

Н. А. Панова

## Фенотип клеток адаптивного иммунитета костного мозга у лактирующих мышей и новорождённых мышат

### Аннотация.

**Цель:** выявить субпопуляции Т-лимфоцитов в костном мозге у лактирующих мышей и новорождённых мышат.

**Материалы и методы.** Исследования проводились на лактирующих мышах и новорождённых мышатах. Были сформированы 2 группы по 5 животных в каждой. Для опыта у животных отбирали костный мозг из проксимального отдела бедренной кости. Отрезали головку бедра и извлекали костный мозг при помощи шприца, которым промывали костномозговую полость солевым раствором. Фенотип клеток адаптивного иммунитета определяли с помощью набора флуорохром-конъюгированных антител: CD4-PerCP-Cy5.5, CD8-PE/Cy7, CD62L-APC/Cy7, CD44-BV510. Сбор данных осуществляли на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter, США). Результаты анализировали в программе Kaluza Analysis 2.1.

**Результаты.** В результате исследования установлено, что CD8<sup>+</sup> Т-клеток эффекторной ( $T_{EM}; CD44^+CD62L^-$ ) и центральной памяти ( $T_{CM}; CD44^+CD62L^+$ ) больше у взрослых особей, тогда как доля CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти наивной памяти ( $T_{NV}; CD44^-CD62L^+$ ) преобладает у мышат. Содержание субпопуляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток наивной памяти ( $T_{NV}; CD44^-CD62L^+$ ) в 1,31 раза больше у новорождённых мышат и составило  $81,97 \pm 2,38 \%$  и  $62,57 \pm 1,48 \%$ , соответственно. Установлено достоверно низкое содержание популяций CD4<sup>+</sup> Т-клеток эффекторной памяти ( $T_{EM}; CD44^+CD62L^-$ ) у мышат  $5,62 \pm 2,15 \%$  по сравнению со взрослыми особями  $13,26 \pm 1,93 \%$  ( $p < 0,05$ ). CD8<sup>+</sup> Т-клетки эффекторной и центральной памяти ( $T_{EM}; T_{CM}$ ) в большом количестве проникают в костный мозг. Это свидетельствует о том, что лимфоциты принимают активное участие в клеточных механизмах иммунного ответа. В костном мозге в процессе иммунных реакций формируются и накапливаются многочисленные субпопуляции Т-лимфоцитов, в частности, цитотоксические клетки и Т-клетки памяти, непосредственно отвечающие за адаптивный иммунитет.

**Ключевые слова:** лактирующие мыши; новорождённые мышата; молозиво; костный мозг; лимфоциты; CD8<sup>+</sup> Т-клетки; CD4<sup>+</sup> Т-клетки; иммунологическая память.

Автор:

Панова Н. А. – кандидат биологических наук; e-mail: panova\_na@mail.ru.

Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины; 196084, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5.

**Введение.** Красный костный мозг является источником развития полипотентных стволовых клеток [1]. В зависимости от своей функциональной принадлежности может быть органом гемопоэза и иммунным органом. Гемопоэз осуществляется в костном мозге, находящемся в плоских костях на протяжении всей жизни в [2]. С возрастом мозговая ткань костей постепенно заменяется на жировую [3; 4].

Костный мозг включается в процесс активации наивных Т-клеток [5; 6]. В процессе иммунного ответа Т-лимфоциты превращаются в Т-клетки памяти, способные обеспечить защиту от повторного заражения [7; 8]. В течение жизни Т-клетки памяти контактируют с различными клетками костного мозга [9; 10].

Тимус специализируется исключительно на развитии Т-лимфоцитов. Клеточные маркеры характеризуют стадии развития Т-клеток в тимусе [11; 12]. Отбор Т-лимфоцитов в тимусе заверша-

ется усилением экспрессии на поверхности клеток выживших клонов специфических клональных Т-клеточных рецепторов и вспомогательных молекул CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> [6; 9]. При селекции в тимусе одновременно формируются субпопуляции Т-лимфоцитов. Т-клетки, в процессе созревания утратившие молекулы CD4<sup>+</sup> и сохранившие молекулы CD8<sup>+</sup>, становятся предшественниками цитотоксических — Т-лимфоцитов [2].

