bcl-6 в В-лимфоцитах смешанных культур.....	120
3.3.2. Изменение экспрессии IgM на В-лимфоцитах.....	123
3.4. Исследование фенотипа Т-хелперов при заболеваниях, ассоциированных с <i>H.pylori</i> -инфекцией	125
4.ОБСУЖДЕНИЕ	131
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	135
ВЫВОДЫ.....	137
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	138
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	138
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	139

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПК – антигенпрезентирующие клетки

ВГВ – вакцина гепатита В

ГА – гидроксид алюминия

ДК – дендритные клетки

ДК-ЦТК – зрелые дендритные клетки, стимулированные смесью провоспалительных цитокинов и простагландином E2

ДНК – дизоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КОЕ – колониеобразующие единицы

КП - короткоживущие плазмоциты

ЛУ – лимфатический узел

МНПК – моноклеарные клетки периферической крови

мРНК – матричная РНК

нДК – незрелые дендритные клетки

нТх – наивные Т-хелперы

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

РНК – рибонуклеиновая кислота

СКВ – системная красная волчанка

Тфр – Т-фолликулярные регуляторные клетки

Тфх – Т-фолликулярные хелперы

Тх – Т-хелперы

Тх1 – Т-хелперы 1 типа

Тх17 – Т-хелперы 17

Тх2 – Т-хелперы 2 типа

Тх22 – Т-хелперы 22

Тх9 – Т-хелперы 9

ФДК – фолликулярные дендритные клетки

AhR – арил-гидрокарбоновый рецептор

AID – индуцируемая активацией цитидин деаминаза

Akt – RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, Protein kinase B alpha

Ascl2 – Achaete-scute complex homolog 2

ATR – атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок

BATF – Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like

Bcl-6 – белок 6 В-клеточной лимфомы

BCOR – Bcl-6-корепрессоры

BCR – В-клеточный рецептор

CCL – хемокин CC-семейства

CCR – рецептор хемокинов CC-семейства

CD – кластер дифференцировки

CHEK1 – Checkpoint kinase 1

CIA – коллаген-индуцированный артрит

CrG – участки ДНК, содержащие цитозин и гуанин, разделенные фосфатом

CTBP1 – C-конец связывающий белок

CTLA-4 (CD152) – cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

CXCL – хемокин CXС-семейства

CXCR – рецептор хемокинов CXС-семейства

EGF – амфирегулин

FOXO – forkhead box protein O

FSC – прямое светорассеивание

GITR – глюкокортикоид-индуцированный TNFR-связывающий белок

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

HLA-DR – человеческий лейкоцитарный антиген II класса

Hsp – белки теплового шока

ICOS – мембранный белок, индуцибельный Т-клеточный костимулятор

IFN – интерферонрегуляторные факторы

IFN γ – интерферон-гамма

IFN γ R – интерферон-гамма рецептор

IgA – иммуноглобулины класса А

IgD – иммуноглобулины класса D

IgE – иммуноглобулин класса E

IgG – иммуноглобулин класса G

IgM – иммуноглобулины класса M

IL – интерлейкин

IRF – интерферон-регулирующие транскрипционные факторы

Jak – янус-киназа

KLF – Krüppel-like Factor

KLF – Krüppel-подобный фактор транскрипции

LCMV – вирус лимфоцитарного хориоменингита

LT α – лимфотоксин-альфа

LT β R – лимфотоксин бета рецептор

MHC – главный комплекс гистосовместимости

miRNA – микроРНК

MTA3 – Metastasis-associated protein

MUC – муцины

NCOR – ядерный рецептор корепрессор

NFAT – ядерный фактор активированных Т-клеток

NF- κ B – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NK – естественные киллеры

NKT – натуральные киллеры Т-клетки

NO – оксид азота

OX40 (CD134, TNFRSF4) – мембранный белок, рецептор надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли

PD-1 (CD279) – мембранный белок надсемейства иммуноглобулинов

PI3K – фосфоинозитид-3-киназы

PLZF – Promyelocytic leukaemia zinc finger protein

PRDM1 – PR domain zinc finger protein 1

PSGL1 – гликопротеиновый лиганд P-селектина 1

PTEN – phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10

ROR γ t – RAR related orphan receptor gamma

S1PR1 – Sphingosine-1-phosphate receptor 1

SAP – SLAM-ассоциированные белки

SLAM – signaling lymphocytic activation molecule

SSC – боковое светорассеивание

STAT – сигнальные белки и активаторы транскрипции

TBK1 – серин-треониновые TANK-связывающие киназы

TCR – Т-клеточный рецептор

TGF – трансформирующий ростовой фактор бета

TNF – фактор некроза опухоли

TRAF – рецептор фактора некроза опухоли

Treg – Т-регуляторные лимфоциты

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы и степень её разработанности

Диссертационная работа направлена на изучение созревания фолликулярных Т-хелперов человека. Фолликулярные Т-хелперы (Тфх) – одна из субпопуляций $CD4^+$ Т-лимфоцитов, основной функцией которой является стимуляция гуморального иммунного ответа. Под контролем Тфх происходит формирование герминативных центров внутри лимфоидного фолликула, созревают В-лимфоциты, способные к переключению изотипов иммуноглобулинов, долгоживущие плазмocyты и В-клетки памяти [Fazilleau N. et al., 2009; Ma C.S. et al., 2012]. Фенотип зрелых Тфх, выделенных из лимфоидных органов человека, характеризуется присутствием на поверхности клетки следующих маркеров: $CD4$, $CD45RO$, $CXCR5$ и отсутствием $CCR7$. Хемокиновый рецептор $CXCR5$ необходим Тфх для миграции и удержания клеток в В-клеточной зоне вторичных лимфоидных органов [Топтыгина А.П., 2012; McHeyzer-Williams L. et al., 2009]. Также зрелые Тфх продуцируют $IL-21$ и $IL-4$ и отличаются высокой экспрессией молекул $ICOS$, $PD-1$, $OX40$ и $CD40L$ [Nurieva R. I. et al., 2008; Crotty S., 2011]. Созреванием Тфх управляет ядерный репрессор транскрипции $Bcl-6$. Транскрипционный фактор $Bcl-6$ способствует экспрессии генов, придающих специфический фенотип Тфх [León B. et al., 2012; Hatzi K. et al., 2015].

Предполагается, что для дифференцировки в Тфх наивным $CD4^+$ Т-лимфоцитам необходимо распознать клоноспецифический антиген на дендритных клетках в Т-клеточной зоне лимфатического узла, экспрессировать хемокиновый рецептор $CXCR5$ для миграции в В-клеточную зону, и там вступить в когнатные взаимодействия с В-лимфоцитами для завершения созревания [Fazilleau N. et al., 2009]. Мнение об участии дендритных клеток в такой двухстадийной схеме созревания основано на данных о частичном ослаблении созревания Тфх в мышцах, лишенных $CD11c^+$ дендритных клеток и способности дендритных клеток в отсутствии $MHCII^+$ В-клеток стимулировать дифференцировку Тх с отдельными

фенотипическими свойствами Тфх. В то же время, Тх, индуцированные избирательной стимуляцией с помощью дендритных клеток *in vivo*, лишены функциональных свойств Тфх [Goenka R. et al., 2011]. Роль В-лимфоцитов подтверждается угнетением созревания Тфх при искусственном дефиците В-лимфоцитов или дефекте их взаимодействия с Т-клетками [Salek-Ardakani S. et al., 2011].

В определенных ситуациях В-лимфоциты, по-видимому, могут быть единственными антигенпрезентирующими клетками, индуцирующими дифференцировку Тфх. Такая возможность показана для дифференцировки Тфх из частично дифференцированных центральных Т-клеток памяти [Chevalier N. et al., 2011]. Однако возможность созревания Тфх из недифференцированных наивных Т-клеток под действием В-лимфоцитов без участия дендритных клеток не исследована.

Усиление созревания Тфх вносит вклад в патогенез аутоиммунных заболеваний с гиперпродукцией аутоантител, а ослабление их созревания может обуславливать слабость гуморального иммунного ответа. При некоторых заболеваниях патогенетическая роль Тфх может быть обусловлена атипичными функциями этой субпопуляции. Так, предполагается, что при инфекции, ассоциированной с *Helicobacter pylori*, Тфх могут не только стимулировать продукцию антител, но и усиливать созревание провоспалительных Т-хелперов 1 типа и Т-хелперов-17 [Ma C.S. et al., 2012; Leber A. et al., 2016].

В связи с этим, изучение ранних процессов дифференцировки Тфх из наивных Т-лимфоцитов является актуальной научной задачей. Понимание специфики созревания Т-фолликулярных хелперов необходимо для расширения представлений о клеточных взаимодействиях при индукции иммунного ответа на инфекцию, а также при развитии аутоиммунных патологий. Данная диссертационная работа посвящена изучению возможности созревания Тфх из наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов при контакте с В-лимфоцитами. Для этого

исследовалась потенциальная возможность наивных Т-лимфоцитов, а также дендритных клеток мигрировать в В-клеточные зоны лимфоидных органов для встречи с В-клетками, а затем изучалось созревание Тфх из наивных Тх в условиях *in vitro* при стимуляции В-лимфоцитами. Полученные данные сравнивались с результатом созревания Тфх под действием дендритных клеток.

Цель работы:

Изучить созревание Т-фолликулярных хелперов в моделях *in vitro* и при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией.

Задачи исследования:

1. Разработать модели иммунных реакций *in vitro* для изучения процессов межклеточной кооперации при созревании Т-фолликулярных хелперов.

2. Оценить экспрессию хемокинового рецептора CXCR5, необходимого для миграции в В-клеточные зоны лимфоидных органов, а также молекул, ассоциированных с функцией Т-хелперов, на циркулирующих наивных CD4⁺ Т-лимфоцитах и на дендритных клетках.

3. Исследовать возможность и особенности созревания Т-фолликулярных хелперов при культивировании с В-лимфоцитами или дендритными клетками.

4. Оценить экспрессию транскрипционного фактора Bcl-6, управляющего созреванием Т-фолликулярных хелперов и В-лимфоцитов герминативных центров, в клетках смешанных культур.

5. Исследовать изменения содержания Т-фолликулярных хелперов при заболеваниях желудка и двенадцатиперстной кишки, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией.

Научная новизна

Впервые показано, что среди незрелых рециркулирующих CD45RO⁺ Т-хелперов обнаруживается группа клеток, несущая молекулы хоминга, ассоциированные с миграцией не только в Т-клеточную зону лимфоидных

органов, но и в фолликулы и перифолликулярную зону. Охарактеризован активационный статус данной группы клеток.

Показано, что различные стимуляторы способны индуцировать экспрессию хемокинового рецептора CXCR5 на дендритных клетках, что может позволить данным клеткам мигрировать в область В-клеточных фолликулов.

Впервые показано, что наивные Т-хелперы, культивируемые в присутствии только дендритных клеток, не приобретают характерного фенотипа Т-фолликулярных хелперов. Стимулирующие сигналы от дендритных клеток способствуют созреванию Т-клеток с фенотипом эффекторов или эффекторных Т-клеток памяти $CD4^+CD45RO^+CCR7^-CXCR5^-$, а также $CD4^+CD45RO^+CCR7^+CXCR5^+$ Т-хелперов с высоким уровнем экспрессии ICOS, PD-1, OX40. Одновременная экспрессия CCR7 и CXCR5 свидетельствует о возможности миграции $CCR7^+CXCR5^+$ клеток, как в Т-клеточную зону лимфоидных органов, так и в В-клеточные фолликулы.

Впервые установлено, что стимуляция наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов при помощи В-лимфоцитов приводит к созреванию Т-клеток с фенотипом Т-фолликулярных хелперов: они экспрессируют ядерный фактор транскрипции Bcl-6, несут молекулы CD45RO, CXCR5, ICOS, PD-1, OX40, CD40L и утрачивают экспрессию хемокинового рецептора CCR7. Впервые показано, что созревание Т-лимфобластов в смешанных культурах Т- и В-лимфоцитов замедляется в присутствии ингибитора Bcl-6.

Выявлено увеличение экспрессии ядерного фактора транскрипции Bcl-6 и снижение экспрессии мембранного IgM В-лимфоцитами смешанных культур с Т-хелперами, что служит свидетельством взаимной стимуляции созревающих Т-фолликулярных хелперов и В-клеток.

При язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией, впервые выявлено увеличение количества фолликулярных Т-хелперов и появление среди них минорной группы $CD4^+CD45RO^+CXCR5^+CCR6^+$ клеток, ассоциированных с миграцией в лимфоидные ткани желудочно-кишечного тракта.

Теоретическая и практическая значимость работы

Изучен процесс созревания Т-фолликулярных хелперов – важного этапа индуктивной фазы гуморального иммунного ответа. Установлено, что, по крайней мере, часть наивных Т-хелперов обладает возможностью прямой миграции в В-клеточные зоны лимфоидных органов, где эти клетки могут вступать в когнатные взаимодействия с В-лимфоцитами. В моделях *in vitro* показано, что процесс созревания Т-фолликулярных хелперов может быть индуцирован путем непосредственного взаимодействия Т-хелперов и В-лимфоцитов, без предварительного контакта с дендритными клетками. Эти данные существенно дополняют и расширяют представления о путях реализации гуморального иммунного ответа.

Были разработаны новые экспериментальные модели индуктивной фазы Т-зависимого гуморального иммунного ответа *in vitro*. Данные модели могут использоваться в современной клеточной иммунологии для изучения процессов межклеточной кооперации клеток иммунной системы в норме и при исследовании механизмов иммунного ответа при инфекционных и аутоиммунных заболеваниях. Использование разработанных моделей иммунных реакций позволит выявить ключевые молекулы, вовлеченные в индукцию гуморального иммунного ответа для создания принципиально новых способов терапии, направленной на стимуляцию недостаточного гуморального иммунного ответа на патогены или подавление аутоиммунных реакций, природа которых обусловлена усилением активности Т-фолликулярных хелперов и В-лимфоцитов.

Получены новые данные об изменении содержания патогенетически значимых субпопуляций Т-хелперов при язвенной болезни и гастродуодените, ассоциированном с *H. pylori*-инфекцией, что позволяет полнее представить роль иммунных процессов в патогенезе данной инфекции. Показано, что при язвенной болезни желудка в крови существенно увеличивается содержание активированных зрелых Т-хелперов, включая Т-фолликулярные хелперы и CCR6⁺

Т-хелперы, тогда как при гастродуодените происходит увеличение группы незрелых CXCR5⁺ Т-хелперов. Выявление двух разных типов изменений субпопуляционного состава Т-хелперов при язвенной болезни и гастродуодените дает возможность для совершенствования диагностики данных заболеваний желудочно-кишечного тракта, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией.

Результаты, полученные в ходе исследований, могут использоваться в рамках курсов иммунологии и микробиологии, читаемых для студентов биологических и медицинских специальностей.

Положения, выносимые на защиту

1. Наивные CD4⁺ Т-лимфоциты периферической крови человека содержат в своем составе малую группу клеток с хемокиновыми рецепторами, необходимыми для миграции как в Т-, так и в В-клеточные зоны вторичных лимфоидных органов, что создает условия для прямого контакта наивных Т-лимфоцитов и В-клеток.

2. В-лимфоциты при прямом контакте с наивными CD4⁺ Т-лимфоцитами способны индуцировать дифференцировку последних в клетки с фенотипом Т-фолликулярных хелперов и экспрессией ядерного фактора транскрипции Bcl-6. В то же время, при стимуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов дендритными клетками происходит преимущественное созревания клеток с фенотипом эффекторов и эффекторных Т-клеток памяти с фенотипом, отличным от Тфх.

3. Полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности локализации всего процесса созревания наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов в фолликулярные Т-хелперы в В-клеточной зоне периферических лимфоидных органов, где роль основных антигенпрезентирующих клеток могут исполнять В-лимфоциты.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяет значительный объем исследований с применением высокотехнологичных современных иммунологических и молекулярно-биологических методов исследования. Апробация диссертационной работы была проведена на совместном заседании Ученого Совета ННИИЭМ имени академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (протокол № 8.1 от 25 октября 2018 года). Результаты проведенных исследований были доложены на XXI Нижегородской сессии молодых ученых (Арзамасский р-н, Нижегородская обл., 2016); на Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной (Нижний Новгород, 2016), на заседаниях Ученого Совета ННИИЭМ имени академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.

Личный вклад автора

Обзор литературы по теме исследования, выделение Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и дендритных клеток, создание смешанных культур Т-лимфоцитов и антигенпрезентирующих клеток, культивирование клеток, подготовка проб и проведение ПЦР, окрашивание поверхностных и внутриклеточных маркеров, статистическая обработка и анализ данных исследований, подготовка материалов для публикаций, а также написание и оформление работы были осуществлены автором лично.

Публикации по теме диссертации

Результаты диссертации опубликованы в 14 печатных работах, из них 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 8 статей и тезисов в материалах всероссийских конференций.

Внедрение полученных результатов в практику

Результаты исследования внедрены в экспериментальную работу лаборатории иммунохимии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 168 стр., содержит 31 рисунок и 6 таблиц. Диссертация состоит из следующих разделов: список сокращений, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы, который включает в себя 4 отечественных и 346 зарубежных источников.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Субпопуляционный состав CD4⁺ Т-лимфоцитов

Важнейшим звеном адаптивной иммунной системы являются CD4⁺ Т-лимфоциты хелперы, оказывающие помощь другим иммунокомпетентным клеткам в реализации иммунного ответа. Секретируя определенный набор цитокинов, Т-хелперы способны положительно или негативно регулировать активность таких клеточных популяций, как В-лимфоциты, Т-киллеры, NK клетки, макрофаги и др. В 1986 году Coffman и Mossman описали две субпопуляции Т-хелперов: Т-хелперы первого и второго типа (Th1 и Th2) [207]. Основанием для этого разделения явилось различие наборов цитокинов, которые продуцировались этими двумя субпопуляциями клеток и определяли набор мишеней их хелперного действия. Согласно разработанной Mossman с соавт. концепции, Th1 и Th2 являются конкурирующими субпопуляциями, которые отвечают за развитие клеточных и гуморальных иммунных реакций, соответственно [207, 208]. Дальнейшие исследования существенно дополнили эту концепцию, и, по современным представлениям, наивный CD4⁺ Т-лимфоцит имеет большой выбор путей созревания в различные типы Т-хелперов. Из них наиболее охарактеризованы Th1 – стимуляторы клеточных иммунных реакций [68, 212], Th2 – стимуляторы эозинофилов и тучных клеток, которые также способствуют продукции IgE, но не являются критически необходимыми для секреции других изотипов иммуноглобулинов [221, 223], Th17 – стимуляторы нейтрофилов и В-лимфоцитов [11, 68] и Т-фолликулярные хелперы (Тfh) – основные стимуляторы гуморального иммунного ответа [91, 190]. Кроме того, описаны Th9, осуществляющие активацию тучных клеток, и Th22, принимающие участие в защите и восстановлении барьерных эпителиальных тканей. Наконец, CD4⁺ Т-лимфоциты содержат субпопуляцию Т-регуляторных клеток, обеспечивающих аутоотолерантность к собственным антигенам и сдерживающих чрезмерную активность клеток иммунной системы [264].

Наивные Th осуществляют выбор пути созревания в зависимости от цитокиновой атмосферы и костимулирующих сигналов, которые они получают от

антигенпрезентирующей клетки (АПК) в ходе распознавания клоноспецифического антигена. Результатом этой стимуляции является экспрессия ядерных факторов, которые активируют гены, необходимые для специфической функции определенной субпопуляции Т-хелперов. В процессе созревания Т-хелперы начинают синтезировать определенный набор цитокинов, характерный для каждой конкретной субпопуляции, и изменяют экспрессию мембранных молекул, необходимых для межклеточной кооперации. В частности, они экспрессируют рецепторы OX40 (CD134) и ICOS (CD278), воспринимающие стимулирующий сигнал от АПК [190], молекулу CD40L, которая передает стимулирующий сигнал в дендритную клетку (ДК) или В-лимфоцит [91, 190] и молекулу PD-1 (CD279), которая ограничивает активность зрелых Т-клеток [73, 307]. Кроме того, созревание эффекторных Т-клеток ведет к утрате хемокинового рецептора CCR7 и селектина CD62L, необходимых для хоминга в Т-клеточные зоны лимфоидных органов, и вызывает экспрессию молекул, необходимых для миграции в зону выполнения эффекторных функций.

1.1.1. Т-хелперы 1 типа

Индукторами развития Т-хелперов 1 типа являются внутриклеточные патогены, локализующиеся в цитоплазме, например, *Mycobacterium avium*, *Salmonella typhimurium*, вирус простого герпеса (HSV), ЛПС [4, 208, 233]. Наивный Тх приобретает фенотип Тх1 типа, распознавая главный комплекс гистосовместимости второго класса с пептидом антигена (МНСII–пептид) на поверхности АПК, в присутствии определенной цитокиновой атмосферы (интерлейкин-12 (IL-12), интерферон- γ (IFN γ), IL-18, IL-23, IL-27) [101, 138].

Активация IFN γ R и TCR приводит к экспрессии ядерного фактора T-bet [297]. T-bet критически необходим для выработки ключевого цитокина Тх1 – IFN γ , нокаут гена T-bet подавляет дифференцировку Тх1 и повышает синтез цитокинов, характерных для Тх2. IFN γ подавляет развитие Тх2 [297]. Такое подавление созревания наивного Т-хелпера в представителя «конкурирующей» субпопуляции является дополнительным механизмом, способствующим

поляризации иммунного ответа по Th1-зависимому пути. Роль IFN γ в реализации иммунного ответа заключается в активации макрофагов, повышении эффективности разрушения фагоцитированных ими патогенов, стимуляции воспаления и противовирусном действии. Нежелательный эффект чрезмерной активности провоспалительных цитокинов, продуцируемых Th1, связан с повреждением тканей клеточными иммунными реакциями и провоцированием развития аутоиммунных процессов [70, 325].

1.1.2. Т-хелперы 2 типа

Данная субпопуляция клеток обеспечивает защиту от паразитов и внеклеточных патогенов. Антигены вирусов оспы, кори, аллергены и протеазы многоклеточных паразитов служат основными индукторами созревания Th2 [208, 233]. Th2 отличаются продукцией IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-25 [161, 298]. Основным стимулятором созревания Th2 признан IL-4, который продуцируется самими Th2, тучными клетками и эозинофилами [154]. Сигналы от IL-4 активируют белок STAT6, который, в свою очередь, активирует ядерный фактор транскрипции GATA3. IL-4, главным образом, приводит к активации тучных клеток; кроме того, данный цитокин способствует пролиферации В-клеток и переключению изотипов иммуноглобулинов [58, 154]. Еще один продукт Th2, IL-9, способствует производству муцина эпителиальными клетками в очаге инфекции на слизистых [183]. IL-10 оказывает супрессивное воздействие на Th1 и воспаление [93]. Также для регуляции иммунного ответа на слизистых и защиты от гельминтов необходима продукция IL-13 [303, 331, 341]. Чрезмерная неконтролируемая активация Th2 приводит к развитию астмы и других аллергических патологий с гиперпродукцией IgE (аллергий реактивного типа).

1.1.3. Т-хелперы 17

Защиту от внеклеточных патогенов осуществляют Th17, развивающиеся независимо от Th1 и Th2 [321]. Они обладают уникальным фенотипом, который характеризуется экспрессией CD161, IL-23R, CCR6 и транскрипционного фактора

ROR γ t. Образование T γ 17 индуцируют IL-6, IL-23, TGF β и IL-1 β , которые, действуя через STAT3, активируют ядерный фактор транскрипции ROR γ t, что приводит к продукции клетками данного типа следующих цитокинов: IL-17A и IL-17F, IL-21, IL-22 [346, 103, 249, 306, 313].

Действие цитокинов, секретируемых самими T γ 17, имеет ярко выраженный провоспалительный характер. Так, продуцируемый этими лимфоцитами IL-17A, способствует синтезу провоспалительных IL-6 и IL-8 (CXCL8) [126]. IL-17A задействован в развитии и прогрессировании аутоиммунных заболеваний, таких как псориаз, синдром Шегнера, болезнь Крона. Совместное действие IL-17A и IL-17F позволяет активировать нейтрофилы при заражении внеклеточными бактериями или грибами [53, 153, 171, 269]. Секретция еще одного цитокина T γ 17 – IL-22 также приводит к активации нейтрофилов, что необходимо для обеспечения защиты от грамотрицательных бактерий и микобактерий [55, 174, 346].

1.1.4. Т-регуляторные клетки

Впервые естественные Т-регуляторные клетки (Treg) были описаны в 1995 г. С. Сакагучи (S. Sakaguchi) и соавторами [264]. Ядерный фактор транскрипции, управляющий созреванием Treg - Foxp3. Он является репрессором транскрипции генов провоспалительных цитокинов, но повышает экспрессию генов молекул CD25 и CTLA-4 [95].

Регуляторные Т-хелперы подразделяют на два подтипа: естественные Treg, созревающие в тимусе, и адаптивные Treg, созревающие в ходе развития иммунного ответа. Основной функцией естественных Treg является обеспечение аутоотолератности и предотвращение аутоиммунных процессов. Важной особенностью фенотипа Treg клеток является экспрессия ингибирующего рецептора CTLA-4 (CD152), который приводит к супрессии Т-клеточной активности. CTLA-4 конкурирует с CD28 за связывание с костимулирующими молекулами CD80 и CD86 на поверхности АПК [263].

Адаптивные регуляторные Т-хелперы образуются при иммунном ответе и служат фактором, ограничивающим иммунный ответ на его заключительных стадиях за счет действия CTLA-4 и продукции противовоспалительных цитокинов. Апативные Treg характеризуются экспрессией TGF β , IL-10 и IL-4. TGF β и IL-10 способствуют подавлению иммунного ответа, опосредованного функциональной активностью Th1 и Th2 [16, 17, 20, 173].

Огромное значение имеет баланс численности и активности Treg клеток. Чрезмерная активность данной популяции клеток может привести к ослаблению иммунной защиты от заболеваний инфекционной и опухолевой природы, а снижение их численности – к развитию аутоиммунных патологий [4].

1.1.5. Т-хелперы 9

В публикациях часто можно встретить ещё одну субпопуляцию Т-хелперов - Th9, названных в честь основного продуцируемого ими цитокина – IL-9. Th9 осуществляют активацию тучных клеток, способствующих защите от паразитарных инвазий и ответственных за развитие аллергических реакций. Тонко сбалансированная сигнализация, опосредованная совместным действием IL-4 и TGF β , приводит к индукции Th9, в то время как сигнал только через IL-4 способствует развитию Th2 [10, 108, 172]. Именно сигнал через TGF β , индуцирующий экспрессию ядерного фактора PU.1 из семейства ETS, критически необходим для дифференцировки Th9 [46, 300].

Показано, что Th9 и секретируемый ими IL-9 способствуют развитию воспалительных реакций, в которых решающее значение имеют тучные клетки [183, 254, 273].

При активации тучных клеток с помощью TGF β и провоспалительных медиаторов, секреция IL-9 приводила к развитию мастоцитоза пищевода. Исследования Ouyang и др. [229] и Dantas и др. [69] показали, что повышенные уровни мРНК IL-9, белка IL-9 в сыворотке и наличие Th9 в крови ассоциировано с развитием системной красной волчанки [175, 214]. Показано, что Th9 могут

способствовать развитию рассеянного склероза и приводят к воспалению в ЦНС [128].

1.1.6. Т-хелперы 22

Важную роль в осуществлении реакций врожденного иммунитета, а также в развитии аутоиммунных патологий играет эффекторная субпопуляция Тх22. Данная группа клеток продуцирует IL-22, IL-13, TNF- α и обладает экспрессией CCR4, CCR6 и CCR10 [78, 301]. От Тх17 их отличает низкий уровень экспрессии CD161 [160, 301]. Созревание Тх22 регулирует внутриклеточный арил-гидрокарбоновый рецептор (AhR) [210].

IL-22 взаимодействует с гетеродимерным рецептором, который состоит из цепей IL-22R1 и IL-10R2 [75, 79, 155, 167, 213, 238]. IL-22R1 экспрессируется на клетках эпителиальной ткани кишечника и легких, гепатоцитах, ацинарных клетках поджелудочной железы [328, 333]. IL-22, совместно с другими цитокинами, такими, как IL-17 или фактор некроза опухоли α (TNF- α), индуцирует экспрессию антимикробных белков (дефензинов, S100A7, S100A8), участвующих в защите барьерных эпителиальных тканей кожи, дыхательных путей и кишечника, стимулирует выработку защитных муцинов (MUC1, MUC3, MUC10 и MUC13) бокаловидными клетками [33, 174, 229, 327, 328].

В связи с локализацией и активными провоспалительными свойствами неконтролируемая и длительная продукция IL-22 ведет к развитию псориаза. При данном заболевании IL-22 индуцирует гиперплазию и пролиферацию кератиноцитов, что приводит к утолщению эпидермиса [259, 346].

1.1.7. Фолликулярные Т-хелперы (краткая характеристика)

Тфх – субпопуляция Т-хелперов, играющая ключевую роль в стимуляции гуморального иммунного ответа [190, 293]. Впервые Т-клетки, несущие хемокиновый рецептор CXCR5, были описаны в 2000 году [35]. Было показано, что выделенные из миндалин CXCR5⁺ Т-клетки способны стимулировать синтез IgG и IgA при совместном культивировании с В-лимфоцитами миндалин [272]. С

тех пор CXCR5 стал одним из главных маркеров Т-фолликулярных хелперов, однако известно, что CXCR5 экспрессируют не только Тфх. Установлено, что среди Т-лимфоцитов рецептор CXCR5 могут экспрессировать активированные CD4⁺ Т-клетки вне герминативных центров и CD4⁺ Т-клетки памяти.

Фенотип Тфх характеризуется высокой экспрессией молекул OX-40, ICOS, принимающих сигнал от АПК (ДК или В-лимфоцита), экспрессией CD40 лиганда, передающего сигнал в АПК, и молекулы PD1, ограничивающей активность зрелых Т-лимфоцитов. Сигнал через ICOS/ICOSL необходим для синтеза Т-хелпером IL-21 – основного цитокина, секретируемого Тфх. Сигнал через CD40/CD40L приводит к экспрессии рецептора для данного цитокина – IL-21R [305]. Стимуляция активированного Т-хелпера при помощи IL-21 приводит к экспрессии мастер-регулятора созревания Тфх – фактора транскрипции Bcl-6 (белок В-клеточной лимфомы 6) [133, 221]. Bcl-6 способен подавлять экспрессию генов мастер-регуляторов других субпопуляций Т-хелперов, а именно: TBX21 (t-bet), GATA3 и RORc [37, 271, 340]. Тфх практически не экспрессируют хемокиновый рецептор CCR7 и селектин CD62L, необходимые для миграции в Т-клеточные зоны лимфоидных органов [116, 119].

В-лимфоциты и часть ДК тоже обладают экспрессией CXCR5. CXCL13, являющийся лигандом для этого рецептора, активно продуцируется самими Тфх, что способствует локализации всех CXCR5⁺ клеток в фолликуле лимфатического узла, и связует их общей целью формирования зародышевого центра. Кроме того, Тфх обладают экспрессией CXCR4, что способствует локализации Тфх в мантийной зоне, окружающей зародышевые центры, где продуцируется его лиганд - CXCL12 [315].

Под воздействием цитокинов, продуцируемых Тфх-лимфоцитами, происходит формирование герминативных центров внутри лимфоидного фолликула, В-лимфоциты претерпевают генетические перестройки при созревании аффинитета и переключении изотипов антител. В результате, под контролем Тфх, В-лимфоциты проходят этапы дифференцировки в В-клетки памяти и плазматические клетки [72, 134].

Каждая субпопуляция Т-хелперов вносит свой особый вклад в реализацию клеточного или гуморального иммунного ответа. Нарушение молекулярно-генетических и функциональных свойств любой из описанных выше субпопуляций может привести к развитию разнообразных патологий: от инфекционных осложнений до аутоиммунных и онкологических заболеваний. В связи с этим, изучение ранних процессов дифференцировки лимфоцитов, как и факторов, которые управляют данным процессом, необходимы для расширения нашего представления об осуществлении иммунного процесса, и создания научной базы для разработки принципиально новых лекарственных средств.

1.2. Зона локализации Тфх и происходящие в ней процессы

Одним из самых важных этапов адаптивного гуморального иммунного ответа является активация В-лимфоцитов, которая приводит к тонкой генетической перестройке иммуноглобулиновых рецепторов, способствующей повышению аффинности антител, переключению изотипов, а также к созреванию В-клеток памяти и плазматических клеток, способных продуцировать растворимые иммуноглобулины [3, 152]. Эти процессы контролируются Т-фолликулярными лимфоцитами хелперами, получившими свое название за счет основного места локализации и выполнения эффекторных функций – фолликулов вторичных лимфоидных органов. Типичными вторичными лимфоидными органами являются лимфатические узлы (ЛУ), которые осуществляют дренаж лимфы в разных частях тела. ЛУ имеют бобовидную форму и покрыты соединительнотканной капсулой, от которой отходят тонкие трабекулы, служащие внутренними перегородками. Афферентные лимфатические сосуды открываются в субкапсулярный синус на выпуклой стороне ЛУ, который соединен с синусами в трабекулах. На противоположной вогнутой стороне расположены ворота ЛУ, где находятся артерии, приносящие кровь в орган, вены и эфферентные лимфатические сосуды, по которым лимфа покидает узел. Ткань ЛУ состоит из коры и мозгового вещества. В глубоком слое коры располагаются Т-клеточные зоны, в которые из кровотока мигрируют $CCR7^+CD62L^+$ наивные Т-

лимфоциты и центральные Т-клетки памяти. Стромальные клетки и ДК Т-клеточной зоны привлекают эти лимфоциты с помощью хемокинов CCL19 (ELC) и CCL21 (SLC) – лигандов рецептора CCR7 [4, 114]. В наружной части коры равномерно расположены лимфоидные фолликулы – место локализации В-лимфоцитов. Здесь обитают фолликулярные дендритные клетки (ФДК), имеющие ключевое значение в формировании и функционировании зародышевых герминативных центров. ФДК экспрессируют хемокин CXCL13, который способствует миграции в фолликул наивных В-лимфоцитов, несущих хемокиновый рецептор CXCR5 [3, 4, 13, 97, 113].

Во время иммунного ответа кроме В-лимфоцитов в фолликул мигрируют Тфх, что способствует формированию зародышевых (герминативных) центров. В зародышевых центрах происходит созревание В-лимфоцитов [208]. В герминативном центре выделяют несколько зон: темную зону, светлую базальную и светлую апикальную. В темной зоне фолликулярные В-лимфоциты получают антигенспецифическую стимуляцию и сигналы от Тфх, в результате претерпевая процессы рекомбинации для переключения изотипов иммуноглобулинов, а также моноклонально пролиферируют.

В наивных В-клетках (до переключения классов антител) гены кластера IGН содержат несколько С-генов (у человека — С μ , С δ , С γ 3, С γ 1, С α 1, С γ 2, С γ 4, С ϵ , С α 2), последовательно расположенных за V-геном. В процессе сплайсинга происходит вырезание из мРНК интрона, который располагается между V и С μ генами, что приводит к формированию матричной РНК, кодирующей μ -цепь. Если дополнительно удаляется участок, кодирующий μ -цепь, то формируется мРНК, кодирующая δ -цепь. Этот процесс приводит к одновременной экспрессии наивными В-клетками IgM и IgD [4]. Переключение синтеза иммуноглобулинов на другие изотипы происходит в ходе иммунного ответа и требует участия Т-лимфоцитов и секретируемых ими цитокинов. Часто повторяющаяся последовательности S, расположенные после V-гена и перед каждым С-геном (кроме С5), подвергаются полимеризации. Это способствует сближению S-участков и образованию петли, в которую попадают определенные С-гены,

которые располагаются между С-геном, необходимым для экспрессии, и между V-геном. Полимеризация способствует чувствительности S-сайтов к ферментам индуцируемой активацией цитидин деаминазе (AID), AP-эндонуклеазе и ДНК-гликозилазе, которые осуществляют двунитевой разрыв. Таким образом, происходит удаление петли, и свободные концы сближающихся участков быстро воссоединяются при помощи негомологичного соединения. Таким образом, единственный, определенный для каждой отдельной В-клетки V-ген может соединяться с различными С-генами, причем такое переключение изотипов является необратимым процессом. В результате В-клетка в определенный момент времени может экспрессировать на мембране только один изотип иммуноглобулина (за исключением IgM и IgD, способных экспрессироваться одновременно) [3, 4, 44, 80, 347].

Известно, что для переключения изотипов антител необходимо участие цитокинов, продуцируемых Т-лимфоцитами. IL-21 способствует переключению изотипов иммуноглобулинов на IgG1, IgG3, и IgA, а IL-4 обеспечивает переключение классов иммуноглобулинов на IgG1 и IgE [3, 19]. IFN γ способен индуцировать переключение изотипов антител на IgG2a (и, возможно, — на IgG3), хотя в литературе также имеются сведения, что IFN γ может ингибировать процесс переключения изотипов [3, 240, 307]. За переключение изотипов иммуноглобулинов на IgA и IgG2b ответственен TGF β , а IL-10 способствует переключению на IgG1 и IgG3 классы антител [3, 87].

После нескольких стадий деления В-лимфоциты проходят процесс соматических гипермутаций для созревания аффинности антител, затрагивающий гипервариабельные области иммуноглобулина, сайты которого участвуют в распознавании антигена. Данный процесс инициируется в ходе иммунного ответа в пролиферирующих активированных В-лимфоцитах герминативных центров после начала процесса переключения изотипов иммуноглобулинов с IgM. Затронутым оказывается только V-домен, а точнее его регион CDR3. Фермент AID в одноцепочечной ДНК дезаминирует остатки дезоксицитидина до дезоксиуридина, который репарационные ферменты хромосомы рассматривают

как чужеродный. Это приводит к замене цитозина на тимин и большому количеству соматических мутаций внутри одного класса нуклеотидов. При этом большая часть получившихся мутаций нарушают способность связывания антитела с антигеном. Однако, большая частота мутаций приводит к возникновению антител, имеющих высокую аффинность активного центра к определенному антигену [3, 4, 76, 236].

Затем созревающие В-лимфоциты (центроциты) мигрируют в светлую базальную зону, где происходит селекция В-клеток при помощи хранящих антигены фолликулярных дендритных клеток и Тфх. В-лимфоциты, имеющие высокоаффинные BCR, побеждают в конкурентной борьбе за антиген и могут представить его фолликулярным Т-хелперам светлой зоны, что необходимо для дальнейшего созревания В-лимфоцитов. Тфх вступают в устойчивый контакт только с теми В-клетками, которые экспрессируют наибольшее количество комплексов МНСII-пептид [3, 194]. При взаимодействии с Тфх, В-лимфоцит должен получить антиапоптотический сигнал, если этого не произойдет, то В-лимфоцит погибнет путем апоптоза. Важный антиапоптотический сигнал индуцирует IL-4. Этот цитокин индуцирует активацию белков семейства Bcl-2, известных своими антиапоптотическими свойствами [3, 330]. После контакта с Тфх, В-лимфоцит должен сделать выбор относительно дальнейшей дифференцировки. Известно, что определяющими факторами в данном процессе являются ядерные факторы транскрипции Bcl-6 и Blimp-1, экспрессируемые В-клетками. Преобладание экспрессии ядерного фактора транскрипции Bcl-6 в В-клетках, способствует их созреванию и дифференцировке в В-клетки памяти, в то время как повышенная экспрессия ядерного фактора транскрипции Blimp-1 позволяет В-клеткам дифференцироваться в долгоживущие плазмocyты, секретирующие высокоаффинные иммуноглобулины [203].

Связывание BCR и CD40 со своими лигандами в сочетании со стимуляцией при помощи IL-21 индуцирует профиль транскрипции В-клеток герминативного центра, в частности, увеличивает экспрессию Bcl-6 в В-клетках, который, в свою очередь, подавляет Blimp-1. Это событие является ключевым для созревания В-

клеток герминативного центра [179, 275, 350]. Развитию плазмоцитов способствует IL-10, тогда как избыточная продукция IL-4 направляет дифференцировку В-лимфоцитов в В-клетки памяти [14, 49, 50, 158].

Пройдя этапы дифференцировки, герминативный центр покидают предшественники В-лимфоцитов памяти и плазматические клетки, продуцирующие высокоаффинные антитела.

1.3. Созревание Тфх

В литературе описано несколько возможных сценариев созревания Тфх. Их можно представить в виде моделей, которые, вполне вероятно, могут взаимодополнять друг друга. Кроме того, необходимо учитывать большую пластичность субпопуляции Тфх и других Тх, а так же их способность к ассиметричному клеточному делению, при котором одна дочерняя клетка сохраняет свойства материнской клетки, а вторая дочерняя клетка начинает специализироваться.

По мнению большинства авторов, начальные события дифференцировки наивных $CD4^+$ Т-клеток в Тфх являются общими для всех субпопуляций Тх и запускаются при распознавании пептидного антигена, представленного на МНСII класса, на поверхности интердигитирующих ДК в Т-клеточной зоне вторичных лимфоидных органов. Через 25-30 часов активированная наивная $CD4^+$ Т-клетка начинает пролиферировать. Образующиеся клоны временно находятся во вторичном лимфоидном органе, где экспрессируют ранний маркер активации CD69. Кроме того, у данных клеток снижается способность к хомингу из ЛУ, что, вероятно, связано с подавлением экспрессии сфингозин 1-фосфатного рецептора 1 (S1PR1), однако через 2-3 дня активированные $CD4^+$ Т-клетки снова экспрессируют S1PR1, что дает им возможность мигрировать в кровоток [1, 280]. Эти клетки включают в себя эффекторные Т-клетки, которые будут выполнять свои функции вне лимфоидной ткани. Однако часть Тх, которые сохраняют экспрессию CD69, остается в ЛУ [90, 272]. Среди них есть клетки,

экспрессирующие CXCR5, что дает им возможность мигрировать к границе Т/В клеточной зоны и дифференцироваться в Тfh [12, 97, 112].

Было продемонстрировано, что важное значение для созревания Тfh имеет аффинность Т-клеточного рецептора к антигену [196]. Несомненно, что Т-клетки с высокоаффинными TCR эффективнее конкурируют за редкие комплексы МНСII-пептид на поверхности АПК. Но взаимосвязана ли высокая аффинность TCR и экспрессия CXCR5 на Тх после контакта с ДК, или высокая аффинность требуется на следующем этапе созревания Тfh для устойчивого взаимодействия с В-клетками, остается неизвестным.

Снижение экспрессии CCR7 и начало экспрессии CXCR5, но не Bcl-6, контролируется фактором транскрипции Ascl2. Этот ядерный фактор так же способствует увеличению миграции Т-клеток в фолликулы и развитию Тfh, что показано *in vivo* в мышинной модели. Ascl2 положительно регулирует экспрессию генов, ассоциированных с развитием Тfh, тогда как подавляет экспрессию генов Тх1 и Тх17 [185]. Однако, экспрессия CXCR5 не является уникальной для клеток Тfh. После антигенной стимуляции более половины Т-клеток экспрессирует хемокиновый рецептор CXCR5, однако, только Тfh локализуются в герминативных центрах вторичных лимфоидных органов. Кроме того, экспрессия CXCR5 характерна для центральных Т-клеток памяти [1, 35, 96, 272], а также для циркулирующих Т-хелперов [48]. По-видимому, экспрессия CXCR5 на CD4⁺ Т-клетках зависит от костимулирующих сигналов от АПК, передаваемых через CD28, OX40 и ICOS [6, 12, 224].

Тип клеток, способный мигрировать к границе Т/В клеточной зоны, получил название экстрафолликулярные Тfh, или пре-Тfh [205]. Пре-Тfh существенно уступают зрелым Тfh по способности влиять на функциональные свойства В-лимфоцитов. В-клетки, получившие сигнал от пре-Тfh, обладают низким уровнем соматических гипермутаций и способны созреть только в короткоживущие плазмциты, секретирующие низкоаффинные антитела. Большинство В-лимфоцитов, стимулированных пре-Тfh, не имеют способности к миграции и подвергаются апоптозу непосредственно в месте стимуляции [1].

Следует отметить, что развитие короткоживущих плазмочитов могут стимулировать разные группы Т-хелперов, поскольку развитие экстрафолликулярных плазмочитов требует активации при помощи CD40L [67], который конститутивно экспрессируется на наивных Т-клетках [169], и его экспрессия значительно увеличивается на эффекторных Т-клетках независимо от их субпопуляционной принадлежности [284].

Миграция пре-Тфх к границе Т/В клеточной зоны и распознавание антигена фолликулярным Т-лимфоцитом в ходе взаимодействия между одним Т-лимфоцитом и одним В-лимфоцитом, которые образуют парные контакты индуцируют второй этап созревания Тфх. Взаимодействие между пре-Тфх и В-клетками одинаково необходимо как для В-лимфоцита, так и для Тфх. В-лимфоцит, не получив сигнала от Т-хелпера, не проходит стадий созревания и погибает путем апоптоза. Тфх также не может завершить свою дифференцировку без данного контакта и погибает, не получив необходимого сигнала [3, 22, 83, 203, 133]. При взаимодействии Т- и В-клеток важную роль выполняет иммунный синапс, поскольку создается непосредственный близкий контакт, обуславливающий локальные сигналы цитокинов и костимуляцию. Кроме того, иммунный синапс очень чувствителен к разным уровням антигена, что может повлиять на вовлечение в процесс клеток с наибольшим уровнем экспрессии комплекса пептид-МНСII [3, 74].

Для адгезии и стабильного контакта между Т- и В-клетками необходим внутриклеточный сигнальный адаптер SAP [54, 246]. Bcl-6 также необходим на этой стадии развития Тфх [165].

Возможны два сценария, соответственно которым происходит дальнейшее развитие Тфх. Согласно однонаправленной модели, пре-Тфх являются начальной стадией развития Тфх, и в дальнейшем проходят дифференцировку в Тфх. Циклическая модель предполагает, что пре-Тфх имеют возможность мигрировать в герминативные центры, там выполнять функции Тфх, а затем выходить из герминативных центров и снова приобретать свойства пре-Тфх [206]. В любом случае, эти события зависят от взаимодействий между Т-хелперами и В-

лимфоцитами, где наиболее важную роль играют цитокиновый сигнал от IL-21 и костимуляция через ICOS. Данный контакт обуславливает образование экстрафолликулярных короткоживущих терминально дифференцированных плазматических клеток, которые способны к синтезу высокоафинных антител класса IgG1-4 и IgA. Кроме того, данное взаимодействие приводит к миграции Т-хелперов в область фолликулов, где происходит формирование зародышевых центров [1, 204].

Короткоживущие плазмоциты (КП) появляются в Т-клеточной зоне в первые дни развития иммунной реакции, и мигрируют в медуллярную зону ЛУ и костный мозг. Эта миграция может быть обусловлена экспрессией хемокинового рецептора CXCR4 и уменьшением экспрессии CXCR5 [117]. КП живут не долго, в течение 3-5 дней, и обеспечивают ранний гуморальный иммунный ответ, причем антителообразование резко снижается при отсутствии КП [123]. Главным регулятором образования плазматических клеток является транскрипционный репрессор Blimp-1, критически необходимый на данном этапе развития иммунного ответа для продукции антител [276, 302]. На следующих этапах иммунного ответа Blimp-1 участвует в развитии В-клеток памяти и поддержании жизнеспособности долгоживущих плазматических клеток со зрелым аффинитетом [277].

Т-хелперы, мигрирующие к герминативным центрам и вступающие в устойчивое взаимодействие с В-лимфоцитами, проходят следующий, третий этап процесса созревания Тфх. Длительность контакта Тфх и В-лимфоцитов в фолликуле значительно короче, чем на границе Т/В-клеточных зон [182]. На данном этапе важную роль выполняет молекула ICOS, которая вносит решающий вклад в поддержание контактов между Т-клетками герминативного центра и В-клетками. Костимуляция через ICOS усиливает освобождение ионов кальция, что, в свою очередь, способствует быстрой экстернализации CD40L из внутриклеточных компартментов Т-клетки. В-клетки герминативных центров увеличивают уровень экспрессии ICOSL в ответ на стимуляцию CD40L [182].

Таким образом, ICOS и CD40L создают положительную обратную связь между В-лимфоцитами и Тфх герминативного центра.

В результате данного взаимодействия В-лимфоциты созревают в плазмциты и В-клетки памяти. Цитокины, секретируемые Тфх способствуют пролиферации В-клеток, их дифференцировке в плазмциты и переключению изотипов иммуноглобулинов [3, 87, 231]. В частности, IL-21 способен переключать изотипы иммуноглобулинов на IgG1, IgG3, и IgA [19], а при действии с IL-4 способствует продукции IgG1 [253, 275].