Пре-Т-лимфоциты проходят стадии развития в тимусе, в результате чего генерируются зрелые, функционально полноценные Т-клетки. [1]. Цитотоксические лимфоциты способны быстро и эффективно уничтожать чужеродные клетки [5]. Т-хелперы активизируют В-лимфоциты, стимулируя выработку ими антител [13]. Совместное взаимодействие лимфоцитов и макрофагов играет важную роль в осуществлении иммунного ответа в организме [14].

В молозивный период, благодаря содержа-

щимся в нём лимфоцитам и иммуноглобулинам, новорождённые мышата приобретают клеточный и гуморальный иммунитет [5; 10; 15].

Анализ состава лимфоидных клеток костного мозга позволяет определить его значимость в формировании иммунитета у новорождённых.

**Цель исследований** — выявление субпопуляций Т-лимфоцитов в костном мозге у лактирующих мышей и новорождённых мышат.

**Материалы и методы.** Экспериментальная часть исследований проводилась на лактирующих мышках и новорождённых мышатах. Были сформированы 2 группы по 5 животных в каждой. У животных использовали костный мозг, отобранный из проксимального отдела бедренной кости. Отрезали головку бедра и извлекали костный мозг при помощи шприца, которым промывали костномозговую полость солевым раствором [16].

Фенотип клеток определяли с помощью набора флуорохром-конъюгированных антител: CCD45-BV421, CD4-PerCP-Cy5.5, CD8-PE/Cy7, CD62L-APC/Cy7, CD44-BV510. Сбор данных осуществляли на проточном цитометре CytoFlex. Результаты анализировали в программе Kaluza Analysis 2.1.

**Результаты и обсуждение.** В результате исследований установлено отличие количества лимфоцитов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> в красном костном мозге у лактирующих мышей и новорождённых мышат (табл. 1). Так, доля клеток CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> в костном мозге у лактирующих мышей превышает в 1,9 и 2,3 раза, соответственно таковую в красном костном мозге у мышат ( $p < 0,05$ ).

Анализируя полученные данные субпопуляций CD8<sup>+</sup> Т-клеток (табл. 2), мы обнаружили максимальное содержание Т-клеток наивной памяти ( $T_{NV}$ ; CD44-CD62L<sup>+</sup>) у мышат —  $81,97 \pm 2,38$  %, что достоверно больше, чем у лактирующих мышей —  $62,57 \pm 1,48$  % ( $p < 0,05$ ).

Анализируя субпопуляции CD8<sup>+</sup> Т-клеток, мы установили достоверно низкое содержание популяций CD8<sup>+</sup> Т-клеток эффекторной и центральной памяти ( $T_{EM}$ ; CD44+CD62L;  $T_{CM}$ ;

**Таблица 1. Количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток от общего числа лимфоцитов (%)**

| Т-клетки         | Красный костный мозг, % |                      |
|------------------|-------------------------|----------------------|
|                  | Лактирующие мыши        | Новорождённые мышата |
| CD4 <sup>+</sup> | $5,04 \pm 2,53^*$       | $2,57 \pm 2,44$      |
| CD8 <sup>+</sup> | $6,02 \pm 1,64^*$       | $2,60 \pm 1,08$      |

**Примечание:** \* $p < 0,05$  по сравнению с содержанием популяций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в костном мозге у лактирующих мышей и новорождённых мышат.

CD44+CD62L) у новорождённых  $0,78 \pm 0,19$  % и  $1,54 \pm 1,03$  %, соответственно, по сравнению со взрослыми животными  $10,14 \pm 2,66$  % и  $6,92 \pm 2,25$  %, соответственно ( $p < 0,001$ ). Содержание CD4<sup>+</sup> Т-клеток эффекторной памяти ( $T_{EM}$ ; CD44+CD62L<sup>-</sup>) у мышат достоверно снижалось до  $5,62 \pm 2,15$  %, по сравнению с лактирующими мышками  $13,26 \pm 1,93$  % ( $P < 0,001$ ). Надо отметить, что количество популяций CD4<sup>+</sup> центральной памяти ( $T_{CM}$ ; CD44+CD62L<sup>+</sup>) в 1,5 раза больше у взрослых лактирующих мышей, чем у новорождённых мышат. Гейтирование популяций CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов представлено на гистограммах (рис. 1 и 2).

В результате исследований установлено, что популяций CD8<sup>+</sup> Т-клеток наивных ( $T_{NV}$ ;) больше у мышат, тогда как популяций CD8<sup>+</sup> Т-клеток эффекторной памяти ( $T_{EM}$ ;) больше у взрослых особей, что свидетельствует о высокой активности лимфоцитов [8]. В костном мозге, помимо пролиферации и дифференцировки, идёт процесс обучения Т-клеток наивной памяти под влиянием лимфоцитов, поступивших в организм новорождённых с молозивом матери [2; 13; 15]. Большая часть пре-Т-лимфоцитов полностью завершают обучение и процессы пролиферации в тимусе на различные субпопуляции, тем самым поддерживая иммунный статус на определённом уровне [14].

На способности клеток специфической иммунной системы к созданию и сохранению иммунологической памяти основано возникновение активно приобретённого специфического иммунитета после перенесённых инфекций или после вакцинации

**Таблица 2. Субпопуляции Т-клеток костного мозга лактирующих мышей и новорождённых мышат**

| Популяции Т-клеток | Субпопуляции Т-клеток | Костный мозг %        |                      |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
|                    |                       | Лактирующие мыши      | Новорождённые мышата |
| CD4 <sup>+</sup>   | CD4 CM                | $2,34 \pm 0,48$       | $1,58 \pm 1,28$      |
|                    | CD4 EM                | $13,26 \pm 1,93^*$    | $5,62 \pm 2,15$      |
|                    | CD4 Naive             | $25,74 \pm 1,81$      | $30,07 \pm 1,18$     |
| CD8 <sup>+</sup>   | CD8 CM                | $6,92 \pm 2,25^{**}$  | $1,54 \pm 1,03$      |
|                    | CD8 EM                | $10,14 \pm 2,66^{**}$ | $0,78 \pm 0,19$      |
|                    | CD8 Naive             | $62,57 \pm 1,48$      | $81,97 \pm 2,38^*$   |

**Примечание:** \* $p < 0,05$ , по сравнению с содержанием популяций CD8<sup>+</sup> Т-клеток наивной памяти ( $T_{NV}$ ) в костном мозге у лактирующих мышей и новорождённых мышат. \*\* $p < 0,001$  по сравнению с содержанием популяций CD8<sup>+</sup> эффекторной ( $T_{EM}$ ) в костном мозге у лактирующих мышей и новорождённых мышат.

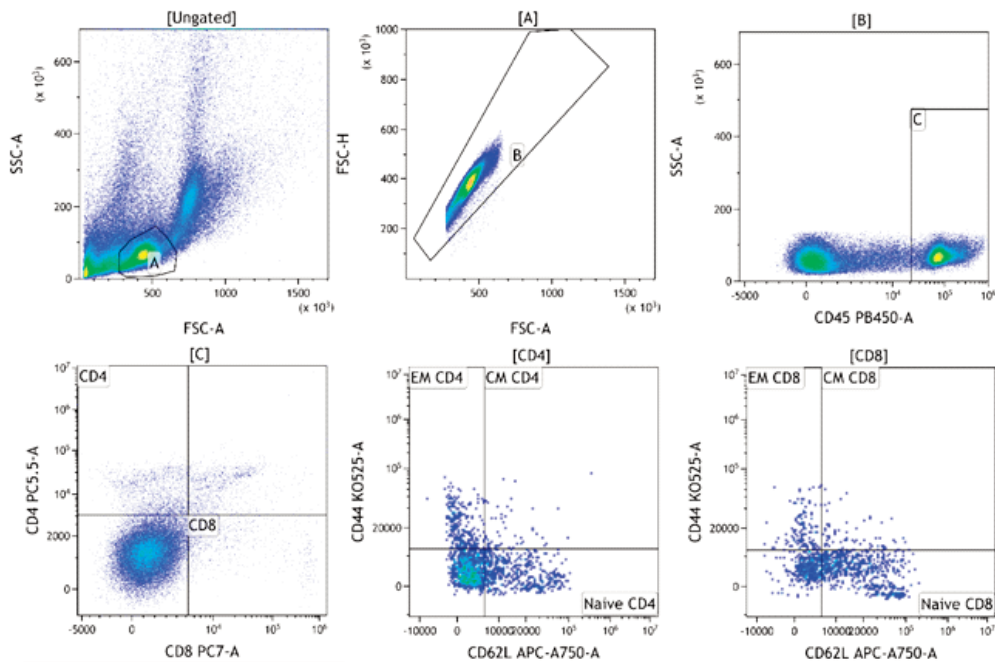


Рис. 1. Гистограмма субпопуляций Т-лимфоцитов клеток костного мозга лактирующей мыши.