Важным маркером Тфх герминативных центров является молекула PD-1. Вероятно, появление PD-1 является результатом постоянного взаимодействия Т-клеток герминативного центра с В-клетками и схоже с механизмом повышения экспрессии PD-1 на CD8⁺ Т-клетках при стимуляции хронической вирусной инфекцией. Уровень PD-1 контролируется ядерным фактором AP-1 и постепенно повышается в результате последовательной стимуляции антигенпрезентирующими В-клетками. Выделенные Тфх быстро теряют PD-1 и CXCR5 при переносе в хозяина, свободного от антигена и количество PD-1⁺CXCR5⁺ клеток строго коррелирует с числом антиген-специфических В-клеток [26]. Это может свидетельствовать о том, что фенотип PD-1^{hi}CXCR5^{hi} не обязательно доказывает устойчивую дифференцировку Тфх, но отражает сколько Т- и В-клеток вступили в когнатные взаимодействия в пределах пространственно-временной границы внутри фолликулов. Кроме того, молекула PD-1, являясь ингибитором клеточной пролиферации, служит своего рода ограничителем чрезмерного деления Тфх герминативных центров [26].

Дальнейшая судьба Тфх после завершения реакции зародышевого центра представляет большой интерес и является предметом исследований. Одним из возможных вариантов является гибель Тфх из-за присутствия на их поверхности высоких уровней молекул CD95 и PD1, которые делают их восприимчивыми к апоптозу [198, 250]. Кроме того, Тфх могут выживать, сохраняя свойства эффекторных Тфх [195, 342, 349]. Наконец, Тфх могут переходить на четвертый, заключительный этап дифференцировки и созревать в Тфх-клетки памяти. Тфх-

памяти при повторной встрече с антигеном, способствуют созреванию центральных В-клеток памяти в долгоживущие плазмоциты [1, 90].

Вероятно, что $CD4^+$ Т-клетки требуют постоянного сохранения антигена для достижения максимальной клональной пролиферации *in vivo*. Было показано, что Т-хелперы перестают делиться при снижении концентрации антигена до определенного уровня [225]. Однако в модели с использованием вирусной инфекции было продемонстрировано, что экспрессия МНСII сохранялась более 3 недель после вирусного клиренса на уровне, достаточном для стимулирования наивных Тх [130]. Известно о существовании популяции $CD69^+CXCR5^+$ Тфх, которые длительное время остаются в непосредственной близости к $CXCL13^+$ ФДК и быстро восстанавливают фенотип эффекторных Тфх при вторичной иммунизации. Видимо, данные клетки являются антигенспецифическими Тфх памяти [90]. Таким образом, антигенспецифические Тфх-клетки могут быть обнаружены в течение некоторого времени после иммунного ответа и имеют потенциальную возможность взаимодействия с В-клетками для активации к продукции антител при повторном заражении. Однако несколько исследований показывают, что $CD4^+$ Т-клетки не являются необходимыми для длительного поддержания В-клеток памяти и продукции IgG плазматическими клетками [120, 308].

Таким образом, описанная выше модель созревания Тфх предусматривает многостадийный процесс, согласно которому первоначально наивные Тх взаимодействует с ДК, приобретают фенотип активированной клетки, дифференцируются в пре-Тфх, затем мигрируют на границу Т- и В-клеточной зоны, проходя следующий этап созревания, и заканчивают свое созревание в В-клеточной зоне, взаимодействуя с В-лимфоцитами.

Роль ДК в процессе созревания Тфх подтверждают следующие наблюдения. Известно, что избыток антигенов индуцирует образование Тфх в отсутствие В-клеток [71]. Вероятно, что устойчивая презентация антигена любой АПК может поддерживать формирование Тфх, а В-клетки становятся преобладающими АПК на пике иммунного ответа. Антигенспецифические $CD4^+CXCR5^+Bcl-6^+$ Т-клетки

обнаруживаются уже через 3 дня после иммунизации/инфекции, что предшествует процессу активации Т-клеток при контакте с В-лимфоцитами [52, 143, 151]. Кроме того, в фолликулах вторичных лимфоидных органах могут быть обнаружены клетки с фенотипом, характерным для Т-фолликулярных хелперов при отсутствии взаимодействий с антигенспецифичными В-лимфоцитами [25, 52, 143, 151, 241]. Формирование $CD4^+CXCR5^+Bcl-6^+$ пре-Тфх также может происходить без взаимодействий с молекулой SAP [52], что свидетельствует о возможности SAP-независимого формирования пре-Тфх при помощи ДК [246].

Однако, несмотря на вышеизложенные наблюдения, известно, что в мышах, лишенных $CD11c^+$ ДК, происходит лишь частичное ослабление созревания Тфх, а также, что ДК в отсутствие $MHCII^+$ В-клеток стимулируют дифференцировку Тх с отдельными фенотипическими свойствами Тфх, которые экспрессируют $CXCR5$, $ICOS$ и $Bcl-6$, но не продуцируют $IL-21$. Для формирования функционально значимого фенотипа Тфх, Т-клеткам необходимо вступать во взаимодействия с другими АПК, и, видимо, главную роль в этом случае должны исполнить активированные В-клетки [105]. Искусственно созданный дефицит В-лимфоцитов или отсутствие на них функциональных молекул $CD19$, $CD40$, $MHC-II$, $ICOSL$ и $CD86$, необходимых для взаимодействия с Т-клетками, угнетает процесс образования Тфх при инфекции [71, 119, 133, 241, 265, 343]. Это свидетельствует о том, что дифференцировка Тфх главным образом зависит от взаимодействия между активированными $CD4^+$ Т-клетками и В-клетками, представляющими антиген [190]. Нарушения развития Тфх при отсутствии молекулы SAP также свидетельствует о необходимости устойчивого контакта между $CD4^+$ Т- и В-клетками, но не между Т-клетками и ДК (подробнее – ниже) [40, 246]. Кроме того, очень важным является сигнал от $ICOSL$, получаемый от В-клеток, критически необходимый для созревания эффекторных Тфх, экспрессирующих $IL-21$, а также ядерные факторы транскрипции $Bcl-6$ и $c-Maf$ [27, 52, 48, 104, 219]. Культивирование В-лимфоцитов с $CD4^+CCR7^+CXCR5^+$ центральными Т-клетками памяти способствует созреванию Т-клеток, с фенотипическими и функциональными свойствами Тфх: для данных клеток

характерна высокая экспрессия костимулирующей молекулы ICOS, эти клетки способствуют дифференцировке плазмочитов и приводят к продукции высокоаффинных антител В-лимфоцитами [48].

Кроме того, был предложен несколько иной взгляд на процесс формирования Тфх. Согласно ему для созревания Тфх необходима ранняя постактиваационная экспрессия ядерного фактора транскрипции Bcl-6, тогда как наличие определенной цитокиновой атмосферы и взаимодействия с В-клетками не являются обязательными на ранних процессах дифференцировки, но необходимы для завершения программы созревания Тфх [241]. Активация CD4⁺ Т-клеток в Т-клеточной зоне приводит к экспрессии ядерного фактора транскрипции Bcl-6 в части клеток. Bcl-6 вызывает репрессию гликопротеинового лиганда Р-селектина 1 PSGL1, что снижает способность Т-клеток удерживаться в Т-клеточной зоне. Экспрессия CCR7 также снижается, что позволяет Bcl-6⁺PSGL1^{lo} клеткам мигрировать к фолликулам [12, 36, 39]. Оказавшись на границе Т- и В-клеточной зоны, свежее активированные наивные Тх получают дополнительные сигналы от В-клеток, способствующие увеличению уровней экспрессии Bcl-6, PD-1 и CXCR5, и дифференцируются в Тфх [119, 133]. Рецептор CXCR5 позволяет Тфх избрать местом локализации фолликул В-клеток, где Тфх при помощи активирующих сигналов способствуют выживанию и созреванию В-лимфоцитов герминативного центра.

Также имеются данные о связи дифференцировки Тфх и Тх2, что показано при заражении нематодой *Heligmosomoides polygyrus* [168]. Кроме того, показано, что Тфх, реагирующие на антигены яиц *Schistosoma mansoni*, могут созревать из Тх2 или из общего с Тх2 предшественника [150, 343]. Видимо, выбор пути развития общего предшественника в Тфх или в Тх2 зависит от уникального микроокружения клеток. В. Leon с соавт. предположила, что наивные антигенспецифичные Т-клетки, которые оказываются в В-клеточных зонах, удерживаются и активируются тут в присутствии CXCR5⁺ ДК, что приводит к инициации транскрипционных факторов, контролирующих дифференцировку Тфх и Тх2 клеток [168, 234, 309]. Если эти Т-клетки получают сигналы от

соседних антигенпрезентирующих В-клеток, они усиливают экспрессию Bcl-6 и CXCR5 и дифференцируются в Тфх. Напротив, те Т-клетки, которые не взаимодействуют с антигенпрезентирующими В-клетками, теряют экспрессию Bcl-6 и CXCR5 и полностью дифференцируются в Тх2, которые могут в конечном итоге покинуть лимфатический узел [25]. В таком случае, фактором микроокружения, определяющим выбор пути созревания между Тфх и Тх2, является наличие или отсутствие взаимодействий с В-клетками.

Анализ литературных источников позволяет сделать вывод, что ответная стимуляция В-лимфоцитами Т-хелперов играет такую же важную роль для процесса дифференцировки Тфх, как и стимуляция фолликулярными Т-хелперами В-клеток для формирования герминативных центров и функционирования В-лимфоцитов. Более того, данные о критической роли В-клеток позволяют сделать предположение о том, что В-лимфоциты для части Т-клеток могут выступать в качестве основных или единственных АПК и вызывать образование Тфх в отсутствии ДК. Важно заметить, что данная схема не отменяет, а дополняет общепризнанную модель созревания Тфх, где главным пусковым механизмом для начала процесса дифференцировки Тфх является взаимодействие с ДК, а взаимодействие с В-лимфоцитами необходимо для завершения процесса дифференцировки.

В гипотетической ситуации, когда В-клетки являются единственными АПК для Тфх, роль ДК может сводиться к доставке антигенов в лимфоузлы и прямой стимуляции В-лимфоцитов. Способность к миграции ДК в область В-клеточных фолликулов была показана в нескольких работах [2, 3, 168, 260]. Такие ДК несут на мембране хемокиновый рецептор CXCR5, который направляет их в зону В-клеточного фолликула, где секретируется лиганд этого рецептора – хемокин CXCL13. Известно, что В-клетки способствуют избытку CXCL13 в зародышевом центре благодаря лимфотоксин (LT)-зависимому механизму. В-клетки, экспрессирующие LT, взаимодействуют с экспрессирующими LTβR стромальными клетками [3, 86, 100, 106, 216] и активируют их к повышенной продукции CXCL13, что позволяет удерживать в зоне В-клеток как ДК,

экспрессирующих CXCR5, так и Тфх [168]. Кроме того, известно о прямой стимуляции дендритными клетками В-лимфоцитов [29, 247], в том числе и В-лимфоцитов фолликулярной зоны [30, 177].

1.4. Мембранные молекулы в созревании и функционировании Тфх

Общеизвестно, что начальная активация любых CD4⁺ Т клеток зависит от распознавания клоноспецифического антигена и сигнальных взаимодействий с костимулирующими мембранными молекулами АПК. В то же время, как уже было указано выше, литературные источники содержат противоречивые данные относительно вклада различных типов АПК (ДК и В-лимфоцитов) в процесс созревания Тфх.

1.4.1. Молекулы костимуляции: CD80, CD86 и CD28; CD40 и CD40L

Показано, что связывание костимулирующих молекул дендритных клеток CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2) с молекулой CD28 на Т-клетках является важным активационным сигналом, участвующим в созревании различных типов Тх [257]. CD40L, экспрессируемый Т-клетками, связываясь с CD40 на ДК, обеспечивает стимуляцию ДК и активацию Т-лимфоцитов [85]. Отсутствие CD40 на ДК [92], или блокирование передачи сигнала через CD28 [314] приводит к резкому снижению экспрессии CXCR5 и хоминга Т-клеток в фолликулы. У мышей с дефицитом CD28 или CD40L, и у людей с мутациями CD40L, уменьшалось число Тфх [6, 34]. Сигнал через CD28 необходим как на ранних стадиях дифференцировки Тфх, так и на поздних, способствуя экспрессии ICOS и Bcl-6 Т-фолликулярными хелперами [180, 316, 322]. Тем не менее, экспрессия CD80 и CD86 при иммунном ответе на вирус коровьей оспы не является критической для генерации Тфх и плазматических клеток, а также продукции вирус-специфических антител [265].

При отсутствии костимулирующих молекул на В-лимфоцитах или на Т-хелперах, не происходит формирования Тфх [71, 119, 133, 241, 343]. Так, не происходит образования герминативных центров внутри фолликулов вторичных

лимфоидных органов, не осуществляется активация и последующая пролиферация В-клеток при отсутствии на них молекулы CD40 или при отсутствии CD40L на Т-лимфоцитах [47, 98, 186]. Стоит отметить, что костимуляция при помощи молекул CD40 и CD40L, негативно регулирует созревание плазматических клеток. Вероятно, это обусловлено активацией экспрессии ядерного фактора Bcl-6, который репрессирует Blimp-1, необходимый для дифференцировки плазматических клеток [3, 248].

Продemonстрирована важная роль представленных на В-лимфоцитах молекул CD86 для развития Тфх, в то время как взаимодействие CD28 с CD80 необходимо преимущественно для развития Тх1 [265]. CD80 не экспрессируется на наивных В-клетках, но его экспрессия может быть вызвана сигналами от CD40, TLR и провоспалительных цитокинов. Белок Bcl-6, который экспрессируют большинство В-клеток герминативных центров, непосредственно препятствует экспрессии CD80, индуцированной сигналом от CD40 [152], но не препятствует CD40-индуцированной экспрессии CD86, CD54, CD11a / 18 (LFA-1) и CD23 [237]. Возможно, снижение экспрессии CD80 при помощи Bcl-6 необходимо для уменьшения вероятности контактов CD80 и ингибирующей молекулы PD-1, высоко экспрессированной на Тфх.

Исследования нескольких независимых групп дали убедительные доказательства важной роли CD86 при стимуляции не только Т-лимфоцитов, но и самих CD86⁺ В-клеток. Стимуляция молекулы CD86 при помощи антител к CD86 на активированных В-лимфоцитах, или молекулы CD28, увеличивает уровни IgG1 [140, 148], IgG2a [294], IgE и IgG4 [129] и влияет на уровень экспрессии антиапоптотических и проапоптотических факторов [294]. На мышинных В-клетках показано, что стимуляция CD86 увеличивает активность PI3K, Akt и IκB киназы αβ. Кроме того, стимуляция CD86 индуцирует увеличение фосфорилирования фосфолипазы Cγ2 и протеинкиназы Caβ. CD86-опосредованная активация этих двух сигнальных путей приводит к активации NF-κB [147, 148]. Таким образом, известно о важной роли CD86 во взаимной

стимуляции В-лимфоцитов и Т-хелперов, необходимой для индукции продуктивного гуморального иммунного ответа [265].

1.4.2. Молекулы ICOS и ICOSL

Для созревания Тфх, поддержания их фенотипа и реализации реакции герминативного центра критически важным является взаимодействие между молекулами ICOS–ICOSL [6, 52, 197]. Индуцибельный костимулятор ICOS был обнаружен в 1999 году [125]. Он является членом семейства молекул CD28. При дефиците CD28 Т-клетки могут получить недостающий костимулирующий сигнал через ICOS [178], хотя сигнальные мотивы в его цитоплазматическом участке отличаются от сигнальных мотивов CD28 [125, 249]. ICOS экспрессируется на всех типах эффекторных Т-клеток, но, в отличие от CD28, не экспрессируется на покоеющихся Т-клетках до стимуляции TCR. Лигандом для ICOS служит B7RP-1 (ICOSL или LICOS), который экспрессирован на В-лимфоцитах, дендритных клетках и макрофагах [320].

У пациентов с мутациями ICOS сильно снижено образование герминативных центров и циркулирующих CXCR5⁺CD45RO⁺ Тфх-клеток памяти [34], а у мышей с нокаутом ICOS^{-/-} и ICOSL^{-/-} субпопуляция Тфх фактически отсутствует, нарушена продукция антител и не происходит формирования зародышевых центров [6, 220]. Экспрессия Bcl-6 существенно снижается при отсутствии ICOS [52]. При острой вирусной инфекции Т-клетки, слабо экспрессирующие IL-2R α , дифференцируются в Bcl-6⁺CXCR5⁺ Тфх лишь при стимуляции ICOS соотв. лигандом В-клеток, тогда как Т-клетки с сильной экспрессией IL-2R α дифференцируются в другие субпопуляции Тх, приобретая ядерный фактор Blimp-1 [52, 99, 334].

Соответственно, у мышей с нарушением передачи внутриклеточного сигнала от ICOS к PI3K дифференцировка Тфх не происходит [104], и удаление каталитической субъединицы P110delta из PI3K блокирует ICOS-индуцированное формирование Тфх [255]. Цитоплазматический участок ICOS содержит, как минимум, три консервативных PI3K-связывающего мотива – Y-x-x-M,

проксимальный SSSVHDPNGE (IProx) и AVNTAKK. Использование CD4⁺ Т-клеток с мутациями ICOS и трансгенным TCR к антигену вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) в модели с переносом в ICOS^{-/-} мышей и оценкой созревания Тфх после инфицирования LCMV показало, что IProx мотив играет критическую роль в дифференцировке Тфх [235]. Важно отметить, что мотив IProx имеет гомологию с консервативными последовательностями TRAF2 и TRAF3 и участвует в активации сериновой треонинкиназы TBK-1, а уменьшение количества TBK-1 связано с нарушением генерации Тфх.

Сигнал от ICOS генерирует высокие уровни PIP3 и каталитической подгруппы PI3K – p50α, которая фосфорилирует ряд белков [256]. Это приводит к экспрессии ядерных транскрипционных факторов NFAT и c-Maf, что способствует производству IL-21 через STAT-3-зависимые механизмы [6, 27, 121], а IL-21, в свою очередь, может усиливать экспрессию мРНК *Bcl-6* [221].

PI3K активирует Akt и белковый комплекс mTORc2, что приводит к инактивации фактора транскрипции FOXO1 и зависящего от него Kruppel-подобного фактора транскрипции 2 (KLF2), которые являются негативными регуляторами экспрессии *Bcl-6* и созревания Тфх [142, 162, 164, 290, 322]. Соответственно, ICOS-индуцированное подавление FOXO1 и KLF2 способствует дифференцировке Тфх [290, 322, 344].

При исследовании ICOS-индуцированного сигналинга была показана роль серин-треониновой TANK-связывающей киназы 1 (TBK1), которая не участвует в начальных стадиях Тфх дифференцировки, но требуется на завершающих этапах развития Тфх-лимфоцитов и герминативных центров [235]. Известно, что TBK1 способна связываться с TNFR-ассоциированным фактором 1, который задействован в сигнальных путях NF-κB и Akt [135, 228, 242]. На многих незрелых и зрелых Тфх ICOS одновременно коэкспрессируется с OX40. Совместная активация ICOS и OX40 и взаимодополняющий внутриклеточный сигналинг положительно влияют на дифференцировку Тфх [52]. Вероятно, OX40 активирует TBK1, и именно таким образом внутриклеточные сигнальные пути от

OX40 и ICOS пересекаются, и совместно контролируют поздние этапы дифференцировки Тфх [299].

Чрезвычайно высокая экспрессия ICOS может приводить к развитию аутоиммунных заболеваний, поскольку данная молекула способствует увеличению популяции Тфх, что, в свою очередь, может приводить к продукции высокоаффинных антител к собственным антигенам [310, 319].

1.4.3. Молекулы OX40 и OX40L

OX40L (CD252) и его рецептор OX40 (CD134) принадлежат к TNF и TNFR надсемействам, соответственно [61, 62]. OX40L не экспрессируется конститутивно, но может быть индуцирован на всех АПК, в том числе на активированных В-клетках. Время и место экспрессии OX40L, скорее всего, зависит от иммунной среды, хотя фактически неизвестно о местной экспрессии OX40L при иммунном ответе в лимфоидных и нелимфоидных органах. Было показано, что OX40 является важной костимулирующей молекулой для выживания $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток и функционирования Т-клеток памяти. OX40 активно участвует в управлении эффекторным Т-клеточным иммунным ответом, что было показано в нескольких моделях аутоиммунных, инфекционных и опухолевых заболеваний [61, 62, 109, 266, 267]. В частности, взаимодействия OX40-OX40L регулируют развитие Тфх и образование герминативных центров [57]. Показано, что у животных, испытывающих недостаток этих молекул, снижается продукция антител [31, 102, 131, 268]. Эксперименты с OX40L-трансгенными и OX40-дефицитарными мышами доказывают, что сигнал через OX40 необходим для экспрессии активированными Т-клетками мРНК *CXCR5* и способствует локализации $CD4^+$ Т-клеток на границе Т- и В-клеточных зон и в фолликулах лимфоузла [94]. Также у OX40-дефицитарных мышей зарегистрировано снижение количества Тфх и тяжелые нарушения участия $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток в иммунном ответе на хронически протекающее инфицирование вирусом лимфоцитарного хориоменингита [31].

Однако остается неизвестным на каких именно этапах развития Тфх ОХ40-взаимодействия наиболее важны. Существуют данные, согласно которым взаимодействия ОХ40-ОХ40L важны уже на этапе первичного взаимодействия $CD4^+$ Т-клеток с ДК для увеличения экспрессии CXCR5 и миграции $CD4^+$ Т-клеток в фолликул [6, 92, 314]. Реализацию этого механизма на ранних этапах созревания Тфх подтверждают эксперименты, в которых у мышей без ОХ40-ОХ40L-взаимодействий при инфицировании вирусом коровьей оспы Тфх практически не образовывались, не формировались В-клетки герминативных центров, а также замедлялась продукция антител [38, 127, 399]. В то же время, наблюдение за пациентом с дефицитом ОХ40, который имел низкий процент циркулирующих эффекторных $CD4^+$ Т-лимфоцитов и В-клеток памяти, но нормальную продукцию антител при вирусной инфекции, свидетельствует о важности взаимодействия ОХ40-ОХ40L на позднем этапе дифференцировки Т-клеток памяти [38]. При стимуляции Т-лимфоцитов *in vitro* антителами к CD3 или CD28 у пациентов с системной красной волчанкой, растворимый ОХ40L усиливает экспрессию нескольких Тфх-ассоциированных молекул (в том числе Bcl-6, CXCR5 и IL-21) в Т-клетках, исходно несущих CXCR5, что, по-видимому, свидетельствует о том, что сигнал от ОХ40 может усиливать дифференцировку незрелых Тфх [127].

Также стимуляция ОХ40 при помощи ОХ40L *in vitro* способствует созреванию ДК, повышает секрецию провоспалительных цитокинов, таких как IL-6 и IL-12, а также усиливает пролиферацию В-лимфоцитов и продукцию антител [7, 291]. Таким образом, ОХ40 и ОХ40L активно участвуют в формировании субпопуляции Тфх и образовании герминативных центров путем изменения активности В-клеток, которые взаимодействуют с незрелыми и зрелыми ОХ40⁺ Тфх. Критическая роль этих взаимодействий для развития Тфх продемонстрирована при инфицировании вирусом коровьей оспы и при хроническом лимфоцитарном вирусном хориоменингите [31]. Возможно, ОХ40-ОХ40L-взаимодействия имеют особенно важное значение для Тфх-опосредованного иммунного ответа на инфекцию высоковирулентными

патогенами, при которой особенно важным является формирование герминативных центров и продукция защитных антител.

Экспрессии OX40 могут способствовать ядерные факторы транскрипции семейства NFAT, которые индуцируются в активированных Т-клетках. NFAT1 и NFAT2 активируются при помощи кальций-опосредованного пути при связывании антигена Т-клеточным рецептором и имеют важное значение для развития Тфх. В CD4⁺ Т-лимфоцитах, стимулированных антигеном, OX40 способен увеличивать транспорт белков NFAT в ядро клетки [61, 286]. OX40 в CD4⁺ Т-клетках активирует сигнальные пути, задействующие как PI3K, так и Akt, а также сигнальный путь NF-κB, в котором важную роль играет TNFR-ассоциированный фактор 2 (см. выше) [285, 287, 288, 289].

1.4.4. Молекулы семейства SLAM и другие рецепторы

Важными для развития Тфх являются взаимодействия молекул семейства SLAM, а именно: SLAM (CD150), CD84, NTB-A (Ly108 у мышей) и CD229 [40, 193]. SLAM-рецепторы взаимодействуют с внутриклеточными адаптерными SLAM-ассоциированными белками (SAP), которые играют важную роль в инициации иммунного ответа. При отсутствии SAP сохраняется продукция цитокинов, но нарушается миграция Т-клеток в В-клеточную зону, снижается способность к когнатным взаимодействиям Т- и В-клеток, не происходит образования герминативных центров, подавляется созревание плазматических клеток и В-клеток памяти [40, 66, 71, 181, 246]. Более того, от молекулы SAP зависит экспрессия CD40L и ICOS [41]. К тому же было показано, что связывание молекул SLAM Тфх-лимфоцитами приводит к синтезу IL-4 [340]. Ген, кодирующий SAP (SH2D1A), мутирует у пациентов с Х-связанным лимфопролиферативным синдромом, при котором наблюдается нарушение Тфх-ассоциированной функции [192, 193].

Т-хелперы зародышевых центров миндалин обладают экспрессией CD57. Данная группа CD57⁺ клеток обладает полным набором фенотипических и функциональных свойств Тфх: экспрессирует CXCR5 и ICOS, активно

продуцирует цитокины, индуцирует переключение изотипов и контролирует созревание аффинитета антител [145, 146]. Однако субпопуляция CD57⁺ Тх, выделенная из периферической крови, не способствует синтезу антител [9]. Таким образом, вероятно, что CD57⁺ Тх выполняют разные функции в зависимости от локализации.

Было замечено, что у мышей при хронической инфекции LCMV и коллаген-индуцированном артрите (CIA) на Тфх экспрессирован глюкокортикоид-индуцированный TNFR-связывающий белок (GITR) [57, 191]. В GITR^{-/-} мышях наблюдалось снижение популяции Тфх, и тем самым, уменьшение иммунного контроля протекания хронической LCMV-инфекции [57]. Было также показано, что введение GITR-Fc значительно уменьшает субпопуляцию Тфх, производящую аутоантитела, и приостанавливает развитие CIA [191]. Возможно, что экспрессия GITR на Тфх необходима для увеличения этой субпопуляции клеток и способствует повышению синтеза антител, как при инфекционных, так и при аутоиммунных заболеваниях.

1.4.5. Негативные регуляторы функционирования Тфх

Наряду с положительными регуляторами, способствующими осуществлению иммунного ответа, Тфх имеют молекулы, негативно регулирующие чрезмерную иммунную активность, которая может способствовать развитию аутоиммунных патологий. Одной из таких молекул является PD-1 (Programmed cell death 1; CD279), высокий уровень экспрессии которой считается признаком Тфх. Вероятно, что PD-1 позволяет избежать бесконтрольной пролиферации Тфх, которую могут спровоцировать частые их взаимодействия с В-лимфоцитами [107]. Так, показано, что способствует PD-1 подавлению сигнала, индуцированного ICOS [28]. Таким образом может регулироваться активность Тфх. Сигнал от IL-2, активирующий STAT5, может ингибировать сигнальный путь от молекулы PD-1, а может вызывать экспрессию Blimp-1, тем самым подавляя дифференцировку Тфх [261].

Ещё одной молекулой, играющей роль ограничителя клеточных иммунных реакций, является CTLA-4. Было показано, что CTLA-4 экспрессируется на Тфх и Тфр (Т-фолликулярных регуляторных клетках), а отсутствие данной молекулы на Тфх приводит к увеличению популяции Тфх и гиперактивации В-клеток [262, 326]. По-видимому, CTLA-4, после связывания CD80/86, подавляет активацию костимулирующей молекулы CD28. Однако, CTLA-4 активирует E3 убиквитин-лигазу Itch, приводя к ингибированию активности Т-клеток [124]. В противоположность этому, в 2014 году исследователи показали, что Itch может оказывать положительное влияние на дифференцировку Тфх, способствовать формированию зародышевых центров и синтезу IgG в ответ на вирусную инфекцию. Также показано, что Itch способен связывать FOXO1 (ингибитор Bcl-6), усиливая его убиквитинилирование и последующую деградацию. Эти данные вполне согласуются с тем, что Bcl-6 не экспрессировался в мышах с дефицитом Itch [332]. Столь противоречивые данные позволяют предположить, что функция CTLA-4 является неоднозначной и зависит от особенностей внутриклеточной молекулярной атмосферы.

1.5. Цитокины в созревании и функционировании Тфх

Наряду с антигенной презентацией и костимуляцией для выживания и пролиферации Т-лимфоцитов необходимо получение соответствующего цитокинового сигнала, который направит дифференцировку наивного Т-лимфоцита в тот или иной тип Т-хелпера. Показано, что для включения программ дифференцировки Тфх необходимы IL-21 и IL-6.

Впервые IL-21 был обнаружен в супернатантах активированных Т-клеток [232]. Выраженной экспрессией IL-21 обладают Тх17, Тфх, NK и NKT-клетки, а так же клетки лимфомы Ходжкина [53, 59, 159, 220]. Рецептор для IL-21 экспрессируется на поверхности Т, В и NK клеток. Он состоит из уникальной α -цепи и γ -цепи, общей с IL-2R и IL-15R [15, 115]. Передача сигнала осуществляется через Jak/STAT-зависимый путь с активацией JAK1 и JAK3 и STAT3 [115]. Продукцию IL-21 инициируют сигналы от IL-6, IL-27 и ICOS,

ведущие к активации транскрипционного фактора c-Maf [27, 121, 243]. При совместном сигнале от IL-21 и TCR происходит усиление пролиферации Т-клеток [232], а посредством активации белка VAV1 IL-21 способствует созреванию Тфх и усиливает собственную аутоэкспрессию [312]. IL-21 особенно важен на начальных стадиях дифференцировки Тфх, благодаря его способности индуцировать экспрессию хемокинового рецептора CXCR5 [149].

IL-6 секретируют различные типы клеток, в частности ФДК в фолликулах лимфоузлов. На ранних этапах созревания Тфх IL-6 вызывает активацию транскрипционных факторов STAT3 и c-Maf, а также экспрессии IL-21 и PD-1 [121]. Было показано, что экспрессия ядерного фактора транскрипции Bcl-6 в зрелых Т-хелперах может зависеть от IL-6 [395, 340]. Но несколько других исследователей продемонстрировало, что сигналы цитокинов IL-6 и IL-21, не влияют на уровень мРНК *Bcl-6* [139].

Важное значение для активированных Тфх имеет IL-27, который усиливает продукцию IL-21 Т-фолликулярными хелперами [23].

Созревание клеток с фенотипом Тфх, но лишенных продукции IL-21, происходит при стимуляции Т-лимфоцитов IFN- α/β . При системной красной волчанке (СКВ) избыточные сигналы от IFN- γ и снижение деградации мРНК *IFNG*, также способствуют созреванию аутореактивных Тфх [166]. При этом блокирование IFN- γ приводит к уменьшению популяции Тфх и купирует проявления СКВ. На поздних стадиях развития Th1, Bcl-6 способен репрессировать продукцию IFN- γ [227]. Вполне возможно, что IFN- γ и Bcl-6 регулируют активность друг друга посредством отрицательной обратной связи.

Лимфопоедин IL-7 негативно регулирует гены программы дифференцировки Тфх *Bcl-6* и *CXCR5*. Было показано, что IL-7-зависимый ядерный фактор STAT-5 репрессировывает Bcl-6 [202]. Однако другие исследователи показали, что нейтрализующие антитела к IL-7 снижают дифференцировку Тфх и продукцию IgG [274].

Важнейшую роль в выполнении специфических функций Тфх исполняют цитокины, секретируемые данной группой клеток. Основным цитокином,

который продуцируют Тфх в больших количествах, является IL-21 [219, 340]. Наряду с аутокринной регуляцией созревания Тфх, IL-21 имеет важное значение для процесса дифференцировки В-клеток в плазматические клетки, индуцируя в них экспрессию Blimp-1 и AID [88]. IL-21 модулирует переключение изотипов иммуноглобулинов, и способствует продукции антител В-клетками [237]. Показано, что в В-клетках IL-21, совместно с сигналом от CD40, увеличивает экспрессию Bcl-6, кроме того, увеличивает экспрессию синдекана-1 (CD138), но уменьшает экспрессию PAX5 [230].

IL-21 может участвовать в развитии различных аутоиммунных заболеваний. При ревматоидном артрите наблюдается повышенная экспрессия IL-21R на клетках синовиальной оболочки и на лейкоцитах периферической крови, а активация лимфоцитов при помощи IL-21 и моноклональных антител к CD3 приводит к повышенной продукции TNF- α и IFN- γ [170]. Блокирование IL-21R при этом заболевании ведет к ослаблению воспалительной реакции [8]. Также гиперпродукция IL-21 наблюдается при болезни Крона и неспецифическом язвенном колите [89]. Было показано, что Тфх играют определенную роль в развитии аутоиммунного гепатита, при котором в крови увеличивается концентрация IL-21 и количество клеток, экспрессирующих молекулярные маркеры Тфх – Bcl-6 и IL-21 [5].

По мере увеличения герминативных центров, Тфх начинают секретировать IL-4, который способствует дифференцировке плазмочитов [323, 330, 340]. IL-4 служит фактором выживания В-клеток, поскольку способствует экспрессии Bcl-XL [330].

Результаты разных исследований продемонстрировали, что Тфх способны также продуцировать цитокины, свойственные другим популяциям Т-хелперов, а именно IFN- γ и IL-17, что, возможно, отражает высокую пластичность данной группы клеток и способность в различных ситуациях осуществлять разнообразные иммунологические функции [283]. ICOS⁺CXCR5⁺ Тфх способны синтезировать IL-17 [324]. Также, среди Т-клеток зародышевого центра были обнаружены клетки, экспрессирующие FoxP3 и синтезирующие IL-10. По-

видимому, эти клетки играют регуляторную роль и ограничивают продукцию антител [176].

Клетки мышей с фенотипом Тфх продуцировали IL-4 при инфицировании различными паразитами, которые обычно индуцируют реакции, связанные с развитием клеток Тх2 и переключением изотипов Ig на IgE. Эти Тфх находились в зародышевых центрах и могли образовывать контакты с В-клетками. В других экспериментах, Тфх, взаимодействующие с В-клетками зародышевых центров, в зависимости от условий развития, продуцировали либо IL-4, либо IFN- γ [149]. Однако Тх1 и Тх2 в определенных условиях также приобретают возможность функционировать как Тфх. Pearce и коллеги собрали антиген-специфические не-Тфх клетки, способные к продукции IL-4 из лимфатических узлов мышей, инфицированных *Schistosoma mansoni* [343]. Когда эти клетки перенесли мышам, также инфицированным *Schistosoma mansoni*, некоторые из перенесенных клеток приобретали фенотип Тфх, что согласуется с концепцией, согласно которой Тх2 могут приобрести черты Тфх [348].

Таким образом, Тфх внутри герминативных центров наряду с типичным для них IL-21 способны продуцировать цитокины, свойственные Тх1 [189], Тх2 [253] и Тх17 [122]. Ввиду такой большой пластичности субпопуляции её линейный статус неоднократно ставился под сомнение, поскольку не вписывался в общепризнанную цитокиноцентрическую парадигму развития эффекторных Т-хелперов [245].

Однако, большое количество накопленных данных о пластичности других субпопуляций Т-хелперов не позволяет считать пластичность Тфх уникальной. Вероятно, возможность развития Тх не ограничена строгими рамками описанных субпопуляций. По мнению O'Shea и коллег, легко представить себе потребность в разнонаправленных узкоспециализированных линиях Т-хелперов, учитывая широкое многообразие микробных патогенов. Терминальная дифференцировка Т-хелперов может быть не выгодна при изменяющихся условиях протекания иммунного ответа. И, тем не менее, остается дискуссионным вопрос относительно

того, как именно осуществляется выбор доминирующего типа иммунного ответа, наиболее подходящего в каждой конкретной ситуации [223].

1.6. Транскрипционные факторы, управляющие созреванием Тфх

1.6.1. Факторы, стимулирующие развитие Тфх

Основным мастер-регулятором программы созревания Тфх считается ядерный фактор транскрипции Bcl-6 (белок 6 В-клеточной лимфомы). Впервые ген *Bcl-6*, кодирующий одноименный белок, был обнаружен 1993 году в неходжкинских лимфомах [21, 56, 141, 337].

Белок Bcl-6 содержит в N-концевой части молекулы ВТВ/POZ-домен и в C-концевой части молекулы – 6 ДНК-связывающих мотивов типа цинковый палец (C2H2). Также в средней части белковой молекулы находятся 3 PEST-мотива, регулирующие активность и стабильность транскрипционного фактора. Bcl-6 репрессирует транскрипцию только в комбинации с корепрессорами: NCOR1, NCOR2, BCOR, MTA3, CTBP1, SMRT, BAZF, PLZF, MIZ1. Анализ диффузной В-клеточной лимфомы позволил выяснить, что Bcl-6 связывает 3345 генов, однако общей для разных типов клеток оказалось лишь меньшая половина этого списка [65].

В В-клеточных лимфомах Bcl-6 играет роль ведущего онкогена, поскольку подавляет гены, ответственные за арест клеточного цикла и индукцию апоптоза в ответ на повреждения ДНК, в частности, гены белков p53, циклина D2, ATR и CHEK1. В результате в клетках накапливаются хромосомные транслокации, ведущие к нарушению функции множества генов, включая неконтролируемую экспрессию самого *Bcl-6* [21, 81].

В норме Bcl-6 активен в В-клетках зародышевых центров периферических лимфоидных органов [45] и служит главным фактором выживания В-лимфоцита на этапе активной пролиферации и перестройки ДНК в ходе созревания аффинитета и переключениях изотипов антител [21, 81]. Bcl-6 подавляет транскрипцию генов ареста клеточного цикла и апоптоза, но облегчает экспрессию AID [65]. В результате клетки могут инициировать переключение

изотипов и соматические гипермутации и, при этом, пролиферировать, не подвергаясь апоптозу, несмотря на неизбежные повреждения ДНК в локусе IGН [239, 249]. Также Bcl-6 способствует сохранению фенотипа В-клеток герминативных центров, подавляя активность своего антагониста Blimp-1 – регулятора дифференцировки В-лимфоцитов в плазматические клетки [221]. Экспрессия Bcl-6 в значительной степени снижается в процессе завершения реакции зародышевого центра, что позволяет В-клеткам дифференцироваться в плазматические клетки и В-клетки памяти.

Роль белка Bcl-6 для Тфх была показана в 2009 году, когда несколько исследователей одновременно сообщили, что экспрессия Bcl-6 в Т-клетках существенна для развития Тфх и образования герминативных центров [133, 221, 339]. Bcl-6 напрямую репрессирует гены, способствующие локализации Т-клеток вне герминативных центров. К ним относятся гены направляющих и адгезионных рецепторов CCR6, EBI2, PSGL1, CCR7 и S1PR1 [309]. Bcl-6 также подавляет гены, необходимые для дифференцировки других типов Т-клеток, такие как *TBX21*, *GATA3* и *RORC*. В CD4⁺ Т-клетках Bcl-6 приводит к экспрессии генов мембранных молекул, свойственных Тфх: CXCR5, CXCR4, PD1 [206, 270]. Также Bcl-6 непосредственно подавляет экспрессию IL-7R, IL-2R и STAT5 [118, 184]. Кроме того, Bcl-6 подавляет гены, лежащие в основе гликолиза - метаболического процесса, который имеет решающее значение для пролиферации эффекторных Т-клеток, но ослаблен у Т-клеток памяти и Тфх [226, 231, 251, 318].

Как уже отмечалось выше, важную роль в индукции экспрессии гена Bcl-6 в ходе дифференцировки Тфх выполняет молекула ICOS, сигнал от которой активирует PI3K и mTORc2, который, в свою очередь, подавляет FOXO1 [344]. На В-лимфоцитах герминативных центров было показано, что ингибирование участка p110d молекулы PI3K изменяет баланс между IRF4 (антагонист Bcl-6) и Bcl-6, что приводит к повышению экспрессии фактора IRF4 и отрицательной регуляции Bcl-6 [345].

В Тфх экспрессия Bcl-6 подавляется PRDM1. IFN- α и - β напрямую ингибирует экспрессию гена Bcl-6 в В-клетках и Тфх. Сигналы от IFN приводят к

экспрессии ядерного фактора T-bet, который подавляет экспрессию Bcl-6 и ведет к развитию T_H1. Bcl-6 обладает способностью саморегулирования своего уровня экспрессии в В-клетках, и, возможно, данный механизм идентичен для Тфх [221]. Посттранскрипционная инактивация Bcl-6 осуществляется посредством ацетилирования, опосредованного действием гистон-ацетилтрансферазы p300 и последующей деградации по убиквитин-протеасомному пути. Деградация Bcl-6 в В-клетках происходит при помощи FBXO11-CUL1 E3-лигазного комплекса и белка COP55 из сигнасомы COP9 [77, 282]. Белок теплового шока Hsp90 наоборот защищает белок от деградации и продлевает жизнь мРНК Bcl-6 [249].

Наряду с Bcl-6 важную роль в снижении экспрессии CCR7 и повышении экспрессии CXCR5 играет передача сигнала через активин А [187]. Высокий уровень экспрессии фактора транскрипции NFAT2 в Тфх также способствует экспрессии CXCR5 [304]. Уменьшение количества CXCR5⁺ Т-лимфоцитов наблюдалось в NFAT1/2-дефицитных мышцах, инфицированных вирусом лимфоцитарного хориоменингита [200].

В то время как Bcl-6 ответственен за экспрессию многих генов, ассоциированных с дифференцировкой Тфх, он не играет роли в экспрессии IL-21. Экспрессию IL-21 индуцирует транскрипционный фактор c-Maf. Экспрессию c-Maf индуцируют ICOS, IL-6 и IL-27 [27, 121, 164, 243]. Экспрессия хемокинового рецептора CXCR5 также зависит от ядерного фактора c-Maf [156].

Сигнал от IL-6R передает белок STAT3. Дефицит STAT3 приводит к нарушению развития В-клеточного ответа, снижению количества циркулирующих Тфх и отсутствию экспрессии IL-21 [84, 252]. Для CD8⁺ Т-лимфоцитов известно, что сигнал через IL-6R приводит к активации транскрипционных факторов STAT3 и NFAT2, последний из которых взаимодействует с промотором гена Pdccl1, что приводит к экспрессии PD-1 [18]. Возможно, что экспрессия PD-1 на Тфх обусловлена аналогичным механизмом. Снижение экспрессии основных маркеров Тфх, таких как CXCR5, ICOS и PD-1 наблюдалось в мышцах с дефицитом факторов NFAT2 и NFAT1, инфицированных LCMV, штаммом Armstrong [200].

Большое значение для экспрессии *Bcl-6* имеет транскрипционный регуляторный фактор интерферона 4 (IRF4), и *Irf4*^{-/-} CD4⁺ Т клетки теряют экспрессию *Bcl-6*, что приводит к угнетению образования Тфх [32].

Транскрипционные факторы LEF-1 и TCF-1 положительно влияют на созревание Тфх и экспрессию хемокинового рецептора CXCR5. На ранних стадиях вирусной инфекции вирус-специфичные Тфх одновременно экспрессируют TCF-1 и Blimp-1 [329]. Дефицит TCF-1 приводит к обеднению популяции Тфх и нарушению их созревания. TCF-1 напрямую связывается с промотором *Bcl-6*, активируя экспрессию белка *Bcl-6*, и с регуляторным регионом *prdm 5'*, репрессируя экспрессию Blimp-1. Также TCF-1 подавляет экспрессию IL-2R [51, 335]. LEF-1 усиливает экспрессию IL-6R и ICOS [51].

1.6.2. Факторы, угнетающие развитие Тфх

Blimp-1 – транскрипционный репрессор, играющий критическую роль в созревании терминальных В-клеток [230], и принимающий участие в Т-клеточной дифференцировке [136, 137, 201]. Он отрицательно регулирует дифференцировку Тфх путем прямого подавления *Bcl-6* и ингибирования экспрессии PD-1 при помощи репрессии транскрипционного фактора NFAT2 (который способствует экспрессии PD-1) [133].

Транскрипционный фактор STAT5 подавляет образование Тфх, ослабляя экспрессию CXCR5, c-Maf и *Bcl-6* [132, 222]. Поэтому ингибирование STAT5 в условиях *in vivo* приводит к повышенному образованию Тфх. При отсутствии Blimp-1 сигнал через STAT5 не влиял на созревание Тфх, в то время как повышенная экспрессия Blimp-1 при отсутствии STAT5 приводила к ослаблению дифференцировки Тфх. Таким образом, сигнальный путь, затрагивающий IL-2/STAT5, а так же Blimp-1, негативно регулирует созревание Тфх [132].

Известно, что ядерные факторы транскрипции T-bet и *Bcl-6*, необходимые для дифференцировки Тх1 и Тфх соответственно, коэкспрессируются в течение ранних и поздних стадий созревания клеток и могут оказывать регулирующее влияние друг на друга. IL-12 через активацию STAT4 способствует индукции IL-

21 и Bcl-6 на ранней стадии дифференцировки T_H1, но на поздних стадиях, STAT4-индуцированный фактор транскрипции T-bet репрессирует Bcl-6, что приводит к дифференцировке наивных CD4⁺ Т клеток в T_H1 [215].

Фактор транскрипции FOXO1 способен подавлять экспрессию Bcl-6 [162, 290]. Кроме того, FOXO1 стимулирует экспрессию фактора транскрипции KLF2 [142, 322]. KLF2 негативно регулирует дифференцировку Тфх за счет стимуляции экспрессии CCR7, CD62L, S1PR1, PSGL1 и подавления экспрессии CXCR5 [142, 164, 322]. Разрушение FOXO1 осуществляется после его убиквитинилирования E3 убиквитин лигазой Itch, которая способствует созреванию Тфх [332].

Белок E, ассоциированный с центромерой, и его репрессоры, ингибиторы связывания белков с ДНК (Id1-Id4), играют критическую роль в дифференцировке Тфх. Субпопуляция Тфх увеличивалась после подавления трансляции Id2 с помощью РНК-интерференции, а повышенная экспрессия Id3 сильно угнетает образование Тфх клеток при LCMV-инфекции. Экспрессия белка E47 приводила к увеличению экспрессии CXCR5, в то время как Id2 ингибировал CXCR5 [278, 317].

Белок Roquin 1 угнетает дифференцировку Тфх путем подавления экспрессии ICOS и OX40 [244, 310].

1.7. МикроРНК и созревание Тфх

МикроРНК (miRNAs) способны регулировать экспрессию генов Тфх путем РНК-интерференции. По-видимому, кластер miRNA 17~92, кодирующий шесть miRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 и miR-92-1), имеет особое значение для развития Тфх. Было показано, что в Т-клетках мышей, не имеющих miR-17~92, в ответ на вирусную инфекцию и белковую иммунизацию происходит селективное угнетение образования Тфх и долгоживущих плазмочитов, замедляется процесс антителообразования. MiR-17~92 способны активировать основные Тфх-ассоциированные молекулы, такие как Bcl-6, CXCR5 и IL-21. Сверхэкспрессия miR-17~92 в Т-клетках способствует развитию аутоиммунных реакций, симптоматика которых сходна с симптоматикой системной красной

волчанки, что связывают со спонтанным накоплением Тфх и В-клеток герминативных центров, а так же повышенной продукцией антител [45, 137].

Показано, что на молекулярном уровне miR-17~92 подавляют экспрессию PTEN и PHLPP2, регулируя дифференцировку и функции Тфх. Костимуляция через CD28 частично опосредует индукцию miR-17~92 и последующее подавление фосфатазы PTEN, которая является одним из немногих негативных регуляторов PI3K/AKT/mTOR-сигнального пути [24]. Подавление PHLPP2 является критическим для регуляции интенсивности передачи сигналов по пути ICOS-PI3K. Как показано выше, сигнал через ICOS приводит к миграции Т-клеток в В-клеточные фолликулы. Действительно, удаление miR-17~92 из Т-клеток приводит к повышенной экспрессии белка PHLPP2, нарушению передачи сигналов через ICOS-PI3K, уменьшению миграции Т-хелперов в В-клеточные фолликулы и нарушению дифференцировки Тфх [137]. Однако известно, что транскрипционный фактор Bcl-6 напрямую репрессирует несколько микроРНК, включая miR-17~92, которые, в свою очередь, подавляют экспрессию CXCR5 в Т-фолликулярных хелперах. Возможно, механизмы действия этого кластера микроРНК на этапах созревания Тфх могут различаться [38, 271, 339].

1.8 Атипичная функция Тфх при инфекции, обусловленной *H. pylori*

H. pylori вызывает хроническую инфекцию приблизительно у половины населения планеты. Проявления инфекции, вызываемой этим микроорганизмом, варьируют от бессимптомного инфицирования до гастрита и язвенной болезни [157, 199]. Предполагается, что манифестные формы этой инфекции ассоциированы с утратой иммунорегуляции и усилением провоспалительного клеточного иммунного ответа, индукторами которого являются специфичные к *H. pylori* Т-хелперы.