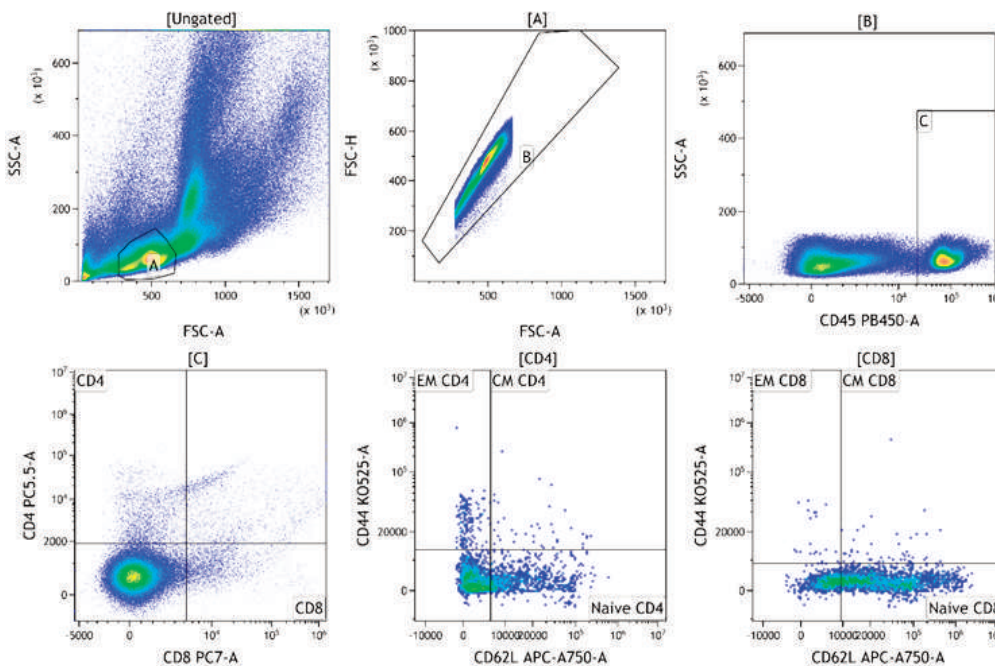


Рис. 2. Гистограмма субпопуляций Т-лимфоцитов клеток костного мозга мышат.

[2]. Рециркуляция иммунокомпетентных клеток между центральными и периферическими органами возможна благодаря маркерам, расположенным на поверхности лимфоцитов и рецепторам клеток.

В процессе иммунного ответа активизируется деятельность костного мозга и тимуса, образуется большое количество субпопуляций лимфоцитов и формируется иммунологическая память. [14].

**Заключение.**  $CD8^+$  Т-клетки эффекторной памяти ( $T_{EM}$ ) активно проникают в костный мозг. Значительное увеличение популяций лимфоцитов в костном мозге свидетельствует о активно-

сти процессов иммунопоеза.

В костном мозге накапливаются цитотоксические клетки и Т-клетки памяти, непосредственно отвечающие за адаптивный иммунитет.

На основании наших исследований можно предположить, что механизмы, происходящие в костном мозге, могут быть активированы не только в процессе иммунного ответа, но и путём колострального иммунитета, когда лимфоциты с молозивом попадают в организм новорождённого и запускают ответную реакцию в виде формирования иммунной памяти и клеточного иммунитета в целом.

## Литература

1. Шиффман Ф. Д. Патология физиологии крови: Пер. с англ / Ф. Д. Шиффман. — М. — СПб.: «Издательство БИНОМ» - «Невский диалект», 2000. — 448 с.
2. Воронин Е. С. Иммунология / Е. С. Воронин, А. М. Петров, М. М. Серых, Д. А. Дервишов. — Москва : Колос-Пресс, 2002. — 408 с. — ISBN 5-901705-11-4. — EDN QXESQF.
3. Bianco P. Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells / P. Bianco // Blood. — 2011. — № 117. — P. 5281–5289. doi: 10.1182/blood-2011-01-315069.
4. Gurkan U. A. The mechanical environment of bone marrow: a review / U. A. Gurkan, O. Akkus // Ann Biomed Eng. — 2008. — № 36. — 1978–1991. doi: 10.1007/s10439-008-9577-x.
5. Feuerer M. Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood borne antigen / M. Feuerer, P. Beckhove et al. // Nat Med. — 2003. — № 9. — 1151–1157. doi: 10.1038/nm914.
6. Duffy D. Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8<sup>+</sup> T cells / D. Duffy, H. Perrin et al. // Immunity. — 2012. — № 37. — P. 917–929.
7. Di Rosa F. Memory T-cell competition for bone marrow seeding / F. Di Rosa, A. Santoni // Immunology. — 2003. — № 108. — P. 296–304. doi: 10.1046/j.1365-2567.2003.01593.x
8. Mazo I. B. Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8<sup>+</sup> T cells / I. B. Mazo, M. Honczarenko et al. // Immunity. — 2005. — № 22. — P. 259–270.
9. Tokoyoda K. Professional memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow / K. Tokoyoda, S. Zehentmeier et al. // Immunity. — 2009. — № 30. — P. 721–730.
10. Pulle G. IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen-independent CD8 memory T cell survival / G. Pulle, M. Vidric, T. H. Watts // J Immunol. — 2006. — № 176. — P. 2739–2748.
11. Herndler-Brandstetter D. Human bone marrow hosts polyfunctional memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells with close contact to IL-15-producing cells / D. Herndler-Brandstetter, K. Landgraf et al. // J Immunol. — 2011. — № 186. — P. 6965–6971.
12. Di Rosa F. The bone marrow: a nest for migratory memory T cells / F. Di Rosa, R. Pabst // Trends Immunol. — 2005. — № 26. — P. 360–366. doi: 10.1016/j.it.2005.04.011.
13. Скопичев В. Г. Молоко: учеб. пособие / В. Г. Скопичев, Н. Н. Максимюк — Санкт-Петербург: Проспект Науки, 2011. — 368 с.
14. Скопичев В. Г. Иммунобиология молочной железы и молочная продуктивность / В. Г. Скопичев, В. Б. Прозоровский. — Beau Bassin: Lap LAMBERT Academic Publishing, 2018. — 328 с.
15. Panova N. A. A role for cellular immunity in early postpartum period / N. A. Panova, V. G. Skopichev // Medical Immunology (Russia). — 2021. — Vol. 23. — № 4. — P. 853–858.
16. Патент № 2743345 С1 Российская Федерация, МПК G01N 33/49. Способ оценки клеточного иммунитета при молозивном вскармливании животных: № 2019143557 : заявл. 20.12.2019 : опубл. 17.02.2021 / Н. А. Панова, В. Г. Скопичев; заявитель ФГБОУ ВО Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины ФГБОУ ВО СПбГАВМ. — EDN NCTBPY.

---

Panova N.

## Phenotype of bone marrow adaptive immune cells in lactating mice and newborn mice

### Abstract.

**Purpose:** To identify subpopulations of T- lymphocytes in the bone marrow of lactating mice and newborn mice.

**Materials and methods.** The studies were carried out in lactating mice and newborn mice. 2 groups of 5 animals each were formed. For the experiment, bone marrow was collected from the animals from the proximal femur. The head of the femur was cut off and the bone marrow was removed using a syringe, which was used to wash the bone marrow cavity with saline solution. The phenotype of adaptive immune cells was determined using a set of fluorochrome-conjugated antibodies: CD4-PerCP-Cy5.5, CD8-PE/Cy7, CD62L-APC/Cy7, CD44-

BV510. Data collection was carried out on a CytoFlex flow cytometer (Beckman Coulter, USA). The results were analyzed in the Kaluza Analysis 2.1 program.

**Results.** The study found that  $CD8^+$  T-cells of effector ( $T_{EM}; CD44^+CD62L^-$ ) and central memory ( $T_{CM}; CD44^+CD62L^+$ ) are greater in adults, while the proportion of  $CD4^+$  T-cells of naïve memory ( $T_{NV}; CD44^-CD62L^+$ ), predominates in pups. The content of the subpopulation of naïve memory  $CD8^+$  T-cells ( $T_{NV}; CD44^-CD62L^+$ ) is 1,31 times higher in newborn pups and amounted to  $81,97 \pm 2,38\%$  and  $62,57 \pm 1,48\%$ , respectively. A significantly low content of populations of  $CD4^+$  T-effector memory cells ( $T_{EM}; CD44^+CD62L^-$ ) in mice was established:  $5,62 \pm 2,15\%$  compared to adults  $13,26 \pm 1,93\%$  ( $p < 0,05$ ). Effector and central memory  $CD8^+$  T-cells ( $T_{EM}; T_{CM}$ ) enter the bone marrow in large numbers. This indicates that lymphocytes take an active part in the cellular mechanisms of the immune response. In the bone marrow, during immune reactions, numerous subpopulations of T-lymphocytes are formed and accumulate, in particular, cytotoxic cells and memory T-cells, which are directly responsible for adaptive immunity.