При инфицировании добровольцев уже через 2 недели наблюдаются признаки иммунного ответа и воспаления: инфильтрация слизистой желудка лейкоцитами, локальный рост продукции IL-1, IL-6 и IL-8, появление антител к *H.*

pylori в крови [110, 218]. Несмотря на быстрое развитие, иммунный ответ оказывается недостаточно эффективным для устранения инфекции. Гуморальный иммунный ответ не оказывает значительного действия на *H. pylori*, поскольку репликативные ниши микроорганизма недоступны для IgM и IgG, а малое количество полимерного иммуноглобулинового рецептора в желудке и связанный с этим недостаток секреции IgA не позволяет полностью устранить *H. pylori* с поверхности эпителия [209]. Провоспалительный клеточный иммунный ответ, по-видимому, сдерживает размножение *H. pylori*, но, при этом, вносит решающий вклад в развитие симптомов гастрита [157]. По крайней мере, заражение хеликобактером мышей с отсутствием Т-лимфоцитов или антиген-специфических Т-хелперов вызывает пожизненную массивную, но бессимптомную инфекцию, тогда как введение этим мышам нормальных Т-хелперов вызывает уменьшение бактериальной нагрузки и, в то же время, развитие острого гастрита [82, 111].

При персистентной *H. pylori*-инфекции слизистая желудка инфильтрирована Т- и В-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами, эозинофильными и нейтрофильными гранулоцитами, тучными клетками и дендритными клетками (ДК), причем Т-, В-лимфоциты и ДК организованы в лимфоидные фолликулы, что свидетельствует о постоянной антигенной презентации [296]. Основными индукторами воспаления являются IL-17A и, особенно, IFN- γ , который при *H. pylori*-инфекции продуцируется различными типами клеток [111]. При этом продукция IFN- γ зависит от IL-17A – ключевого цитокина Т-хелперов-17 (Тх17) [279], и от IL-23 [43] – цитокина дендритных клеток, основной функцией которого является стимулирование Тх17 [144]. Кроме того, продукция IFN- γ , IL-17A и развитие воспаления в модели *H. pylori*-инфекции у мышей нуждается в IL-21 – цитокине, который продуцируют фолликулярные Т-хелперы (Тфх), а также Тх17 и NKT-клетки [42], причём у инфицированных мышей наблюдается накопление Тфх в мезентериальных лимфатических узлах и *lamina propria* желудка [163]. Таким образом, в провоспалительном клеточном иммунном ответе на *H. pylori* могут синергично участвовать не только «профессиональные»

стимуляторы воспаления: Th17 и различные IFN- γ -продуцирующие клетки, но и Tfh, которые при данной инфекции могут выполнять несвойственную им провоспалительную функцию и вносить вклад в патогенез заболевания [190].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Общая схема исследований

Объектом исследования являлись клетки крови взрослых практически здоровых доноров, и культивируемые в различных условиях стимуляции. Кроме того в работе использовались клетки крови пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта, ассоциированными с *H. pylori*-инфекцией. Характеристика пациентов приведена в п. 2.25.

На первом этапе работы оценивалась возможность миграции наивных Т-лимфоцитов хелперов в В-клеточные зоны лимфоидных органов. Для этого из периферической крови взрослых здоровых доноров выделяли $CD4^+CD45RA^+CD45RO^-$ наивные Т-хелперы с помощью иммуномагнитной сепарации и оценивали экспрессию на них хемокинового рецептора CXCR5, направляющего клетки в фолликулы лимфоидных органов. Также оценивалась экспрессия хемокинового рецептора CXCR4 и рецептора CCR7, отвечающего за миграцию в Т-клеточную зону. Для точной характеристики степени зрелости обнаруженной группы $CD45RA^+CD45RO^-CXCR5^+$ Т-хелперов определяли экспрессию на них молекул, ассоциированных с активацией и созреванием (ICOS, OX40, CD40L, PD-1) и полученные показатели сравнивали с основной группой $CXCR5^-$ наивных Т-хелперов и со зрелыми $CD45RO^+$ Т-хелперами. Кроме того, с помощью внутриклеточного иммунофлуоресцентного окрашивания в $CXCR5^+$ и $CXCR5^-$ наивных Т-хелперах оценивалось наличие ядерного фактора Bcl-6.

Для оценки возможности миграции ДК в В-клеточную зону лимфоидных органов использовали ДК, полученные традиционным способом из моноцитов *in vitro* (подробнее – ниже). Незрелые ДК активировали различными стимуляторами (смесь индукторов воспаления, вакцины, стимулирующие гуморальный и клеточный иммунитет, инактивированные бактерии и грибы) и через 2 суток оценивали экспрессию на них хемокиновых рецепторов CXCR5, CCR7 и CXCR4, а также типичные для ДК маркеры (HLA-DR, CD80, CD83, CD86).

На первом этапе работы была обнаружена экспрессия CXCR5 на подгруппе наивных циркулирующих Т-хелперов и на ДК, полученных в определенных

условиях стимуляции, что свидетельствует о принципиальной возможности миграции этих клеток в В-клеточную зону лимфоидных органов и установления контакта с В-лимфоцитами. В связи с этим на следующем этапе работы исследовался процесс созревания Тфх в моделях *in vitro*, в которых наивные Т-хелперы взаимодействовали с В-лимфоцитами или с ДК. Для создания смешанных культур наивные Т-хелперы и В-лимфоциты выделяли из крови доноров иммуномагнитной сепарацией, а ДК получали из моноцитов *in vitro*. Затем наивные Т-хелперы сокультивировали с аллогенными В-лимфоцитами или с аллогенными ДК и оценивали появление в культуре активированных Т-клеток (лимфобластов) с типичным фенотипом Тфх ($CD4^+CD45RO^+CXCR5^+CCR7^-$). Также в группах созревающих клеток, различающихся по наличию CXCR5 и CCR7, оценивалось изменение экспрессии молекул, ассоциированных с активацией и созреванием (ICOS, OX40, CD40L, PD-1). С помощью комбинации поверхностного и внутриклеточного окрашивания определяли появление в созревающих CXCR5⁺ Т-хелперах ядерного фактора Bcl-6. Кроме того, в смешанных культурах Т-хелперов и ДК оценивали экспрессию генов мастер-регуляторов основных субпопуляций Т-хелперов (*T-bet*, *GATA3*, *RORc*, *Bcl-6*) с помощью полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией, (ОТ-ПЦР) в реальном времени. Поскольку сокультивирование В-лимфоцитов с наивными Т-хелперами приводило к преимущественному созреванию клеток с фенотипом Тфх, была исследована ответная реакция В-клеток на контакт с созревающими Тфх. Для этого у В-клеток оценивался прирост экспрессии характерных для фенотипа В-клеток зародышевых центров молекул CXCR5 и Bcl-6. О запуске процесса переключения изотипов иммуноглобулинов судили по уменьшению доли В-клеток, несущих мембранный IgM. Кроме того, исследовался фенотип Т-хелперов при язвенной болезни желудка.

2.2. Объем исследований

Для поиска CXCR5⁺ клеток среди циркулирующих наивных Т-лимфоцитов и их фенотипической характеристики было получено 120 образцов для 4-х

цветной лазерной проточной цитометрии (включая контрольные образцы и образцы контроля чистоты иммуномагнитной сепарации) из крови 12 доноров.

Для исследования экспрессии хемокиновых рецепторов на ДК при различных условиях стимуляции использовались моноциты из 32 образцов донорской крови. Из моноцитов было получено 150 вариантов культур незрелых и зрелых ДК с использованием различных активаторов созревания. При иммунофлуоресцентном окрашивании было получено 1186 образцов для 2-х цветной лазерной проточной цитометрии (включая контрольные).

Для исследования созревания Тfh *in vitro* было поставлено 25 независимых экспериментов. Из них: 19 экспериментов с использованием смешанных культур Т- и В-лимфоцитов (57 вариантов культур, включая контрольные) и 7 экспериментов с использованием смешанных культур Т-лимфоцитов и ДК (21 вариант культур). При иммунофлуоресцентном окрашивании было получено 410 образцов для 4-х цветной лазерной проточной цитометрии (включая контрольные образцы и образцы контроля чистоты иммуномагнитной сепарации). Для постановки ОТ-ПЦР было использовано 4 образца смешанных культур Т-лимфоцитов и ДК-ЦТК.

Всего было засеяно 228 вариантов культур клеток и проведено 1886 цитометрических исследований.

2.3. Реагенты, использованные в работе

1. Моноклональные антитела анти-CD4, конъюгированные с флуоресцеинизотиоционатом (FITC), («Сорбент», г. Москва)
2. Моноклональные антитела анти-HLA-DR, конъюгированные с флуоресцеинизотиоционатом (FITC), («Сорбент», г. Москва)
3. Моноклональные антитела анти-IgM, конъюгированные с флуоресцеинизотиоционатом (FITC), («Сорбент», г. Москва)
4. Моноклональные антитела анти-CD3, конъюгированные с фикоэритрином («Сорбент», г. Москва)
5. Моноклональные антитела анти-CD14, конъюгированные с фикоэритрином («Сорбент», г. Москва)

6. Моноклональные антитела анти-CXCR4, конъюгированные с фикоэритрином (eBiosciences, USA)
7. Моноклональные антитела анти-CD45RA, конъюгированные с фикоэритрином (Beckman Coulter, USA)
8. Моноклональные антитела анти-CXCR5, конъюгированные с фикоэритрином (eBiosciences, USA)
9. Моноклональные антитела анти-CD19, конъюгированные тандемным красителем фикоэритрином и цианиновым красителем Cy7 (Beckman coulter, USA)
10. Моноклональные антитела анти-CD45RO, конъюгированные с тандемным красителем перидинин-хлорофилл протеином - eFluor 710 (eBiosciences, USA)
11. Моноклональные антитела анти-CCR7, конъюгированные с аллофикоцианином (eBiosciences, USA)
12. Моноклональные антитела анти-Bcl-6, конъюгированные с аллофикоцианином (eBiosciences, USA)
13. Моноклональные антитела анти-CD40L, конъюгированные с аллофикоцианином (eBiosciences, USA)
14. Моноклональные антитела анти-OX40, конъюгированные с аллофикоцианином (eBiosciences, USA)
15. Моноклональные антитела анти-PD1, конъюгированные с аллофикоцианином (eBiosciences, USA)
16. Моноклональные антитела анти-ICOS, конъюгированные с аллофикоцианином (eBiosciences, USA)
17. Моноклональные антитела анти-CXCR5, конъюгированные с аллофикоцианином (eBiosciences, USA)
18. Моноклональные антитела анти-CD80, конъюгированные с фикоэритрином (eBiosciences, USA)
19. Моноклональные антитела анти-CD83, конъюгированные с фикоэритрином (eBiosciences, USA)

20. Моноклональные антитела анти-CD86, конъюгированные с фикоэритрином (eBiosciences, USA)
21. Моноклональные антитела анти-CCR6, конъюгированные с фикоэритрином (eBiosciences, USA)
22. Моноклональные антитела анти-CCR9, конъюгированные с фикоэритрином (eBiosciences, USA)
23. Набор для выделения наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов методом иммуномагнитной сепарации с негативной селекцией EasySep® Negative Selection Human Naïve CD4⁺ T Cell Enrichment Kit (Stemcell technologies, USA).
24. Набор для выделения наивных В-лимфоцитов методом иммуномагнитной сепарации с негативной селекцией EasySep® Negative Selection Human B Cell Enrichment Kit (Stemcell technologies, USA)
25. Рекомбинантный человеческий IL-4 (R&D, USA)
26. Рекомбинантный человеческий IL-4 (Sci-store, Россия)
27. Рекомбинантный человеческий IL-1 β (R&D, USA)
28. Рекомбинантный человеческий IL-6 (R&D, USA)
29. Рекомбинантный человеческий IL-6 (Sci-store, Россия)
30. Рекомбинантный человеческий GM-CSF (R&D, USA)
31. Рекомбинантный человеческий GM-CSF (Sci-store, Россия)
32. Рекомбинантный человеческий фактор некроза опухоли α (Sigma-aldrich, USA)
33. Простагландин E₂ (Sigma-aldrich, USA)
34. Набор буферов для окрашивания внутриклеточных белков Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBiosciences, USA)
35. Набор для выделения РНК NucleoSpinRNA XS (Macherey-Nagel, Germany).
36. Набор TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents kit для оценки экспрессии генов *Bcl-6*, *TBX21*, *GATA3*, и *RORc* (Applied Biosystems, USA)
37. Набор TaqMan gene expression assay reagents для оценки экспрессии генов *Bcl-6*, *TBX21*, *GATA3*, и *RORc* (Applied Biosystems, USA)

38. Этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) (Gibco, «Invitrogen», USA)
39. Hystopaque-1077 (Sigma-aldrich, USA)
40. Азид натрия (NaN_3)
41. Ингибитор ядерного фактора транскрипции Bcl-6 – 79-6 (Merck Millipore, Calbiochem, USA)
42. Дрожжевая рекомбинантная вакцина гепатита В (Комбиотех, Москва)
43. Адъювант суспензия геля гидроксида алюминия (Комбиотех, Москва).
44. BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США)

2.4. Среды для культур клеток и их компоненты

1. Среда Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), сухая (Sigma, USA).
2. Среда RPMI Medium 1640, жидкая 1× (Gibco, UK).
3. Фосфатно-солевой буфер Dulbecco PBS(A) (далее - PBS), сухой (Sigma-aldrich, USA).
4. L-глутамин, сухой (ПанЭко, г. Москва).
5. Эмбриональная телячья сыворотка (FCS) (PAA Laboratories, Austria).
6. Полная питательная среда (ППС) для культивирования моноклеарных клеток периферической крови.
7. Бикарбонат натрия, 7,5% раствор (Предприятие ПанЭко, г. Москва).

2.5. Приготовление полной питательной среды

Стерильную среду RPMI Medium 1640 (1×) разливали в стерильные флаконы по 90 мл, добавляли в каждый флакон по 10 мл 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки и L-глутамин по 58,4 мг на 100 мл среды. Изначально сыворотку инактивировали нагреванием при +56°C в течении 30 мин., стерильно разливали по 10 мл во флакон и хранили при - 20°C до использования. При хранении готовой ППС более двух недель повторно вносили L-глутамин.

2.6. Приготовление PBS

Содержимое флакона PBS(A) растворяли в 500 мл бидистиллята. Доводили до 1 литра и титровали до pH 7,2-7,4 (используя 10% HCl или 1 молярную NaOH). Стерилизовали фильтрацией.

2.7. Приготовление среды DMEM

1 флакон Dulbecco's Modified Eagle's Medium для приготовления 1 л среды разводили в 900 мл бидистиллированной воды, затем добавляли 49,3 мл 7,5% раствора бикарбоната натрия. Размешивали на магнитной мешалке и доводили значение pH до 7,2-7,4, используя 10% HCl или 1 молярную NaOH. Доводили объем до 1 л бидистиллированной водой. Готовую среду стерилизовали фильтрацией через мембранный фильтр Millipore с диаметром пор 0,22 мкм.

2.8. Приготовление PBS с азидом натрия

90 мг NaN₃ добавляли к 100 мл PBS для получения 0,09% раствора.

2.9. Приготовление EDTA

К 100 мл PBS добавляли 200 мг EDTA, сутки размешивали на мешалке. Затем проводили стерилизацию фильтрацией. Значения pH доводились до 7-7,2 (используя 10% HCl или 1 молярную NaOH).

2.10. Приготовление среды для иммуномагнитной сепарации

При иммуномагнитной сепарации использовалась среда для бус следующего состава: PBS(A) с 1mM EDTA (292,25 мг/л) и 2% FCS.

2.11. Стерильный забор венозной крови

Забор венозной крови для создания клеточных культур осуществляли стерильно по общепринятой методике в вакуумные пробирки Vacuette с натрия гепарином. Содержание гепарина в пробирках составляло 12-30 ед./мл крови. Стерильно взятая гепаринизированная кровь хранилась не более двух часов до начала лабораторных исследований при +4°C. Для цитометрического исследования свежевыделенных образцов крови использовали забор в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой.

2.12. Выделение мононуклеарных клеток крови и приготовление клеточных суспензий

Вся работа с клетками крови осуществлялась в ламинарных шкафах, расположенных внутри стерильных боксов. Для выделения мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) использовали метод градиентного центрифугирования. Пробы стерильной гепаринизированной крови разводили в 2 раза средой DMEM и наслаивали на слой Nystopaque-1077 (Sigma, USA) в соотношении 3:1. Пробы центрифугировали при 400 g в течение 46 минут при комнатной температуре. После центрифугирования собирали клетки интерфазы, содержащие МНПК, в центрифужную пробирку. Затем доводили объем до 10 мл средой DMEM, клетки осаждали центрифугированием при 1200 об./мин. в течение 12 минут. Образовавшийся супернатант сливали, к клеткам добавляли 10 мл среды DMEM, тщательно перемешивали суспензию клеток и подсчитывали количество клеток в камере Горяева. После подсчета осаждали клетки центрифугированием 7 минут при 1000 об./мин. Готовили суспензию МНПК в ППС с концентрацией $4,5 \times 10^6$ клеток/мл для разделения на моноциты и лимфоциты.

2.13. Разделение лимфоцитов и моноцитов

Лимфоциты получали из клеточных суспензий с концентрацией $4,5 \times 10^6$ клеток/мл свежевыделенных МНПК, которые засеивали по 1 мл суспензии на лунку на 24-луночные полистироловые планшеты (Costar, USA) и инкубировали 2 часа при 37° С в CO₂-инкубаторе. После инкубации неадгезировавшиеся клетки (лимфоциты) осторожно смывали средой DMEM (по 1 мл на лунку) 3-4 раза. Собранные лимфоциты использовались для выделения наивных Т-лимфоцитов хелперов и В-лимфоцитов, а адгезировавшиеся клетки (моноциты) – для получения ДК.

2.14. Получение наивных Т-хелперов

Наивные CD4⁺ Т-лимфоциты хелперы (нТх) выделяли иммуномагнитной сепарацией с негативной селекцией с помощью набора EasySep® Negative Selection Human Naïve CD4⁺ T Cell Enrichment Kit (Stemcell technologies, USA).

Для сепарации использовали клеточную суспензию лимфоцитов, имеющую объем от 250 мкл до 2 мл с концентрацией 5×10^7 кл/мл. Выделение осуществлялось в несколько этапов в соответствии с инструкцией производителя:

1. Готовили суспензию клеток с концентрацией 5×10^7 кл/мл в среде для бус. Суспензию клеток переносили в полистироловые 5 мл (12×75 мм) пробирки (Falcon™ 5 mL Polystyrene Round-Bottom Tubes BD Biosciences), подходящие к магниту Purple EasySep™ Magnet (Stemcell technologies, USA).

2. Добавляли биотинилированные антитела к CD45RO (EasySep™ Biotinylated Anti-CD45RO Antibody) из расчета по 50 мкл на каждый мл суспензии клеток. Тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре (15-25°C) 15 минут.

3. Добавляли обогащенный коктейль антител (EasySep™ Human Naïve CD4+ T Cell Enrichment Cocktail) по 50 мкл на каждый мл исходного объема суспензии клеток. Тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 10 минут.

4. Перемешав при помощи пипетки смесь магнитных наночастиц (EasySep™ Magnetic Nanoparticles) и убедившись, что частицы распределились равномерно, добавляли их к клеточной суспензии по 100 мкл на каждый мл исходного объема суспензии клеток. Тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 10 минут.

5. Доводили клеточную суспензию до 2,5 мл средой для бус. Смесь клеток в пробирке аккуратно пипетировали 2-3 раза. Пробирку помещали в магнит (Purple EasySep™ Magnet) на 10 минут.

6. Брали магнит, и одним верным непрерывным движением переливали клеточную суспензию в новую полистироловую 5 мл пробирку. Оставляли магнит и пробирку в перевернутом положении на 2-3 секунды, затем возвращали

пробирку в вертикальное положение. Нежелательные клетки оставались в старой пробирке, прижатые магнитом к стенке.

7. Пробирку с собранной суспензией клеток помещали в магнит на 10 минут и повторяли пункт 6.

Затем подсчитывали выход клеток при помощи камеры Горяева. Клетки осаждали центрифугированием при 1000 об./мин. 7 минут и ресуспендировали в среде ППС в концентрации 5×10^5 кл/мл.

2.15. Получение В-лимфоцитов

В-лимфоциты выделяли иммуномагнитной сепарацией с негативной селекцией с помощью набора EasySep® Negative Selection Human B Cell Enrichment Kit (Stemcell technologies, USA)

Для выделения В-лимфоцитов использовали клеточную суспензию лимфоцитов, имеющую объем от 500 мкл до 2 мл с концентрацией 5×10^7 кл/мл. Выделение осуществлялось в несколько этапов в соответствии с инструкцией производителя:

1. Готовили суспензию клеток, имевшую концентрацию 5×10^7 кл/мл в среде для бус. Суспензию клеток переносили в полистироловые 5 мл (12×75 мм) пробирки (Falcon™ 5 mL Polystyrene Round-Bottom Tubes BD Biosciences).

2. Добавляли обогащенный коктейль антител (EasySep™ Human B Cell Enrichment Cocktail) по 50 мкл на каждый мл суспензии клеток. Тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 10 минут.

3. Перемешивали магнитные частицы (EasySep™ D Magnetic Particles) в течение 30 секунд до исчезновения видимых агрегатов.

4. Добавляли магнитные частицы к клеточной суспензии по 75 мкл на каждый мл суспензии клеток. Тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 5 минут.

5. Доводили клеточную суспензию до объема 2,5 мл средой для бус. Смесь клеток в пробирке аккуратно пипетировали 2-3 раза. Пробирку помещали в магнит на 5 минут.

6. Брали магнит, и одним верным непрерывным движением переливали клеточную суспензию в центрифужную пробирку. Оставляли магнит и пробирку в перевернутом положении на 2-3 секунды, затем возвращали пробирку в вертикальное положение. Нежелательные клетки оставались в старой пробирке.

Затем подсчитывали выход клеток при помощи камеры Горяева. Клетки осаждали центрифугированием при 1000 об./мин. 7 минут и ресуспендировали в среде ППС в концентрации $2,5 \times 10^5$ кл/мл. В данной концентрации клетки добавляли к нТх.

2.16. Получение дендритных клеток

Для получения незрелых дендритных клеток выделяли моноциты из мононуклеарных клеток периферической крови. Отделяли от МНПК при помощи адгезии на пластике, как это описано в п. 2.13. Лунки с высокой клеточной плотностью использовали в дальнейшей работе. К адгезировавшимся моноцитам добавляли по 750 мкл/лунку среду ППС, вносили рекомбинантные человеческие GM-CSF до концентрации 100 нг/мл и IL-4 до концентрации 20 нг/мл. Клетки инкубировали при $+37^\circ \text{C}$ и 5 % CO_2 . На третьи сутки культивирования повторно вносили GM-CSF и IL-4 в указанных концентрациях.

К 7 суткам культивирования моноциты дифференцировались в незрелые ДК. Для индукции созревания незрелые ДК из 7-ми суточных культур пересеивали в свежую ППС, добавляли индукторы созревания и культивировали еще 2 суток.

Наиболее эффективным индуктором созревания была смесь медиаторов воспаления: 25 нг/мл IL-1 β , 25 нг/мл IL-6, 50 нг/мл TNF- α , 1 мкг/мл простагландина E_2 . Такие стимулированные цитокинами зрелые ДК обозначены далее ДК-ЦТК. Контрольные ДК, росшие 2 суток в ППС без стимуляторов, сохраняли фенотип незрелых ДК и обозначены далее нДК.

При исследовании экспрессии CXCR5 в качестве индукторов созревания также использовали дрожжевую рекомбинантную вакцину гепатита В (Комбиотех, Москва), адъювант суспензию геля гидроксида алюминия (Комбиотех, Москва), и инактивированные (убитые нагреванием) бактерии (*Escherichia coli* штамм M17, *Bacillus cereus* штамм IP5832) и грибы (*Saccharomyces boulardii*, *Candida albicans*) в концентрациях от 10^4 до 10^8 микроорганизмов в мл.

После культивирования ДК собирали, подсчитывали в камере Горяева, осаждали центрифугированием и использовали для оценки экспрессии мембранных молекул или использования в смешанных культурах клеток. Для добавления в смешанные культуры с нТх ДК дважды отмывали и разводили до концентрации 10^5 клеток/мл в ППС.

2.17. Создание смешанных культур Т- и В-лимфоцитов

При засеве смешанных культур наивных Т-хелперов (нТх) и В-лимфоцитов использовали соотношение 1:5, воспроизводящее преобладание В-клеток в фолликулах и перифолликулярном пространстве. Смешанные культуры в нескольких повторах выращивали в круглодонных 96-луночных планшетах в ППС в течение 5 суток. В каждую лунку смешанных культур засевали по 5×10^4 нТх и $2,5 \times 10^5$ В-лимфоцитов. В качестве контролей использовались лунки с нТх без В-клеток и лунки с В-лимфоцитами без нТх. Смешанные культуры выращивали 5 суток.

2.18. Создание смешанных культур Т-лимфоцитов и ДК

При засеве смешанных культур нТх и ДК использовали соотношение 5:1, воспроизводящее преобладание Т-клеток над антигенпрезентирующими клетками в Т-клеточной зоне лимфоидных органов. Смешанные культуры в нескольких повторах выращивали в круглодонных 96-луночных планшетах в ППС в течение 5 суток. В каждую лунку смешанных культур засевали по 5×10^4 нТх и 10^4 ДК. Кроме того, добавляли одиночные контрольные лунки с нТх и с ДК. Смешанные культуры выращивали 5 суток.

2.19. Определение экспрессии молекул на наружной мембране лимфоцитов методом лазерной проточной цитофлуориметрии

Для исследования фенотипа наивных Т-хелперов, Т-хелперов и В-лимфоцитов смешанных культур, а также для оценки чистоты иммуномагнитной сепарации использовалось иммунофлуоресцентное окрашивание и лазерная проточная цитофлуориметрия.

Для этого клетки осаждали на центрифуге с ротором для планшетов при 1500 оборотах в мин. в течение 4 мин., надосадок сбрасывали, и клетки ресуспендировали в 50 мкл PBS с 0,9 % NaN_3 . К клеткам вносили моноклональные антитела (МКА), конъюгированные с флуорохромами, в количестве, рекомендуемом производителями. Для оценки фенотипа нТх и Тх из смешанных культур использовались МКА к следующим молекулам: CD3, CD4, CD45RO, CD45RA, CD40L, CD134 (OX40), CD279 (PD-1), CD278 (ICOS), CCR7 и CXCR5. Для оценки фенотипа свежевыделенных В-лимфоцитов и В-клеток из смешанных культур использовались МКА к следующим молекулам: CD45, CD19, CD16, CD56, IgM, CXCR5. После внесения МКА клетки инкубировали при +4°C 40 минут на мультишейкере. После инкубации во все лунки вносили по 150 мкл PBS с 0,9 % NaN_3 , осаждали центрифугированием и еще 1 раз отмывали с 200 мкл PBS с NaN_3 . Затем ресуспендировали осадок клеток в 200 мкл PBS с NaN_3 или в 1% растворе параформа на PBS. Окрашенные пробы анализировали на проточном цитофлюориметре FacsCalibur (BD Biosciences, США).

При анализе изменения фенотипа Т-лимфоцитов в смешанных культурах клетки последовательно выделяли в гейт лимфоцитов или в гейт лимфобластов в соответствии с профилем прямого и бокового светорассеивания, затем – в гейт CD4^+ Т-хелперов, а затем – в гейты клеток с различной экспрессией хемокиновых рецепторов CCR7 и CXCR5. При анализе изменения фенотипа В-лимфоцитов в смешанных культурах клетки последовательно выделяли в гейт лимфоцитов, затем – в гейт CD19^+ В-клеток.

Обработка результатов осуществлялась в программе CellQuest. Оценивался процент клеток, несущих маркер, а так же плотность экспрессии маркера по

геометрической средней интенсивности флуоресценции окрашенных клеток (MFI).

2.20. Внутриклеточное окрашивание ядерного фактора Bcl-6

Для оценки экспрессии ядерного фактора транскрипции Bcl-6 в Т- и В-лимфоцитах после окрашивания поверхностных маркеров клетки фиксировали и их мембраны пермеабилизировали с помощью набора реагентов Foxp3 Fixation/Permeabilization Kit (eBioscience, США) следующим образом:

1. Приготовление фиксирующего буфера (FP): концентрат (Fixation/Permeabilization Concentrate) разводился растворителем (Fixation/Permeabilization Diluent) в соотношении 1:3.
2. Приготовление пермеабилизирующего буфера (PB): концентрат (Permeabilization Buffer 10×) разводился деионизированной водой в соотношении 1:9.
3. К клеточной суспензии добавляли 200 мкл FP, центрифугировали при 1200 об./мин. 4 минуты и удаляли супернатант
4. К преципитату добавляли 200 мкл FP, инкубировали в холодильнике в течение 30 минут
5. Центрифугировали при 1200 об./мин. 4 минуты, супернатант удаляли
6. К преципитату добавляли 200 мкл PB, центрифугировали при 1200 об./мин. 4 минуты, супернатант удаляли
7. Добавляли 100 мкл PB и 4,3 мкл моноклональных антител анти-Bcl-6, конъюгированных с аллофикоцианином (eBioscience, США). Инкубировали 30 минут в холодильнике
8. После инкубации к суспензии клеток добавляли 100 мкл PB, центрифугировали при 1200 об./мин. 4 минуты, удаляли супернатант
9. К преципитату добавляли 200 мкл PB, центрифугировали при 1200 об./мин. 4 минуты, супернатант удаляли
10. Добавляли 200 мкл PBS+NaN₃
11. Проводили цитофлуориметрический анализ.

2.21. Определение экспрессии молекул на наружной мембране дендритных клеток методом лазерной проточной цитофлуориметрии

Клетки собирали из культур и осаждали центрифугированием. В зависимости от схемы эксперимента и количества проб, к осадку добавляли необходимый объем среды DMEM. Пробы вносили в лунки 96-ти луночного круглодонного планшета. Клетки в планшете осаждали на центрифуге с ротором для планшетов при 1500 оборотах в мин. в течение 4 мин., надосадок сбрасывали, и клетки ресуспензировали в PBS с 0,9 % NaN_3 . К клеткам вносили флуоресцентно меченые МКА к следующим молекулам: CD14, HLA-DR, CD80, CD83, CD86, CCR7 и CXCR5. После внесения МКА клетки инкубировали при $+4^\circ\text{C}$ 40 минут на мультишейкере при медленном круговом движении платформы. Затем во все лунки добавляли по 150 мкл PBS с 0,9 % NaN_3 , осаждали центрифугированием и еще 1 раз отмывали с 200 мкл PBS с NaN_3 . Затем ресуспендировали осадок клеток в 200 мкл PBS с NaN_3 или в 1% растворе параформа на PBS. Окрашенные пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Calibur, гейтируя ДК по профилям прямого и бокового светорассеивания.

2.22. Определение экспрессии генов ядерных факторов транскрипции при помощи полимеразной цепной реакции

3-х суточные смешанные культуры Т-хелперов и ДК-ЦТК использовали для оценки экспрессии генов ядерных факторов транскрипции основных субпопуляций Т-хелперов. Клетки смешанных культур собирали, осаждали центрифугированием и в пробирки вносили лизирующий буфер следующего состава: 100 мкл раствора RA1 и 2 мкл редуцирующего агента TCEP из набора NucleoSpinRNA XS (Macherey-Nagel, Германия). Лизаты клеток хранили при -70°C в эппендорфах. Перед использованием образцы медленно размораживали на льду в холодильнике в течение часа. РНК экстрагировали из проб с помощью набора NucleoSpinRNA XS (Macherey-Nagel, Германия).

Для этого готовили реагенты следующим образом:

1. rDNase – добавляли во флакон 230 мкл свободной от РНКазы воды, инкубировали 1 минуту при комнатной температуре. Раствор замораживали при температуре -20 °С и хранили не более 6 месяцев.

2. Carrier RNA – 300 мкг растворяли в 750 мкл раствора RA1. Концентрация – 400 нг/мл.

3. Wash Buffer RA3 – к 7 мл добавляли 28 мл 96%-100% этанола. Хранили год при комнатной температуре.

Очистка РНК осуществлялась следующим образом:

1. Для создания необходимых условий для связывания РНК добавляли 100 мкл 70% этанола к лизату, перемешивали пипетированием 5 раз.

2. Для связывания РНК в колонку NucleoSpinRNA XS с голубым кольцом вносили лизат. Центрифугировали 30 секунд при 11000 G, +4°C.

3. Десолирование кремниевой мембраны осуществляли при помощи добавления 100 мкл MDB (Membrane Desalting Buffer), центрифугировали 30 секунд на 11000 G, +4°C.

4. Для разрушения ДНК готовили реакционную смесь rDNase в стерильных пробирках для каждого изолята при помощи добавления 3 мкл ресуспендированной rDNase к 27 мкл реакционного буфера для rDNase. Аккуратно перемешивали. Затем наносили 25 мкл полученной смеси в центр кремниевой мембраны. Закрывали крышку и инкубировали 15 минут при комнатной температуре.

5. Отмывание и осушение кремниевой мембраны выполняли следующим образом.

Шаг 1. Добавляли 100 мкл буфера RA2, инкубировали 2 минуты при комнатной температуре, центрифугировали 30 секунд при 11000 G, +4°C. Помещали колонку внутрь новой пробирки.

Шаг 2. Добавляли 400 мкл буфера RA3. Центрифугировали 30 секунд при 11000 G, +4°C. Удалили слив, поместили колонку обратно, в ту же пробирку.

Шаг 3. Добавляли 200 мкл буфера RA3. Центрифугировали 2 минуты при 11000 G, +4°C для полного высушивания мембраны. Помещали колонку в свободный от нуклеаз эппендорф.

6. Элюирование высокоочищенной РНК проводили при помощи добавления 25 мкл свободной от РНКаз воды. Центрифугировали 30 секунд при 11000 G, +4°C.

Для оценки экспрессии генов ядерных факторов в однораундовой относительной количественной ОТ-ПЦР в реальном времени использовались наборы TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents kit и TaqMan gene expression assay reagents (Applied Biosystems, USA) и праймеры генов - *Bcl-6*, *TBX21*, *GATA3*, *RORc* и β_2 -микроглобулина (для нормализации) (Applied Biosystems, USA). Перед ОТ-ПЦР в оптических пробирках MicroAmp (Applied Biosystems, USA) готовили реакционные смеси согласно рекомендациям производителя наборов.

Относительное количество транскриптов оценивали на приборе Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, США). Температурный лист при проведении ПЦР: 30 минут - 48°C, 10 минут - 95°C, 15 секунд - 95°C, 1 минута - 60°C – считывание показателей – 55 циклов. Результаты ОТ-ПЦР обрабатывали с помощью программного обеспечения прибора Stratagene Mx3005P.

2.23. Разведение ингибитора фактора транскрипции Bcl-6

Ингибитор ядерного фактора транскрипции Bcl-6 – 79-6 (Merck Millipore, Calbiochem, USA) добавляли к смешанным культурам Т- и В-лимфоцитов в первый день культивирования. Предварительно готовили рабочий концентрат ингибитора для внесения в лунку. 50 мг порошка ингибитора Bcl-6 (468,1 г/моль)

растворяли в 10,7 мл DMSO, получив 10 mM (40×) маточный раствор. Для внесения в лунку разводили маточный раствор в 5 раз до концентрации 2 μM. Рабочий концентрат добавляли к необходимому объему клеточной суспензии для конечной концентрации в лунке 50 μM.

2.24. Исследование фенотипа Т-хелперов при язвенной болезни

Обследовали взрослых больных с манифестными формами *H. pylori*-инфекции (N=17, возраст от 32 до 57 лет, средний возраст 48,5 лет) и взрослых практически здоровых доноров группы сравнения (N=12, возраст от 28 до 55 лет, средний возраст 40,6 лет). Больные с *H. pylori*-инфекцией разделялись на 2 группы в зависимости от клинических проявлений заболевания. Первую группу больных составляли пациенты с язвенной болезнью (N=8, возраст от 32 до 57 лет, средний возраст 45,7 лет). Все пациенты этой группы наряду с диагнозом язвенной болезни имели диагнозы хронического гастрита и хронического дуоденита. У 5 пациентов язвы были локализованы в двенадцатиперстной кишке, у двоих – в антруме желудка, и у одного – в средней трети тела желудка. Все пациенты этой группы страдали хроническими заболеваниями желудка и/или двенадцатиперстной кишки в течение 7 – 20 лет. 5 человек этой группы имели ранее установленный диагноз язвенной болезни с хроническим рецидивирующим течением, у 3 человек язвенная болезнь была диагностирована впервые. Сопутствующими заболеваниями были: хронический холецистит (5 пациентов), хронический панкреатит (5 пациентов), гастроэзофагальная рефлюксная болезнь (4 человека). Вторую группу составляли пациенты с диагнозом хронического гастрита и хронического дуоденита (далее – гастродуоденит) без признаков атрофии слизистой и без язвенной болезни (N=9, возраст от 45 до 55 лет, средний возраст 50,4 года). Сопутствующими заболеваниями были: рефлюкс-эзофагит (2 человека) и дуоденогастральный рефлюкс (3 человека).

Больные обследовались при поступлении в стационар в связи с обострением основного заболевания. Исследование проводилось до начала лечения. Наличие *H. pylori*-инфекции у всех больных было подтверждено с помощью быстрого уреазного теста и обнаружения ДНК *H. pylori* полимеразой цепной реакцией. Для

определения фенотипа Т-лимфоцитов клетки крови пациентов обеих групп и лиц группы сравнения окрашивались мечеными моноклональными антителами. Использовались антитела к молекулам CD4 (Сорбент, Москва), меченые флуоресцеинизотиоционатом, к CD45RO, меченые PerCPeFluor710 (eBiosciences, США), к CD45RA (Beckman Coulter, США), CCR6 или CCR9 (eBiosciences, США), меченые фикоэритрином, к CCR7, CXCR5, или ICOS, меченые аллофикоцианином (eBiosciences, США). Затем пробы клеток обрабатывали лизирующим эритроциты раствором BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США), отмывали и фиксировали 1% параформальдегидом. Анализ проводили на лазерном проточном цитофлуориметре FacsCalibur (BD Biosciences, США), последовательно гейтируя лимфоциты, CD4⁺ лимфоциты, CD45RO⁻ и CD45RO⁺ Т-клетки. Затем рассчитывали количество клеток, несущих комбинации исследуемых маркеров, как долю (%) от общего количества лимфоцитов.

2.25. Статистическая обработка данных

Результаты проточной цитофлуориметрии обрабатывались в программном обеспечении CellQuest, результаты ОТ-ПЦР – с помощью программного обеспечения прибора Stratagene Mx3005P. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-теста Стьюдента для зависимых и независимых выборок. При исследовании фенотипа Т-хелперов у пациентов с язвенной болезнью и гастроудоденитом статистический анализ проводили с использованием критерия Ньюмена-Кейлса (при множественном сравнении). Данные на рисунках представлены в виде $M \pm m$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Характеристика использованных в работе клеточных популяций

3.1.1. Характеристика наивных CD4⁺ Т лимфоцитов

В данной работе в качестве основного метода исследования созревания Тфх использовалось совместное культивирование различных популяций клеток иммунной системы, выделенных из крови иммуномагнитной сепарацией или полученных *in vitro*. Эти популяции клеток подвергались фенотипическому анализу для контроля чистоты выделения. Кроме того, при фенотипическом анализе очищенных клеток оценивалась экспрессия хемокиновых рецепторов, необходимых для миграции в Т- или В-клеточные зоны лимфоидных органов. Данные об экспрессии хемокиновых рецепторов позволяли сделать вывод о возможности встречи соответствующих групп клеток *in vivo* при индукции иммунного ответа. На основе полученных данных из очищенных популяций клеток создавали смешанные культуры для изучения созревания Тфх.

Основным объектом исследования являлись наивные CD4⁺ Т-лимфоциты хелперы (нТх), выделенные из венозной крови взрослых здоровых доноров последовательным разделением на градиенте плотности, адгезией на пластике и иммуномагнитной сепарацией с негативной селекцией. Чистота выделенной субпопуляции наивных CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ Т-лимфоцитов составляла от 94,5 до 98,4% (Рис 1, б). Средний выход очищенных наивных CD4⁺ Т-клеток составлял 7,28±1,45 % от исходного количества МНПК.

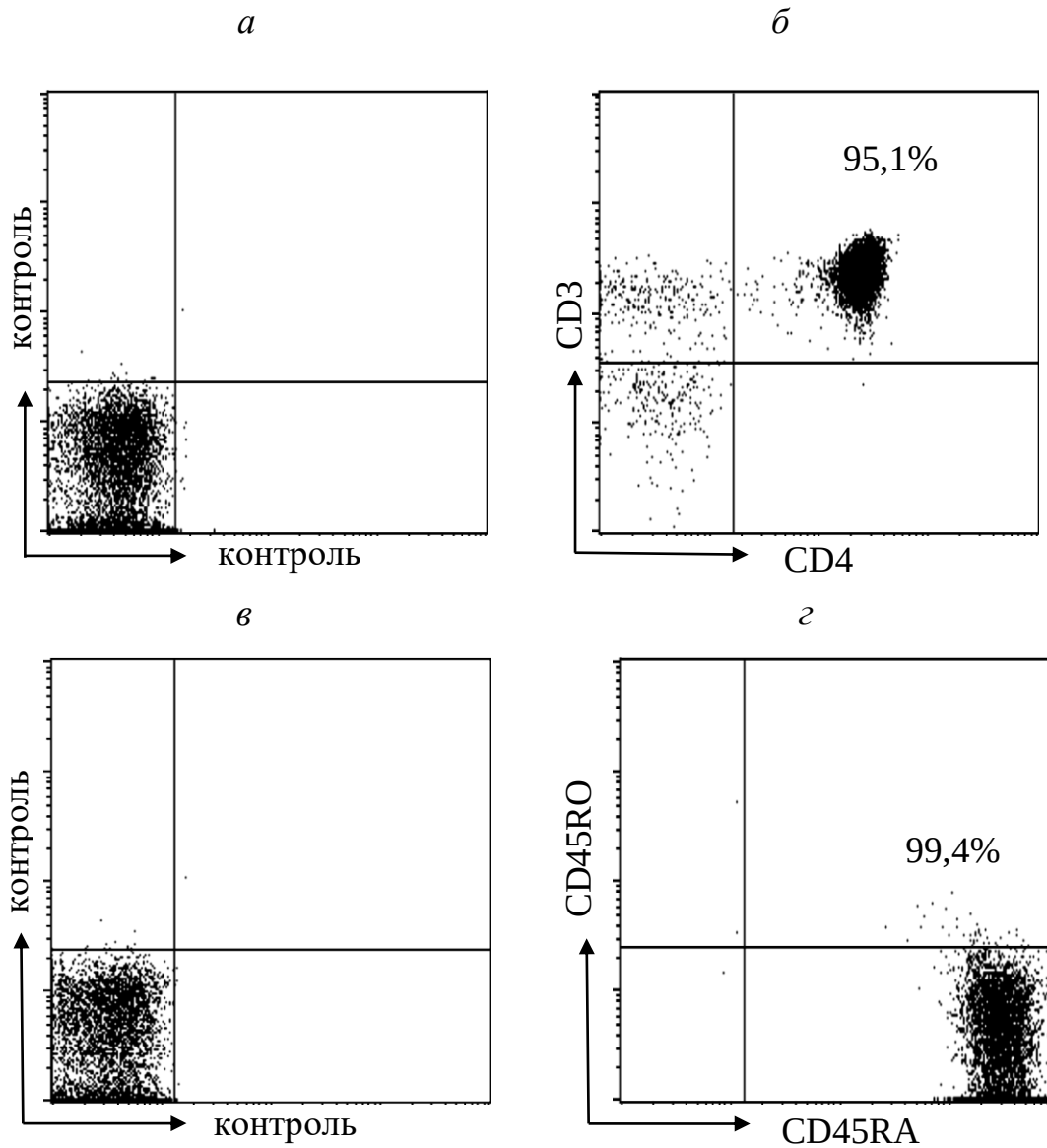


Рис. 1. Характеристика чистоты наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов, выделенных иммуномагнитной сепарацией. Чистота выделенных $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов в данном эксперименте составила 95,1% (*б*); *а* – соответствующий изотипический контроль. Доля $CD45RA^+CD45RO^-$ клеток среди $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов составляет 99,4% (*г*); *в* – соответствующий изотипический контроль.

На свежевыделенных наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитах оценивалась экспрессия хемокиновых рецепторов. Результат репрезентативного эксперимента приведен на рис. 2. Как и следовало ожидать, подавляющее большинство $CD4^+$ Т-клеток экспрессировало хемокиновый рецептор CCR7 (рис. 2*в*, *ж*). Как известно, этот

рецептор направляет нТх в Т-клеточные зоны лимфатических узлов для поиска антигенов, принесенных зрелыми CCR7⁺ ДК. Малая часть очищенных CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻ Т-лимфоцитов была лишена экспрессии CCR7. Несмотря на малочисленность, данная группа клеток чётко отделялась от основной массы CCR7⁺ нТх (рис. 2в).

Хемокиновый рецептор CXCR5 экспрессировала небольшая группа Т-клеток (рис. 2е, ж). Доля CXCR5⁺ клеток среди наивных CD4⁺ Т-клеток составляла $5,1 \pm 1,2$ %. Подавляющее большинство CD4⁺ CD45RA⁺ CXCR5⁺ Т-лимфоцитов также несла на своей мембране рецептор CCR7 (рис. 2ж). Содержание CXCR5⁺CCR7⁺ клеток среди нТх равнялось $3,43 \pm 0,95\%$.

Как известно, экспрессия CXCR5 характерна для В-клеток и Тфх. Лигандом CXCR5 является хемокин CXCL13, который продуцируют маргинальные ретикулярные клетки и фолликулярные ДК стромального происхождения, локализующиеся внутри В-клеточных фолликулов и в межфолликулярном регионе. Экспрессия хемокинового рецептора CXCR5 на малой группе нТх может позволить данной группе клеток мигрировать в область В-клеточных фолликулов.

Выраженной экспрессией хемокинового рецептора CXCR4 обладали фактически все выделенные наивные CD4⁺ Т-лимфоциты, включая CXCR5⁺ клетки (рис. 2е). Можно предположить, что экспрессия CXCR4 на наивных CD4⁺ Т-лимфоцитах способствует миграции этих клеток как в паракортикальную зону периферических лимфоидных органов, так и в мантийную зону фолликулов лимфатических узлов и межфолликулярное пространство. Такая свобода выбора маршрута миграции обусловлена особенностями локализации лиганда данного рецептора - хемокина CXCL12. CXCL12 продуцируют эндотелиальные и стромальные клетки, которые в лимфатических узлах расположены в различных зонах, включая зону смешанного расположения Т- и В-лимфоцитов [315].

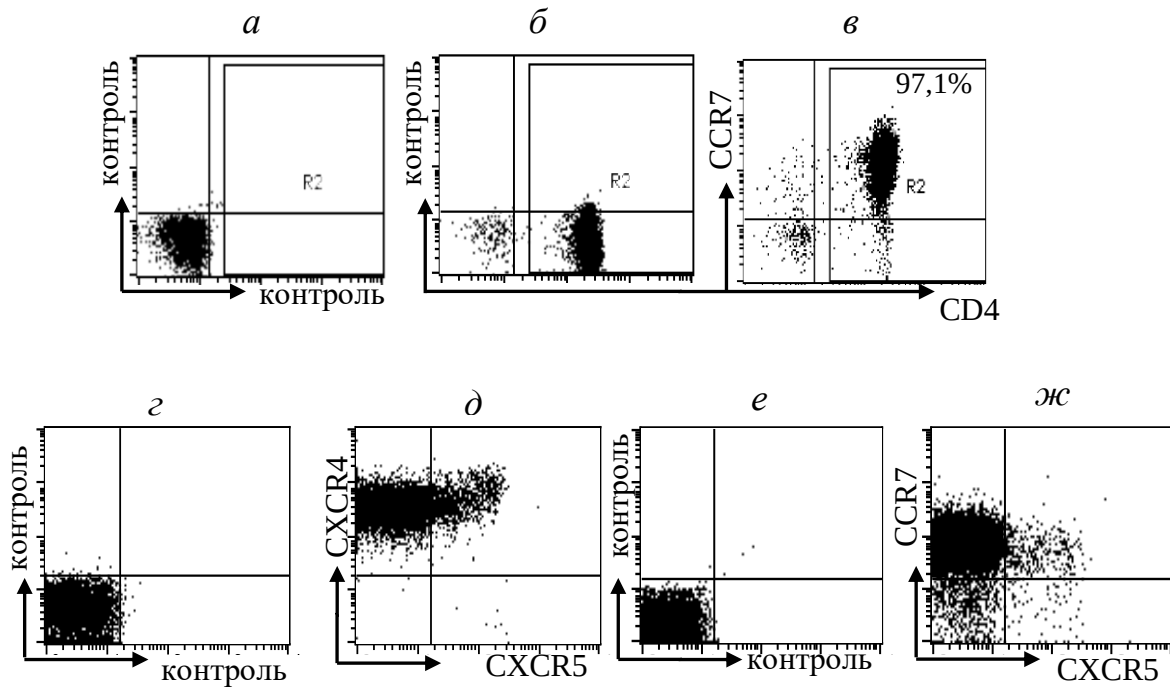


Рис. 2. Экспрессия хемокиновых рецепторов на наивных $CD4^+$ Т-клетках. *а* – изотипический контроль; *б* – клетки, окрашенные МКА к $CD4$, выделены в гейт R2; *в* – экспрессия CCR7 на гейтированных $CD4^+$ наивных Т-клетках. Распределение CXCR4 и CXCR5 (*д*), а также CCR7 и CXCR5 (*ж*) на гейтированных $CD4^+$ наивных Т-клетках. *г* и *е* – изотипические контроли для *д* и *ж*, соответственно.

Результат подробного фенотипического анализа нТх приведен на рис. 3. На гистограмме представлены средние показатели экспрессии хемокиновых рецепторов и молекул, ассоциированных с функцией Т-хелперов. Группа клеток с фенотипом $CCR7^+CXCR5^-$ была наиболее широко представлена. В среднем $90,27 \pm 2,06\%$ нТх экспрессировали хемокиновый рецептор CCR7, свойственный наивным $CD4^+$ Т-лимфоцитам, но не экспрессировали хемокиновый рецептор CXCR5. Малая группа наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов ($3,43 \pm 0,95\%$ клеток), наряду с рецептором CCR7, экспрессировала хемокиновый рецептор CXCR5. Ещё одна малая группа выделенных магнитной сепарацией клеток ($5,7 \pm 2,15\%$) была

лишена рецепторов CCR7 и CXCR5, и, как это будет показано ниже, являлась примесью более зрелых Т-хелперов к основной группе нТх.

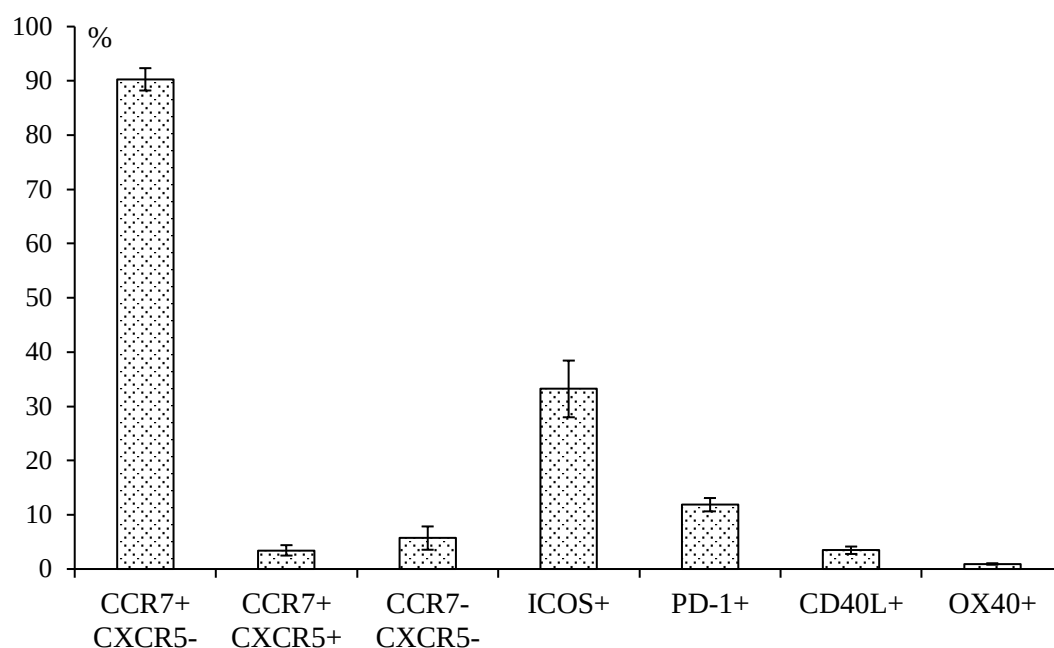


Рис. 3. Средние показатели экспрессии хемокиновых рецепторов и молекул, ассоциированных с функцией Тх, на наивных $CD4^+$ Т-клетках (процент клеток с фенотипами, обозначенными под гистограммой).

Кроме хемокиновых рецепторов на наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитах оценивалась экспрессия молекул, ассоциированных с функцией Т-хелперов, а именно CD40L, CD134 (OX40), CD279 (PD-1) и CD278 (ICOS) (рис. 3). Наивные $CD4^+$ Т-хелперы обладали относительно высокой экспрессией мембранной молекулы ICOS – $33,2 \pm 5,22\%$ клеток несли данную молекулу, необходимую для передачи костимулирующего сигнала в Т-лимфоцит. $11,85 \pm 1,22\%$ наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов экспрессировали молекулу PD-1, которая характерна для зрелых Тх и ограничивает их функциональную активность. На небольшом количестве Т-клеток ($3,45 \pm 0,68\%$) мы выявили экспрессию CD40L, служащей для передачи сигнала в ДК или В-лимфоциты. Молекула OX40, участвующая во взаимодействии с АПК, практически отсутствовала на данных клетках – $0,92 \pm 0,13\%$ нТх экспрессировали данную молекулу.

В контексте данной работы особый интерес представляла малая субпопуляция $CD4^+CCR7^+CXCR5^+$ Т-лимфоцитов. Экспрессия хемокинового рецептора CXCR5 на циркулирующих наивных Т-хелперах может позволить данной группе клеток мигрировать в В-клеточные зоны лимфоидных органов, где нТх могут вступать во непосредственные взаимодействия с В-лимфоцитами. Однако данная группа клеток может представлять собой примесь зрелых Т-клеток к общей группе нТх. Для выяснения степени зрелости этих клеток был проведен сравнительный анализ экспрессии мембранных молекул, ассоциированных с функцией зрелых Т-хелперов на различных группах клеток: на нТх с разным набором хемокиновых рецепторов и на зрелых $CD45RO^+$ Т-хелперах крови.

3.1.2. Сравнительная характеристика фенотипа $CD4^+CD45RO^-CXCR5^+$ Т-клеток

Для выяснения статуса $CD4^+CD45RO^-CXCR5^+$ Т-клеток анализировали экспрессию функционально значимых молекул CD40L, OX40, PD-1 и ICOS на этой группе клеток. На рис. 4 представлен репрезентативный результат оценки экспрессии этих молекул на нТх в зависимости от присутствия или отсутствия хемокиновых рецепторов CXCR5 и CCR7, в сравнении с экспрессией на зрелых $CD4^+CD45RO^+$ клетках.

Как видно из представленных данных небольшая группа $CXCR5^+$ нТх практически не несла молекул CD40L и OX40, слабо экспрессировала PD-1 и была вариабельна по экспрессии ICOS (рис.4, ряд *а*). Превалирующее большинство наивных Т-хелперов несло на своей мембране хемокиновый рецептор CCR7. Эти клетки, также как и $CXCR5^+$ нТх, практически не несли CD40L и OX40, обладали невысокой экспрессией PD-1, и были вариабельны по экспрессии ICOS (рис.4, ряд *б*). Малая группа $CCR7^-$ клеток в составе нТх обладала выраженной экспрессией PD-1 и ICOS (рис.4 ряд *б*). Зрелые $CD45RO^+$ Т-хелперы обладали высоким уровнем экспрессии молекул OX40, PD-1 и ICOS (рис.4, ряд *в*).

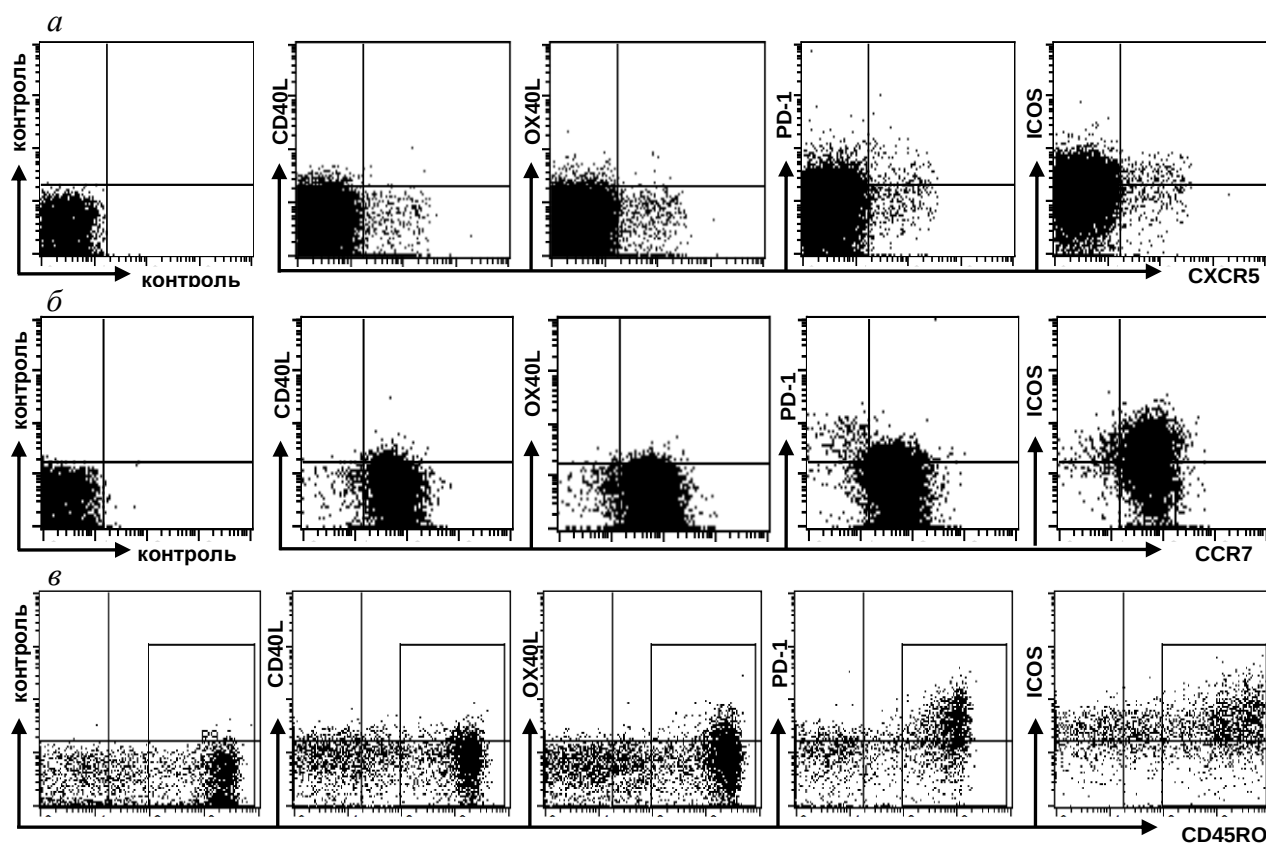


Рис. 4. Фенотипическая характеристика групп Т-хелперов. Экспрессия CD40L, OX40, PD-1 и ICOS на наивных Тх в зависимости от экспрессии CXCR5 (ряд *a*, CXCR5⁺ нТх в правых квадрантах, CXCR5⁻ - в левых) и в зависимости от экспрессии CCR7 (ряд *б*, CCR7⁺ нТх в правых квадрантах, CCR7⁻ клетки - в левых). Ряд *в*: аналогичные показатели для общей субпопуляции CD4⁺ Тх в зависимости от экспрессии CD45RO (CD45RO⁺ клетки выделены в гейт R9). При цитометрическом анализе использовали последовательное гейтирование лимфоцитов, затем - CD4⁺ клеток и клеток исследуемых популяций.

Среднее количество клеток, несущих функционально значимые маркеры на анализируемых группах Т-хелперов, представлены на рис. 5 и в табл. 1. Как уже было отмечено выше, основная группа нТх с фенотипом CD45RO⁻CCR7⁺CXCR5⁻ фактически не несла молекул CD40L и OX40. Эти молекулы экспрессировали $2,23 \pm 1,14\%$ и $0,89 \pm 0,42\%$ клеток, соответственно. $9,11 \pm 4,8\%$ CD45RO⁻CCR7⁺CXCR5⁻ клеток несли молекулу PD-1 и $27,94 \pm 13,31\%$ - молекулу ICOS (рис. 5). Таким образом, данная группа клеток обладала всеми признаками типичных наивных Т-хелперов – отсутствие на клеточной мембране молекулы CD45RO,

присутствие хемокинового рецептора CCR7 и низкий уровень экспрессии функционально значимых для зрелых Т-хелперов молекул. Далее эти клетки обозначены как типичные нТх.

CD45RO⁻CCR7⁺CXCR5⁺ нТх не отличались от типичных нТх по экспрессии CD40L ($3,82 \pm 1,40\%$), OX40 ($1,25 \pm 0,33\%$) и ICOS ($30,71 \pm 6,61\%$) (рис. 5). В то же время, $17,34 \pm 2,67\%$ CXCR5⁺ нТх экспрессировало молекулу PD-1. Количество PD-1⁺ клеток в данной группе нТх было достоверно больше чем в основной группе нТх ($p=0,007$), но существенно ниже, чем у зрелых CD45RO⁺ Т-хелперов ($p=0,00001$).

Группа нТх с фенотипом CD45RO⁻CCR7⁻CXCR5⁻ характеризовалась повышенной экспрессией всех функционально значимых для зрелых Т-хелперов молекул по сравнению с типичными нТх. Молекулу ICOS экспрессировали $47,12 \pm 5,01\%$ клеток данной группы, $30,81 \pm 5,64\%$ клеток несли PD-1, $5,8 \pm 1\%$ – CD40L и менее $3,91 \pm 1,06\%$ – OX40. Сравнение CD45RO⁻CCR7⁻CXCR5⁻ клеток с типичными нТх и зрелыми CD45RO⁺ Т-хелперами крови показало, что эти клетки обладают промежуточными уровнями экспрессии всех исследуемых молекул, достоверно превышающими показатели типичных нТх, но значительно уступающим показателям зрелых Тх (рис. 5), что может свидетельствовать о большей степени зрелости этих клеток по сравнению с остальными нТх.

Зрелые CD45RO⁺ Т-хелперы обладали сильной экспрессией исследуемых молекул и достоверно отличались по этим параметрам от всех групп наивных Т-хелперов. $65,88 \pm 7,65\%$ и $65,39 \pm 6,28\%$ клеток данной группы несли молекулы ICOS и PD-1, соответственно, $18,03 \pm 6,59\%$ клеток экспрессировало CD40L и $14,08 \pm 5,09\%$ - OX40 (рис. 5).

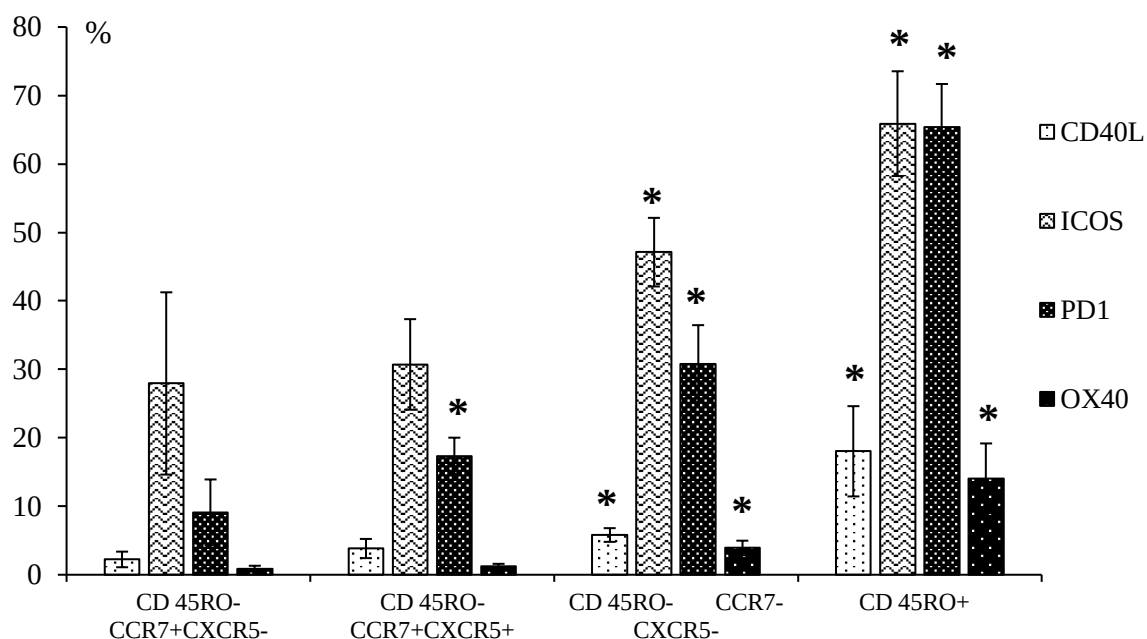


Рис. 5. Среднее количество клеток, несущих соответствующие маркеры в группах Тх. Группы обозначены под гистограммой, анализируемые маркеры – справа. * – достоверные отличия от типичных CD45RO⁻CCR7⁺CXCR5⁻ наивных Тх (p<0,05 в парном t-тесте).

Таблица 1. Среднее количество клеток, несущих соответствующие маркеры в группах Тх (%).

Исследуемые молекулы	Группа клеток			
	Типичные наивные CD45RO ⁻ CCR7 ⁺ CXCR5 ⁻ Тх	Наивные CD45RO ⁻ CCR7 ⁺ CXCR5 ⁺ Тх	CD45RO ⁻ CCR7 ⁻ CXCR5 ⁻ Тх	Зрелые CD45RO ⁺ Тх
CD40L	2,23±1,14	3,82±1,4	5,8±1 *	18,03±6,59 *
ICOS	27,94±13,31	30,71±6,61	47,12±5,01 *	65,88±7,65 *
PD-1	9,11±4,8	17,34±2,67 *	30,81±5,64 *	65,39±6,28 *
OX40	0,89±0,42	1,25±0,33	3,91±1,06 *	14,08±5,09 *

* – достоверные отличия от типичных CD45RO⁻CCR7⁺CXCR5⁻ наивных Тх (p<0,05 в парном t-тесте).

Таким образом, показано, что CXCR5⁺ нТх не отличаются от типичных нТх по фенотипу, за исключением умеренно повышенной экспрессии PD-1. Кроме того, выявлено, что популяция наивных CD4⁺CD45RO⁻CXCR5⁺CCR7⁺ Т-клеток не экспрессирует ядерный фактор транскрипции, свойственный популяции Т-фолликулярных хелперов – белок Bcl-6 (рис. 6). Эти результаты свидетельствуют о том, что дифференцировочный статус исследуемой группы клеток ещё не определен и близок или идентичен типичным нТх. Однако эта субпопуляция имеет большую возможность выбора микроокружения, способного влиять на путь их дальнейшей дифференцировки. Это обусловлено одновременной экспрессией рецепторов CXCR5 и CCR7, которая может позволить этим клеткам мигрировать как в В-клеточную зону лимфоидного органа, где они вступят во взаимодействие с В-лимфоцитами, так и в Т-клеточную зону, где их судьба будет решаться исходя из локального микроокружения и цитокиновой атмосферы.

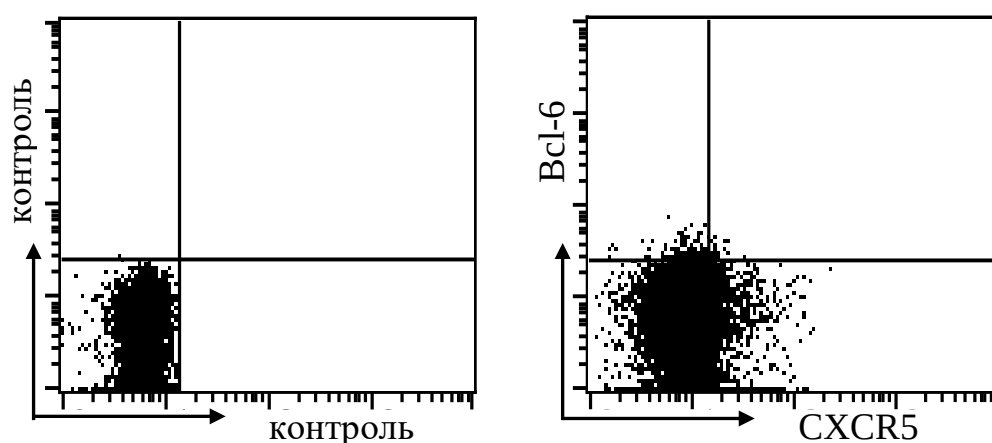


Рис. 6. Отсутствие экспрессии белка Bcl-6 в CXCR5⁺ наивных Т-хелперах. Слева – контроль окрашивания.

3.1.3. Характеристика дендритных клеток, использованных для создания смешанных культур

Незрелые ДК (нДК) получали из моноцитов венозной крови взрослых здоровых доноров традиционным способом с помощью инкубации клеток с гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (ГМ-КСФ) и интерлейкином-4 (ИЛ-4). Для получения зрелых ДК (ДК-ЦТК) в культуры добавляли ИЛ-1 β , ИЛ-6, фактор некроза опухоли- α и простагландин E₂, затем культивировали клетки 2 суток.

На рис. 7 отражена экспрессия на полученных нами незрелых и зрелых ДК функционально значимых мембранных молекул. Практически все незрелые ДК характеризовались экспрессией молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса HLA-DR и костимулирующих CD80 и CD86. Часть незрелых ДК слабо экспрессировала молекулу CD83. На незрелых ДК наблюдался крайне низкий остаточный уровень экспрессии моноцитарного маркера CD14. При созревании ДК существенно возрастал уровень экспрессии HLA-DR, CD80 и CD86, и все клетки приобретали маркер зрелых ДК CD83. Молекула CD14 практически отсутствовала. Таким образом, фенотип полученных ДК полностью соответствовал стадиям их созревания. Полученные нДК и ДК-ЦТК были использованы для создания смешанных культур с нТх.

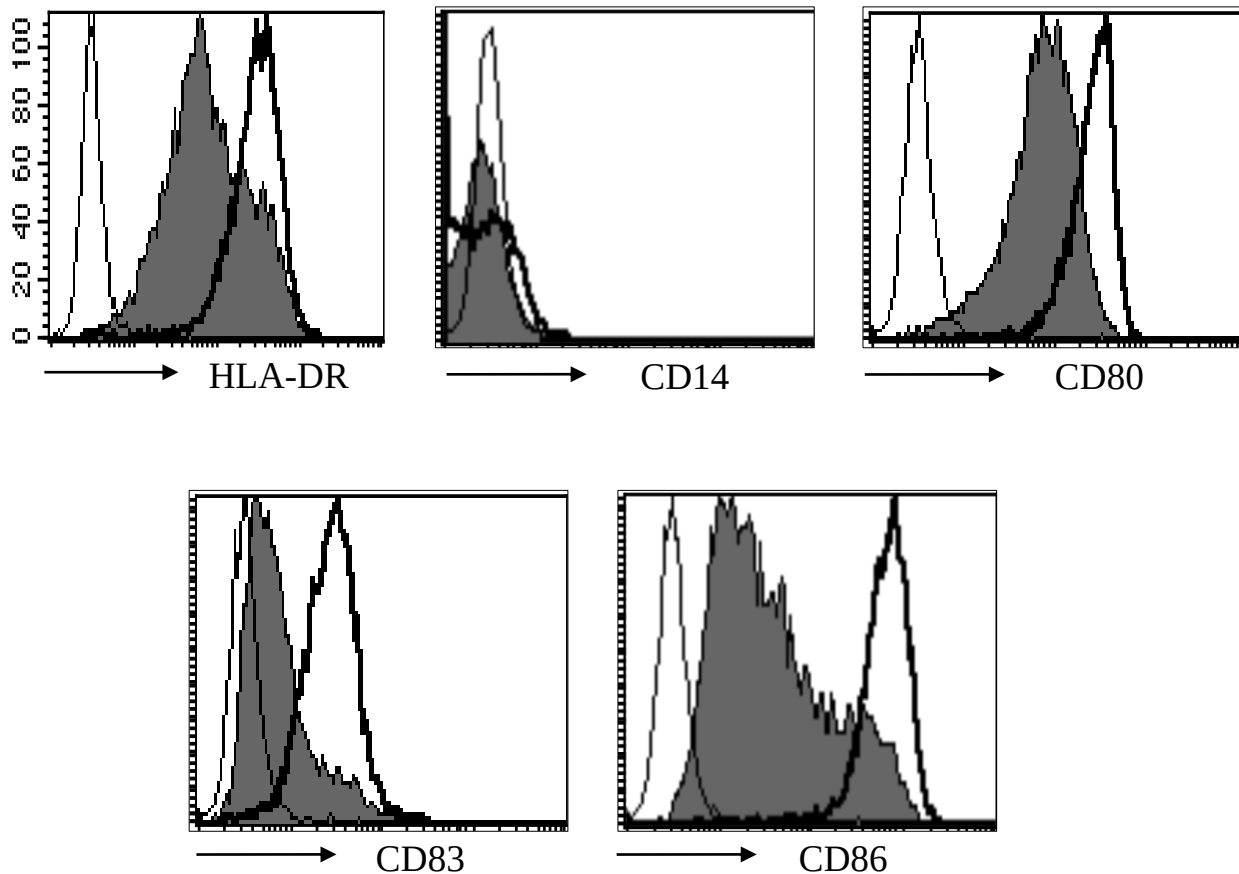


Рис. 7. Характеристика дендритных клеток, использованных для создания смешанных культур. Экспрессия мембранных молекул на нДК (гистограммы с серым полем) и ДК-ЦТК (толстая линия). Тонкая линия – контроль окрашивания.

Для оценки маршрутов миграции ДК и, соответственно, возможности их контакта с нТх в различных зонах лимфоидных органов оценивали экспрессию хемокиновых рецепторов на ДК при использовании различных условий стимуляции. Как известно, ДК после стимуляции паттернами микроорганизмов подвергаются созреванию, в ходе которого приобретают хемокиновые рецепторы для миграции в лимфоидную ткань. Наиболее охарактеризован механизм миграции ДК, который обусловлен экспрессией рецептора CCR7. Лиганды этого рецептора (CCL19 и CCL21) продуцируются на всём пути миграции ДК из периферических тканей в Т-клеточную зону дренирующих лимфатических узлов. Часть ДК в определённых условиях созревания может также экспрессировать рецептор CXCR5, который способствует локализации этих клеток в В-клеточных

зонах. Ранее мы показали, что стимулирующая гуморальный иммунный ответ вакцина гепатита В (ВГВ), а также входящий в её состав адъювант гидроксид алюминия (ГА) стимулируют экспрессию CXCR5 на моноцитарных ДК.

Для оценки экспрессии хемокиновых рецепторов на ДК, полученных из моноцитов в рамках данной работы, инкубировали незрелые ДК с ВГВ, ГА, а также со следующими микроорганизмами: *Escherichia coli* штамм M17, *Bacillus cereus* штамм IP5832, *Saccharomyces boulardii* и *Candida albicans*. Инактивированные микроорганизмы добавляли в культуры нДК в концентрациях от 10^4 до 10^8 колониеобразующих единиц (КОЕ) в мл. Экспрессию рецепторов определяли с помощью проточной цитометрии. Для сравнения способности микроорганизмов индуцировать экспрессию хемокиновых рецепторов рассчитывали показатель активности по формуле: $10^9/\text{концентрация микроорганизма}$, вызывающая полумаксимальный прирост экспрессии рецептора. Показано, что все использованные микроорганизмы стимулируют экспрессию CCR7 на ДК. При этом наибольшей активностью обладают грибы *C. albicans* (рис. 8 а). Например, полумаксимальный рост экспрессии CCR7 соответствует действию $1,24 \times 10^6$ КОЕ/мл *C. albicans*, тогда как *S. boulardii* для достижения того же эффекта должны быть добавлены в концентрации $1,1 \times 10^8$ КОЕ/мл. Кроме того *C. albicans* индуцирует экспрессию на ДК рецептора CXCR5, тогда как другие использованные микроорганизмы такой активностью не обладают.

Репрезентативный результат экспрессии хемокиновых рецепторов на ДК, стимулированных ВГВ, ГА и двумя концентрациями грибов *C. albicans* (10^7 и 10^8), а также на нДК и ДК-ЦТК отображен на рис 8 б и в. *C. Albicans*, ВГВ и ГА индуцируют экспрессию CXCR5 на ДК, причём часть ДК экспрессирует CCR7 и CXCR5 одновременно.

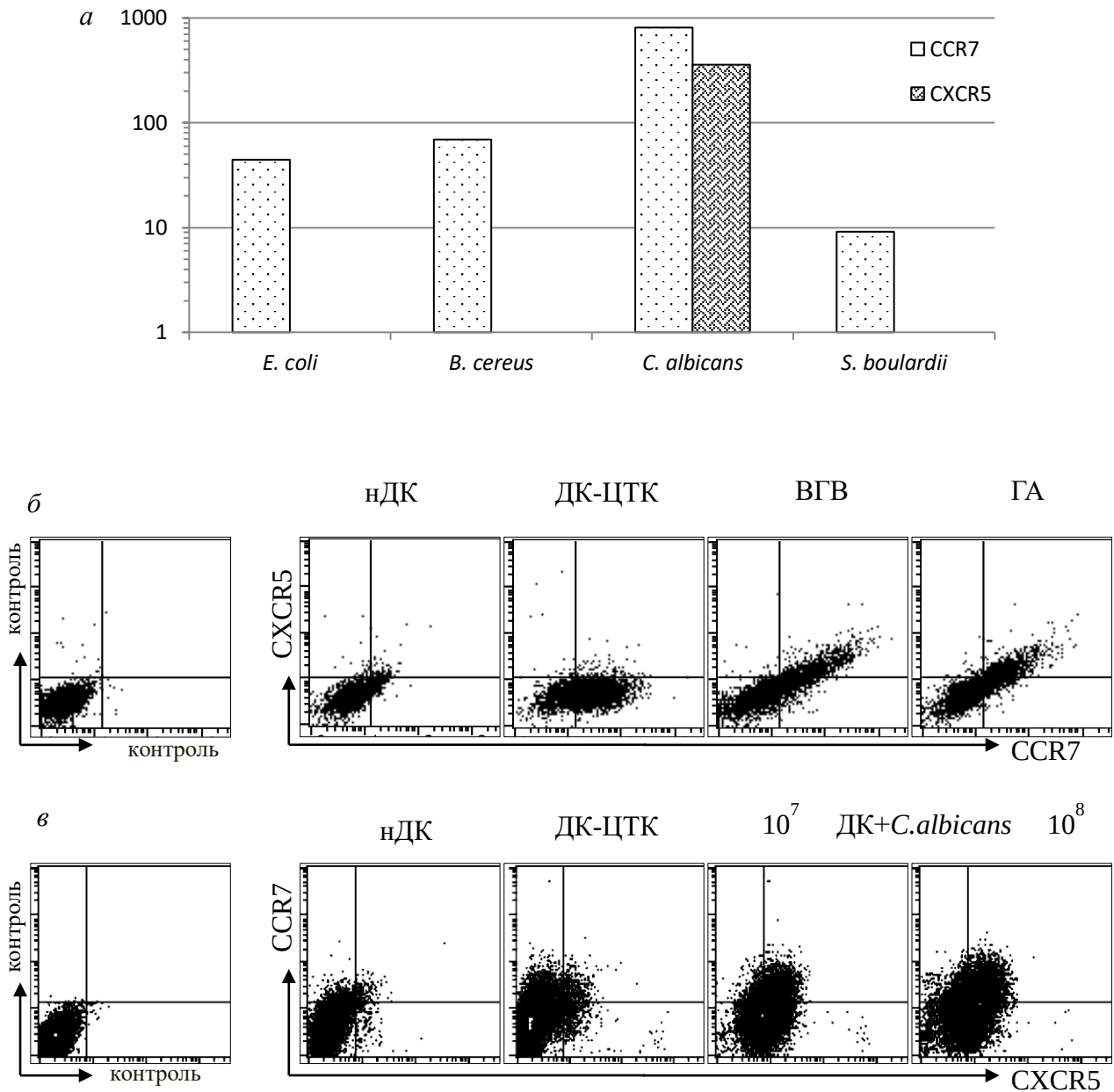


Рис. 8. Экспрессия хемокиновых рецепторов на дендритных клетках. *а* – сравнения способности микроорганизмов индуцировать экспрессию CXCR5 и CCR7 (показатель активности, пояснение в тексте). Экспрессия хемокиновых рецепторов CXCR5 и CCR7 на нДК, ДК-ЦТК, ДК, стимулированных ВГВ и ГА (*б*) и двумя концентрациями грибов *C. albicans* (10^7 и 10^8) (*в*).

Таким образом, дендритные клетки при созревании, индуцированном различными стимулами, экспрессируют рецептор CCR7, направляющий их в Т-клеточные зоны лимфоидных органов. Как известно, Т-клеточная зона является основным местом встречи ДК, несущих антигены из периферических тканей, и нТх, рециркулирующих в поисках первого контакта с клоноспецифическим антигеном. Кроме того, определённые стимулы, например, грибы *C. Albicans*, вакцина гепатита В и гидроксид алюминия, могут индуцировать экспрессию на ДК хемокинового рецептора CXCR5. Лиганд этого рецептора — хемокин CXCL13 продуцируется в фолликулах и перифолликулярном пространстве лимфоидных органов, куда могут мигрировать эти ДК, наряду с В-лимфоцитами и частью наивных Т-хелперов. Таким образом контакт ДК с нТх может происходить как в Т-, так и в В-клеточной зоне лимфоидных органов.

3.1.4. Характеристика В-лимфоцитов, использованных для создания смешанных культур

В-лимфоциты получали из венозной крови взрослых здоровых доноров при помощи последовательного разделения клеток на градиенте плотности, отделения от моноцитов адгезией на пластике, и, затем, иммуномагнитной сепарации с негативной селекцией. На рисунке 9 представлена характеристика чистоты выделенных В-лимфоцитов, которые в дальнейшем были использованы для создания смешанных культур с нТх. Фактически все очищенные В-лимфоциты (более 98%) экспрессировали молекулы, свойственные данной популяции клеток, такие как CD19, CD45 и HLA-DR. Отсутствие на клетках молекул CD16, CD56, CD14, CD3 и CD4 позволяет сделать вывод о том, что использованные в работе В-лимфоциты не содержали сколь либо значимой примеси естественных киллеров, моноцитов или Т-лимфоцитов.

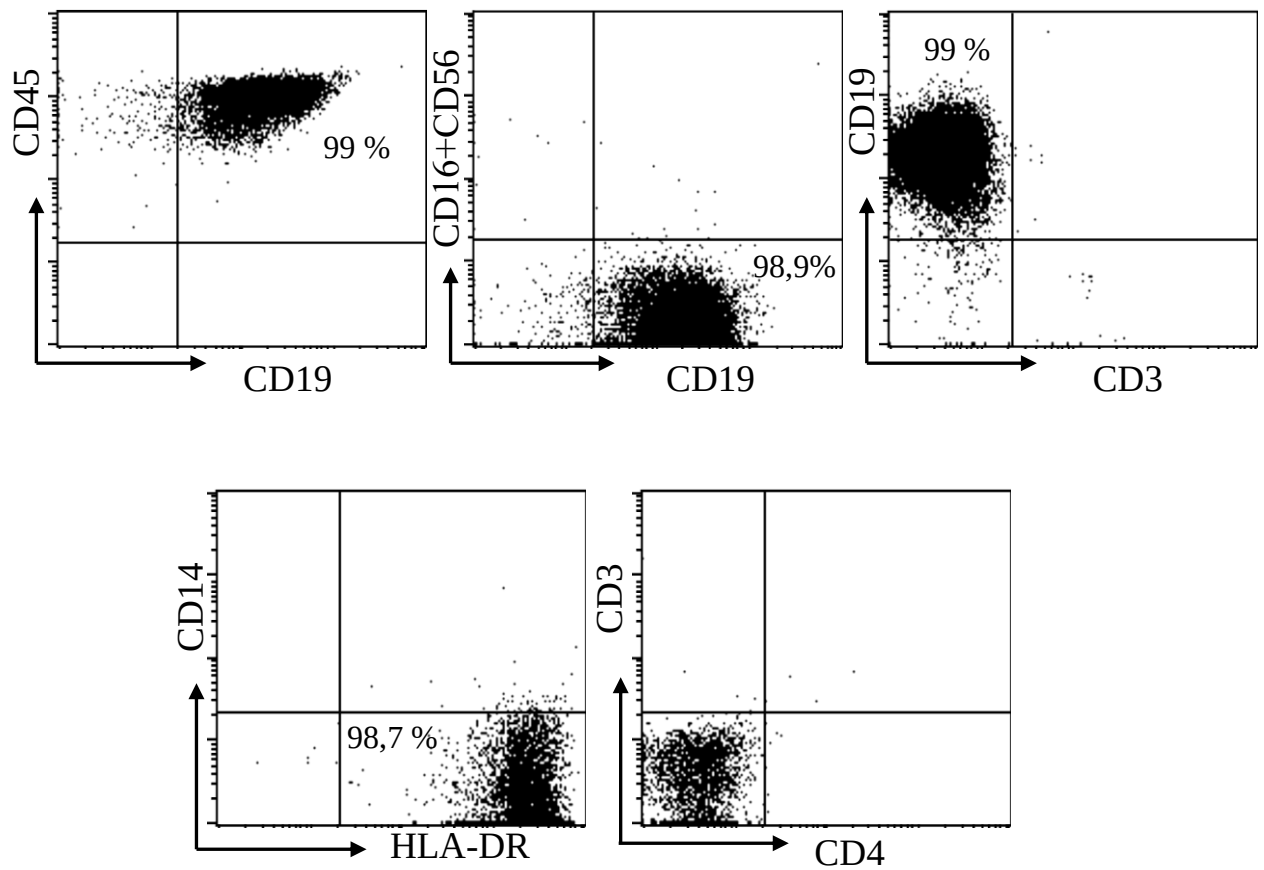


Рис. 9. Характеристика В-лимфоцитов, использованных для создания смешанных культур. Выделенная проба содержит более 98 % $CD19^+HLA-DR^+$ В-лимфоцитов и не содержит Т-клеток, естественных киллеров и моноцитов. Названия маркеров обозначены у осей графиков, доля клеток целевых популяций – в соответствующих квадрантах.

3.2. Созревание фолликулярных Т-хелперов при стимуляции наивных Т-лимфоцитов различными антигенпрезентирующими клетками *in vitro*

3.2.1. Морфологические и фенотипические проявления созревания CD4⁺ Т-лимфоцитов *in vitro*

Созревание Т-хелперов изучали, создавая смешанные культуры, в которых наивные CD4⁺ Т-лимфоциты получали стимулирующий сигнал от аллогенных ДК или В-лимфоцитов. При создании смешанных культур использовали соотношение В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов 5:1, что воспроизводило преобладание В-клеток в фолликулах и перифолликулярном пространстве, и соотношение ДК и Т-лимфоцитов 1:5, отражающее преобладание Т-клеток над АПК в Т-клеточной зоне лимфоидных органов.

Стимуляция наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов аллогенными АПК *in vitro* приводила к олигоклональной активации Т-лимфоцитов и превращению части клеток в лимфобласты. К пятым суткам культивирования наблюдалось значительное увеличение размеров лимфобластов, это позволяло четко отделять их от покоящихся лимфоцитов в соответствии с профилем прямого светорассеивания (FSC) и бокового светорассеивания (SSC). Представленная на рисунке 10 б гистограмма отражает, что стимуляция нТх аллогенными В-лимфоцитами способствовала превращению 22,68±3,02% наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов в лимфобласты. Стимуляция нТх аллогенными нДК вызывала трансформации 32,64±8,06% Т-клеток в лимфобласты, а культивирование нТх совместно с ДК-ЦТК приводило к бласттрансформации 54,4±17,1% Т-клеток.

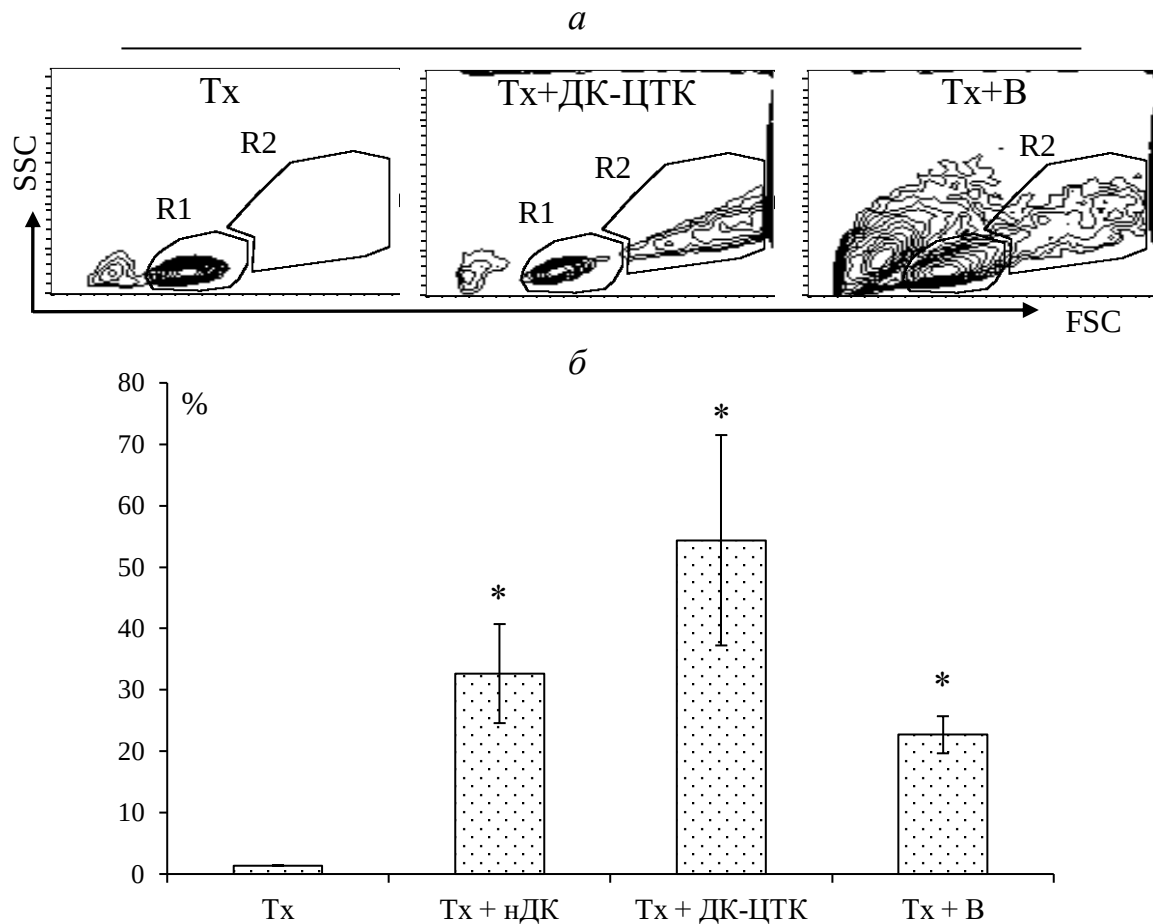


Рис. 10. Стимуляция наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов аллогенными АПК приводит к появлению в культуре лимфобластов (гейт R2 на рис. *a*). Лимфоциты выделены в гейт R1. На гистограмме (*б*) представлена доля лимфобластов среди $CD4^+$ клеток разных культур. Варианты культур подписаны под графиками: Tx – контрольные культуры наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов без АПК; Tx + В – смешанные культуры наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов; Tx + нДК или ДК-ЦТК – смешанные культуры наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов с нДК или ДК-ЦТК, соответственно. * – достоверные отличия от контрольных наивных $CD4^+$ Т-клеток без АПК ($p < 0,05$).

На рис. 11 представлена экспрессия молекулы CD45RO на Т-хелперах в смешанных культурах клеток. Экспрессия CD45RO оценивалась на клетках, выделенных в гейты лимфоцитов или лимфобластов, а затем – в гейт CD4⁺ клеток. Как известно, молекула CD45RO экспрессируется на Т-клетках в процессе созревания. Её экспрессия отсутствует на нТх, использованных для создания смешанных культур (рис. 1).

В гейте лимфоцитов клетки из контрольных культур нТх без АПК фактически не несли молекулу CD45RO ($1,3 \pm 0,76\%$ CD45RO⁺ клеток), тогда как лимфобласты в этих культурах отсутствовали. Таким образом, клетки контрольных культур к 5 суткам культивирования оставались незрелыми. В смешанных культурах Т-лимфоциты, не прошедшие трансформацию в лимфобласты, также слабо экспрессировали CD45RO. Так, в культурах с нДК молекулу CD45RO экспрессировала лишь малая часть клеток в гейте Т-лимфоцитов ($4,06 \pm 1,73\%$). В смешанных культурах Т-хелперов и зрелых ДК молекулу CD45RO экспрессировала также небольшая часть ($10,33 \pm 2,19\%$) Т-лимфоцитов, не трансформированных в лимфобласты (рис. 11 а).

Практически все созревшие клетки были сосредоточены в гейте лимфобластов. Т-лимфобласты, стимулированные незрелыми ДК, достаточно сильно ($63,51 \pm 8,11\%$) экспрессировали маркер зрелости CD45RO. Т-лимфобласты смешанных культур со зрелыми ДК обладали чрезвычайно высокой экспрессией CD45RO - $95,13 \pm 1,51\%$ клеток характеризовались экспрессией данной молекулы (рис. 11 а). В смешанных культурах с В-лимфоцитами Т-хелперы с признаками созревания также практически отсутствовали в гейте лимфоцитов, и подавляющее большинство созревающих CD45RO⁺ Т-клеток было сосредоточено в гейте лимфобластов – данная молекула была представлена на $62,82 \pm 3,61\%$ Т-лимфобластов (рис. 11 б).

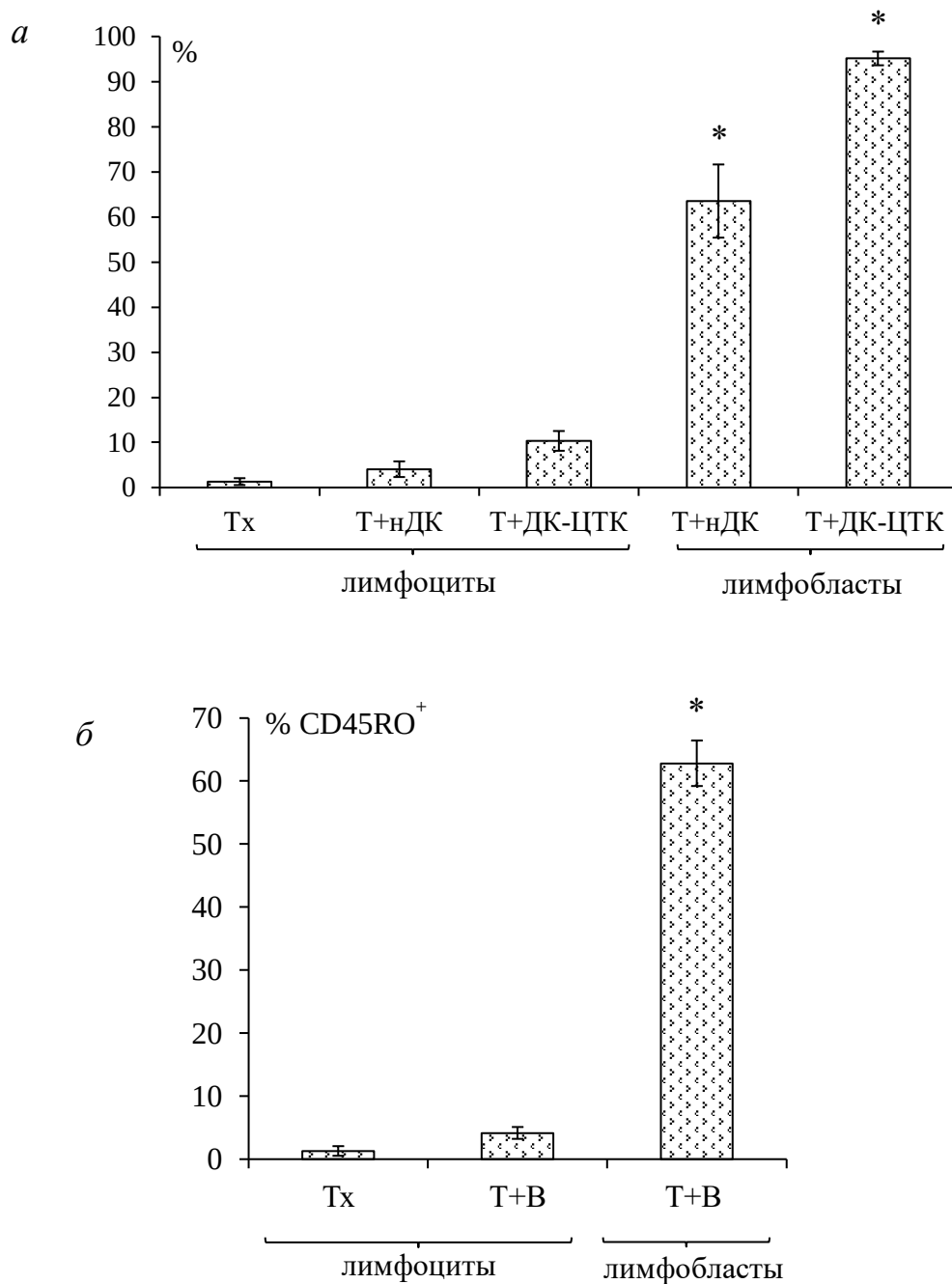


Рис. 11. Созревающие CD45RO⁺ Т-клетки в культурах, стимулированных нДК и ДК-ЦТК (гистограмма *а*) или В-лимфоцитами (*б*) были локализованы в гейте лимфобластов (R2 – рис.10 *а*). Экспрессия CD45RO определялась на клетках, выделенных в гейты лимфоцитов или лимфобластов, а затем - в гейт CD4⁺ клеток.*- достоверные отличия от контрольных наивных CD4⁺ Т-клеток без АПК ($p<0,05$).