**Key words:** lactating mice; newborn mice; colostrum; Bone marrow; lymphocytes;  $CD8^+$  T-cells;  $CD4^+$  T-cells; immunological memory.

Author:

Panova N. — PhD (Biol. Sci.); e-mail: panova\_na@mail.ru.

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine; 196084, Russia, St. Petersburg, Chernigovskaya st., 5.

### References

- Shiffman F. D. Pathophysiology of blood: Transl. from English / F. D. Shiffman. — M. — St. Petersburg: "BINOM Publishing House" - "Nevsky Dialect", 2000. — 448 p.
- Voronin E. S. Immunology / E. S. Voronin, A. M. Petrov, M. M. Serykh, D. A. Dervishov. — Moscow: Kolos-Press, 2002. — 408 p. — ISBN 5-901705-11-4. — EDN QXESQF.
- Bianco P. Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells / P. Bianco // Blood. — 2011. — № 117. — P. 5281–5289. doi: 10.1182/blood-2011-01-315069.
- Gurkan U. A. The mechanical environment of bone marrow: a review / U. A. Gurkan, O. Akkus // Ann Biomed Eng. — 2008. — № 36. — 1978–1991. doi: 10.1007/s10439-008-9577-x.
- Feurerer M. Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood borne antigen / M. Feuerer, P. Beckhove et al. // Nat Med. — 2003. — № 9. — 1151–1157. doi: 10.1038/nm914.
- Duffy D. Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory  $CD8^+$  T cells / D. Duffy, H. Perrin et al. // Immunity. — 2012. — № 37. — P. 917–929.
- Di Rosa F. Memory T-cell competition for bone marrow seeding / F. Di Rosa, A. Santoni // Immunology. — 2003. — № 108. — P. 296–304. doi: 10.1046/j.1365-2567.2003.01593.x
- Mazo I. B. Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory  $CD8^+$  T cells / I. B. Mazo, M. Honczarenko et al. // Immunity. — 2005. — № 22. — P. 259–270.
- Tokoyoda K. Professional memory  $CD4^+$  T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow / K. Tokoyoda, S. Zehentmeier et al. // Immunity. — 2009. — № 30. — P. 721–730.
- Pulle G. IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes antigen-independent  $CD8$  memory T cell survival / G. Pulle, M. Vidric, T. H. Watts // J Immunol. — 2006. — № 176. — P. 2739–2748.
- Herndler-Brandstetter D. Human bone marrow hosts polyfunctional memory  $CD4^+$  and  $CD8^+$  T cells with close contact to IL-15-producing cells / D. Herndler-Brandstetter, K. Landgraf et al. // J Immunol. — 2011. — № 186. — P. 6965–6971.
- Di Rosa F. The bone marrow: a nest for migratory memory T cells / F. Di Rosa, R. Pabst // Trends Immunol. — 2005. — № 26. — P. 360–366. doi: 10.1016/j.it.2005.04.011.
- Skopichev V. G. Milk: a textbook / V. G. Skopichev, N. N. Maksimuk — St. Petersburg: Prospect Nauki, 2011. — 368 p.
- Skopichev V. G. Immunobiology of the mammary gland and milk productivity / V. G. Skopichev, V. B. Prozorovsky. — Beau Bassin: Lap LAMBERT Academic Publishing, 2018. — 328 p.
- Panova N. A. A role for cellular immunity in early postpartum period / N. A. Panova, V. G. Skopichev // Medical Immunology (Russia). — 2021. — Vol. 23. — № 4. — P. 853–858.
- Patent No. 2743345 C1 Russian Federation, IPC G01N 33/49. Method for assessing cellular immunity during colostrum feeding of animals: No. 2019143557: declared. 20.12.2019: published. 17.02.2021 / N. A. Panova, V. G. Skopichev; applicant FSBEI HE St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine FSBEI HE SPbGAVM.