Таким образом, стимуляция Т-хелперов дендритными клетками и В-лимфоцитами приводила к созреванию CD45RO⁺ Т-лимфоцитов и их трансформации в крупные Т-лимфобласты. Подавляющее большинство Т-клеток с фенотипическими признаками созревания при цитометрии были локализованы в гейте лимфобластов. В дальнейшей работе фенотип клеток анализировался отдельно для лимфоцитов и лимфобластов. При этом подразумевалось, что Т-лимфобласты представляют собой клетки, получившие эффективную стимуляцию к созреванию от аллогенных АПК, тогда как в группу лимфоцитов входят незрелые клетки, которые не смогли обнаружить свой клоноспецифический антиген на АПК.

3.2.2. Экспрессия хемокиновых рецепторов на CD4⁺ Т-клетках смешанных культур с различными АПК

Среди лимфобластов смешанных культур наблюдались изменения экспрессии хемокиновых рецепторов, однако лимфоциты эти изменения фактически не затрагивали. Характер изменений зависел от типа антигенпрезентирующих клеток.

На рисунке 12а и в таблице 2 отражено, что превалирующее большинство наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов контрольных культур, также как и Т-лимфоцитов, стимулированных двумя типами ДК (незрелыми и зрелыми), экспрессировали мембранный хемокиновый рецептор CCR7, и фактически не экспрессировали CXCR5. Однако экспрессия CXCR5 значительно увеличивалась среди Т-лимфобластов в смешанных культурах с незрелыми ДК: 38,8±9,63% этих клеток несли данный хемокиновый рецептор. При этом экспрессия CCR7 на лимфобластах смешанных культур существенно снижалась по сравнению с лимфоцитами контрольных и смешанных культур.

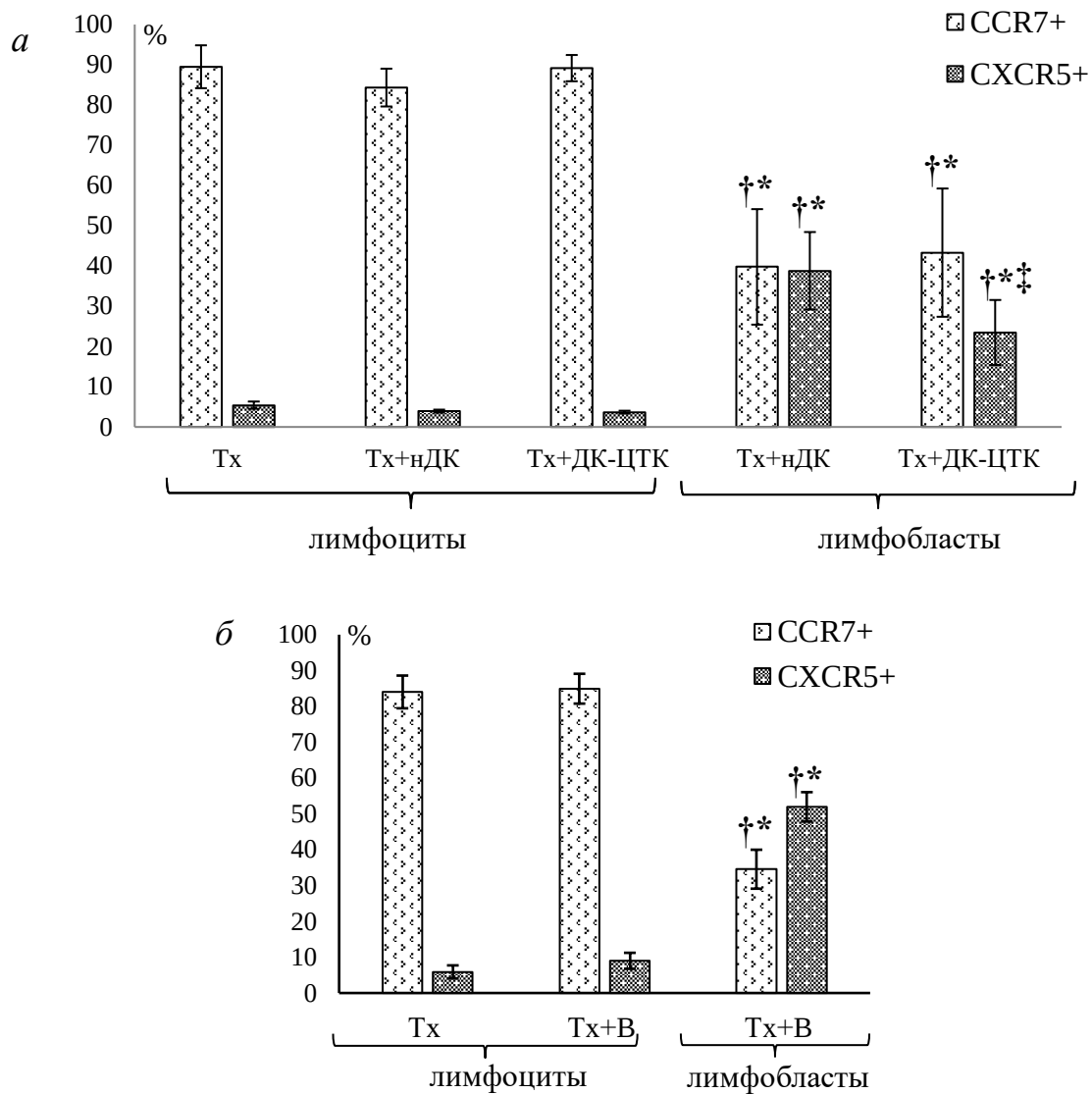


Рис. 12. На гистограммах *а* и *б* – количество $CD4^+$ Т-клеток, несущих хемокиновые рецепторы CCR7 и CXCR5, в смешанных культурах с дендритными клетками и В-лимфоцитами, соответственно. Типы клеток обозначены под гистограммами. Контрольные наивные $CD4^+$ Т-клетки без АПК обозначены Тх. Т-клетки из смешанных культур с нДК обозначены Тх+нДК, из культур с ДК-ЦТК – Тх+ДК-ЦТК, из культур с В-лимфоцитами – Тх+В. * - достоверные отличия от контрольных наивных $CD4^+$ Т-клеток без АПК ($p < 0,05$), † - достоверные отличия лимфобластов от лимфоцитов ($p < 0,05$), ‡ - отличие от аналогичной группы в культуре с В-клетками ($p < 0,05$).

Процент Т-лимфобластов, несущих CXCR5, также увеличивался в культурах клеток, созревших со зрелыми ДК, хотя рост экспрессии этого рецептора был менее выражен, чем в культурах с нДК, и был достоверно ниже, чем в культурах с В-лимфоцитами. Процент клеток, несущих CCR7, также снижался в два раза в сравнении с Т-лимфоцитами контрольных и смешанных культур. Различий в потере CCR7 при созревании Т-лимфобластов, индуцированном нДК и ДК-ЦТК, не наблюдалось.

Таблица 2. Процент CD4⁺ Т-клеток, несущих хемокиновые рецепторы CCR7 и CXCR5, в смешанных культурах с дендритными клетками

Хемокиновые рецепторы	Исследуемая культура клеток				
	Гейт лимфоцитов			Гейт лимфобластов	
	Тх	Тх+нДК	Тх+ДК-ЦТК	Тх+нДК	Тх+ДК-ЦТК
CCR7	89,51±5,32	84,33±4,69	89,17±3,26	39,77±14,35*†	43,31±15,93 *†
CXCR5	5,41±0,9	3,92±0,37	3,69±0,34	38,8±9,63 *†	23,47±8,07 *†‡

* - достоверные отличия от контрольных наивных CD4⁺ Т-клеток без АПК (p<0,05),

† - достоверные отличия лимфобластов от лимфоцитов (p<0,05),

‡ - отличие от аналогичной группы в культуре с В-клетками (p<0,05).

На рисунке 12 (гистограмма б) и в таблице 3 показано, что большинство Т-лимфоцитов, стимулированных В-клетками, экспрессировали хемокиновый рецептор CCR7 (84,02±4,56% и 84,92±4,16% клеток соответственно), экспрессия CXCR5 данными клетками была незначительна. В то же время среди созревших Т-лимфобластов процент клеток, несущих CXCR5, значительно увеличивался – 51,95±4,1% Т-лимфобластов в данных культурах экспрессировали CXCR5. При этом процент лимфобластов, экспрессирующих CCR7, снижался до 34,55±5,43%.

Таблица 3. Процент CD4⁺ Т-клеток, несущих хемокиновые рецепторы CCR7 и CXCR5, в смешанных культурах с В-лимфоцитами.

Хемокиновые рецепторы	Исследуемая культура клеток		
	Гейт лимфоцитов		Гейт лимфобластов
	Тх	Тх+В	Тх+В
CCR7	84,02±4,56	84,92±4,16	35,55±5,43 *†
CXCR5	5,9±1,8	8,99±2,22	51,95±4,1 *†‡

* - достоверные отличия от контрольных наивных CD4⁺ Т-клеток без АПК (p<0,05),

† - достоверные отличия лимфобластов от лимфоцитов в смешанных культурах (p<0,05).

Таким образом, в гейте лимфобластов, созревающих в смешанных культурах с различными АПК, наблюдалось усиление экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR5 и утрата рецептора CCR7. Экспрессия рецептора CXCR5 была наибольшей в смешанных культурах с В-лимфоцитами и наименее выраженной в культурах со зрелыми ДК. Экспрессия CCR7 на Т-лимфобластах в различных смешанных культурах не различалась.

На гистограмме рис. 13 и в табл. 4 представлен анализ распределения хемокиновых рецепторов CCR7 и CXCR5 на CD4⁺ Т-лимфоцитах смешанных культур с нДК. Показано, что Т-лимфоциты контрольных культур характеризовались фенотипом CCR7⁺CXCR5⁻, малое количество клеток несло оба рецептора, 14,75±5,08% клеток не несли исследуемые хемокиновые рецепторы. Клеток с фенотипом CCR7⁻CXCR5⁺ среди Т-лимфоцитов контрольных культур не наблюдалось. Таким образом, большинство Т-лимфоцитов, не прошедших трансформацию в лимфобласты, в культурах с нДК обладали типичным для наивных Т-клеток набором хемокиновых рецепторов: CCR7⁺CXCR5⁻.

Т-лимфобласты, созревающие в культурах с нДК, были более гетерогенны и достоверно отличались от контрольных культур Т-клеток. Большинство Т-лимфобластов приобретало фенотип CCR7⁻CXCR5⁻. По своему фенотипу эти

клетки соответствуют Т-клеткам-эффекторам и эффекторным Т-клеткам памяти, которые утратили способность к миграции в лимфоидную ткань. В условиях *in vivo* такие клетки выходят в рециркуляцию для поиска очага инфекции. Популяция CCR7⁺CXCR5⁻ клеток достоверно уменьшалась в Т-лимфобластах смешанных культур с нДК по сравнению с процентом клеток данной группы из культур Т-лимфоцитов и нДК. Достоверно возрастала популяция Т-лимфобластов с фенотипом CCR7⁻CXCR5⁺, достигая 20,54±3,25%.

Таблица 4. Процентное содержание CD4⁺ Т-клеток, различающихся по экспрессии хемокиновых рецепторов CCR7 и CXCR5 среди лимфоцитов и лимфобластов смешанных культур, стимулированных незрелыми ДК

Хемокиновые рецепторы	Варианты клеточных культур		
	Контрольные Т-лимфоциты	Т-лимфоциты + нДК	Т-лимфобласты + нДК
CCR7 ⁺ CXCR5 ⁻	83,94±6,96	80,88±4,99	12,41±5,7 *†
CCR7 ⁻ CXCR5 ⁺	0,62±0,2	1,05±0,25	20,54±3,25 *†‡
CCR7 ⁺ CXCR5 ⁺	5,15±1,17	2,86±0,74	13,73±10,45
CCR7 ⁻ CXCR5 ⁻	10,27±7,35	15,2±5,36	53,32±13,18 *†

* - достоверные различия между контролем и опытом, † - различия между лимфоцитами и лимфобластами, ‡ - отличия от аналогичной группы в культуре с В-клетками (p<0,05).

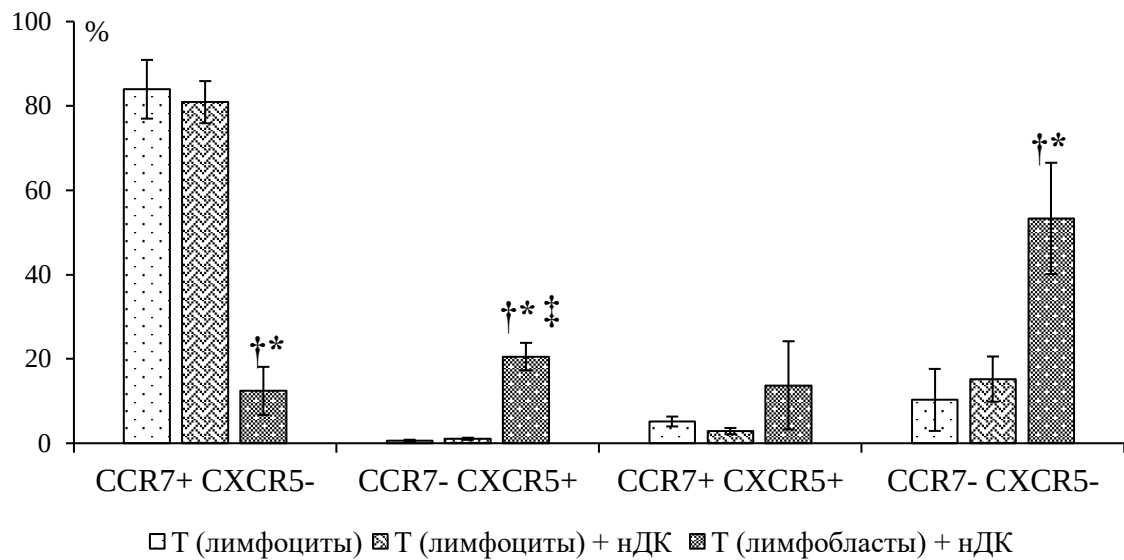


Рис. 13. Содержание групп $CD4^+$ Т-клеток, различающихся по экспрессии хемокиновых рецепторов CCR7 и CXCR5 среди лимфоцитов и лимфобластов смешанных культур, стимулированных незрелыми ДК. Фенотип групп клеток обозначен под гистограммами, принадлежность к лимфоцитам или лимфобластам – в легенде. Достоверные различия между контролем и опытом обозначены как * ($p < 0,05$), различия между лимфоцитами и лимфобластами обозначены - † ($p < 0,05$), отличия от аналогичной группы в культуре с В-клетками - ‡ ($p < 0,05$).

На рис. 14 и в табл. 5 отображено процентное содержание Т-лимфоцитов контрольных культур, $CD4^+$ Т-лимфоцитов и $CD4^+$ Т-лимфобластов смешанных культур со зрелыми дендритными клетками (ДК-ЦТК), в зависимости от распределения хемокиновых рецепторов CCR7 и CXCR5. Наиболее значимой популяцией Т-лимфобластов, созревающих в культурах со зрелыми ДК (ДК-ЦТК), являлись клетки с фенотипом $CCR7^-CXCR5^-$, которые составляли более 60% лимфобластов из этих культур. Как уже отмечалось выше эти клетки, по-видимому, являются аналогами Т-клеток-эффекторов и эффекторных Т-клеток памяти. Более 15% Т-лимфобластов экспрессировали хемокиновый рецептор CCR7 без экспрессии CXCR5. По своему фенотипу ($CD45RO^+CCR7^+CXCR5^-$) эти клетки соответствуют центральным Т-клеткам памяти, способным к

рециркуляции с выходом в Т-клеточные зоны лимфатических узлов. Около 10% Т-лимфобластов несли оба рецептора. Группа клеток с фенотипом CCR7⁻ CXCR5⁺ была самая малочисленная. Их доля составляла лишь 8,76±0,8%.

Таблица 5. Процентное содержание CD4⁺ Т-клеток, различающихся по экспрессии хемокиновых рецепторов CCR7 и CXCR5 среди лимфоцитов и лимфобластов смешанных культур, стимулированных зрелыми ДК

Хемокиновые рецепторы	Варианты клеточных культур		
	Контрольные Т-лимфоциты	Т-лимфоциты + ДК-ЦТК	Т-лимфобласты + ДК-ЦТК
CCR7 ⁺ CXCR5 ⁻	83,94±6,96	84,56±4,34	15,97±6,3 *†
CCR7 ⁻ CXCR5 ⁺	0,62±0,2	1,03±0,31	8,76±0,82 *†‡
CCR7 ⁺ CXCR5 ⁺	5,15±1,17	2,43±0,3 *	9,55±8,4
CCR7 ⁻ CXCR5 ⁻	10,27±7,35	11,96±3,98	65,99±14,04 *†

* - достоверные различия между контролем и опытом ($p<0,05$), † - различия между лимфоцитами и лимфобластами ($p<0,05$), ‡ - отличия от аналогичной группы в культуре с В-клетками ($p<0,05$).

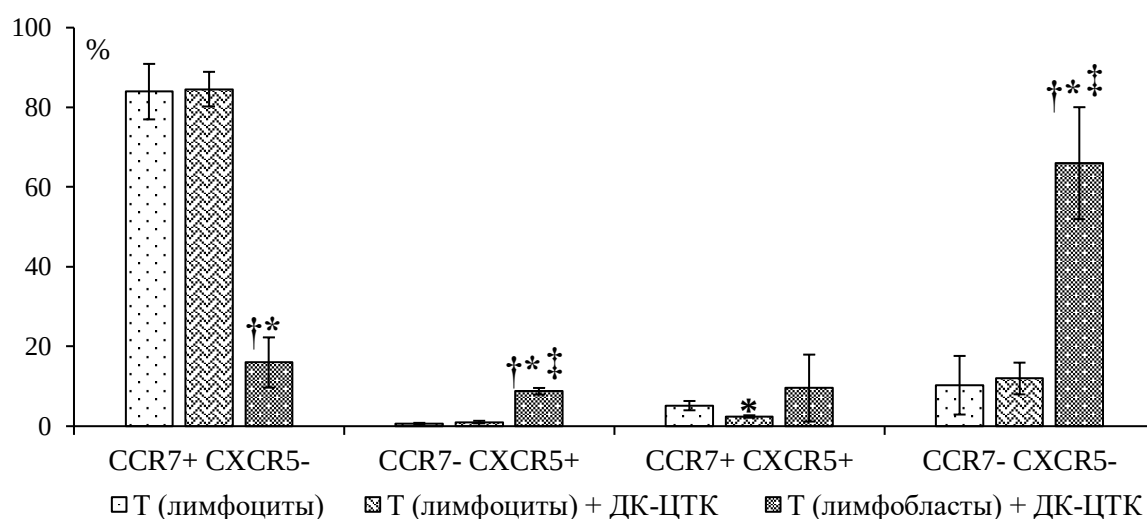


Рис. 14. Содержание групп CD4⁺ Т-клеток, различающихся по экспрессии хемокиновых рецепторов CCR7 и CXCR5 среди лимфоцитов и лимфобластов смешанных культур, стимулированных зрелыми ДК-ЦТК. Обозначения аналогичны рис. 13.

Т-лимфоциты из культур с В-клетками демонстрировали схожее с Т-клетками контрольных культур распределение хемокиновых рецепторов (рис. 15 и табл.6). В Т-лимфобластах смешанных культур с В-клетками наблюдались достоверные различия по содержанию субпопуляций с разным набором хемокиновых рецепторов. Около 40% Т-лимфобластов имели фенотип CCR7⁻ CXCR5⁺, характерный для Тфх, 26% клеток не несли исследуемых молекул, более 20% Т-лимфобластов экспрессировали только CCR7, и совсем малая часть клеток несли оба рецептора. Таким образом, подавляющее число Т-лимфобластов, созревших в культурах с В-лимфоцитами, характеризовалось экспрессией хемокинового рецептора CXCR5, способного направить созревающие клетки в В-клеточную зону лимфатического узла. Стоит отметить, что на данных клетках отсутствовал рецептор CCR7, удерживающий Т-лимфоциты в Т-клеточной зоне вторичных лимфоидных органов и служащий маркером незрелых Т-хелперов.

Таблица 6. Процентное содержание CD4⁺ Т-клеток, различающихся по экспрессии хемокиновых рецепторов CCR7 и CXCR5 среди лимфоцитов и лимфобластов смешанных культур, стимулированных В-лимфоцитами

Хемокиновые рецепторы	Варианты клеточных культур		
	Контрольные Т-лимфоциты	Т-лимфоциты + В-лимфоциты	Т-лимфобласты + В-лимфоциты
CCR7 ⁺ CXCR5 ⁻	80,34±4,77	81,45±3,75	23,90±4,76 *†
CCR7 ⁻ CXCR5 ⁺	0,98±0,27	1,58±0,44	37,25±4,4 *†‡
CCR7 ⁺ CXCR5 ⁺	4,73±2,2	6,57±2,13	13,43±3,46
CCR7 ⁻ CXCR5 ⁻	14,75±5,08	10,98±3,69	26,28±3,92 *†‡

* - достоверные различия между контролем и опытом ($p < 0,05$), † - различия между лимфоцитами и лимфобластами ($p < 0,05$), ‡ - отличия от аналогичной группы в культуре с В-клетками ($p < 0,05$).

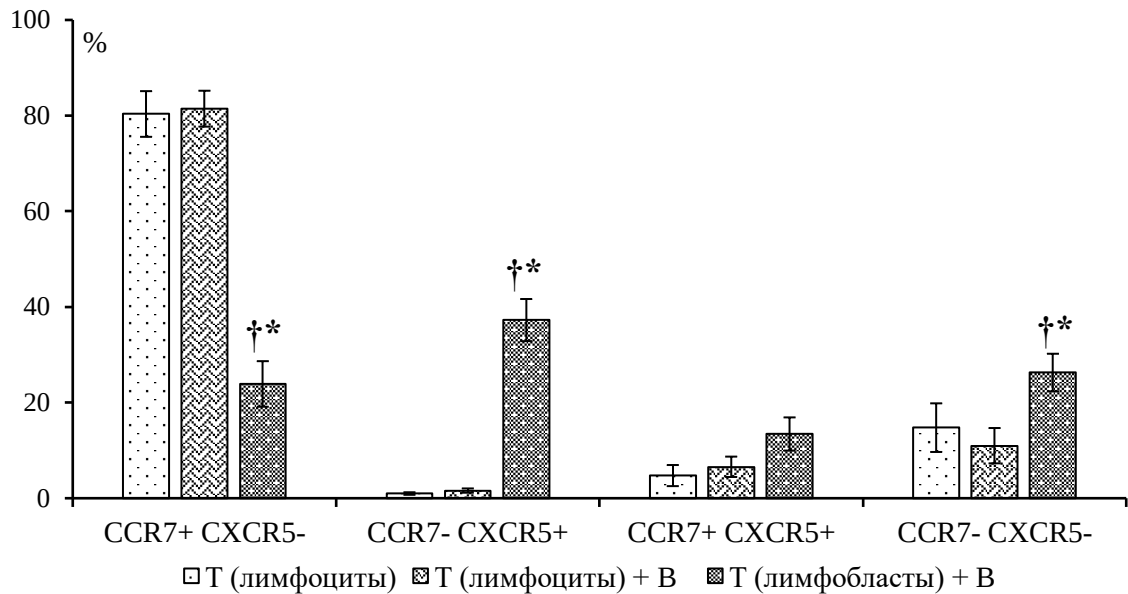


Рис. 15. Содержание групп $CD4^+$ Т-клеток, различающихся по экспрессии хемокиновых рецепторов CCR7 и CXCR5 среди лимфоцитов и лимфобластов смешанных культур, стимулированных В-лимфоцитами (Т-лимфоциты + В или Т-лимфобласты + В, соответственно) или среди Т-лимфоцитов контрольных культур без В-клеток (Т-лимфоциты). Обозначения аналогичны рис. 13.

3.2.3. Фенотипическая характеристика групп Т-хелперов с различными наборами хемокиновых рецепторов

На рис. 16 отображена экспрессия функционально значимых молекул Т-хелперов, а именно ICOS, PD-1, CD40L и OX40 на лимфобластах, созревших под действием В-лимфоцитов. Как указано в литературном обзоре, высокий уровень экспрессии этих молекул, особенно, ICOS и PD-1, характерен для зрелых Тфх. Показано, что практически все $CXCR5^+$ Т-лимфобласты из смешанных культур обладают высоким уровнем экспрессии молекул ICOS, PD-1 и OX-40, тогда как $CXCR5^-$ клетки обладают меньшей плотностью экспрессией этих молекул или лишены их (рис. 16 б). Молекула CD40L присутствует на части $CXCR5^+$ Т-лимфобластов, но различие ее экспрессии между $CXCR5^-$ и $CXCR5^+$ Т-лимфобластами выражено слабее.

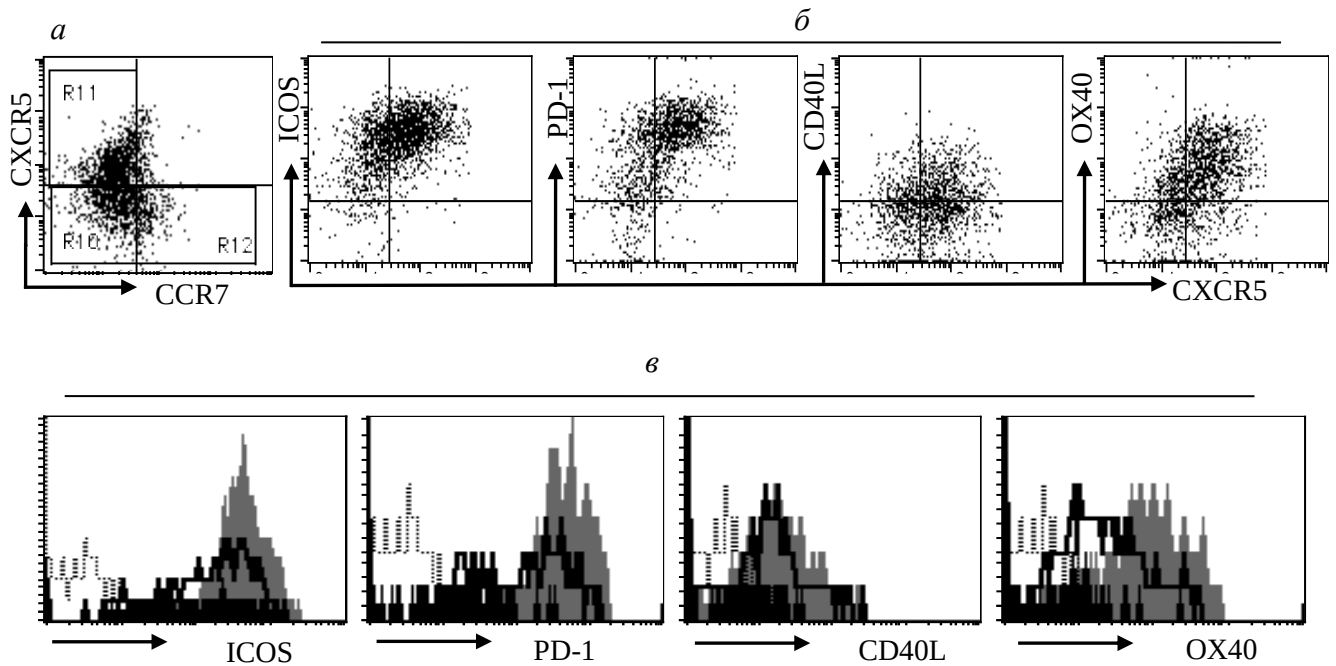


Рис. 16. Характеристика $CD4^+$ лимфобластов из смешанных культур Т-клеток и В-лимфоцитов. *a* – экспрессия CCR7 и CXCR5 и пример гейтирования CCR7⁻CXCR5⁻ клеток (гейт R10), CCR7⁻CXCR5⁺ клеток (R11) и CCR7⁺CXCR5⁻ клеток (R12). *б* – экспрессия молекул ICOS, PD-1, CD40L и OX40 в зависимости от наличия CXCR5. *в* – интенсивность экспрессии молекул ICOS, PD-1, CD40L и OX40 на CCR7⁻CXCR5⁺ Т-лимфобластах (гистограммы с серым полем), CCR7⁺CXCR5⁻ лимфобластах (толстая черная линия) и CCR7⁺CXCR5⁻ (гистограммы с черным полем). Пунктир – контроль окрашивания.

Также оценивалась интенсивность экспрессии молекул ICOS, PD-1, CD40L и OX40 на группах Т-лимфобластов с разным набором хемокиновых рецепторов: на CCR7⁻CXCR5⁺, CCR7⁺CXCR5⁻ и CCR7⁻CXCR5⁻ Т-лимфобластах (рис. 16*в*). Для этого мы использовали отдельное гейтирование клеток, что представлено на рис. 16 (*a*). В гейт R10 выделены лимфобласты, на которых отсутствует экспрессия данных хемокиновых рецепторов (CCR7⁻CXCR5⁻). Гейт R12 содержит группу клеток, экспрессирующих CCR7, но не CXCR5 (CCR7⁺CXCR5⁻). Наконец,

большая часть лимфобластов была сосредоточена в гейте R11 – это клетки, экспрессирующие хемокиновый рецептор CXCR5, но не CCR7 (CCR7⁻CXCR5⁺).

Было выявлено, что группа Т-лимфобластов с фенотипом CCR7⁻CXCR5⁺ обладала наибольшим уровнем экспрессии молекул, характерных для зрелых активированных Т-хелперов. Высокая интенсивность экспрессии этих молекул отражена на рис. 16в как наибольший сдвиг графика вправо по горизонтальной оси (интенсивности флуоресценции). Таким образом, данные клетки по своему фенотипу (CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁻CXCR5⁺ICOS^{hi}PD-1^{hi}CD40L⁺OX40⁺) соответствовали Т-фолликулярным хелперам.

Лимфобласты с фенотипом CCR7⁻CXCR5⁻ занимали промежуточное положение по степени зрелости. Данные клетки имели меньший уровень экспрессии ICOS и CD40L, низкий уровень экспрессии OX40, экспрессия маркера PD-1 была довольно гетерогенной – формировались подгруппы с промежуточным и низким уровнями экспрессии. Предположительно, данные клетки представляли собой смесь незрелых и функционально зрелых Т-хелперов.

CCR7⁺CXCR5⁻ лимфобласты обладали низким уровнем экспрессии PD-1, разнообразной экспрессией ICOS и были лишены молекул CD40L и OX40. Таким образом, CCR7⁺CXCR5⁻ клетки практически не отличались от исходных наивных Т-хелперов по своему фенотипу. Возможно, что группы с различной экспрессией хемокиновых рецепторов отражают этапы созревания Т-фолликулярных хелперов в культуре – от CCR7⁺CXCR5⁻ лимфобластов, подобных наивным Т-хелперам, до клеток с фенотипом зрелых фолликулярных Т-хелперов.

На рис. 17 представлено распределение экспрессии хемокиновых рецепторов CCR7 и CXCR5 на CD4⁺ Т-лимфобластах, созревших с нДК (а) и со зрелыми ДК (б). Применяли метод отдельного гейтирования наиболее многочисленных в культурах субпопуляций. Гейт R8 содержал CCR7⁻CXCR5⁻ Т-лимфобласты, гейт R9 – CCR7⁺CXCR5⁻ клетки, гейт R10 – группу CCR7⁺CXCR5⁺ клеток. Клетки с Тфх-подобным фенотипом CCR7⁻CXCR5⁺ в культурах,

использованных для данных экспериментов, были немногочисленны и не образовывали четко определяемой группы, пригодной для гейтирования.

Анализ экспрессии молекул, ассоциированных с созревaniem Т-хелперов в гейтированных группах клеток, показал, что CCR7⁺CXCR5⁺ Т-лимфобласты в культурах с нДК сильно экспрессировали молекулы ICOS, PD-1 и OX40. Т-лимфобласты с фенотипом CCR7⁻CXCR5⁻ в культурах с нДК имели относительно небольшой уровень экспрессии ICOS, PD-1 и OX40 и не отличались от CCR7⁺CXCR5⁺ клеток по экспрессии CD40L. CCR7⁺CXCR5⁻ лимфобласты в культурах с нДК имели невысокие уровни экспрессии PD-1, CD40L и OX40, уровень экспрессии ICOS был несколько выше (рис.17в).

CCR7⁺CXCR5⁺ Т-лимфобласты смешанных культур с ДК-ЦТК чрезвычайно сильно экспрессировали молекулу ICOS, и обладали достаточно высоким уровнем экспрессии молекулы PD-1 и OX40. CCR7⁺CXCR5⁻ Т-лимфобласты в культурах с ДК-ЦТК имели в своем составе небольшую часть клеток, лишенных молекул PD-1, CD40L и OX40, однако большая часть CCR7⁺CXCR5⁻ клеток демонстрировала фенотип зрелых Тх с высоким уровнем экспрессии ICOS, PD-1, CD40L и OX40. CCR7⁻CXCR5⁻ лимфобласты обладали низкой интенсивностью флуоресценции молекулы ICOS и средним уровнем экспрессии молекул PD-1, CD40L и OX40 (рис.17г).

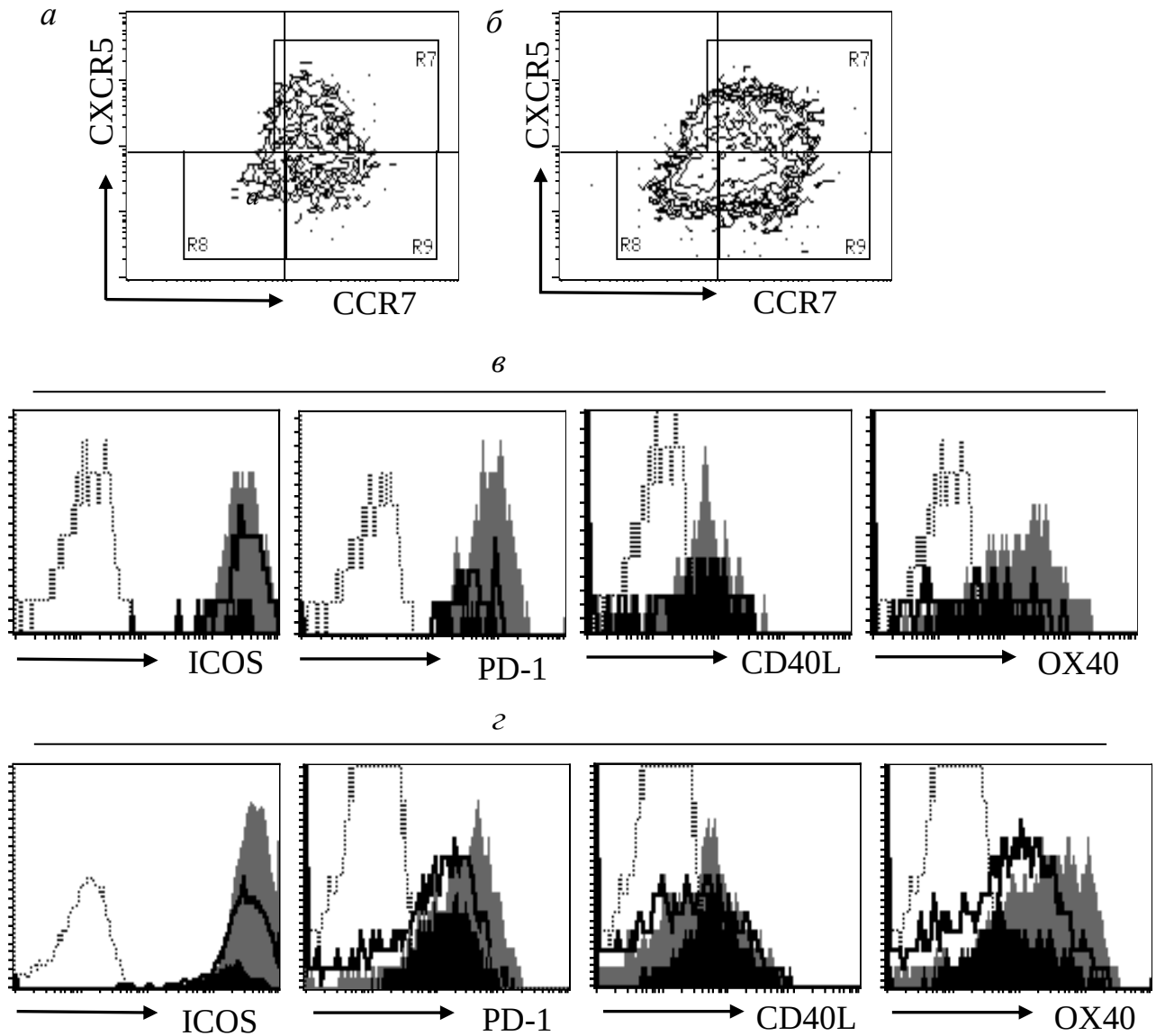


Рис. 17. Экспрессия CCR7 и CXCR5 на CD4⁺ лимфобластах из смешанных культур Т-клеток с нДК (*a*) и с ДК-ЦТК (*б*). Выделены CCR7⁺CXCR5⁺ клетки (гейт R7), CCR7⁻CXCR5⁻ клетки (R8) и CCR7⁺CXCR5⁻ клетки (R9). Интенсивность экспрессии молекул ICOS, PD-1, CD40L и OX40 на группах CD4⁺ лимфобластов из культур Т-клеток с нДК (*в*) и с ДК-ЦТК (*г*). Группы CD4⁺ лимфобластов: CCR7⁺CXCR5⁺ клетки (гистограммы с серым полем), CCR7⁺CXCR5⁻ клетки (толстая черная линия) и CCR7⁻CXCR5⁻ клетки (гистограммы с черным полем). Пунктир — контроль окрашивания. Названия маркеров обозначены у соответствующих осей.

Таким образом, в смешанных культурах $CD4^+$ Т-хелперов с нДК и ДК-ЦТК практически не происходит созревания Т-лимфобластов с набором хемокиновых рецепторов, характерных для Тфх ($CCR7^-CXCR5^+$). Однако формируются группы клеток с фенотипом $CCR7^+CXCR5^+$, $CCR7^+CXCR5^-$, $CCR7^-CXCR5^-$. Особый интерес представляет группа клеток с одновременной экспрессией CCR7 и CXCR5 и высоким уровнем экспрессии ICOS и PD-1: возможно, данные клетки являются аналогами пре-Тфх или циркулирующих Тфх, описанных в литературе. Экспрессия CXCR5 на данных клетках может позволить им мигрировать в В-клеточную зону лимфатического узла, где они вступят в контакт с В-клетками и пройдут процесс дифференцировки в Тфх. Однако, это лишь одна из дальнейших возможностей развития $CD4^+CCR7^+CXCR5^+$ Т-лимфобластов. Хемокиновый рецептор CCR7 на клетках данной группы может удерживать их в Т-клеточной зоне лимфатического узла, где судьба этой группы клеток будет зависеть от определенной цитокиновой атмосферы и микроокружения в условиях *in vivo*. Известно, что костимулирующая молекула ICOS служит ранним активационным маркером, и, возможно, молекула хемокинового рецептора CXCR5, также является ранним маркером активации клеток, и только при определенных условиях может создать возможность для миграции $CD4^+CCR7^+CXCR5^+$ Т-лимфобластов в В-клеточную зону.

3.2.4. Экспрессия ядерного фактора транскрипции Bcl-6 в $CD4^+$ лимфоцитах и лимфобластах, созревших с антигенпрезентирующими клетками

Как известно, созреванием Т-фолликулярных хелперов управляет ядерный фактор транскрипции Bcl-6. Для более полного представления о статусе исследуемой группы $CD4^+CD45RO^+CCR7^-CXCR5^+$ Т-лимфоцитов, культивируемых в смешанных культурах с антигенпрезентирующими клетками, мы оценивали экспрессию ядерного фактора транскрипции Bcl-6 в Т-лимфоцитах

и Т-лимфобластах смешанных культур. Для оценки экспрессии белка Bcl-6 в Т-лимфоцитах применялась комбинация поверхностного и внутриклеточного окрашивания.

Результат репрезентативного эксперимента с использованием смешанных культур с В-лимфоцитами представлен на рис. 18. Средние значения экспрессии Bcl-6 в Т-лимфоцитах и Т-лимфобластах смешанных и контрольных культур, а также экспрессия Bcl-6 в CXCR5⁺ и CCR7⁺ Т-клетках представлены на рис 19.

Экспрессия Bcl-6 в Т-клетках контрольных культур была крайне низкой – $2,4 \pm 1,06\%$ клеток экспрессировали Bcl-6. Bcl-6⁺CXCR5⁺ Т-клетки фактически отсутствовали – их доля составила лишь $0,16 \pm 0,1\%$. Также в контрольных культурах обнаруживалось малое количество Bcl-6⁺CCR7⁺ клеток. Их содержание составляло $1,35 \pm 0,8\%$ от всех Т-хелперов.

Т-лимфоциты смешанных культур с В-клетками, не прошедшие трансформацию в лимфобласты, незначительно повышали экспрессию Bcl-6. В результате $5,88 \pm 1,9\%$ Т-лимфоцитов смешанных культур обладали экспрессией этого ядерного фактора. Доля Bcl-6⁺CXCR5⁺ Т-хелперов в лимфоцитарном гейте оставалась низкой и составляла $0,67 \pm 0,26\%$. Среди Т-лимфоцитов смешанных культур с В-лимфоцитами незначительно увеличивался процент клеток с фенотипом Bcl-6⁺ CCR7⁺ (до $3,38 \pm 1,55\%$).

Наибольший процент Bcl-6⁺ клеток регистрировался в гейте CD4⁺ лимфобластов смешанных культур с В-клетками, и составлял $12,02 \pm 2,23\%$. Содержание Bcl-6⁺CXCR5⁺ клеток среди Т-лимфобластов смешанных культур приближалось к общему повышенному содержанию Bcl-6⁺ клеток в этой группе: $8,97 \pm 1,85\%$ этих клеток экспрессировали одновременно и Bcl-6, и CXCR5. При этом доля Bcl-6⁺CCR7⁺ Т-лимфобластов в смешанной культуре не увеличивалась и составляла $1,56 \pm 0,6\%$. Таким образом, наиболее высокая экспрессия Bcl-6 наблюдалась среди Т-лимфобластов, созревших в культурах с В-лимфоцитами. Кроме того, эти клетки характеризовались одновременной экспрессией ядерного

фактора транскрипции Bcl-6 и хемокинового рецептора CXCR5, что характерно для Т-фолликулярных хелперов.

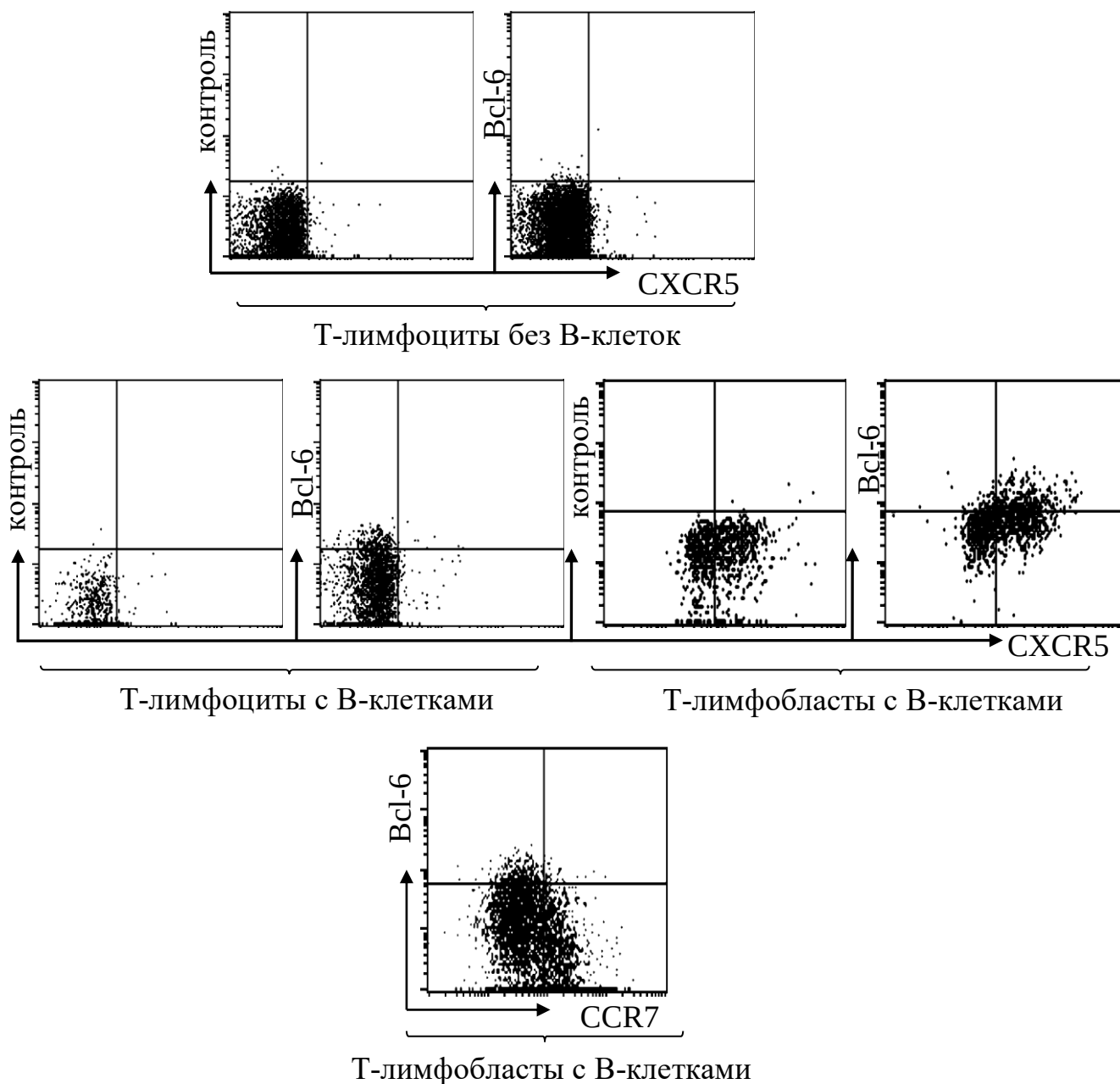


Рис. 18. Экспрессия Bcl-6 в $CD4^+$ лимфоцитах и лимфобластах в зависимости от наличия хемокиновых рецепторов. Названия маркеров обозначены у соотв. осей, а типы клеток – под графиками.

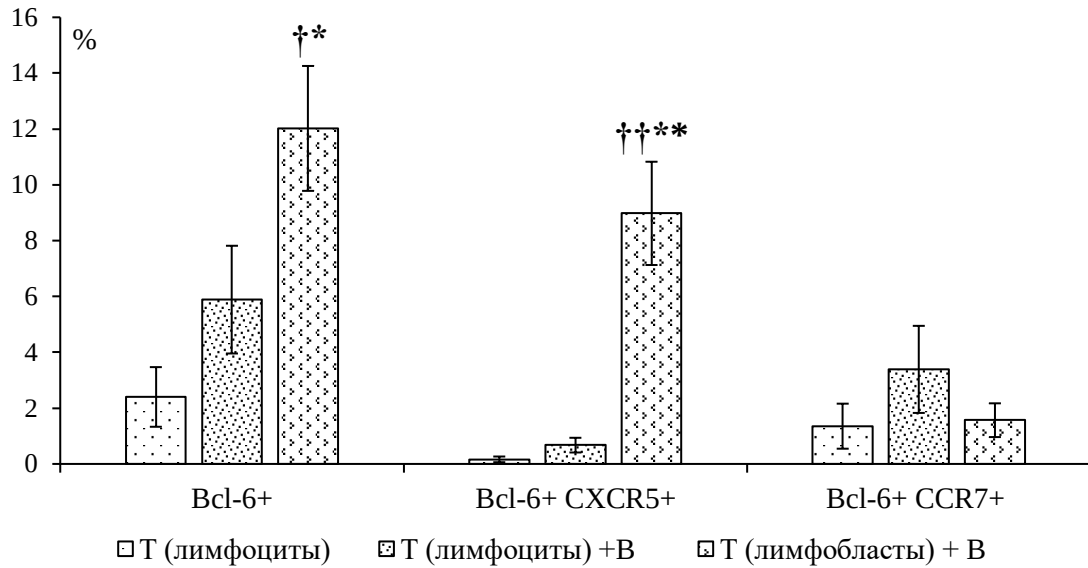


Рис. 19. Средние значения содержания Bcl-6⁺ и Bcl-6⁺CXCR5⁺ клеток среди CD4⁺ Т-клеток в смешанных культурах с В-лимфоцитами (N=9). Типы клеток обозначены под графиком. Достоверные отличия от контрольных Т-лимфоцитов обозначены - * (p=0,03) и ** (p=0,0005), различия между лимфоцитами и лимфобластами - † (p=0,02) и † † (p=0,0003). Обозначения аналогичны рис. 15.

Также оценивалась экспрессия ядерного фактора транскрипции Bcl-6 и её связь с экспрессией хемокиновых рецепторов CXCR5 и CCR7 на Т-лимфоцитах и Т-лимфобластах смешанных культур с незрелыми дендритными клетками (рис.20). Доля клеток, экспрессирующих белок Bcl-6 среди Т-лимфоцитов этих культур, была невелика и составляла 5,97±1,11%. Т-лимфобласты этих культур также слабо экспрессировали Bcl-6 (5,67±2,34%) и по этому параметру существенно уступали Т-лимфобластам смешанных культур с В-лимфоцитами.

Bcl-6⁺CXCR5⁺ Т-лимфоциты в смешанных культурах с нДК практически отсутствовали. Небольшое количество этих клеток (2,68±1,01%) содержалось в гейте лимфобластов. Количество Bcl-6⁺CXCR5⁺ Т-лимфобластов в культурах с нДК было значительно ниже, чем в культурах с В-лимфоцитами (p=0,004). Молекулы Bcl-6 и CCR7 одновременно экспрессировало небольшое количество Т-

лимфоцитов ($3,15 \pm 0,58\%$) и крайне малое количество Т-лимфобластов ($0,67 \pm 0,33\%$) смешанных культур с нДК.

Таким образом, созревающие Т-лимфобласты смешанных культур с нДК слабо экспрессировали ядерный фактор транскрипции Bcl-6. Кроме того, процент созревающих Bcl-6⁺CXCR5⁺ Т-лимфобластов, потенциально являющихся Т-фолликулярными хелперами, был незначителен.

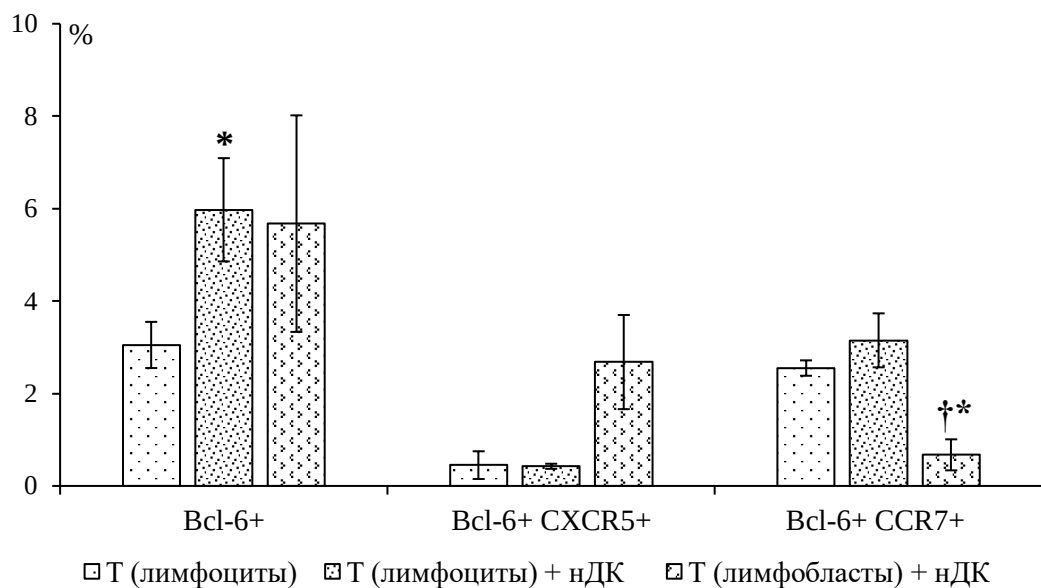


Рис. 20. Средние значения содержания Bcl-6⁺ и Bcl-6⁺CXCR5⁺ клеток среди CD4⁺ Т-клеток в смешанных культурах с незрелыми дендритными клетками (N=4). Типы клеток обозначены под графиком. Достоверные отличия от контрольных Т-лимфоцитов обозначены - * ($p < 0,05$), различия между лимфоцитами и лимфобластами - † ($p < 0,05$).

В смешанных культурах со зрелыми дендритными клетками экспрессия ядерного фактора транскрипции Bcl-6 была еще слабее, чем в культурах с нДК (рис. 21). Этот фактор экспрессировали лишь $4,75 \pm 0,92\%$ Т-лимфоцитов и $3,77 \pm 1,15\%$ Т-лимфобластов. Экспрессия Bcl-6 в лимфобластах в культурах с ДК-ЦТК была в 3,1 раза ниже чем в культурах с В-лимфоцитами ($p = 0,013$). Bcl-6⁺CXCR5⁺ Т-лимфоциты практически отсутствовали. Процент Bcl-6⁺CXCR5⁺ Т-лимфобластов в культурах с ДК-ЦТК незначительно увеличивался ($1,13 \pm 0,05\%$) в сравнении с контрольными культурами Т-лимфоцитов, но был в 7,9 раза ниже,

чем в смешанных культурах с В-лимфоцитами ($p=0,0009$). Доля Т-лимфоцитов с фенотипом $Bcl-6^+CCR7^+$ в культурах со зрелыми ДК была также невелика и составляла $3,02 \pm 0,6\%$ (рис. 21). $Bcl-6^+CCR7^+$ Т-лимфобласты отсутствовали.

Таким образом, в смешанных культурах $CD4^+$ Т-лимфоцитов и зрелых ДК была выявлена экспрессия ядерного фактора $Bcl-6$, однако созревания клеток с фенотипом Т-фолликулярных хелперов ($Bcl-6^+CXCR5^+$) практически не наблюдалось.

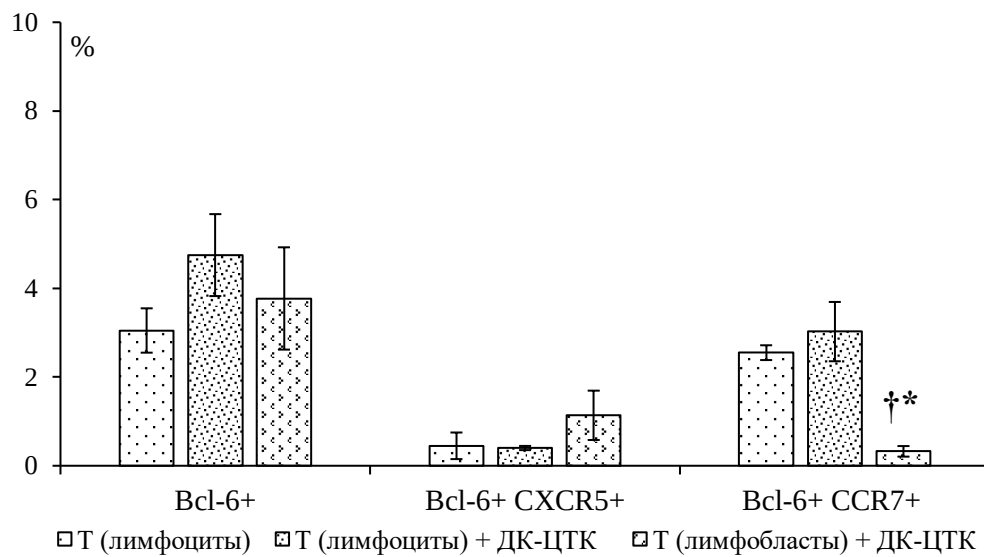


Рис. 21. Средние значения содержания $Bcl-6^+$ и $Bcl-6^+CXCR5^+$ клеток среди $CD4^+$ Т-клеток в смешанных культурах со зрелыми дендритными клетками ($N=4$). Типы клеток обозначены под графиком. Достоверные отличия от контрольных Т-лимфоцитов обозначены - * ($p<0,05$), различия между лимфоцитами и лимфобластами - † ($p<0,05$).

Анализ полученных данных позволил сделать вывод, что Т-лимфоциты смешанных культур, не прошедшие трансформацию в лимфобласты, не приобретают характерных фенотипических особенностей Тфх: не экспрессируют хемокиновый рецептор $CXCR5$ и ядерный фактор транскрипции $Bcl-6$, данные параметры остаются в пределах уровней контролей. В то же время, созревание

клеток с фенотипом, характерным для Т-фолликулярных хелперов, происходит среди Т-лимфобластов. Наиболее активно созревание Т-фолликулярных хелперов происходит в смешанных культурах В-лимфоцитов и Т-клеток. Значительно меньший процент Тфх созревает в культурах с незрелыми дендритными клетками и, наконец, в культурах со зрелыми ДК крайне малое количество Т-лимфобластов приобретают фенотип, свойственный Тфх (рис. 22).

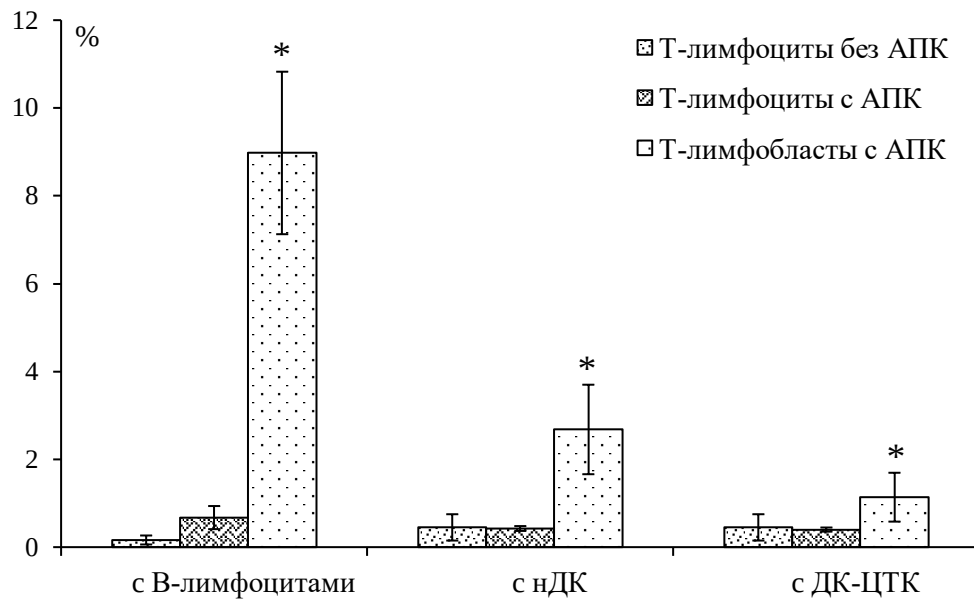


Рис. 22. Сравнение содержания $V\beta 1-6^+CXCR5^+$ Т-клеток в культурах с В-лимфоцитами, нДК и ДК-ЦТК. Типы Т-лимфоцитов обозначены в правом верхнем углу, под графиками – названия АПК. Достоверные отличия от соотв. показателя смешанной культуры с В-клетками обозначены - * ($p < 0,03$).

Данное наблюдение даёт основания для выдвижения гипотезы, согласно которой для процесса дифференцировки Тфх достаточно взаимодействия нТх с В-лимфоцитами, в то время как контакт с дендритными клетками не всегда является обязательным. Учитывая потенциальную возможность части наивных Т-хелперов к миграции из кровотока в В-клеточные зоны лимфоидных органов, можно предположить, что для этих клеток весь процесс созревания Т-фолликулярных хелперов может осуществляться непосредственно в этих зонах.

Стимуляция наивных CD4⁺ Т-клеток при культивировании со зрелыми дендритными клетками вызывала одновременное накопление транскриптов всех основных генов мастер-регуляторов дифференцировки субпопуляций Т-хелперов: Тх1, Тх2, Тх17 и Тфх – *TBX21*, *GATA3*, *RORc* и *Bcl-6*, соответственно (рис. 23). По-видимому, стимуляция Т-хелперов моноцитарными дендритными клетками может создать условия для дифференцировки Т-лимфоцитов по любому пути развития, вызвав транзиторную экспрессию, казалось бы, несовместимого набора конкурирующих друг с другом ядерных факторов. Основной же выбор субпопуляционной направленности может зависеть от действия факторов микроокружения, отсутствующих в смешанной культуре Т-хелперов и дендритных клеток. Так поляризация активированных Т-хелперов в Тх1 и Тх2 будет во многом зависеть от действия цитокинов ранее созревших Т-хелперов соответствующих субпопуляций, а контакт с В-лимфоцитами создаст условия для дифференцировки Тфх.

Кроме того, можно отметить, что экспрессия гена *Bcl-6* в Тх при стимуляции ДК-ЦТК, зарегистрированная с помощью ПЦР (рис. 23), не приводит к существенной экспрессии белка Bcl-6, детектируемой с помощью проточной цитометрии (рис. 21). Возможно, данный результат можно объяснить негативной регуляцией экспрессии Bcl-6 на более поздних этапах реализации генетической информации в Т-лимфоцитах, стимулированных ДК-ЦТК.

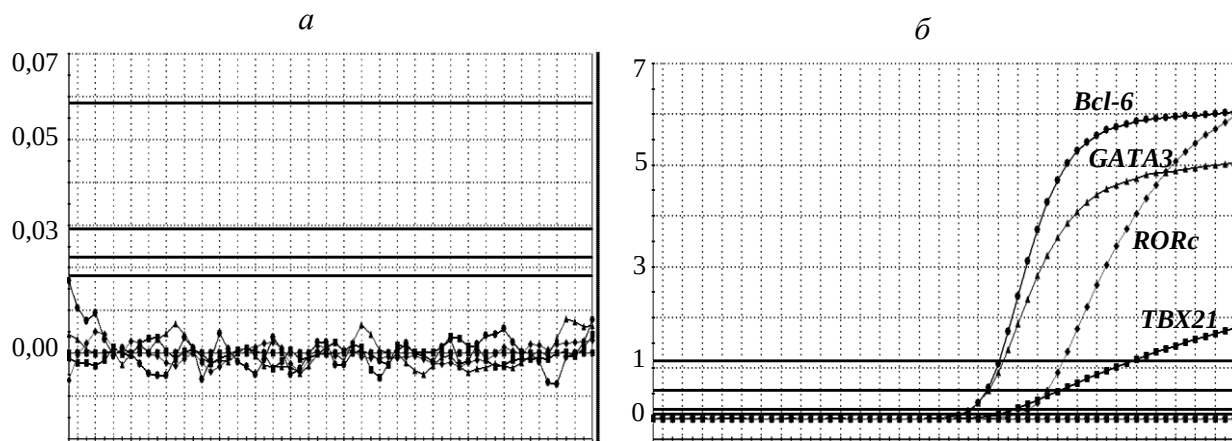


Рис. 23. Графики накопления транскриптов в ОТ-ПЦР показывают отсутствие экспрессии мастер-регуляторов субпопуляций Тх в контрольных культурах нТх (а) и экспрессию генов *Bcl-6*, *GATA3*, *RORc* и *TBX21* в культурах, стимулированных ДК-ЦТК (б). Результат репрезентативного эксперимента (N=5).

3.2.5. Влияние ингибирования ядерного фактора транскрипции *Bcl-6* на созревание Т-клеток в смешанных культурах с В-лимфоцитами

Для оценки роли ядерного фактора транскрипции *Bcl-6* в созревании клеток с фенотипом Тфх в смешанных культурах Т- и В-лимфоцитов использовали ингибитор *Bcl-6* – вещество 79-6 в конечной концентрации 50 μM . Выбор концентрации был осуществлен на основе данных о специфической активности ингибитора по отношению к *Bcl-6* в В-клеточных лимфомах, представленных производителем, а также на основе результатов предварительных экспериментов оценки токсичности ингибитора по отношению к нормальным лимфоцитам. Для проверки токсичности МНПК засевали с концентрациями ингибитора от 10 до 250 μM и наблюдали морфологию культур в течение 5 суток. На 5 сутки клетки собирали и подсчитывали выход и жизнеспособность клеток, выбирая максимальную концентрацию, не оказывающую влияние на оба эти параметра.

Затем ингибитор вносили в культуры Т-лимфоцитов и смешанные культуры Т- и В-лимфоцитов. Контролями служили аналогичные культуры с внесением растворителя ингибитора (DMSO). На пятые сутки культивирования оценивали

созревание клеток по общему содержанию лимфобластов и их фенотипу методом проточной цитофлуориметрии. Было поставлено два эксперимента, при этом каждый параметр измерялся в 6 повторах. Результаты первого эксперимента представлены на рис. 24 (а), второго – на рис. 24 (б). В смешанных культурах Т- и В-лимфоцитов в присутствии ингибитора мы обнаружили достоверное подавление бласттрансформации Т-лимфоцитов как в первом, так и во втором эксперименте. В первом эксперименте содержание $CD3^+$ Т-лимфобластов в смешанных культурах Т- и В-лимфоцитов без ингибитора составляло $37,23 \pm 1,39\%$ и значительно снижалось в культурах с ингибитором до $23,69 \pm 3,44\%$. Во втором эксперименте содержание Т- лимфобластов среди смешанных культур Т- и В-лимфоцитов без добавления ингибитора составляло $33,41 \pm 1,73\%$ и уменьшалось в присутствии ингибитора до $27,55 \pm 3,69\%$. В культурах Т-лимфоцитов без АПК бласттрансформация не была выявлена как в присутствии, так и в отсутствии ингибитора.

Также мы оценивали количество созревающих клеток с фенотипом Т-фолликулярных хелперов по анализу наличия $CD4^+CXCR5^+CCR7^-$ Т-лимфобластов в смешанных культурах Т- и В-лимфоцитов, и в смешанных культурах Т- и В-лимфоцитов в присутствии ингибитора Bcl-6. Было выявлено снижение доли $CD4^+CXCR5^+CCR7^-$ Т-лимфобластов в культурах с добавлением ингибитора Bcl-6 (рис.24в).

Можно сделать вывод, что ингибитор ядерного фактора транскрипции Bcl-6 угнетает процесс трансформации покоящихся Т-лимфоцитов в активированные Т-лимфобласты и ослабляет созревание клеток с фенотипом Тфх, что подтверждает роль Bcl-6 в процессе дифференцировки Тфх, индуцированной В-лимфоцитами.

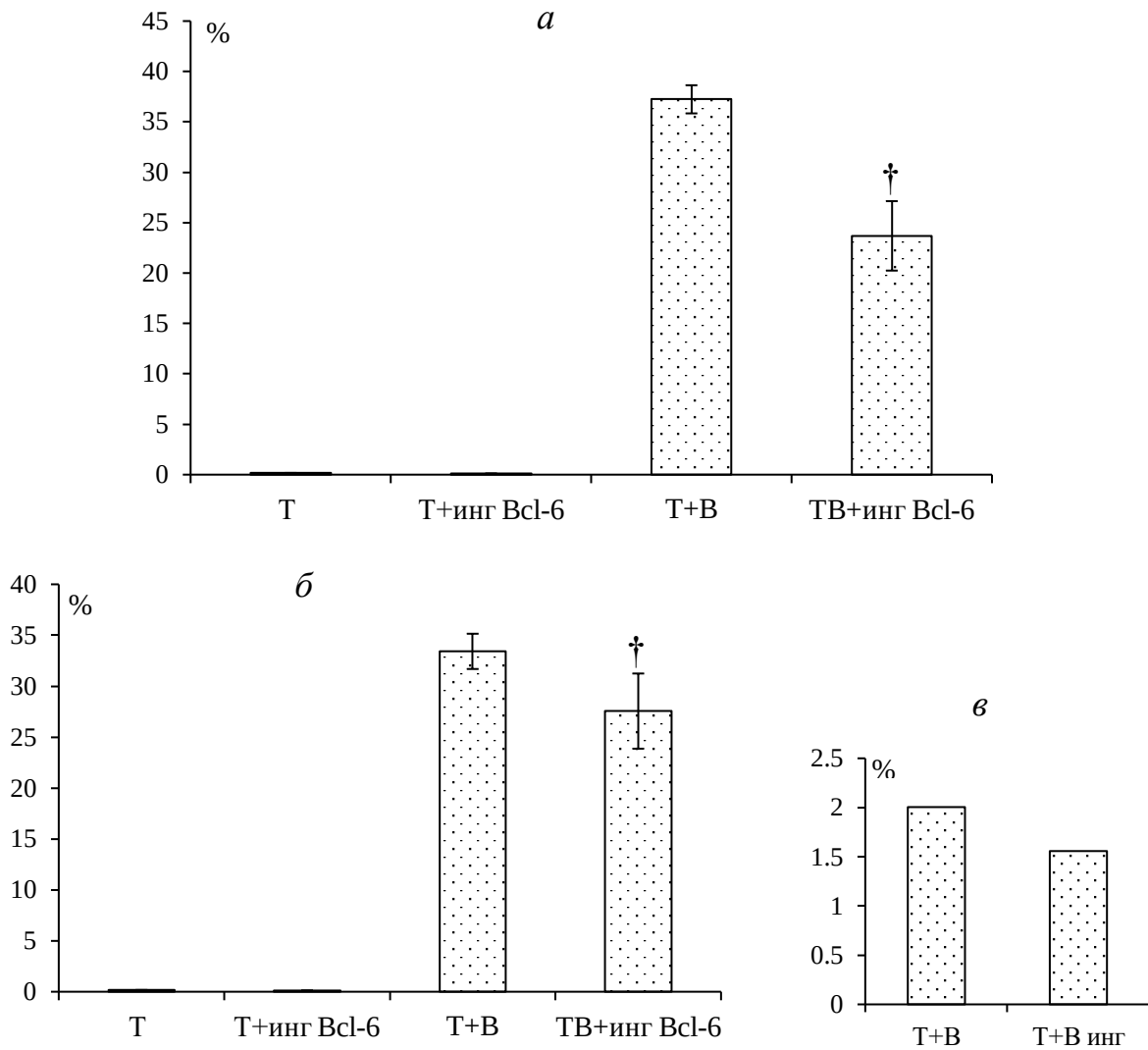


Рис. 24. Влияние ингибитора Bcl-6 на созревание Тфх в культурах Т- и В-лимфоцитов. Представлены данные двух экспериментов (а, б). Гистограммы отображают средние доли лимфобластов в культурах Т-лимфоцитов (Т), Т-лимфоцитов в присутствии ингибитора Bcl-6 (Т+инг Bcl-6), смешанных культурах Т- и В-лимфоцитов (Т+В), смешанных культурах при добавлении ингибитора Bcl-6 (ТВ+инг Bcl-6). Достоверные отличия соответствующих типов культур с добавлением и без добавления ингибитора обозначены как † ($p < 0,05$). Действие ингибитора Bcl-6 на общее количество $CD4^+CXCR5^+CCR7^-$ лимфобластов, созревающих в смешанных культурах Т- и В-лимфоцитов (в).

3.3. Изменение свойств В-лимфоцитов при взаимодействии с Т-хелперами *in vitro*

3.3.1. Индукция экспрессии ядерного фактора транскрипции Bcl-6 в В-лимфоцитах смешанных культур

В смешанных культурах Т- и В-лимфоцитов экспрессия Bcl-6 возрастала не только в Т-лимфобластах, но и в CXCR5⁺ В-лимфоцитах, что представлено на рис. 25а. В-лимфоциты в контрольных культурах без Т-клеток обладали относительно невысокой экспрессией Bcl-6 ($9,12 \pm 1,66\%$), в то время как экспрессия данного ядерного фактора достоверно увеличивалась в смешанных культурах В-лимфоцитов и Т-хелперов, достигая $19,33 \pm 2,69\%$ (рис.25б).

Данное наблюдение свидетельствует о проявлении взаимной стимуляции Т- и В-клеток, что приводит к созреванию Тfh и формированию фенотипа фолликулярных В-клеток. Вполне вероятно, что созревающие в культурах фолликулярные Т-хелперы способствуют созреванию В-лимфоцитов, в которых экспрессия ядерного фактора транскрипции Bcl-6 необходима для успешного переключения изотипов иммуноглобулинов и созревания аффинитета антител, т.к. известно, что Bcl-6 блокирует апоптоз, индуцируемый повреждениями ДНК при этих процессах. Однако было замечено, что В-клетки смешанных культур с Т-лимфоцитами, входящие в гейт лимфобластов, достоверно снижают ($4,75 \pm 0,55\%$) экспрессию соответствующих маркеров, что отражено на рис. 25б. Возможно, эти клетки представляют собой созревшие плазмобласты, утратившие хемокиновый рецептор CXCR5 и ядерный фактор транскрипции Bcl-6.

Косвенным подтверждением этого предположения является следующее наблюдение. При добавлении к клеточным культурам очищенных В-лимфоцитов ингибитора ядерного фактора транскрипции Bcl-6 79-6 мы обнаружили увеличение содержания В-лимфобластов в культурах В-лимфоцитов с добавлением ингибитора Bcl-6 по сравнению с показателями контрольных культур (рис.25в). В первом эксперименте доля В-лимфобластов контрольных

культур составляла $20,74 \pm 1,81\%$ и недостоверно увеличивалась в культурах с ингибитором $28,02 \pm 2,13\%$. Во втором эксперименте содержание В-лимфобластов в контрольных культурах составляло $25,59 \pm 1,78\%$ и достоверно увеличивалось в культурах В-лимфоцитах, культивируемых с ингибитором до $39,17 \pm 2,4\%$ (рис.25в). Известно, что ядерный фактор Bcl-6 взаимно подавляет регулятор дифференцировки плазматических клеток – ядерный фактор транскрипции Blimp-1. Возможно, ингибция Bcl-6 приводит к накоплению ядерного фактора Blimp-1, что способствует трансформации В-лимфоцитов в плазмобласты, которые и определяются в гейте крупных клеток - лимфобластов. Однако, это предположение остается дискуссионным вопросом и требует прямой проверки с помощью оценки экспрессии специфических маркеров плазмобластов и плазмоцитов.

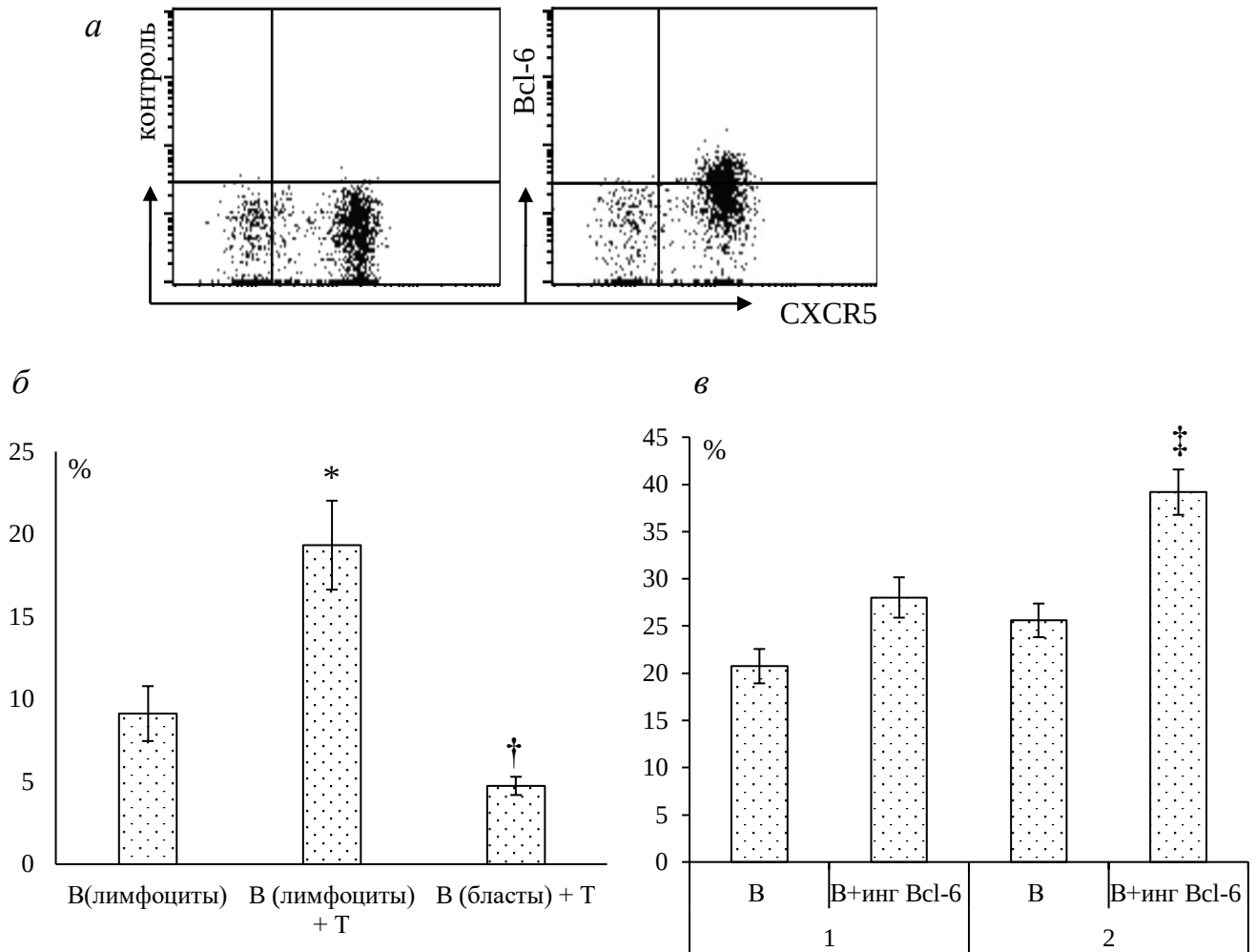


Рис. 25. Экспрессия ядерного фактора транскрипции Bcl-6 в В-клетках смешанных культур. *a* – репрезентативный пример экспрессии Bcl-6 и CXCR5 на В-лимфоцитах из смешанных культур Т-хелперов и В-лимфоцитов; слева – контроль окрашивания Bcl-6. *б* – средние значения содержания Bcl-6⁺CXCR5⁺ клеток среди В-лимфоцитов в контрольных культурах нестимулированных В-клеток и в смешанных культурах Т- и В-лимфоцитов (N=6). Достоверные отличия контрольных В-лимфоцитов от В-лимфоцитов смешанных культур с Т-лимфоцитами обозначены – * (p=0,005), отличия В-лимфоцитов от В-лимфобластов смешанных культур с Т-лимфоцитами обозначены как – † (p=0,01). *в* – влияние ингибитора Bcl-6 на долю В-лимфобластов в культурах В-лимфоцитов без ингибитора (В) и В-лимфоцитов в присутствии ингибитора Bcl-6 (В+инг Bcl-6). 1 – данные первого эксперимента, 2 – данные второго эксперимента. Достоверные отличия соответствующих типов культур с добавлением и без добавления ингибитора обозначены как ‡ (p=0,004).

3.3.2. Изменение экспрессии IgM на В-лимфоцитах

Как известно, иммуноглобулин IgM, наряду с IgD, находятся на поверхности зрелых наивных В-лимфоцитов, ранее не контактировавших с антигеном. После активации антигеном и под действием Т-хелперов и их цитокинов запускается процесс переключения изотипов иммуноглобулинов, в ходе которого происходит замена синтеза IgM и IgD на синтез IgG, IgA и IgE. При помощи иммунофлюоресцентного анализа мы выявили отличия экспрессии IgM на свежевыделенных В-лимфоцитах, В-клетках контрольных культур без Т-хелперов, а также на В-лимфоцитах и В-лимфобластах смешанных культур с Т-клетками. Свежевыделенные В-лимфоциты обладали высокой экспрессией IgM, при культивировании с Т-лимфоцитами экспрессия IgM на В-лимфоцитах снижалась, причем наибольшее снижение экспрессии регистрировалось на В-лимфобластах смешанных культур (рис.26а).

Кроме того, в смешанных культурах Т- и В-лимфобластов происходило уменьшение доли В-клеток, имеющих фенотип $\text{IgM}^+\text{CXCR5}^+$. Контрольные культуры одиночных В-лимфоцитов характеризовались высоким процентом клеток, экспрессирующих IgM и CXCR5 - $42,43 \pm 4,83\%$ В-лимфоцитов экспрессировали данные молекулы. В смешанных культурах В-клеток с Т-лимфоцитами снижалось количество $\text{IgM}^+\text{CXCR5}^+$ В-лимфоцитов и составляло $33,49 \pm 9,64\%$. В смешанных культурах В-лимфобластов и Т-лимфоцитов ещё более выраженно снижалось количество $\text{IgM}^+\text{CXCR5}^+$ В-лимфобластов и составило $23,98 \pm 8,71\%$ (рис.26, б).

Таким образом, В-лимфоциты, культивируемые с CD4^+ Т-лимфоцитами, постепенно снижают экспрессию IgM, что свидетельствует о запуске процесса переключения изотипов иммуноглобулинов. Данные наблюдения позволяют сделать вывод о том, что сокультивирование В-лимфоцитов с CD4^+ Т-лимфоцитами способствует созреванию В-лимфоцитов и формированию

фенотипа фолликулярных В-клеток, способных к переключению изотипов иммуноглобулинов.

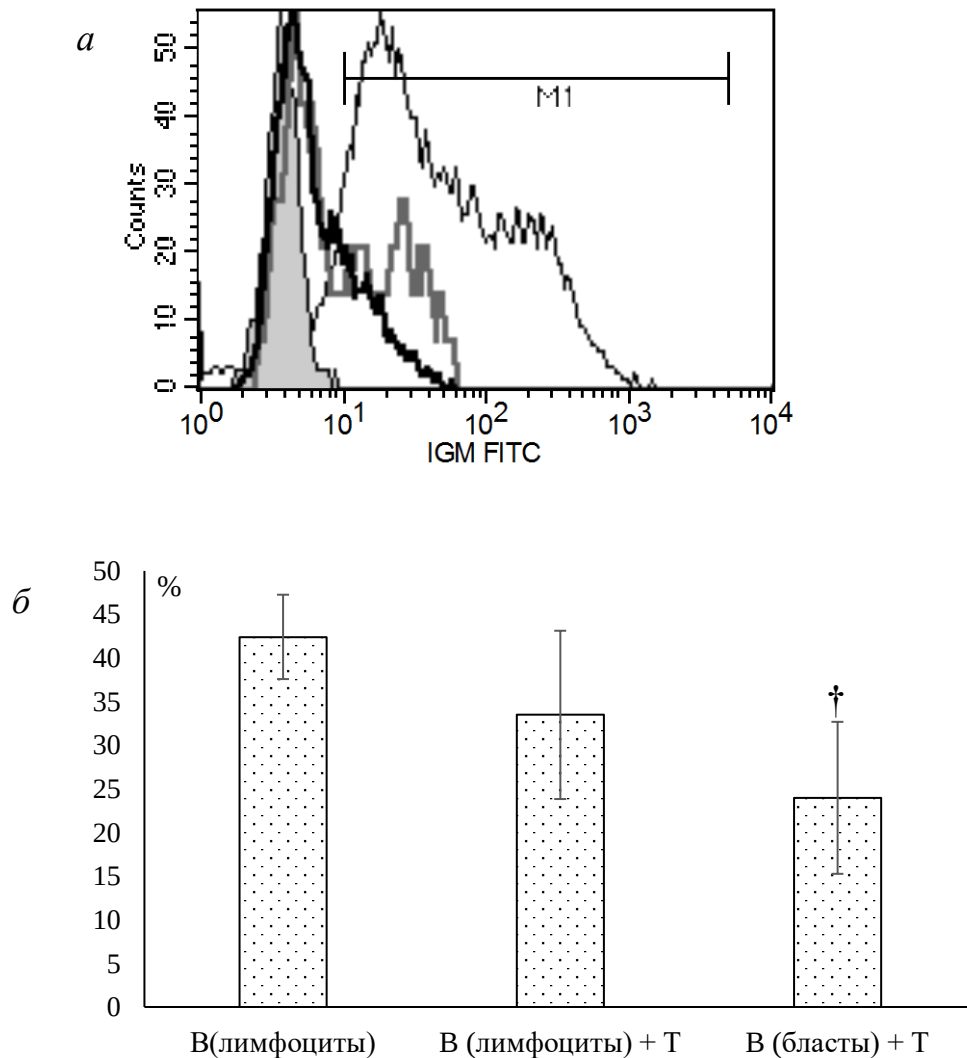


Рис. 26. Экспрессия IgM на свежевыделенных В-лимфоцитах (тонкая черная линия), на В-лимфоцитах, из культур с Т-клетками (серая толстая линия), на В-лимфобластах (черная толстая линия). Гистограмма с закрашенным серым полем – изотипический контроль (*a*). *б* – средние значения содержания IgM⁺CXCR5⁺ В-лимфоцитов и В-лимфобластов контрольных (В) и смешанных (В+Т) культур. † – достоверные отличия от смешанных культур В-лимфоцитов и Т-клеток ($p=0,04$).

3.4. Исследование фенотипа Т-хелперов при заболеваниях, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией

Обследовалась группа пациентов с язвенной болезнью в сочетании с хроническим гастродуоденитом (далее – группа с язвенной болезнью), группа с хроническим гастродуоденитом без язвенной болезни (далее – группа с гастродуоденитом), группа здоровых доноров. Показано, что в крови пациентов с манифестными формами *H. pylori*-инфекции содержание $CD4^+$ лимфоцитов практически не изменяется (рис. 27а). Существенные отличия пациентов с язвенной болезнью были обнаружены при анализе экспрессии молекулы ICOS на Т-хелперах. При язвенной болезни наблюдался значительный рост содержания $CD4^+CD45RO^+ICOS^+$ Т-клеток (рис. 27б), тогда как при гастродуодените без язвенной болезни никакого увеличения количества $ICOS^+$ Т-хелперов не обнаружено.

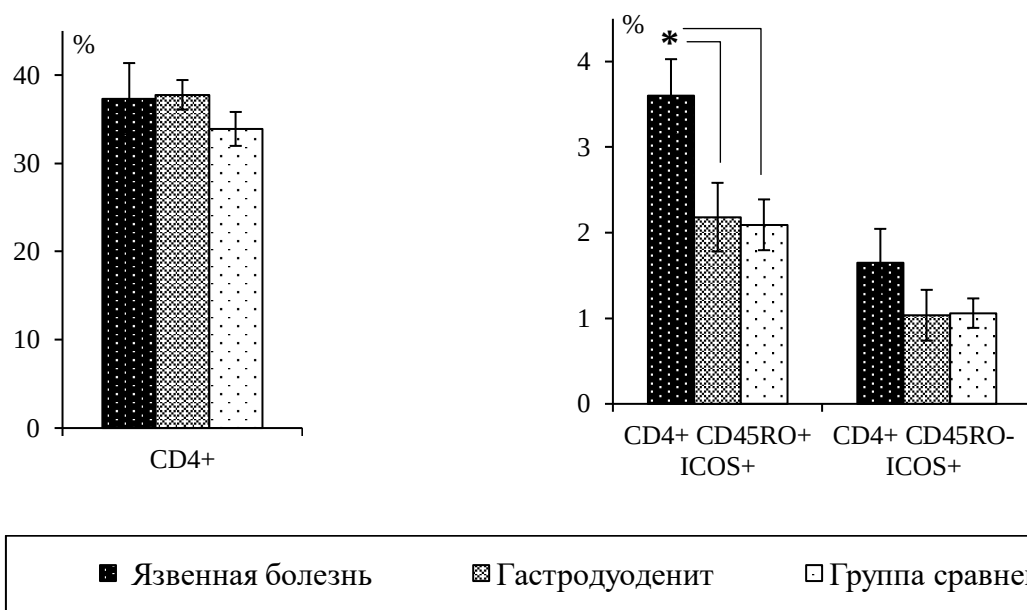


Рис. 27. Содержание $CD4^+$ лимфоцитов (а), а также $CD4^+CD45RO^+ICOS^+$ и $CD4^+CD45RO^-ICOS^+$ лимфоцитов (б) в крови больных с язвенной болезнью, с хроническим гастродуоденитом без язвенной болезни и у лиц группы сравнения (% от всех лимфоцитов крови). * – достоверные отличия при $p < 0,05$ по критерию Ньюмена-Кейлса.

Таким образом, при язвенной болезни значительно возрастает количество недавно активированных ICOS⁺ зрелых Т-хелперов, что свидетельствует об интенсификации вовлечения Т-хелперов в иммунный ответ при данном заболевании.

Анализ экспрессии хемокиновых рецепторов показал рост содержания зрелых Т-хелперов, несущих рецептор CCR6, который участвует в миграции клеток в желудочно-кишечный тракт (рис. 28a). Рост количества CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺ лимфоцитов при язвенной болезни происходит, в основном, за счет наиболее зрелых клеток с фенотипом CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁻ эффекторов/эффекторных Т-клеток памяти (рис. 29). Следует отметить связь экспрессии CCR6 с субпопуляцией Th17. Несмотря на то, что CCR6 не является специфическим маркером Th17 (количество экспрессирующих его клеток значительно больше количества зрелых Th17), экспрессия гена CCR6 находится под контролем мастер-регуляторов созревания Th17 – ядерных факторов ROR γ t и PLZF [281]. Таким образом, рост экспрессии CCR6 может отражать активизацию программы созревания Th17 при язвенной болезни, ассоциированной с *H. pylori*-инфекцией.

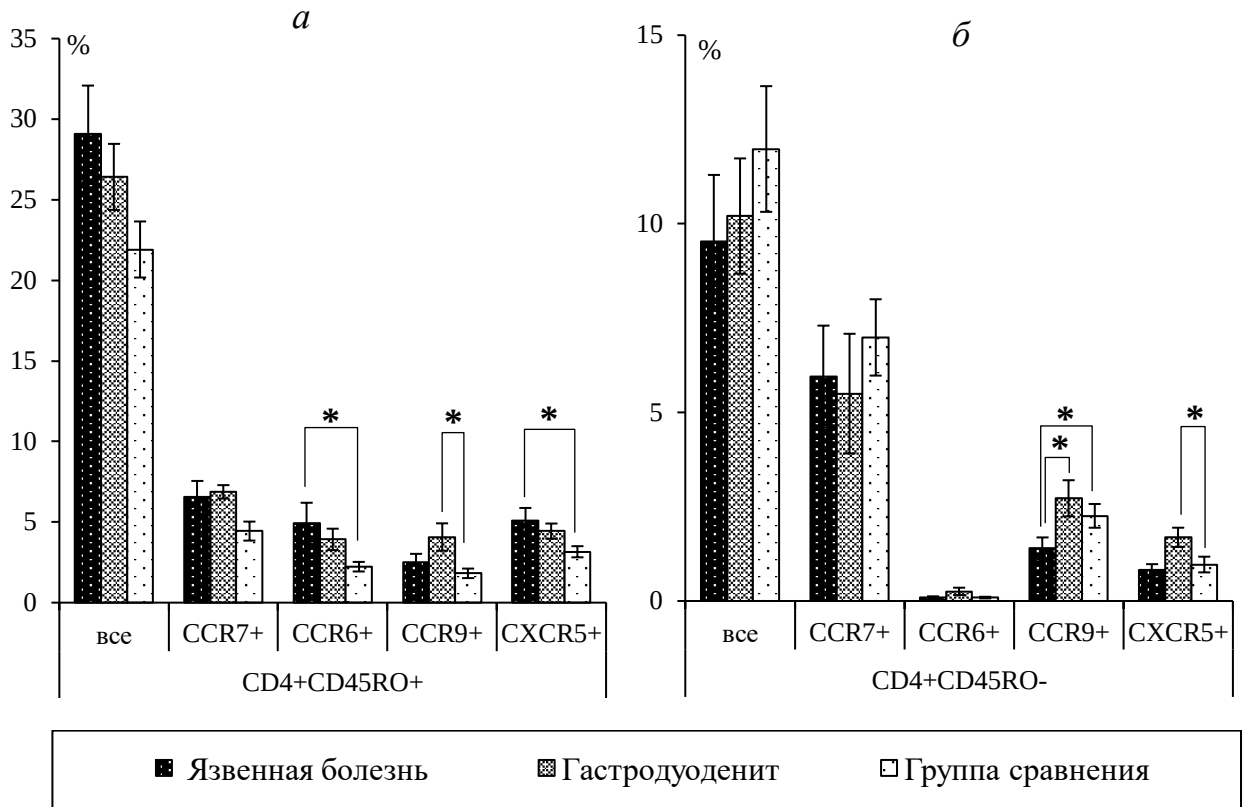


Рис. 28. Содержание зрелых CD4⁺CD45RO⁺ Т-клеток (а) и незрелых CD4⁺CD45RO⁻ Т-клеток (б), экспрессирующих хемокиновые рецепторы CCR7, CCR6, CCR9 и CXCR5 в крови больных с язвенной болезнью, с хроническим гастродуоденитом и у лиц группы сравнения (% от всех лимфоцитов крови). * – достоверные отличия при $p < 0,05$ по критерию Ньюмена-Кейлса.

Также у пациентов с язвенной болезнью наблюдается достоверное увеличение содержания CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺ клеток (рис. 28а). Анализ распределения молекул CCR7 и CXCR5 показывает, что увеличение экспрессии CXCR5 при язвенной болезни происходит за счёт наиболее зрелой группы клеток с фенотипом Тфх – CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺CCR7⁻ (рис. 30а). Анализ распределения рецепторов CCR6 и CXCR5 свидетельствует, что большинство CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺ клеток и CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺ клеток представляют две различные группы Т-хелперов (рис. 30б). В норме два этих рецептора практически не экспрессируются на одних и тех же клетках, но при язвенной болезни в крови появляется малая группа клеток, экспрессирующих эти

рецепторы одновременно. Несмотря на свою малочисленность эти $CD4^+CD45RO^+CCR6^+CXCR5^+$ клетки надежно определяются с помощью цитометрии (рис. 31). Функция этих клеток неизвестна, но, учитывая набор хемокиновых рецепторов, можно предположить, что они способны мигрировать в В-клеточные зоны лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой кишечника. Учитывая отмеченную в литературном обзоре потенциальную возможность провоспалительного действия Тфх при данной инфекции, миграция Тфх в пораженный желудочно-кишечный тракт может вносить свой вклад в развитие деструктивных воспалительных процессов при язвенной болезни.

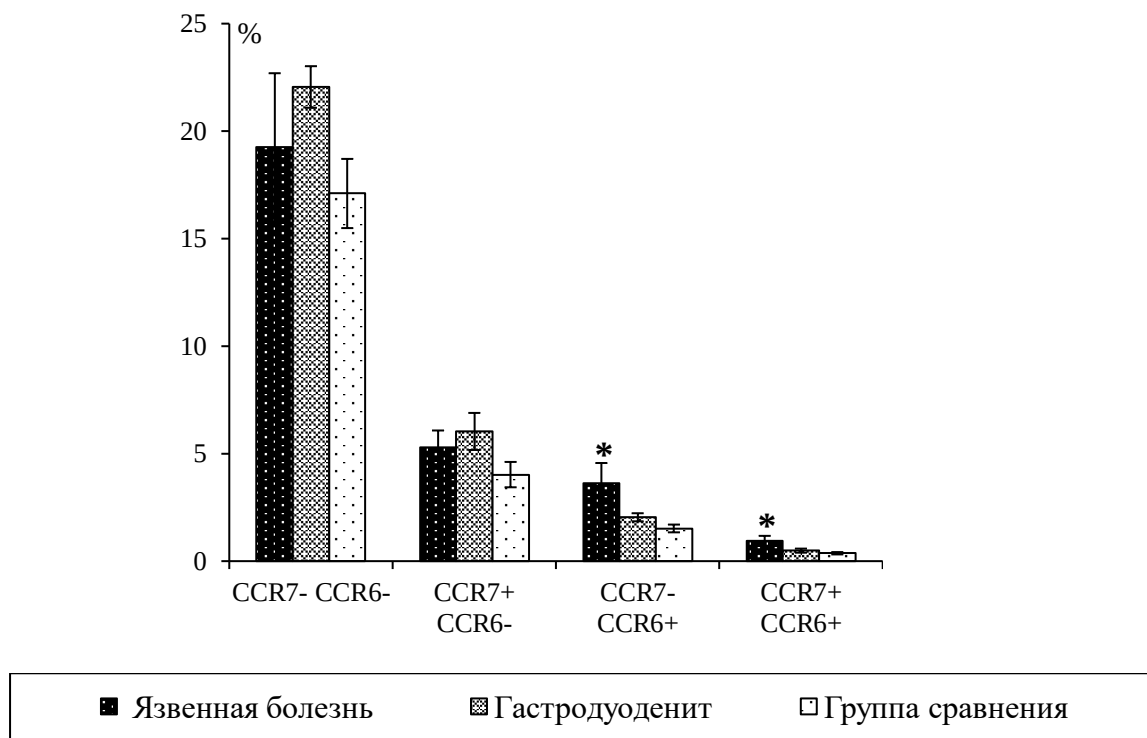


Рис. 29. Содержание зрелых $CD4^+CD45RO^+$ лимфоцитов с набором мембранных молекул CCR7 и CCR6 (% от всех лимфоцитов крови) при исследуемых заболеваниях. Набор анализируемых молекул приведен под гистограммами. * – достоверные отличия от группы сравнения при $p < 0,05$ по критерию Ньюмена-Кейлса.

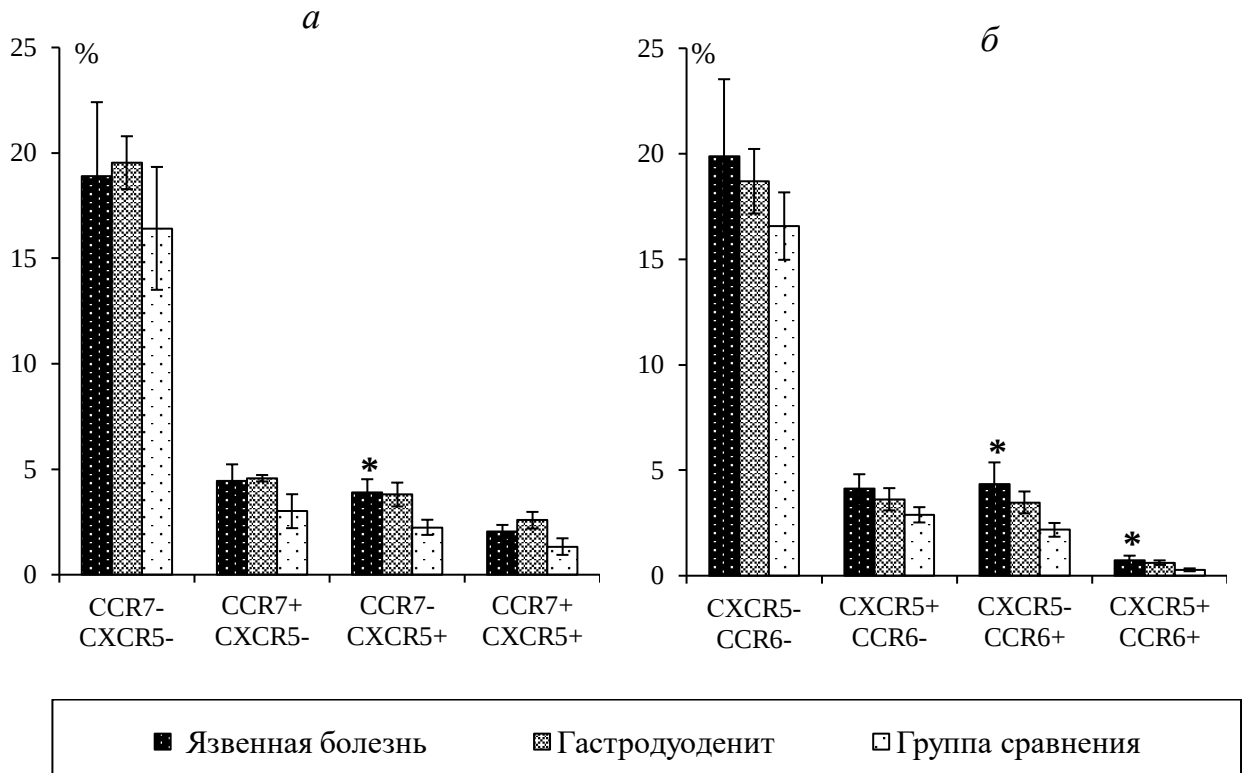


Рис. 30. Содержание зрелых $CD4^+CD45RO^+$ лимфоцитов с различными наборами мембранных молекул (% от всех лимфоцитов крови) при исследуемых заболеваниях. Набор анализируемых молекул приведен под гистограммами. * — достоверные отличия от группы сравнения при $p < 0,05$ по критерию Ньюмена-Кейлса.

При гастродуодените достоверный рост содержания $CXCR5^+$ клеток наблюдается в незрелой субпопуляции $CD45RO^-$ Т-хелперов (рис. 28б). В субпопуляции зрелых $CD45RO^+$ Т-хелперов детектируется существенный рост содержания зрелых клеток, несущих молекулу хоминга в тонкий кишечник CCR9, тогда как рост количества $CXCR5^+$ клеток невелик и при множественном сравнении статистически недостоверен (рис. 28а). Функциональный статус $CD4^+CD45RO^-CXCR5^+$ лимфоцитов при гастродуодените неизвестен, но в норме клетки с таким фенотипом, как это было описано в п. 3.1.2, практически не отличаются от типичных наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов. По нашему предположению, эти клетки имеют возможность к миграции из кровотока в В-клеточные зоны и перифолликулярное пространство лимфоидных органов, где

могут дифференцироваться в Тфх в ходе прямых взаимодействий с В-лимфоцитами.

Таким образом, фенотипические изменения Т-лимфоцитов периферической крови при гастродуодените могут свидетельствовать лишь об увеличении потенциальной возможности созревания Тфх, тогда как при язвенной болезни мы наблюдаем результат реализации этой возможности – рост количества зрелых Тфх в кровеносном русле.

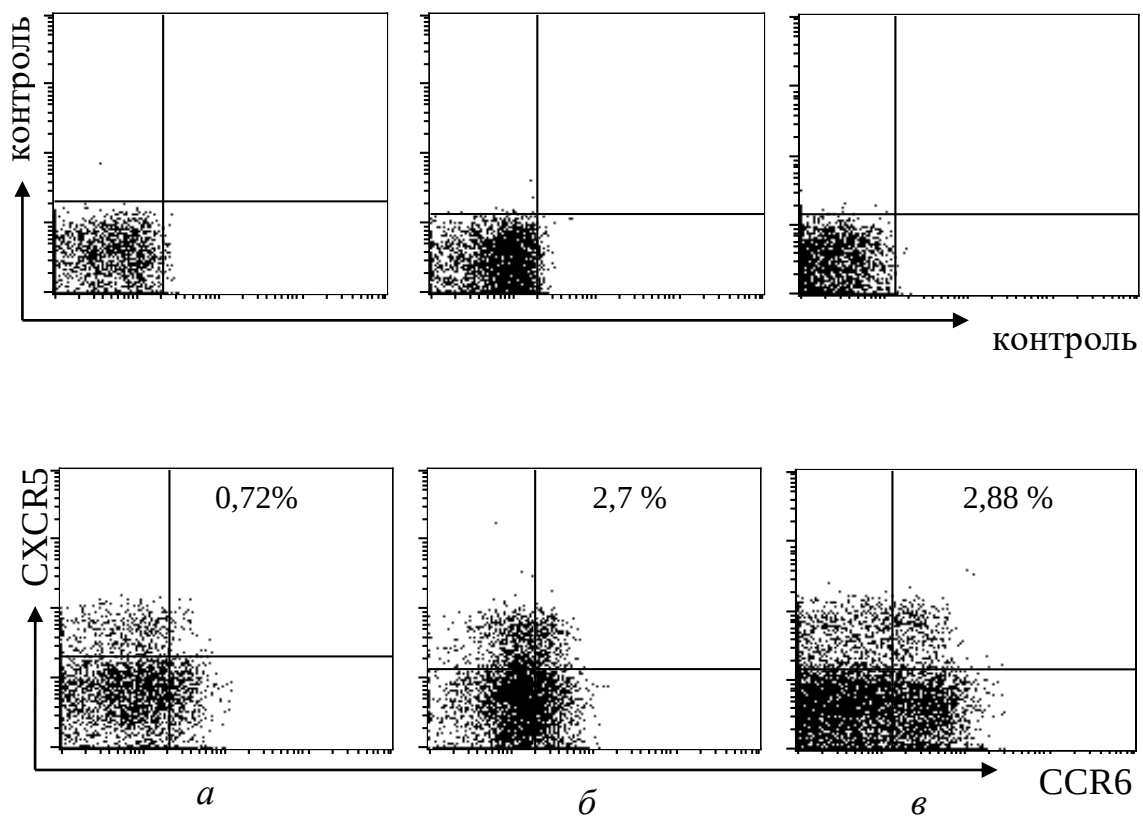


Рис. 31. Экспрессия хемокиновых рецепторов CCR6 и CXCR5 на CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитах у здорового донора (*a*), больного хроническим гастродуоденитом без язвенной болезни (*б*) и больного с язвенной болезнью желудка (*в*). Верхний ряд графиков – негативные контроли окрашивания. В верхнем правом квадранте обозначена доля CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺CXCR5⁺ клеток от всех CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитов.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно описанной в литературе модели дифференцировки Тфх, их созревание является сложным многоступенчатым процессом, в начале которого наивный CD4⁺ Т-лимфоцит должен вступить во взаимодействие с ДК в Т-клеточной зоне лимфатического узла. Распознавание антигена клоноспецифичным CD4⁺ Т-лимфоцитом инициирует его активацию. Вероятно, активация Т-лимфоцитов при участии ДК не всегда приводит к формированию групп клеток с определенной направленностью, по крайней мере, не приводит к образованию клеток с полными или частичными характеристиками Тфх. Дальнейшая дифференцировка Тх будет зависеть от конкретной цитокиновой атмосферы и уникального микроокружения в каждый определенный момент времени. Как мы показали, Т-лимфобласты, созревающие со зрелыми активированными ДК, обладали экспрессией генов самых разных субпопуляций Т-хелперов – *TBX21*, *GATA3*, *RORc* и *Bcl-6*. Данное наблюдение свидетельствует о том, что выбор субпопуляционной направленности Тх на первых этапах взаимодействия с ДК ещё не определён. Кроме того, индуцированная дендритными клетками экспрессия гена *Bcl-6* в Т-хелперах, не приводила к росту содержания белка Bcl-6, свидетельствуя о том, что программа созревания Тфх в этих клетках еще не запущена. Большая часть Т-лимфобластов, созревающих с ДК, приобретали фенотип CCR7⁺CXCR5⁻. Вероятно, эти клетки являлись аналогами эффекторов или эффекторных Т-клеток памяти, отличными от Тфх. В условиях *in vivo* данные клетки могли бы покинуть лимфатический узел и отправиться в рециркуляцию по организму в очаги воспаления. Однако было показано, что часть Тх, созревающих в смешанных культурах с двумя типами ДК, характеризовалась одновременной экспрессией хемокиновых рецепторов CXCR5 и CCR7. Вероятно, данные клетки являлись аналогами субпопуляций пре-Тфх или циркулирующих Тфх. Кроме того, CCR7⁺CXCR5⁺ Т-лимфобласты смешанных культур со зрелыми ДК обладали повышенной экспрессией костимулирующей молекулы ICOS и достаточно высокими уровнями экспрессии PD-1 и OX-40. Эта,

возможно транзиторная, экспрессия хемокинового рецептора CXCR5 на активированных Тх может позволить мигрировать данным клеткам в В-клеточную зону лимфатического узла, где Тх, оказавшись в окружении В-лимфоцитов, пройдут этапы дифференцировки в Тфх. Такая модель созревания Тфх вполне соответствует описанной в литературе многостадийной схеме созревания Тфх.

Однако вышеизложенные результаты исследований позволили сформулировать ещё одну гипотезу альтернативного пути дифференцировки Тфх. Мы показали, что созревание Тфх может инициировать прямое взаимодействие нТх с В-лимфоцитами, без предварительного контакта с ДК. Известно, что В-лимфоциты могут связывать антигены в межфолликулярном пространстве или «короне» фолликула, куда антигены доставляются в свободной форме с афферентной лимфой. Такие антигены могут поглощаться В-лимфоцитами для дальнейшей презентации. Таким образом, в этой зоне В-лимфоциты могут выполнять роль основных антигенпрезентирующих клеток при условии встречи нТх и В-лимфоцита. Как показано в данной работе, кровь человека содержит малую субпопуляцию наивных $CD4^+CD45RA^+CD45RO^-$ Т-лимфоцитов, одновременно экспрессирующих такие хемокиновые рецепторы, как CCR7, CXCR4 и CXCR5. По нашему предположению, данный набор рецепторов делает возможным миграцию этих наивных Т-лимфоцитов как в Т-клеточные, так и в В-клеточные зоны лимфоидных органов, где они могут вступать во взаимодействия с CXCR5⁺ дендритными клетками и В-лимфоцитами, что необходимо для полноценного созревания Т-фолликулярных хелперов. Таким образом, местом встречи *in vivo* нТх и В-лимфоцитов вполне может являться область В-клеточных фолликулов. Для исследования созревания Т-фолликулярных хелперов в условиях *in vitro* создавались смешанные культуры В- и Т-лимфоцитов в соотношении В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов 5:1, что воспроизводило преобладание В-клеток в фолликулах и межфолликулярном пространстве. Было показано, что совместное культивирование $CD4^+$ наивных Т-хелперов и В-лимфоцитов приводило к

созреванию Т-лимфобластов, фенотипически соответствующих Тфх. Данные клетки не экспрессировали CCR7, однако, отличались присутствием на мембране хемокинового рецептора CXCR5. Они обладали чрезвычайно высокими уровнями экспрессии молекул ICOS и PD-1, и достаточно высокими уровнями экспрессии CD40L и OX40. Смешанные культуры Т- и В-лимфоцитов также содержали группу CCR7⁺CXCR5⁻ Т-лимфобластов с низкими уровнями экспрессии маркеров зрелых Тх и группу CCR7⁻CXCR5⁻ Т-лимфобластов со средними уровнями экспрессии данных молекул. Возможно, данные группы клеток отражали этапы созревания Т-фолликулярных хелперов в культуре, но не являлись самостоятельными субпопуляциями. Кроме того, Т-лимфобласты, созревшие в смешанных культурах с В-лимфоцитами экспрессировали ядерный фактор транскрипции, свойственный субпопуляции Тфх – белок Bcl-6, при этом, большая часть клеток одновременно экспрессировала хемокиновый рецептор CXCR5. Таким образом, наивные Т-лимфоциты при сокультивировании с В-клетками созревали преимущественно в клетки с фенотипом фолликулярных Т-хелперов. Было замечено, что экспрессия Bcl-6 возрастала не только в Т-лимфобластах смешанных культур с В-клетками, но и в самих CXCR5⁺ В-лимфоцитах. Кроме того, в смешанных культурах В-клеток с Т-лимфоцитами снижалось количество IgM⁺CXCR5⁺ В-лимфоцитов. Это свидетельствует о функциональной активности созревающих Тфх и о проявлении взаимной стимуляции Т- и В-клеток, результатом чего являлось созревание Тфх, а также формирование фенотипа фолликулярных В-клеток. Таким образом, на основании результатов проведенных исследований можно сделать вывод, согласно которому весь процесс созревания Тфх для части наивных Т-хелперов может быть локализован в В-клеточной зоне вторичных лимфоидных органов. Кроме того, для созревания Тфх первоначальный контакт нТх и ДК не всегда является обязательным, в то время как контакт нТх с В-лимфоцитами является критически необходимым для дифференцировки Тфх. Стоит отметить, что соответствующая гипотетическая модель созревания Т-фолликулярных хелперов не отменяет собой основную гипотезу созревания Тфх, а лишь дополняет её. Можно предположить, что в

условиях *in vivo* созревание Тфх осуществляется несколькими способами и обе предложенные схемы созревания отражают возможности дифференцировки Тфх в организме. Вероятно, в условиях отсутствия ДК роль основных АПК могут выполнять В-лимфоциты, причём субпопуляционная направленность Тх будет определяться более специфично: большая часть Тх, получивших сигнал от В-клеток, дифференцируется в Тфх. Такое развитие событий может повлечь за собой чрезмерную активацию В-лимфоцитов и увеличение ими продукции аутоантител, что чревато развитием аутоиммунных заболеваний с гуморальным механизмом иммунного ответа. Кроме того, избыточная активация Тфх при отдельных заболеваниях может приводить к усилению воспаления, индуцированного клеточными иммунными реакциями. Так, в мышинных моделях *H. pylori*-инфекции продукция провоспалительных цитокинов IL-17A и интерферона- γ зависит от продукции IL-21, и ассоциирована с увеличением концентрации Тфх в брыжеечных лимфатических узлах. При исследовании пациентов с язвенной болезнью, вызванной *H. pylori*-инфекцией, мы обнаружили не только рост количества недавно активированных зрелых Т-хелперов в крови, но и увеличение содержания группы клеток с фенотипом зрелых Т-фолликулярных хелперов. Часть CXCR5⁺ Тфх при язвенной болезни экспрессировала хемокиновый рецептор CCR6, отвечающий за миграцию в воспаленную слизистую кишечника и ассоциированные с ней лимфоидные органы. Мы предполагаем, что эти клетки способны направленно мигрировать в В-клеточные зоны лимфоидных тканей кишечника, что повышает эффективность их участия в развитии воспаления при язвенной болезни. Важно отметить, что при гастродуодените, который характеризуется меньшими деструктивно-воспалительными изменениями слизистой, мы не наблюдали достоверного увеличения содержания зрелых Т-фолликулярных хелперов. Таким образом, выраженные деструктивно-воспалительные изменения слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки при *H. pylori*-инфекции ассоциированы с интенсификацией вовлечения Т-хелперов в иммунный ответ и усилением созревания Тфх.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было показано, что часть наивных Т-хелперов периферической крови человека экспрессирует хемокиновый рецептор CXCR5, необходимый для миграции в В-клеточные зоны вторичных лимфоидных органов. По нашему мнению, в условиях организма, наивные CXCR5⁺ Т-хелперы имеют потенциальную возможность прямой миграции в В-клеточные зоны вторичных лимфоидных органов, где в окружении В-лимфоцитов, пройдут процесс дифференцировки в Т-фолликулярные хелперы. Разработанные нами модели совместного культивирования иммунокомпетентных клеток в условиях *in vitro* позволили изучить возможность созревания наивных Т-хелперов в Т-фолликулярные хелперы при взаимодействии с В-лимфоцитами, а также при взаимодействии с дендритными клетками. Лимфобласты, созревающие в смешанных культурах с В-лимфоцитами, приобретали фенотип, свойственный Т-фолликулярным хелперам и характеризовались экспрессией хемокинового рецептора CXCR5, высокой экспрессией молекул ICOS, PD-1, CD40L, OX40, а также экспрессией ядерного фактора транскрипции Bcl-6. Эти результаты свидетельствуют о том, что процесс дифференцировки Т-фолликулярных хелперов может быть индуцирован при непосредственном прямом взаимодействии с В-лимфоцитами, без участия в данном процессе дендритных клеток. Кроме того, было показано, что созревающие Т-фолликулярные хелперы обладали функциональной активностью, которая проявлялась в изменении фенотипических характеристик В-лимфоцитов смешанных культур. В-лимфоциты смешанных культур экспрессировали ядерный фактор транскрипции Bcl-6, управляющий созреванием В-клеток герминативных центров, и снижали экспрессию IgM.

В смешанных культурах Т-хелперов и двух типов дендритных клеток происходило преимущественное созревание Т-лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁺CXCR5⁺, характерным для Т-клеток эффекторов и

эффекторных Т-клеток памяти. Практически не происходило созревания Т-лимфоцитов с фенотипом Т-фолликулярных хелперов.

Несмотря на то, что основной функцией Тфх является стимуляция гуморальных иммунных реакций, при отдельных заболеваниях эти клетки могут принимать участие в клеточных иммунных реакциях и развитии воспаления. Показано, что при язвенной болезни желудка, ассоциированной с *H. pylori*-инфекцией, происходит увеличение содержания недавно активированных зрелых Т-хелперов, в том числе клеток с фенотипом Т-фолликулярных хелперов, а также CXCR5⁺CCR6⁺ Т-хелперов. Вероятно, данные клетки способны мигрировать в В-клеточные зоны, ассоциированные с лимфоидной тканью кишечника, где могут вносить свой вклад в развитие воспаления при данных заболеваниях. Также мы показали, что при гастродуодените, ассоциированном с *H. pylori*-инфекцией, происходит увеличение группы незрелых CXCR5⁺ Т-хелперов, которые при условии миграции в В-клеточные зоны вторичных органов, могут созревать в Т-фолликулярные хелперы.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны модели совместного культивирования антигенпрезентирующих клеток и Т-лимфоцитов в условиях *in vitro*.
2. Наивные CD4⁺ Т-лимфоциты периферической крови человека содержат малую группу клеток, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CCR7, CXCR4 и CXCR5, обеспечивающие миграцию как в Т-, так и в В-клеточные зоны вторичных лимфоидных органов.
3. Наивные CD4⁺ Т-лимфоциты *in vitro* под действием В-лимфоцитов дифференцируются преимущественно в клетки с фенотипом Т-фолликулярных хелперов и повышенной экспрессией Bcl-6.
4. Под действием дендритных клеток наивные CD4⁺ Т-лимфоциты созревают преимущественно в Т-хелперы с фенотипом CD45RO⁺CCR7⁻CXCR5⁻.
5. В-лимфоциты, созревающие в смешанных культурах с Т-лимфоцитами, повышают экспрессию Bcl-6 и снижают экспрессию IgM, что свидетельствует о взаимной стимуляции Т- и В-лимфоцитов.
6. При язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией, выявлено увеличение содержания активированных зрелых Т-хелперов, а также зрелых Т-фолликулярных хелперов и зрелых CCR6⁺ Т-хелперов.
7. При гастродуодените, ассоциированном с *H. Pylori*-инфекцией, происходит увеличение группы незрелых CXCR5⁺ Т-хелперов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Данные об изменении содержания патогенетически значимых субпопуляций Т-хелперов при язвенной болезни и гастродуодените, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией, могут быть в дальнейшем использованы для улучшения диагностики этих заболеваний.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Разработанные экспериментальные модели совместного культивирования иммунокомпетентных клеток *in vitro* могут использоваться в исследовательских целях для изучения процессов межклеточных взаимодействий при реализации гуморального иммунного ответа, как в норме, так и при различных заболеваниях инфекционной или аутоиммунной природы. Это позволит изучить молекулярные механизмы, лежащие в основе развития данных заболеваний, что в дальнейшем может быть использовано в иммунофармакологии для разработки новых методов лечения с использованием таргетной терапии, способствующей подавлению аутоиммунных реакций или направленной на усиление недостаточного гуморального иммунного ответа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Камышный А.М., Гриневич И.В., Деген А.С., Топол И.А., Буга Т.М.. TFH – новая линия дифференцировки Т-хелперов: происхождение, фенотип, эффекторные функции, роль в развитии аутоиммунной патологии // Патология. – 2011. – Т.8. – №3. – С. 4–11.
2. Талаев В.Ю., Плеханова М.В., Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н. Действие вакцин на экспрессию хемокиновых рецепторов дендритными клетками новорожденных и взрослых *in vitro* // Иммунология. – 2013. – Т. 34. – № 6. – С. 318–323.
3. Топтыгина А.П. Лимфоидный фолликул – территория иммунного ответа // Иммунология. – 2012. – Т. 33 (3). – С. 162-9.
4. Ярилин А. А. Иммунология. М.: ГЭОТАР Медицина, 2010.
5. Abe K., Takahashi A., Imaizumi H., Hayashi M., Okai K., Kanno Y., Watanabe H., Ohira H. Interleukin-21 plays a critical role in the pathogenesis and severity of type I autoimmune hepatitis // Springerplus. – 2016. – V.5 (1). – P. 777.
6. Akiba H., Takeda K., Kojima Y. et al. The role of ICOS in the CXCR5+ follicular B helper T cell maintenance *in vivo* // The Journal of Immunology. – 2005. – V. 175 (4). – P. 2340–2348.
7. Akiba, H., H. Oshima, K. Takeda, M. Atsuta, H. Nakano, A. Nakajima, C. Nohara, H. Yagita, K. Okumura. CD28-independent costimulation of T cells by OX40 ligand and CD70 on activated B cells // J. Immunol. – 1999. – V.162 (12). – P. 7058–7066.
8. Andersson A.K., Feldmann M., Brennan F.M. Neutralizing IL-21 and IL-15 inhibits pro-inflammatory cytokine production in rheumatoid arthritis // Scand. J. Immunol. – 2008. – V68 (1). – P. 103–111.
9. Andersson E., Ohlin M., Borrebaeck C. A., Carlsson R. CD4+CD57+ T cells derived from peripheral blood do not support immunoglobulin production by B cells // Cell. Immunol. – 1995. – V. 163 (2). – P. 245–253.
10. Angkasekwinai P., Chang S.H., Thapa M., Watarai H., Dong C. Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling // Nature immunology. – 2010. – V. 11 (3). – P. 250-6.
11. Annunziato F., Cosmi L., Santarlasci V., Maggi L., Liotta F., Mazzinghi B., et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells // J. Exp. Med. – 2007. – V. 204 (8). – P. 1849-61.
12. Ansel K. M., McHeyzer-Williams L. J., NgoV. N., McHeyzer-Williams M. G., Cyster J. G. *In vivo* activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines // J. Exp. Med. – 1999. – V. 190 (8). – P. 1123–1134.

13. Ansel K. M., Ngo V. N., Hyman P. L. et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles // *Nature*. – 2000. – V. 406 (6793). – P. 309–314.
14. Arpin C., J. Déchanet J., Van Kooten C., Merville P., Grouard G., Brière F., Banchereau J., Liu Y. J. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro // *Science*. – 1995. – V. 268 (5211). – P. 720–722.
15. Asao H., Okuyama C., Kumaki S., Ishii N., Tsuchiya S., Foster D., Sugamura K. Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex // *J. Immunol.* – 2001. – V. 167 (1). – P. 1–5.
16. Asseman C., Mauze S., Leach M.W., Coffman R.L., Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation // *J. Exp. Med.* – 1999. – V. 190 (7). – P. 995–1004.
17. Asseman C., Read S., Powrie F. Colitogenic Th1 cells are present in the antigen-experienced T cell pool in normal mice: control by CD4⁺ regulatory T cells and IL-10 // *J. Immunol.* – 2003. – V. 171 (2). – P. 971–978.
18. Austin J.W., Lu P., Majumder P., Ahmed R., Boss J.M. STAT3, STAT4, NFATc1, and CTCF regulate PD-1 through multiple novel regulatory regions in murine T cells // *J. Immunol.* – 2014. – V. 192 (10). – P. 4876–86.
19. Avery D. T., Bryant V. L., Ma C. S. et al. IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naïve B cells is differentially regulated by IL-4 // *J. Immunol.* – 2008. – V. 181 (3). – P. 1767–1779.
20. Bach J. F. Regulatory T cells under scrutiny // *Nature Rev. Immunol.* – 2003. – V.3 (3) – P.189–98.
21. Baron B. W., Nucifora G., McCabe N., Espinosa R. 3rd, Le Beau M. M., McKeithan T. W. Identification of the gene associated with the recurring chromosomal translocations t(3;14)(q27;q32) and t(3;22)(q27;q11) in B-cell lymphomas // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1993. – V. 90 (11). – P. 5262–5266.
22. Batista F. D., Harwood N. E. The who, how and where of antigen presentation to B cells // *Nature Rev. Immunol.* – 2009. – V. 9 (1). – P. 15–27.
23. Batten M., Ramamoorthi N., Kljavin N.M., Ma C.S., Cox J.H., Dengler H.S., et al. IL-27 supports germinal center function by enhancing IL-21 production and the function of T follicular helper cells // *J. Exp. Med.* – 2010. – V. 207 (13). – P. 2895–906.
24. Baumjohann D., Kageyama R., Clingan J.M., Morar M.M., Patel S., de Kouchkovsky D., Bannard O., Bluestone J.A., Matloubian M., Ansel K.M., et al. The microRNA cluster miR-17(sim)92 promotes Tfh cell differentiation and represses subset-inappropriate gene expression // *Nat. Immunol.* – 2013. – V. 14 (8). – P. 840–848.

25. Baumjohann D., Okada T., Ansel K.M. Cutting Edge: distinct waves of BCL6 expression during T follicular helper cell development // *J. Immunol.* – 2011. – V. 187 (5). – P. 2089–2092.
26. Baumjohann, D., Preite S., Reboldi A., Ronchi F., Ansel K.M., Lanzavecchia A., Sallusto F. Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype // *Immunity.* – 2013. – V. 38 (3). – P. 596–605.
27. Bauquet A.T., Jin H., Paterson A.M., Mitsdoerffer M., Ho I.C., Sharpe A.H., et al. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells // *Nat. Immunol.* – 2009. – V. 10 (2). – P. 167–75.
28. Bennett F., Luxenberg D., Ling V., Wang I.M., Marquette K., Lowe D., et al. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses // *J. Immunol.* – 2003. – V. 170 (2). – P. 711–8.
29. Bergtold A., Desai D.D., Gavhane A., Clynes R. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells // *Immunity.* – 2005. – V. 23 (5). – P. 503–14.
30. Berney C., Herren S., Power C.A., Gordon S., Martinez-Pomares L., Kosco-Vilbois M.H. A member of the dendritic cell family that enters B cell follicles and stimulates primary antibody responses identified by a mannose receptor fusion protein // *J. Exp. Med.* – 1999. – V. 190 (6). – P. 851–860.
31. Boettler T., F. Moeckel, Y. Cheng, M. Heeg, S. Salek-Ardakani, S. Crotty, M. Croft, and M. G. von Herrath. OX40 facilitates control of a persistent virus infection // *PLoS Pathog.* – 2012. – V. 8 (9). – e1002913.
32. Bollig N., Brustle A., Kellner K., Ackermann W., Abass E., Raifer H., et al. Transcription factor IRF4 determines germinal center formation through follicular T-helper cell differentiation // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2012. – V. 109 (22). – P. 8664–9.
33. Boniface K, Guignouard E., Pedretti N., Garcia M., Delwail A., Bernard F.-X., Nau F., Guillet G., Dagregorio G., Yssel H., Lecron J.-C., Morel F. A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation // *Clin. Exp. Immunol.* – 2007. – V. 150 (3). – P. 407–415.
34. Bossaller L., Burger J., Draeger R. et al. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5⁺ CD4 germinal center Th cells // *J. Immunol.* – 2006. – V. 177 (7). – P. 4927–32.

35. Breitfeld D., Ohl L., Kremmer E. et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production // *J. Exp. Med.* – 2000. – V. 192. – P. 1545–1552.
36. Britschgi M.R., Link A., Lissandrin T.K., Luther S.A. Dynamic modulation of CCR7 expression and function on naive T lymphocytes in vivo // *J. Immunol.* – 2008. – V. 181 (11). – P. 7681–7688.
37. Bunting K.L., Melnick A.M. New effector functions and regulatory mechanisms of BCL-6 in normal and malignant lymphocytes // *Curr. Opin. Immunol.* – 2013. V. 25 (3). – P. 339–46.
38. Byun, M., C. S. Ma, A. Akc,ay, V. Pedergrana, U. Palendira, J. Myoung, D. T. Avery, Y. Liu, A. Abhyankar, L. Lorenzo, et al. Inherited human OX40 deficiency underlying classic Kaposi sarcoma of childhood // *J. Exp. Med.* – 2013. – V. 210 (9). – P. 1743–1759.
39. Campbell J.J., Murphy K.E., Kunkel E.J., Brightling C.E., Soler D., Shen Z., Boisvert J., Greenberg H.B., Vierra M.A., Goodman S.B., Genovese M.C., Wardlaw A.J., Butcher E.C., Wu L. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans // *J. Immunol.* – 2001. – V. 166 (2). – P. 877–884.
40. Cannons J. L., Qi H., Lu K. T. et al. Optimal germinal center responses require a multistage T cell: B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84 // *Immunity.* – 2010. – V. 32 (2). – P. 253–265
41. Cannons J.L., Yu L.J., Jankovic D., Crotty S., Horai R., Kirby M., et al. SAP regulates T cell-mediated help for humoral immunity by a mechanism distinct from cytokine regulation. // *J. Exp. Med.* – 2006. – V. 203 (6). – P. 1551–1565.
42. Carbo A., Olivares-Villagomez D., Hontecillas R., Bassaganya-Riera J., Chaturvedi R., Piazuelo M.B., Delgado A., Washington M.K., Wilson K.T., Algood H.M. Systems modeling of the role of interleukin-21 in the maintenance of effector CD4⁺ T cell responses during chronic *Helicobacter pylori* infection // *MBio.* – 2014. – V. 5. – e01243-14.
43. Caruso R., Fina D., Paoluzi O.A., Del Vecchio Blanco G., Stolfi C., Rizzo A., Caprioli F., Sarra M., Andrei F., Fantini M.C., MacDonald T.T., Pallone F., Monteleone G. IL-23-mediated regulation of IL-17 production in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa // *Eur. J. Immunol.* – 2008. – V. 38. – P. 470-478.
44. Casali P., Zan H. Class switching and Myc translocation: how does DNA break? // *Nat. Immunol.* – 2004. – V. 5 (11). – P. 1101–3.
45. Cattoretti G., Chang C.C., Cechova K., Zhang J. et al. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells // *Blood.* – 1995. – V. 86 (1). – P. 45-53.
46. Chang H.C., Sehra S., Goswami R., Yao W., Yu Q., Stritesky G.L., Jabeen R., McKinley C., Ahyi A.N., Han L., Nguyen E.T., Robertson M.J., Perumal N.B., Tepper R.S., Nutt S.L., Kaplan M.H. The transcription factor PU.1 is required for

- the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation // *Nature immunology*. – 2010. – V. 11 (6). – P. 527-34.
47. Chattopadhyay P. K., Yu J., Roederer M. A live-cell assay to detect antigen-specific CD4⁺ T cell with diverse cytokine profiles // *Nature Med.* – 2005. – V. 11 (10). – P. 1113–1117.
 48. Chevalier N., Jarrossay D., Ho E., Avery D.T., Ma C.S., Yu D., Sallusto F., Tangye S.G., Mackay C.R. CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses // *J. Immunol.* – 2011. – V. 186 (10). – P. 5556-68.
 49. Choe J., Kim H. S., Armitage R. J., Choi Y. S. The functional role of B cell antigen receptor stimulation and IL-4 in the generation of human memory B cells from germinal center B cells. *J. Immunol.* – 1997. – V. 159 (8). – P. 3757–3766.
 50. Choe, J., Choi. Y. S. IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells // *Eur. J. Immunol.* – 1998. – V. 28 (2). – P. 508–515.
 51. Choi Y.S., Gullicksrud J.A., Xing S., Zeng Z., Shan Q., Li F., et al. LEF-1 and TCF-1 orchestrate T(FH) differentiation by regulating differentiation circuits upstream of the transcriptional repressor Bcl6 // *Nat Immunol.* – 2015. – V. 16 (9). – P. 980–90.
 52. Choi Y.S., Kageyama R., Eto D., Escobar T.C., Johnston R.J., Monticelli L., et al. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6 // *Immunity*. – 2011. – V. 34 (6). – P. 932–46.
 53. Chtanova T., Tangye S. G., Newton R. et al. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells // *J. Immunol.* – 2004. – V. 173 (1). – P. 68–78.
 54. Chu, C., Wang Y., Zhang X., Ni X. SAP-regulated T cell-APC adhesion and ligation-dependent and -independent Ly108-CD3 ζ interactions // *J. Immunol.* – 2014. – V. 193 (8) – P. 3860–3871.
 55. Chung Y., Yang X., Chang S.H., Ma L., Tian Q., Dong C. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4⁺ T lymphocytes // *Cell Res.* – 2006. – V. 16 (11) – P. 902–907.
 56. Ci W., Polo J., Melnick A. B-cell lymphoma 6 and the molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma // *Curr. Opin. Hematol.* – 2008. – V. 15 (4). – P. 381–390.
 57. Clouthier D.L., Zhou A.C., Wortzman M.E., Luft O., Levy G.A., Watts T.H. GITR intrinsically sustains early type 1 and late follicular helper CD4 T cell accumulation to control a chronic viral infection // *PLoS Pathog.* – 2015. – V. 11 (1). – e1004517.

58. Coffman R.L., Seymour B.W., Hudak S., Jackson J., Rennick D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice // *Science*. – 1989. – V. 245 (4915). – P. 308-310.
59. Coquet J. M., Kyparissoudis K., Pellicci D. G., et al. IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production // *J. Immunol.* – 2007. – V. 178 (5). – P. 2827–2834.
60. Cosmi L., De Palma R., Santarlasci V., Maggi L., Capone M., Frosali F., et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161⁺CD4⁺ T cell precursor // *J. Exp. Med.* – 2008. – V. 205 (8). – P. 1903-1916.
61. Croft, M. Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134) // *Annu. Rev. Immunol.* – 2010. – V. 28. – P. 57–78.
62. Croft, M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases // *Nat. Rev. Immunol.* – 2009. – V. 9 (4). – P. 271–285.
63. Croft, M., Benedict C. A., Ware C. F. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2013. – V. 12 (2) – P. 147–168.
64. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH) // *Annu. Rev. Immunol.* – 2011. – V. 29. – P. 621–63.
65. Crotty S., Johnston R.J., Schoenberger S.P. Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation // *Nat. Immunol.* – 2010. – V. 11(2). – P. 114-20.
66. Crotty S., Kersh E.N., Cannons J., Schwartzberg P.L., Ahmed R. SAP is required for generating long-term humoral immunity // *Nature*. – 2003. – V. 421 (6920). – P. 282–7.
67. Cunningham A. F., Serre K., Mohr E., Khan M., Toellner K. M. Loss of CD154 impairs the Th2 extrafollicular plasma cell response but not early T cell proliferation and interleukin-4 induction // *Immunology* . – 2004. – V. 113 (2). – P. 187–193.
68. Damsker J.M., Hansen A.M., Caspi R.R. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2010. – V. 1183. – P. 211-21.
69. Dantas A.T., Marques C.D., da Rocha Junior L.F., Cavalcanti M.B., Gonçalves S.M., et al. Increased serum interleukin-9 levels in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: pathogenic role or just an epiphenomenon // *Disease markers*. – 2015. – V. 2015. – P. 519638.
70. Darrah P.A., Patel D.T., De Luca P.M., et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccinemediated protection against *Leishmania major* // *Nat. Med.* – 2007. – V. 13 (7). – P. 843-850.
71. Deenick E.K., Chan A., Ma C.S., Gatto D., Schwartzberg P.L., Brink R., Tangye SG. Follicular helper T cell differentiation requires continuous antigen

- presentation that is independent of unique B cell signaling // *Immunity*. - 2010. – V. 33(2). – P. 241–53.
72. Deenick E. K., Ma C. S. The regulation and role of T follicular helper cells in immunity // *Immunology*. – 2011.- V. – 134 (4). – P. 361–367.
 73. Del Rio M., Buhler L., Gibbons C., Tian J., Rodriguez-Barbosa J. PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2, and other co-inhibitory signaling pathways in transplantation // *Transplant International*. – 2008. – V. 21 (11). – P. 1015-28.
 74. Depoil, D., Zaru R., Guiraud M., Chauveau A., et al. Immunological synapses are versatile structures enabling selective T cell polarization // *Immunity*. – 2005. – V. 22 (2). – P. 185–194.
 75. Dhillon A.S., Hagan S., Rath O., Kolch W. MAP kinase signaling pathways in cancer // *Oncogene*. – 2007. – V. 26 (22). – P. 3279–3290.
 76. Di Noia J. M., Neuberger M. S. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation // *Annu. Rev. Biochem.* – 2007. – V. 76. – P. 1–22.
 77. Duan S., Cermak L., Pagan J.K., Rossi M., Martinengo C., di Celle P.F., Chapuy B., Shipp M., Chiarle R., Pagano M. FBXO11 targets BCL6 for degradation and is inactivated in diffuse large B-cell lymphomas // *Nature*. – 2011. – V. 481 (7379). – P. 90–93.
 78. Duhon T., Geiger R., Jarrossay D., Lanzavecchi A., Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells // *Nat.Immunol.* - 2009. – V. 10 (8). – P. 857–863.
 79. Dumoutier L., Van Roost E., Colau D., Renauld J.C. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocytestimulating factor // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2000. – V. 97 (18). – P. 10144–10149.
 80. Durandy A. Activation-induced cytidine deaminase: a dual role in class-switch recombination and somatic hypermutation // *Eur. J. Immunol.* – 2003. – V. 33 (8). – P. 2069–73.
 81. Duy C., Hurtz C., Shojaee S., Cerchietti L., Geng H., Swaminathan S., et al. BCL-6 enables Ph⁺ acute lymphoblastic leukaemia cells to survive BCR-ABL1 kinase inhibition // *Nature*. – 2011. – V. 473 (7347). – P. 384–8.
 82. Eaton K.A., Ringler S.R., Danon S.J. Murine splenocytes induce severe gastritis and delayed-type hypersensitivity and suppress bacterial colonization in *Helicobacter pylori*-infected SCID mice // *Infect. Immun.* – 1999. – V. 67 (9). – P. 4594-4602.
 83. Ebert L. M., Horn M. P., Lang A. B., Moser B. B cells alter the phenotype and function of follicular-homing CXCR5⁺ T cells // *Eur. J. Immunol.* – 2004. – Vol. 34 (12). – P. 3562–3571.

84. Eddahri F., Denanglaire S., Bureau F., Spolski R., Leonard W.J., Leo O., et al. Interleukin-6/STAT3 signaling regulates the ability of naive T cells to acquire B-cell help capacities // *Blood*. – 2009. – V. 113 (11). – P. 2426–33.
85. Elgueta R., Benson M.J., de Vries V.C., Wasiuk A., Guo Y., Noelle R.J. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system // *Immunol. Rev.* – 2009. – V. 229 (1). – P. 152–72.
86. Endres R., Alimzhanov M.B., Plitz T., Fütterer A., et al. Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin beta receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin beta and tumor necrosis factor by B cells. *J. Exp. Med.* – 1999. – V. 189 (1). – P. 159–168.
87. Ettinger R., Kuchen S., Lipsky P. E. The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease // *Immunol. Rev.* – 2008. – V. 223. – P. 60–86.
88. Ettinger R., Sims G. P., Fairhurst A.-M., et al. IL-21 induces differentiation of human naïve and memory B cells into antibody-secreting plasma cells // *J. Immunol.* – 2005. – V. 175 (12). – P. 7867–7879.
89. Fantini M.C., Monteleone G., Macdonald T.T. IL-21 comes of age as a regulator of effector T cells in the gut. *Mucosal // Immunol.* – 2008. – V. 1 (2). – P. 110–115.
90. Fazilleau N., Eisenbraun M., Malherbe L. et al. Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells // *Nat. Immunol.* – 2007. – V. 8 (7). – P. 753–761.
91. Fazilleau N., Mark L., McHeyzer-Williams L.J., McHeyzer-Williams M.H. Follicular helper T cells: lineage and location // *Immunity*. – 2009. – V. 30 (3). – P. 324–35.
92. Fillatreau S., Gray D. T cell accumulation in B cell follicles is regulated by dendritic cells and is independent of B cell activation // *J. Exp. Med.* – 2003. – V. 197 (2). – P. 195–206.
93. Fiorentino D.F., Bond M.W., Mosmann T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones // *J. Exp. Med.* – 1989. – V. 170 (6). – P. 2081–2095.
94. Flynn S., Toellner K. M., Raykundalia C., Goodall M., Lane P. CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1 // *J. Exp. Med.* – 1998. – V. 188 (2). – P. 297–304.
95. Fontenot J., Rudensky A. A well-adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3 // *Nature Immunol.* – 2005. – V.6 (4). – P.331–7.
96. Förster R., Emrich T., Kremmer E., Lipp M. Expression of the G-protein-coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells // *Blood*. – 1994. – V. 84 (3). – P. 830–840.

97. Forster R., Mattis A. E., Kremmer E. et al. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen // *Cell*. – 1996. – V. 87 (6). – P. 1037–1047.
98. Foy T. M., Laman J. D., Ledbetter J. A. et al. gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory // *J. Exp. Med.* – 1994. – V. 180 (1). – P. 157–163.
99. Franko, J.L., and Levine, A.D. Antigen-independent adhesion and cell spreading by inducible costimulator engagement inhibits T cell migration in a PI-3K-dependent manner // *J. Leukoc. Biol.* – 2009. – V. 85 (3). – P. 526–538.
100. Fu Y.X., Huang G., Wang Y., Chaplin D.D. B lymphocytes induce the formation of follicular dendritic cell clusters in a lymphotoxin alpha-dependent fashion // *J. Exp. Med.* – 1998. – V. 187 (7). – P. 1009–1018.
101. Galon J., Sudarshan C., Ito S., Finbloom D., O'Shea J.J. IL-12 induces IFN regulating factor-1 (IRF-1) gene expression in human NK and T cells // *J. Immunol.* – 1999. – V. 162 (12). – P. 7256–62.
102. Gaspar F. M., Kim M. Y., McConnell F. M., Raykundalia C., Bekiaris V., P. J. Lane. Mice deficient in OX40 and CD30 signals lack memory antibody responses because of deficient CD4 T cell memory // *J. Immunol.* – 2005. – V. 174 (7). – P. 3891–3896.
103. Ghoreschi K., Laurence A., Yang X.P., et al. Generation of pathogenic T (H)17 cells in the absence of TGF- β signaling // *Nature*. – 2010. – V. 467 (7318). – P. 967–971.
104. Gigoux M., Shang J., Pak Y., Xu M., Choe J., Mak T.W., et al. Inducible costimulator promotes helper T-cell differentiation through phosphoinositide 3-kinase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2009. – V. 106 (48). – P. 20371–6.
105. Goenka R., Barnett L.G., Silver J.S., O'Neill P.J., Hunter C.A., Cancro M.P., et al. Cutting edge: dendritic cell-restricted antigen presentation initiates the follicular helper T cell program but cannot complete ultimate effector differentiation. *J. Immunol.* 2011; 187: 1091–95
106. Gonzalez M., Mackay F., Browning J.L., Kosco-Vilbois M.H., Noelle R.J. The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles // *J. Exp. Med.* – 1998. – V. 187 (3). – P. 997–1007.
107. Good-Jacobson K. L., Szumilas C. G., Chen L. et al. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of longlived plasma cells // *Nature Immunol.* – 2010. – V. 11 (6). – P. 535 – 542.
108. Goswami R., Jabeen R., Yagi R., Pham D., Zhu J., Goenka S., Kaplan M.H. STAT6-dependent regulation of Th9 development // *Journal of immunology*. – 2012. – V. 188 (3). – P. 968–75.

109. Goulding, J., V. Tahiliani, S. Salek-Ardakani. OX40:OX40L axis: emerging targets for improving poxvirus-based CD8⁺ T-cell vaccines against respiratory viruses // *Immunol. Rev.* – 2011. – V. 244 (1). – P. 149–168.
110. Graham D.Y., Opekun A.R., Osato M.S., El-Zimaity H.M., Lee C.K., Yamaoka Y., Qureshi W.A., Cadoz M., Monath T.P. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers // *Gut.* – 2004. – V. 53. – P. 1235–1243.
111. Gray B.M., Fontaine C.A., Poe S.A., Eaton K.A. Complex T cell interactions contribute to *Helicobacter pylori* gastritis in mice // *Infect. Immun.* – 2013. – V. 81. – P. 740–752.
112. Gulbranson-Judge A., MacLennan I. Sequential antigen-specific growth of T cells in the T zones and follicles in response to pigeon cytochrome c // *Eur. J. Immunol.* – 1996. – V. 26 (8). – P. 1830–1837.
113. Gunn M. D., Ngo V. N., Ansel K. M. et al. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1 // *Nature.* – 1998. – V. 391 (6669). – P. 799–803.
114. Gunn M. D., Tangemann K., Tam C. et al. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 1998. – V. 95 (1). – P. 258–263.
115. Habib T., Senadheera S., Weinberg K., Kaushansky K. The common gamma chain (gamma c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3 // *Biochemistry.* – 2002. – V. 41 (27). – P. 8725–8731.
116. Hardtke S., Ohl L., Forster R. Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help // *Blood.* – 2005. – V. 106 (6). – P. 1924–31.
117. Hargreaves D.C., Hyman P. L., Lu T. T., et al. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements // *J. Exp. Med.* – 2001. – V. 194 (1). – P. 45–56.
118. Hatzi K., Nance J.P., Kroenke M.A., et al. BCL6 orchestrates Tfh cell differentiation via multiple distinct mechanisms. *J. Exp. Med.* – 2015. – V. 212 (4). – P. 539–553.
119. Haynes N.M., Allen C.D., Lesley R., Ansel K.M., Killeen N., Cyster J.G. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1^{high} germinal center-associated subpopulation // *J. Immunol.* – 2007. – V. 179 (8). – P. 5099–5108.

120. Hebeis, B. J., Klenovsek K., Rohwer P., et al. Activation of virus-specific memory B cells in the absence of T cell help // *J. Exp. Med.* – 2004. – V. 199 (4). – P. 593–602.
121. Hiramatsu Y., Suto A., Kashiwakuma D., Kanari H., Kagami S., et al. c-Maf activates the promoter and enhancer of the IL-21 gene, and TGF-beta inhibits c-Maf-induced IL-21 production in CD4⁺ T cells // *J. Leukoc. Biol.* – 2010. – V. 87(4). – P. 703–12.
122. Hirota K., Turner J.E., Villa M., et al. Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell- cell-dependent IgA responses // *Nat. Immunol.* –2013. – V. 14 (4). – P. 372–379.
123. Ho F., Lortan J.E., MacLennan I.C.M., Khan M. Distinct short-lived and long-lived antibodyproducing cell populations // *Eur. J. Immunol.* – 1986. – V.16 (10). – P. 1297–1301.
124. Hoff H., Kolar P., Ambach A., Radbruch A., Brunner-Weinzierl M.C. CTLA-4 (CD152) inhibits T cell function by activating the ubiquitin ligase Itch // *Mol. Immunol.* – 2010. – V. 47 (10). – P. 1875–81.
125. Hutloff A., Dittrich A., Kroczeck R., et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28 // *Nature.* – 1999. – V. 397 (6716). – P. 263–266.
126. Hwang S.Y., Kim J.Y., Kim K.W., Park M.K., Moon Y., Kim W.U., Kim H.Y. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF- κ B- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways // *Arthritis Res Ther.* – 2004. – V. 6(2). – P. 120–128.
127. Jacquemin C., Schmitt N., Contin-Bordes C., Liu Y., Narayanan P., et al. OX40 ligand contributes to human lupus pathogenesis by promoting T follicular helper response // *Immunity.* - 2015. – V. 42 (6). – P. 1159–1170.
128. Jager A., Dardalhon V., Sobel R.A., Bettelli E., Kuchroo V.K. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes // *Journal of immunology.* – 2009. – V. 183 (11). – P. 7169-77.
129. Jeannin P., Delneste Y., Lecoanet-Henchoz S., Gauchat J.F., Ellis .J., Bonnefoy J.Y. CD86 (B7-2) on human B cells. A functional role in proliferation and selective differentiation into IgE- and IgG4- producing cells // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272 (25). – P. 15613–15619.
130. Jelley-Gibbs D.M., Brown D.M., Dibble J.P., Haynes L., Eaton S.M., Swain S.L. Unexpected prolonged presentation of influenza antigens promotes CD4 T cell memory generation // *J. Exp. Med.* – 2005. – V. 202 (5). – P. 697–706.

131. Jember A. G., Zuberi R., Liu F. T., M. Croft. Development of allergic inflammation in a murine model of asthma is dependent on the costimulatory receptor OX40 // *J. Exp. Med.* – 2001. – V. 193 (3). – P. 387–392.
132. Johnston R.J., Choi Y.S., Diamond J.A., Yang J.A., Crotty S. STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation // *J. Exp. Med.* – 2012. – V. 209 (2). – P. 243–50.
133. Johnston R.J., Poholek A.C., DiToro D., et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation // *Science*. – 2009. – V. 325 (5943). – P. 1006–10.
134. Joseph E. Craft follicular helper T cells in immunity and systemic autoimmunity // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2012. – V. 8 (6). – P. 337–347.
135. Joung S. M., Park Z. Y., Rani S., Takeuchi O., Akira S., Lee J. Y. Akt contributes to activation of the TRIF-dependent signaling pathways of TLRs by interacting with TANK-binding kinase 1 // *J. Immunol.* – 2011. – V. 186 (1). – P. 499–507.
136. Kallies A., Hawkins E.D., Belz G.T., Metcalf D., Hommel M., Corcoran L.M., et al. Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance // *Nat. Immunol.* – 2006. – V. 7 (5). – P. 466–74.
137. Kang G., Liu W.H., Lu P., Jin H.Y., Lim H.W., Shepherd J., Fremgen D., Verdin E., Oldstone M.B., Qi H. MicroRNAs of the miR-17~92 family are critical regulators of TFH differentiation // *Nat. Immunol.* – 2013. – V. 14 (8). – P. 849–857.
138. Kano S., Sato K., Morishita Y., et al. The contribution of transcription factor IRF1 to the interferongamma-interleukin 12 signaling axis and TH1 versus TH-17 differentiation of CD4⁺ T cells // *Nat. Immunol.* – 2008. – V.9 (1). – P. 34-41.
139. Karnowski A, Chevrier S, Belz GT, Mount A, Emslie D, D’Costa K, Tarlinton DM, Kallies A, Corcoran LM. B and T cells collaborate in antiviral responses via IL-6, IL-21, and transcriptional activator and coactivator, Oct2 and OBF-1 // *J. Exp. Med.* – 2012. – V. 209 (11). – P. 2049–2064.
140. Kaspirowicz D.J., Kohm A.P., Berton M.T., Chruscinski A.J., Sharpe A., Sanders V.M. Stimulation of the B cell receptor, CD86 (B7-2), and the beta 2-adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 and IgE produced per B cell // *J. Immunol.* – 2000. – V. 165 (2). – P. 680–690.
141. Kerckaert J.P., Deweindt C., Tilly H., Quief S., Lecocq G., Bastard C. LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas // *Nat. Genet.* – 1993. – V. 5 (1). – P. 66-70.

142. Kerdiles Y. M., Beisner D.R., Tinoco R., et al. Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor // *Nat. Immunol.* – 2009. – V. 10 (2). – P. 176–184.
143. Kerfoot S.M., Yaari G., Patel J.R., Johnson K.L., Gonzalez D.G., Kleinstein S.H., Haberman A.M. Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone // *Immunity.* – 2011. – V. 34 (6). – P. 947–960.
144. Khamri W., Walker M.M., Clark P., Atherton J.C., Thursz M.R., Bamford K.B., Lechler R.I., Lombardi G. *Helicobacter pylori* stimulates dendritic cells to induce interleukin-17 expression from CD4⁺ T lymphocytes // *Infect. Immun.* – 2010. – V. 78. – P. 845–853.
145. Kim C. H., Rott L. S., Clark-Lewis I., et al. Subspecialization of CXCR5⁺ T-cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized CXCR5⁺ T cells // *J. Exp. Med.* – 2001. – V. 193 (12). – P. 1373–1381.
146. Kim J. R., Lim H. W., Kang S. G. et al. Human CD57⁺ germinal center T-cells are the major helpers for GC-B cells and induce class switch recombination // *BMC Immunol.* – 2005. – V. 6. – P. 3.
147. Kin N.W., Sanders V. M. CD86 stimulation on a B cell activates the phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt and phospholipase C gamma 2/protein kinase C alpha beta signaling pathways // *J. Immunol.* – 2006. – V. 176 (11). – P. 6727–6735.
148. Kin N.W., Sanders V. M. CD86 regulates IgG1 production via a CD19-dependent mechanism // *J. Immunol.* – 2007. – V. 179 (3). – P. 1516–1523.
149. King C., Tangye S.G., Mackay C.R. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses // *Annu. Rev. Immunol.* – 2008. – V. 26. – P. 741–766.
150. King I.L., Mohrs M. IL-4-producing CD4⁺ T cells in reactive lymph nodes during helminth infection are T follicular helper cells // *J. Exp. Med.* – 2009. – V. 206 (5) – P. 1001–1007.
151. Kitano, M., Moriyama S., Ando Y., Hikida M., Mori Y., Kurosaki T., Okada T. Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity // *Immunity.* – 2011. – V. 34 (6). – P. 961–972.
152. Klein U., Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy // *Nature Rev. Immunol.* – 2008. – V. 8 (1). – P. 22–33.
153. Kleinschek M.A., Boniface K., Sadekova S., Grein J., Murphy E.E., Turner S.P., et al. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD 161 and promote intestinal inflammation // *J. Exp. Med.* – 2009. – V. 206 (3). – P. 525–534.

154. Kopf M., Le Gros G., Bachmann M., Lamers M.C., Bluethmann H., Kohler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses // *Nature*. 1993. – V. 362 (6417). – P. 245-248.
155. Kotenko S.V., Izotova L.S., Mirochnitchenko O.V., et al. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276 (4). – P. 2725–2732.
156. Kroenke M.A., Eto D., Locci M., Cho M., Davidson T., Haddad E.K., et al. Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation // *J. Immunol.* – 2012. – V. 188 (8). – P. 3734–44.
157. Kronsteiner B., Bassaganya-Riera J., Philipson C., Viladomiu M., Carbo A., Abedi V., Hontecillas R. Systems-wide analyses of mucosal immune responses to *Helicobacter pylori* at the interface between pathogenicity and symbiosis // *Gut microbes*. – 2016. – V. 7 (1). – P. 3–21.
158. Kwon H., Thierry-Mieg D., Thierry-Mieg J., Kim H.P., Oh J., Tunyaplin C., Carotta S., Donovan C.E., Goldman M.L., Tailor P., Ozato K., Levy D.E., Nutt S.L., Calame K., Leonard W.J. Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors // *Immunity*. – 2009. – V. 31 (6). – P. 941–952.
159. Lamprecht B., Kreher S., Anagnostopoulos I., Jöhrens K., Monteleone G., Jundt F., Stein H., Janz M., Dörken B., Mathas S. Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3alpha // *Blood*. – 2008. – V. 112 (8). – P. 3339-3347.
160. Larsen M., Arnaud L., Hié M., et al. Multiparameter grouping delineates heterogeneous populations of human IL17 and/or IL22 Tcell producers that share antigen specificities with other Tcell subsets // *Eur. J. Immunol.* – 2011. – V. 41 (9). – P. 2596–2605.
161. Le Gros G., Ben-Sasson S.Z., Seder R., Finkelman F.D., Paul W.E. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4- producing cells // *J. Exp. Med.* – 1990. – V. 172 (3). – P. 921-929.
162. Leavenworth J. W., Verbinnen B., Yin J., Huang H., Cantor H. A p85 α -osteopontin axis couples the receptor ICOS to sustained Bcl-6 expression by follicular helper and regulatory T cells // *Nat. Immunol.* – 2015. – V. 16 (1). – P. 96–106.
163. Leber A., Abedi V., Hontecillas R., Viladomiu M., Hoops S., Ciupe S., Caughman J., Andrew T., Bassaganya-Riera J. Bistability analysis of CD4+ T

- follicular helper and regulatory cells during *Helicobacter pylori* infection // *J. Theor. Biol.* – 2016. – V. 398. – P. 74-84.
164. Lee J.Y., Skon C.N., Lee Y.J., Oh S., Taylor J.J., Malhotra D., et al. The transcription factor KLF2 restrains CD4(+) T follicular helper cell differentiation // *Immunity.* – 2015. – V. 42 (2). – P. 252–64.
 165. Lee S. K., Rigby R.J., Zotos D., Tsai L.M., et al. B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells // *J. Exp. Med.* – 2011. – V. 208 (7). – P. 1377–1388.
 166. Lee S.K., Silva D.G., Martin J.L., Pratama A., Hu X., Chang P.P., et al. Interferon-gamma excess leads to pathogenic accumulation of follicular helper T cells and germinal centers // *Immunity.* – 2012. – V. 37 (5). – P. 880–92.
 167. Lejeune D., Dumoutier L., Constantinescu S., Kruijer W., Schuringa J.J., Renauld J-C. Interleukin- 22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatomacell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10 // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277 (37). – P. 33676–33682.
 168. León B., Ballesteros-Tato A., Browning J.L., Dunn R., Randall T.D., Lund F.E. Regulation of TH2 development by CXCR5+ dendritic cells and lymphotoxin-expressing B cells // *Nat. Immunol.* – 2012. – V. 13 (7). – P. 681-90.
 169. Lesley R., Kelly L. M., Xu, Y. Cyster, J. G. Naive CD4 T cells constitutively express CD40L and augment autoreactive B cell survival // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 2006. – V. 103 (28). – P. 10717–10722.
 170. Li J., Shen W., Kong K., Liu Z. Interleukin-21 induces T-cell activation and proinflammatory cytokine secretion in rheumatoid arthritis // *Scand. J. Immunol.* – 2006. – V. 64 (5). – P. 515–522.
 171. Li L., He J., Zhu L., Yang Y., Jin Y., Jia R., Liu X., Liu Y., Sun X., Li Z. The clinical relevance of IL-17-producing CD4+CD161+ cell and its subpopulations in primary sjögren's syndrome // *J. Immunol. Res.* – 2015. – V. 2015. – P. 307453.
 172. Li M.O., Sanjabi S., Flavell R.A. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms // *Immunity.* – 2006. – V. 25. – P. 455-471.
 173. Li M.O., Wan Y.Y., Flavell R.A. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation // *Immunity.* – 2007. – V. 26 (5). – P. 579-591.

174. Liang S.C., Tan X.Y., Luxenberg D.P., et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides // *J. Exp. Med.* – 2006. – V. 203 (10). – P. 2271–2279.
175. Liao W., R. Spolski, P. Li, N. Du, E.E. West, M. Ren, S. Mitra, W.J. Leonard. Opposing actions of IL-2 and IL-21 on Th9 differentiation correlate with their differential regulation of BCL6 expression // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2014. – V. 111 (9). – P. 3508-13.
176. Lim H.W., Hillsamer P., Kim C. H. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses // *J. Clin. Invest.* – 2004. – V. 114 (11). – P. 1640–1649.
177. Lindquist R.L., Shakhar G., Dudziak D., Wardemann H., Eisenreich T., Dustin M.L., Nussenzweig M.C. Visualizing dendritic cell networks in vivo // *Nat. Immunol.* – 2004. – V. 5 (12). – P. 1243–1250.
178. Linterman M., Rigby R., Wong R., et al. Roquin differentiates the specialized functions of duplicated T cell costimulatory receptor genes CD28 and ICOS // *Immunity.* – 2009. – V. 30 (2). – P. 228–241.
179. Linterman M.A., Beaton L., Yu D., Ramiscal R.R., Srivastava M., Hogan J.J., Verma N.K., Smyth M.J., Rigby R.J., Vinuesa C.G. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses // *J. Exp. Med.* – 2010. – V. 207 (2). – P. 353–363.
180. Linterman M.A., Denton A.E., Divekar D.P., Zvetkova I., Kane L., Ferreira C., et al. CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection // *Elife.* – 2014. – V.3. – e03180.
181. Linterman M.A., Rigby R.J., Wong R.K., Yu D., Brink R., Cannons J.L., Schwartzberg P.L., et al. Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity // *J. Exp. Med.* – 2009. – V. 206 (3). – P. 561–576.
182. Liu D., Xu H., Shih C., et al. T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction // *Nature.* – 2015. – V. 517 (7533). – P. 214–218.
183. Liu J., Harberts E., Tammaro A., Girardi N., et al. IL-9 regulates allergen-specific Th1 responses in allergic contact dermatitis // *J. Invest. Dermatol.* – 2014. – V. 134 (7). – P. 1903-11.
184. Liu X., Lu H., Chen T., Nallaparaju K.C., et al. Genome-wide analysis identifies Bcl6-controlled regulatory networks during T follicular helper cell differentiation // *Cell.* – 2016. – V. 14 (7). – P. 1735–1747.
185. Liu X., Chen X., Zhong B., Wang A., Wang X., Chu F., Nurieva R.I., Yan X., Chen P., van der Flier L.G., et al. Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development // *Nature.* – 2014. – V. 507 (7493). – P. 513-518.

186. Liu Y. J., Joshua D. E., Williams G. T. et al. Mechanism of antigendriven selection in germinal centers // *Nature*. – 1989. – V. 342 (6252). – P. 929–931.
187. Locci M., Wu J.E., Arumemi F., Mikulski Z., Dahlberg C., Miller A.T., et al. Activin A programs the differentiation of human TFH cells // *Nat. Immunol.* – 2016. – V. 17 (8). – P. 976–84.
188. Longphre M., Li D., Gallup M., et al. Allergeninduced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells // *J. Clin. Invest.* – 1999. – V.104 (10). – P. 1375-1382.
189. Lu, K. T., Kanno Y., Cannons J.L., et al. Functional and epigenetic studies reveal multistep differentiation and plasticity of in vitro-generated and in vivo-derived follicular T helper cells // *Immunity*. – 2011. – V. 35 (4). – P. 622–632.
190. Ma C.S., Deenick E.K., Batten M, Tangye S.G. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells // *J. Exp. Med.* – 2012. – V. 209 (7). – P. 1241-53.
191. Ma J., Feng D., Wei Y., Tian J., Tang X., Rui K., et al. Blockade of glucocorticoid-induced tumor necrosis factor-receptor-related protein signaling ameliorates murine collagen-induced arthritis by modulating follicular helper T cells // *Am. J. Pathol.* – 2016. – V. 186 (6). – P. 1559–67.
192. Ma, C.S., Hare N.J., Nichols K.E., et al. Impaired humoral immunity in X-linked lymphoproliferative disease is associated with defective IL-10 production by CD4+ T cells // *J. Clin. Invest.* - 2005. – V. 115 (4). – P. 1049–1059.
193. Ma, C.S., Nichols K.E., Tangye S.G. Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules // *Annu. Rev. Immunol.* – 2007. – V. 25. – P. 337–379.
194. MacLennan I. C. Germinal centers // *Annu. Rev. Immunol.* – 1994. –Vol. 12. – P. 117–139.
195. MacLennan, I. C., Gulbranson-Judge A., Toellner K.M., et al. The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop // *Immunol. Rev.* – 1997. – V. 156. – P. 53–66.
196. Malherbe L., Mark L., Fazilleau N., et al. Vaccine adjuvants alter TCR-based selection thresholds // *Immunity*. – 2008. – V. 28 (5). – P. 698–709.
197. Marafioti T., Paterson J.C., Ballabio E., Chott A., Natkunam Y., Rodriguez-Justo M., et al. The inducible T-cell co-stimulator molecule is expressed on subsets of T cells and is a new marker of lymphomas of T follicular helper cell-derivation // *Haematologica*. – 2010. – V. 95 (3). – P. 432–9.
198. Marinova E., Han S., Zheng B. Human germinal center T cells are unique Th cells with high propensity for apoptosis induction // *Int. Immunol.* – 2006. – V. 18 (8). – P. 1337–1345.

199. Marshall B.J., Warren J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration // *Lancet*. – 1984. – V. 1 (8390). – P. 1311-1315.
200. Martinez G.J., Hu J.K., Pereira R.M., Crampton J.S., Togher S., Bild N., et al. Cutting edge: NFAT transcription factors promote the generation of follicular helper T cells in response to acute viral infection // *J. Immunol.* – 2016. – V. 196 (5). – P. 2015–9.
201. Martins G.A., Cimmino L., Shapiro-Shelef M., Szabolcs M., Herron A., Magnusdottir E., et al. Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function // *Nat. Immunol.* – 2006. – V. 7 (5). – P. 457–65.
202. McDonald P.W., Read K.A., Baker C.E., Anderson A.E., Powell M.D., Ballesteros-Tato A, et al. IL-7 signalling represses Bcl-6 and the TFH gene program // *Nat. Commun.* – 2016. – V. 7. – P. 10285.
203. McHeyzer-Williams L. J., Pelletier N., Mark L. et al. Follicular helper T cells as cognate regulators of cell immunity // *Curr. Opin. Immunol.* – 2009. – Vol. 21 (3). – P. 266–273.
204. McHeyzer-Williams L. McHeyzer-Williams M. Antigen-specific memory B cell development // *Annu. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 23. – P. 487–513.
205. McHeyzer-Williams L., Malherbe L., McHeyzer-Williams M. Checkpoints in memory B-cell evolution // *Immunol. Rev.* – 2006. – V. 211. – P. 255–268.
206. Mondal A., Sawant D., Dent A.L. Transcriptional repressor BCL6 controls Th17 responses by controlling gene expression in both T cells and macrophages // *J. Immunol.* – 2010. – V. 184 (8). – P. 4123–4132.
207. Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M. W., Giedlin M. A., Coffman R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins // *J. Immunol.* – 1986. – V. 136 (7). – P. 2348-57.
208. Mosmann, T.R., Coffman, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties // *Annu. Rev. Immunol.* – 1989. – V. 7. – P. 145-173.
209. Moyat M., Velin D. Immune responses to *Helicobacter pylori* infection // *World J. Gastroenterol.* – 2014. – V. 20 (19). – P.5583-5593.
210. Mukherjee S., Schaller M.A., Neupane R., Kunkel S.L., Lukacs N.W. Regulation of T cell activation by Notch ligand, DLL4, promotes IL-17 production and Rorc activation // *J. Immunol.* – 2009. – V. 182 (12). – P. 7381–7388.
211. Murphy K.K., Travers K.P., Walport M. Janeway's Immunobiology. – 7th edition. – Garland Science. – 2008. – P. 18-20.

212. Murphy K.M., Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances // *Nat. Immunol.* – 2010. – V. 11 (8). – P. 674-80.
213. Nagalakshmi M.L., Rascle A., Zurawski S., Menon S., De Waal Malefyt R. Interleukin-22 activates STAT3 and induces IL-10 by colon epithelial cells // *Int Immunopharmacol.* – 2004. – V. 4 (5). – P. 679–691.
214. Nagy G., Koncz A., Telarico T., Fernandez D., Ersek B., Buzas E., Perl A. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and sysemic lupus erythematosus // *Arthritis Res. Ther.* – 2010. – V. 12 (3). – P. 210.
215. Nakayamada S., Kanno Y., Takahashi H., Jankovic D., Lu K.T., Johnson T.A., et al. Early Th1 cell differentiation is marked by a Tfh cell-like transition // *Immunity.* – 2011. – V. 35 (6). – P. 919–31.
216. Ngo V.N., Korner H., Gunn M.D., Schmidt K.N., et al. Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen // *J. Exp. Med.* – 1999. – V. 189 (2). – P. 403–412.
217. Niu H., Cattoretti G., Dalla-Favera R. BCL6 controls the expression of the B7-1/CD80 costimulatory receptor in germinal center B cells // *J. Exp. Med.* – 2003. – V. 198 (2). – P. 211–221.
218. Nurgalieva Z.Z., Conner M.E., Opekun A.R., Zheng C.Q., Elliott S.N., Ernst P.B., Osato M., Estes M.K., Graham D.Y. B-cell and T-cell immune responses to experimental *Helicobacter pylori* infection in humans // *Infect. Immun.* – 2005. – V. 73. – P. 2999-3006.
219. Nurieva R. I., Chung Y., Hwang D., et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages // *Immunity.* – 2008. – Vol. 29 (1). – P. 138–149.
220. Nurieva R., Yang X. O., Martinez G., et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells // *Nature.* – 2007. – V. 448 (7152)– P. 480–483.
221. Nurieva R.I., Chung Y., Martinez G.J., Yang X.O., Tanaka S., Matskevitch T.D., Wang Y.H., Dong C. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells // *Science.* – 2009. – V. 325(5943). – P. 1001–1005.
222. Nurieva R.I., Podd A., Chen Y., Alekseev A.M., Yu M., Qi X., et al. STAT5 protein negatively regulates T follicular helper (Tfh) cell generation and function // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287. – P. 11234–9.
223. O'Shea J.J., Paul W.E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells // *Science.* – 2010. – V. 327 (5969). – P. 1098-102.
224. Obermeier, F., Schwarz H., Dunger N., et al. OX40/OX40L interaction induces the expression of CXCR5 and contributes to chronic colitis induced by

- dextran sulfate sodium in mice // *Eur. J. Immunol.* – 2003. – V. 33 (12). – P. 3265–74.
225. Obst R., van Santen H.M., Mathis D., Benoist C. Antigen persistence is required throughout the expansion phase of a CD4(+) T cell response // *J. Exp. Med.* – 2005. – V. 201 (10). – P. 1555–1565.
 226. Oestreich K. J., Read K.A., Gilbertson S.E., et al. Bcl-6 directly represses the gene program of the glycolysis pathway // *Nat. Immunol.* – 2014. – V. 15 (10). – P. 957–964.
 227. Oestreich K.J., Huang A.C., Weinmann A.S. The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns // *J. Exp. Med.* – 2011. – V. 208 (5). – P. 1001–13.
 228. Ou, Y. H., M. Torres, R. Ram, E. Formstecher, C. Roland, T. Cheng, R. Brekken, R. Wurz, A. Tasker, T. Polverino, et al. TBK1 directly engages Akt/PKB survival signaling to support oncogenic transformation // *Mol. Cell.* – 2011. – V. 41 (4). – P. 458–470.
 229. Ouyang H., Shi Y.B., Su N., Li L.Y. Abnormality and significance of interleukin-9 and CD4 (+) interleukin-9 (+) T-cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus // *Zhonghua Yi. Xue. Za. Zhi.* – 2013. – V. 93 (2). – P. 99-103.
 230. Ozaki K., Spolski R., Ettinger R., Kim H.P., Wang G., Qi C.F., et al. Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6 // *J. Immunol.* – 2004. – V. 173 (9). – P. 5361–71.
 231. Ozaki K., Spolski R., Feng C.G., et al. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production // *Science.* – 2002. – V. 298 (5598). – P. 1630–1634 (2002).
 232. Parrish-Novak J., Dillon S. R., Nelson A. et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function // *Nature.* – 2000. – V. 408 (6808). – P. 57–63.
 233. Paul W.E., Seder R.A. Lymphocyte responses and cytokines // *Cell.* – 1994. – V. 76 (2). – P. 241-251.
 234. Paul W.E., Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? // *Nat. Rev. Immunol.* – 2010. – V. 10 (4). – P. 225–235.
 235. Pedros C., Zhang Y., Hu J.K., Choi Y.S., Canonigo-Balancio A.J., Yates J.R. III, et al. A TRAF-like motif of the inducible costimulator ICOS controls development of germinal center TFH cells via the kinase TBK1 // *Nat. Immunol.* – 2016. – V. 17 (7). – P. 825–33.
 236. Peled J. U., Kuang F. L., Iglesias-Ussel M. D. et al. The biochemistry of somatic hypermutation // *Annu. Rev. Immunol.* – 2007. – V. 26. – P. 481–511.

237. Pene J., Gauchat J.F., Lecart S., Drouet E., Guglielmi P., et al. Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells // *J. Immunol.* – 2004. – V. 172 (9). – P. 5154–57.
238. Pestka S., Krause C., Sarkar D., Walter M., Shi Y., Fisher P. Interleukin-10 and related cytokines and receptors // *Annu. Rev. Immunol.* – 2004. – V. 22. – P. 929–979.
239. Phan R.T., Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells // *Nature.* – 2004. – V. 432 (7017). – P. 635–9.
240. Pistoia V., Cocco C. IL-21: a new player in the control of isotype switch in Peyer's patches // *J. Leukoc. Biol.* – 2009. – V. 85 (5). – P. 739–743.
241. Poholek A.C., Hansen K., Hernandez S.G., Eto D., Chandele A., Weinstein J.S., et al. In vivo regulation of Bcl6 and T follicular helper cell development // *J. Immunol.* – 2010. – V. 185 (1). – P. 313–26.
242. Pomerantz J. L., Baltimore D. NF- κ B activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase // *EMBO J.* – 1999. – V. 18 (23). – P. 6694–6704.
243. Pot C., Jin H., Awasthi A., Liu S.M., Lai C.Y., Madan R., et al. Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells // *J. Immunol.* – 2009. – V. 183 (2). – P. 797–801.
244. Pratama A., Ramiscal R.R., Silva D.G., Das S.K., Athanasopoulos V., Fitch J., et al. Roquin-2 shares functions with its paralog Roquin-1 in the repression of mRNAs controlling T follicular helper cells and systemic inflammation // *Immunity.* – 2013. – V. 38 (4). – P. 669–80.
245. Qi H. T follicular helper cells in space-time // *Nat. Rev. Immunol.* – 2016. – V. 16 (10). – P. 612–25.
246. Qi H., Cannons J.L., Klauschen F., Schwartzberg P.L., Germain R.N. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation // *Nature.* – 2008. – V. 455 (7214). – P. 764–9.
247. Qi H., Egen J.G., Huang A.Y., Germain R.N. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigenbearing dendritic cells // *Science.* – 2006. – V. 312 (5780). – P. 1672–6.
248. Randall T.D., Heath A.W., Santos-Argumedo L., et al. Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers // *Immunity.* – 1998. – V. 8 (6). – P. 733–742.

249. Ranuncolo S., Polo J., Dierov J., Singer M., Kuo T., Greally J., Green R., Carroll M., Melnick A. Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR // *Nat. Immunol.* – 2007. – V. 8 (7). – P. 705–714.
250. Rasheed A.U., Rahn H.P., Sallusto F., Lipp M., Muller G. Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression // *Eur. J. Immunol.* – 2006. – 36 (7). – P. 1892–1903.
251. Ray J. P., Staron M.M., Shyer J.A., et al. The Interleukin-2-mTORc1 kinase axis defines the signaling, differentiation, and metabolism of T helper 1 and follicular B helper T cells // *Immunity.* – 2015. – V. 43 (4). – P. 690–702.
252. Ray J.P., Marshall H.D., Laidlaw B.J., Staron M.M., Kaech S.M., Craft J. Transcription factor STAT3 and type I interferons are corepressive insulators for differentiation of follicular helper and T helper 1 cells // *Immunity.* – 2014. – V. 40 (3). – P. 367–77.
253. Reinhardt R., Liang H., Locksley R. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire // *Nature Immunol.* – 2009. – V. 10 (4). – P. 385–393.
254. Renauld J.-C., Goethals A., Houssiau F., Van Roost E., Van Snick J. Cloning and expression of a cDNA for the human homolog of mouse T cell and mast cell growth factor P40 // *Cytokine.* – 1990. – V. 2 (1). – P. 9-12.
255. Rolf J., Bell S.E., Kovesdi D., Janas M.L., Soond D.R., Webb L.M., et al. Phosphoinositide 3-kinase activity in T cells regulates the magnitude of the germinal center reaction // *J. Immunol.* – 2010. – V. 185 (7). – P. 4042–52.
256. Rolf J., Fairfax K., Turner M. Signaling pathways in T follicular helper cells // *The J. Immunol.* – 2010. – V. 184 (12). – P. 6563–6568.
257. Rudd C.E., Taylor A., Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction // *Immunol. Rev.* – 2009. – V. 229 (1). – P. 12–26.
258. Rutz S., Noubade R., Eidenschenk C., et al. Transcription factor c-Maf mediates the TGF-beta-dependent suppression of IL-22 production in TH17 cells // *Nat. Immunol.* – 2011. – V. 12(12). – P. 1238–1245.
259. Sa S.M., Valdez P.A., Wu J., et al. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis // *J. Immunol.* – 2007/ - V. 178 (4). – P. 2229– 2240.
260. Saeki H., Wu M.T., Olasz E., Hwang S.T. A migratory population of skin-derived dendritic cells expresses CXCR5, responds to B lymphocyte

- chemoattractant in vitro, and co-localizes to B cell zones in lymph nodes in vivo // *Eur J. Immunol.* – 2000. – V. 30 (10). – P. 2808–14.
261. Sage P.T., Francisco L.M., Carman C.V., Sharpe A.H. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood // *Nat. Immunol.* – 2012. – V. 14 (2). – P. 152–61.
 262. Sage P.T., Paterson A.M., Lovitch S.B., Sharpe A.H. The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells // *Immunity.* – 2014. – V. 41 (6). – P. 1026–39.
 263. Saito T., Yamasaki S. Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors // *Immunol. Rev.* – 2003. – V.192. – P.143-160.
 264. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases // *J. Immunol.* – 1995. – V.155 (3). – P. 1151-1164.
 265. Salek-Ardakani S., Choi Y.S., Rafii-El-Idrissi Benhnia M., Flynn R., Arens R., Schoenberger S., et al. B cell-specific expression of B7-2 is required for follicular Th cell function in response to vaccinia virus // *J. Immunol.* – 2011. – V. 186 (9). – P. 5294–303.
 266. Salek-Ardakani S., Croft M. Tumor necrosis factor receptor/tumor necrosis factor family members in antiviral CD8 T-cell immunity // *J. Interferon. Cytokine Res.* – 2010. – V. 30 (4). – P. 205–218.
 267. Salek-Ardakani S., Flynn R., Arens R., Yagita H., Smith G. L., Borst J., Schoenberger S. P., Croft M. The TNFR family members OX40 and CD27 link viral virulence to protective T cell vaccines in mice // *J. Clin. Invest.* - 2011. – V. 121 (1). – P. 296–307.
 268. Salek-Ardakani S., Song J., Halteman B. S., Jember A. G., Akiba H., Yagita H., Croft M. OX40 (CD134) controls memory T helper 2 cells that drive lung inflammation // *J. Exp. Med.* - 2003. – V. 198 (2). – P. 315–324.
 269. Samson M., Audia S., Fraszczak J., et al. Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica pathogenesis // *Arthritis Rheum.* – 2012. – V. 64 (11). – P. 3788-98.
 270. Sawant D.V., Sehra S., Nguyen E.T., Jadhav R., Englert K., Shinnakasu R., Hangoc G., Broxmeyer H.E., Nakayama T., Perumal N.B., et al. Bcl6 controls the Th2 inflammatory activity of regulatory T cells by repressing Gata3 function // *J. Immunol.* - 2012. – V. 189 (10). – V. 4759–4769.

271. Sawant D.V., Wu H., Kaplan M.H., Dent A.L. The Bcl-6 target gene microRNA-21 promotes Th2 differentiation by a T cell intrinsic pathway // *Mol. Immunol.* – 2013. – V. 54 (3-4). – P. 435–42.
272. Schaerli P. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function // *J. Exp. Med.* – 2000. – V. 192 (11). – P. 1553–1562.
273. Sehra S., Yao W., Nguyen E.T., Glosson-Byers N.L., Akhtar N., Zhou B., Kaplan M.H. TH9 cells are required for tissue mast cell accumulation during allergic inflammation // *Journal of Allergy & Clinical Immunology.* – 2015. – V. 136 (2). – P. 433-440.
274. Seo Y.B., Im S.J., Namkoong H., et al. Crucial Roles of Interleukin-7 in the Development of T Follicular Helper Cells and in the Induction of Humoral Immunity // *J. Virol.* – 2014. – V. 88 (16). – P. 8998–9009.
275. Shaffer A.L., Lin K.I., Kuo T.C., Yu X., Hurt E.M., Rosenwald A., Giltane J.M., Yang L., Zhao H., Calame K., Staudt L.M. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program // *Immunity.* – 2002. – V. 17 (1). – P. 51–62.
276. Shapiro-Shelef M., Lin K.I., McHeyzerWilliams L.J., Liao J., McHeyzer-Williams M.G., Calame K. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells // *Immunity.* – 2003. – V. 19 (4). – P. 607–620.
277. Shapiro-Shelef M., Lin K.I., Savitsky D., Liao J., Calame K. Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow // *J. Exp. Med.* – 2005. – V. 202 (11). – P.1471–1476.
278. Shaw L.A., Belanger S., Omilusik K.D., Cho S., Scott-Browne J.P., Nance J.P., et al. Id2 reinforces TH1 differentiation and inhibits E2A to repress TFH differentiation // *Nat. Immunol.* – 2016. – V. 17 (7). – P. 834–43.
279. Shi Y., Liu X.F., Zhuang Y., Zhang J.Y., Liu T., Yin Z., Wu C., Mao X.H., Jia K.R., Wang F.J., Guo H., Flavell R.A., Zhao Z., Liu K.Y., Xiao B., Guo Y., Zhang W.J., Zhou W.Y., Guo G., Zou Q.M. *Helicobacter pylori* induced Th17 responses modulate Th1 cell responses, benefit bacterial growth, and contribute to pathology in mice // *J. Immunol.* – 2010. – V. 184. – P. 5121-5129.
280. Shiow L.R., Rosen D.B., Brdicková N., et al. CD69 acts downstream of interferon- α/β to inhibit s1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs // *Nature.* – 2006. – V. 440 (7083). – P. 540–544.
281. Singh S.P., Zhang H.H., Tsang H., Gardina P.J., Myers T.G., Nagarajan V., et al. PLZF Regulates CCR6 and is Critical for the Acquisition and Maintenance of the Th17 Phenotype in Human Cells // *J. Immunol.* – 2015. – V. 194 (9). – P. 4350–61.

282. Sitte S., Glasner J., Jellusova J., Weisel F., Panattoni M., Pardi R., Gessner A. JAB1 is essential for B cell development and germinal center formation and inversely regulates fas ligand and Bcl6 expression // *J. Immunol.* - 2012. – V. 188 (6). – P. 2677-86.
283. Smith K. M., Brewer J. M., Rush C. M., et al. In vivo generated Th1 cells can migrate to B cell follicles to support B cell responses // *J. Immunol.* – 2004. – V. 173 (3). – P. 1640–1646.
284. Smith K. M., Pottage L., Thomas E.R., et al. Th1 and Th2 CD4⁺ T cells provide help for B cell clonal expansion and antibody synthesis in a similar manner in vivo // *J. Immunol.* – 2000. – V. 165 (6). – P. 3136–3144.
285. So T., Choi H., Croft M. OX40 complexes with phosphoinositide 3- kinase and protein kinase B (PKB) to augment TCR-dependent PKB signaling // *J. Immunol.* – 2011. – V. 186 (6). – P. 3547–3555.
286. So T., Song J., Sugie K., Altman A., Croft M. Signals from OX40 regulate nuclear factor of activated T cells c1 and T cell helper 2 lineage commitment // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2006. – V. 103 (10). – P. 3740–3745.
287. So T., Soroosh P., Eun S. Y., Altman A., Croft M. Antigen-independent signalosome of CARMA1, PKC θ , and TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) determines NF- κ B signaling in T cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2011. – V. 108 (7). – P. 2903–2908.
288. Song J., Salek-Ardakani S., Rogers P. R., Cheng M., Van Parijs L., Croft M. The costimulation-regulated duration of PKB activation controls T cell longevity // *Nat. Immunol.* – 2004. – V. 5 (2). – P. 150–158.
289. Song, J., So T., Croft M. Activation of NF- κ B1 by OX40 contributes to antigen-driven T cell expansion and survival // *J. Immunol.* – 2008. – V. 180 (11). – P. 7240–7248.
290. Stone E. L., Pepper M., Katayama C.D., et al. ICOS coreceptor signaling inactivates the transcription factor FOXO1 to promote Tfh cell differentiation // *Immunity.* – 2015. – V. 42 (2). – P. 239–251.
291. Stuber E., Neurath M., Calderhead D., Fell H. P., Strober W. Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells // *Immunity.* – 1995. – V. 2 (5). – P. 507–521.
292. Sugimoto K., Ogawa A., Mizoguchi E., et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis // *J. Clin. Invest.* – 2008. – V. 118 (2). – P. 534–544.
293. Suh W.K. Life of T follicular helper cells // *Mol. Cells.* – 2015. – V. 38 (3). – P. 195–201.

294. Suvas S., Singh V., Sahdev S., Vohra H., Agrewala J.N. Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277 (10). – P. 7766–7775.
295. Suzuki K., Maruya M., Kawamoto S., et al. The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut // *Immunity.* – 2010. – V. 33 (1). – P. 71–83.
296. Suzuki T., Kato K., Ohara S., Noguchi K., Sekine H., Nagura H., Shimosegawa T. Localization of antigen-presenting cells in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa // *Pathol. Int.* – 2002. – V. 52. – P. 265-271.
297. Suzuki Y., Orellana M.A., Schreiber R.D., Remington J.S. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii* // *Science.* – 1988. – V. 240 (4851). – P. 516-518.
298. Swain S.L., Weinberg A.D., English M., Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors // *J. Immunol.* – 1990. – V. 145 (11). – P. 3796-3806.
299. Tahilian V., Hutchinson T.E., Abboud G., Croft M., Salek-Ardakani S. OX40 Cooperates with ICOS To Amplify Follicular Th Cell Development and Germinal Center Reactions during Infection // *J. Immunol.* – 2017. – V. 198 (1). – P. 218-228.
300. Tamiya T., Ichiyama K., Kotani H., Fukaya T., Sekiya T., et al. Smad2/3 and IRF4 play a cooperative role in IL-9-producing T cell induction // *J. Immunol.* – 2013. – V. 191 (5). – P. 2360-71.
301. Trifari S., Kaplan C.D., Tran E.H., Crellin N.K., Spits H. Identification of a human helper T-cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells // *Nat. Immunol.* – 2009. – V. 10 (8). – P. 864–871.
302. Turner C.A., Mack D.H., Davis M.M. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells // *Cell.* – 1994. – V. 77 (2). – P. 297–306.
303. Urban J.F. Jr., Noben-Trauth N., Donaldson D.D., et. al. IL-13, IL-4, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis* // *Immunity.* – 1998. – V. 8 (2). – P. 255-264.
304. Vaeth M., Muller G., Stauss D., Dietz L., Klein-Hessling S., Serfling E., et al. Follicular regulatory T cells control humoral autoimmunity via NFAT2-regulated CXCR5 expression // *J. Exp. Med.* – 2014. – V. 211 (3). – P. 545–61.
305. Van Essen D., Kikutani H., Gray D. CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function // *Nature.* – 1995. – V. 378 (6557). – P. 620–623.

306. Veldhoen M., Uyttenhove C., Snick J. van, Helmby H., Westendorf A., Buer J., Martin B., Wilhelm C., Stockinger, B. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset // *Nat. Immunol.* – 2008. – V. 9 (12). – P. 1341-6.
307. Vercelli D., Geha R. S. Regulation of isotype switching // *Curr. Opin. Immunol.* – 1992. – V. 4 (6). – P. 794–797.
308. Vieira P., Rajewsky K. Persistence of memory B cells in mice deprived of T cell help // *Int. Immunol.* – 1990. – V. 2 (6). – P. 487–494.
309. Vinuesa C. G., Cyster J. G. How T cells earn the follicular rite of passage // *Immunity.* – 2011. – V. 35 (5). – P. 671–680.
310. Vinuesa C., Cook M., Angelucci C., et al. A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity // *Nature.* – 2005. – V. 435 (7041). – P. 452–458.
311. Vogel K.U., Edelmann S.L., Jeltsch K.M., Bertossi A., Heger K., Heinz G.A., et al. Roquin paralogs 1 and 2 redundantly repress the Icos and Ox40 costimulator mRNAs and control follicular helper T cell differentiation // *Immunity.* – 2013. – V. 38 (4). – P. 655–68.
312. Vogelzang A., McGuire H.M., Yu D., Sprent J., Mackay C.R., King C. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells // *Immunity.* – 2008. – V. 29 (1). – P. 127–37.
313. Volpe E., Servant N., Zollinger R., et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses // *Nat. Immunol.* – 2008. – V. 9 (6). – P. 650–657.
314. Walker L.S., Gulbranson-Judge A., Flynn S., et al. Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers // *J. Exp. Med.* – 1999. – V. 190 (8). – P.1115–22.
315. Wang C., Hillsamer P., Kim C. H. Phenotype, effector function, and tissue localization of PD-1-expressing human follicular helper T cell subsets // *BMC Immunology.* – 2011. – V. 12. – P. 53.
316. Wang C.J., Heuts F., Ovcinnikovs V., Wardzinski L., Bowers C., Schmidt E.M., et al. CTLA-4 controls follicular helper T-cell differentiation by regulating the strength of CD28 engagement // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2014. – V. 112 (2). – P. 524–9.
317. Wang H., Geng J., Wen X., Bi E., Kossenkova A.V., Wolf A.I., et al. The transcription factor Foxp1 is a critical negative regulator of the differentiation of follicular helper T cells // *Nat. Immunol.* – 2014. – V. 15 (7). – P. 667–75.

318. Wang R., Green, D. R. Metabolic checkpoints in activated T cells // *Nat. Immunol.* – 2012. – V. 13 (10). – P. 907–915.
319. Warnatz K., Bossaller L., Salzer U., et al. Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency // *Blood.* – 2006. – V. 107 (8). – P. 3045–5225.
320. Watanabe M., Takagi Y., Kotani M., et al. Down-regulation of ICOS ligand by interaction with ICOS functions as a regulatory mechanism for immune responses // *J. Immunol.* – 2008. – V.180 (8). – P. 5222–34.
321. Weaver C.T., Harrington L.E., Mangan P.R., Gavrieli M., Murphy K.M. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties // *Immunity.* – 2006. – V. 24 (6). – P. 677–688.
322. Weber J.P., Fuhrmann F., Feist R.K., Lahmann A., Al Baz M.S., Gentz L.J., et al. ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Kruppel- like factor 2 // *J. Exp. Med.* – 2015. – V. 212 (2). – P. 217–33.
323. Weinstein J.S., Herman E.I., Lainez B., Licona-Limón P., Esplugues E., Flavell R., Craft J. TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response // *Nat. Immunol.* – 2016. – V. 17 (10). P. 1197–205.
324. Wichner K., Stauss D., Kampfrath B., Krüger K., Müller G., Rehm A., Lipp M., Höpken U.E. Dysregulated development of IL-17- and IL-21-expressing follicular helper T cells and increased germinal center formation in the absence of ROR γ t // *FASEB J.* – 2016. – V. 30 (2). – P. 761–74.
325. Williams M.A., Tyznik A.J., Bevan M.J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells // *Nature.* – V. 441. – P. 890–893.
326. Wing J.B., Ise W., Kurosaki T., Sakaguchi S. Regulatory T cells control antigen-specific expansion of Tfh cell number and humoral immune responses via the coreceptor CTLA-4 // *Immunity.* – 2014. – V. 41 (6). – P. 1013–25.
327. Wolk K., Witte E., Wallace E., et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis // *Eur. J. Immunol.* – 2006. – V. 36 (5). – P. 1309–1323.
328. Wolk K., Kunz S., Witte E., Friedrich M., Asadullah K., Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues // *Immunity.* – 2004. – V. 21 (2). – P. 241–254.
329. Wu T., Shin H.M., Moseman E.A., Ji Y., Huang B., Harly C., et al. TCF1 is required for the T follicular helper cell response to viral infection // *Cell Rep.* – 2015. – V. 12 (12). – P. 2099–110.

330. Wurster A. L., Rodgers V. L., White M. F. et al. Interleukin-4 mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277 (30). – P. 27169–27175
331. Wynn T.A. IL-13 effector functions // *Annu. Rev. Immunol.* – 2003. – V. 21. – P. 425-456.
332. Xiao N., Eto D., Elly C., Peng G., Crotty S., Liu Y.C. The E3 ubiquitin ligase Itch is required for the differentiation of follicular helper T cells // *Nat. Immunol.* – 2014. – V. 15 (7). – P. 657–66.
333. Xie M.H., Aggarwal S., Ho W.H., et al. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275 (40). – P. 31335–31339.
334. Xu H., Li X., Liu D., et al. Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility // *Nature.* – 2013. – V. 496 (7446). – P. 523–527.
335. Xu L., Cao Y., Xie Z., Huang Q., Bai Q., Yang X., et al. The transcription factor TCF-1 initiates the differentiation of TFH cells during acute viral infection // *Nat. Immunol.* – 2015. – V. 16 (9). – P. 991–9.
336. Ye B.H., Lista F., Lo Coco F., Knowles D.M., Offit K., Chaganti R.S., et al. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma // *Science.* – 1993. – V. 262 (5134). – P. 747-50.
337. Ye Z.J., Zhou Q., Yin W., Yuan M.L., Yang W.B., Xiong X.Z., Zhang J.C., Shi H.Z. Differentiation and immune regulation of IL-9-producing CD4⁺ T cells in malignant pleural effusion // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2012. – V. 186 (11). – P. 1168-79.
338. Yong P.F., Salzer U., Grimbacher B. The role of costimulation in antibody deficiencies: ICOS and common variable immunodeficiency // *Immunol Rev.* – 2009. – V. 229 (1). – P. 101-13.
339. Yu D., Rao S., Tsai L.M., Lee S.K., He Y., Sutcliffe E.L., Srivastava M., Linterman M., Zheng L., Simpson N., et al. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment // *Immunity.* – 2009. – V. 31 (3). – P. 457–468.
340. Yusuf I., Kageyama R., Monticelli L., et al. Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150) // *J. Immunol.* – 2010. – V. 185 (1). – P. 190–202.
341. Zaiss D.M., Yang L., Shah P.R., Kobie J.J., Urban J.F., Mosmann T.R. Amphiregulin, a TH2 cytokine enhancing resistance to nematodes // *Science.* – 2006. – V. 314 (5806). – P. 1746.

342. Zaph C., Uzonna J., Beverley S. M., Scott P. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites // *Nat. Med.* – 2004. – V. 10 (10). – P. 1104–1110.
343. Zaretsky A.G., Taylor J.J., King I.L., Marshall F.A., Mohrs M., Pearce E.J. T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens // *J. Exp. Med.* – 2009. – V. 206 (5). – P. 991–9.
344. Zeng H., Cohen S., Guy C., Shrestha S., Neale G., Brown S.A., et al. mTORC1 and mTORC2 kinase signaling and glucose metabolism drive follicular helper T cell differentiation // *Immunity.* – 2016. – V. 45 (3). – P. 540–54.
345. Zhang T.T. , Makondo K. J., Marshall A.J. p110 Phosphoinositide 3-Kinase Represses IgE Switch by Potentiating BCL6 Expression // *J. Immunol.* – 2012. – V. 188 (8). – P. 3700–3708.
346. Zheng Y., Danilenko D.M., Valdez P. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis // *Nature.* – 2007. – V. 445. – P. 648–651.
347. Zhu C., Lee V., Finn A., Senger K., Zarrin A. A., Pasquier L.D., Hsu. E. Origin of immunoglobulin isotype switching // *Curr. Biol.* – 2012 – V. 22(10). – P. 872–880.
348. Zhu J., Yamane H., Paul W.E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations // *Annu. Rev. Immunol.* – 2010. – V. 28. – P. 445–89.
349. Zinkernagel R. M., Bachmann M.F., Kündig T.M., et al. On immunological memory // *Annu. Rev. Immunol.* – 1996. – V. 14. – P. 333–367.
350. Zotos D., Coquet J.M., Zhang Y., Light A., D'Costa K., et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism // *J. Exp. Med.* – 2010. – V. 207 (2). – P. 365–378.