

Санкт–Петербургский Государственный университет
Биологический факультет
Кафедра цитологии и гистологии

Давыдова Алина Алексеевна

**Анализ дифференцировки минорных популяций
ТИМОЦИТОВ**

Выпускная квалификационная работа магистра

Работа выполнена в отделе
иммунологии
ФГБУ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН.

Научный руководитель:
д.м.н., проф. Серебряная Н.Б.

Научный консультант:
д.б.н., проф. Полевщиков А.В.

Зав. кафедрой:
д.б.н. проф. Харазова А.Д.

Санкт–Петербург 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. КРАТКИЙ АНАЛИЗ СОЗРЕВАНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-ЛИМФОЦИТОВ.....	7
1.1. Основные этапы дифференцировки Т-лимфоцитов в тимусе.....	7
1.2. Краткий обзор основных популяций тимоцитов.....	10
ГЛАВА 2. Проблема определения DN2 клеток.....	12
2.1. Коммитирование предшественников Т-клеток.....	12
2.2. Выделение DN2 клеток как отдельной субпопуляции.....	12
ГЛАВА 3. НК-КЛЕТКИ.....	17
3.1. Фенотип и субпопуляции НК-клеток.....	17
3.1.1. Выделение субпопуляции НК-клеток по CD127.....	19
3.1.2. НК-клетки памяти.....	22
3.2. Дифференцировка НК-клеток на периферии.....	23
3.3. Тимические НК-клетки.....	26
3.3.1. Выбор пути дифференцировки НК-клеток во время раннего тимопоэза.....	28
3.3.2. Модели развития тимических НК-клеток.....	32
3.3.3. Тимические НК-клетки на периферии.....	33
3.4. Функции НК-клеток.....	33
3.4.1. Контактный цитотоксический.....	35
3.4.1.1. Иммунный синапс.....	36
3.4.1.2. Механизмы контактного цитотоксического.....	37
3.4.2. Антителозависимая клеточная цитотоксичность.....	41
3.4.3. Продукция цитокинов.....	41
ГЛАВА 4. ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ.....	44
4.1 Тучные клетки: определение, фенотип, функции.....	44
4.2. Тимические тучные клетки.....	47
4.3. Дифференцировка предшественников тучных клеток.....	48
ГЛАВА 5. Т-регуляторные лимфоциты (Treg).....	51
5.1. История открытия Treg.....	51
5.2. Фенотип Treg.....	51
5.3. Субпопуляции Treg.....	53
5.3.1. Естественные Treg.....	53
5.3.2. Адаптивные Treg.....	55
5.4. Функции Treg.....	56
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	59
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	62
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	63

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ККМ – красный костный мозг

APC – antigene-presenting cells – антиген-презентирующие клетки

BID – BH3 interacting- domain death agonist – ген BID, член семейства белков Bcl-2

BMCP – basophil/mast cell progenitor – бипотентный предшественник тучных клеток и базофилов

CAD – caspase- activated DNase endonuclease – каспаз-активированная ДНКаза эндонуклеаза

Casp – caspase – каспаза

CCR, CXCR – chemokine receptor – рецептор хемокина

CD – clusters of differentiation – кластер дифференцировки

c-kit (CD117) – рецептор к фактору роста стволовых клеток

CLP – common lymphoid progenitor – общий лимфоидный предшественник

CMP – common myeloid progenitor – общий миелоидный предшественник

CMV – cytomegalovirus – цитомегаловирусная инфекция

DN – double negative T-cells – дважды негативные T- клетки (CD4-CD8-)

DN1-4 - double negative T-cells 1-4 – стадии дифференцировки DN

DP – double positive T-cells – дважды позитивные T-клетки (CD4+CD8+)

EGFP - Enhanced Green Fluorescent Protein – зеленый флуоресцентный белок

ETP – early T-cell progenitor – ранний предшественник T-клеток

FcεRI – high -affinity IgE receptor – высокоаффинный рецептор к иммуноглобулину E

FcγRI – high -affinity IgG receptor – высокоаффинный рецептор к иммуноглобулину G

FoxP3 – forkhead box P3 – белок семейства FoxP3

GITR - glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor – глюкокортикоид-индуцированный рецептор семейства фактора некроза опухоли

GM-CSF – granulocyte-macrophage colony stimulating factor –
гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

GMP – granulocytic-macrophagal progenitor – гранулоцитарно-макрофагальный
гранулоцитарно-макрофагальный предшественник

HIV – human immunodeficiency virus – вирус иммунодефицита человека

HSC –hematopoetic stem cell – гемопоэтическая стволовая клетка

IL – interleukin – интерлейкин

IFN – interferon - интерферон

KIR – killer cell Ig-like receptor – киллерные иммуноглобулиноподобные
рецепторы

LFA – lymphocyte function-assotiated antigene – интегрин $\alpha_L\beta_2$

MCP –mast-cell comitted progenitor – коммитированный предшественник
тучных клеток

MHC – major histocompatibility complex – главный комплекс
гистосовместимости

mMCP – mouse mast cell protease – протеаза тучных клеток мыши

MPP – multipotent progenitor – мультипотентный предшественник

mTEC – medullary thymic epithelial cells – медуллярные эпителиальные клетки тимуса

NFAT – nuclear factor of activated cells – ядерный фактор активированных
Т-клеток

Nfil3 (E4BP4) – nuclear factor, interleukin 3 regulated – ядерный фактор,
регулируемый интерлейкином-3

NGF – nerve growth factor –фактор роста нервов

NK – natural killers – естественные (натуральные) киллеры

NKG – natural killer group – рецепторы NK-группы

NKT – natural killer T cells – естественные киллерные Т-клетки

OX40L – tumor necrosis factor ligand superfamily member 4 –
цитокин семейства факторов некроза опухоли, лиганд рецептора
CD134 (OX40)

SP – single positive T-cells – однопозитивные Т-клетки CD4+ или CD8+

SMAC – supramolecular activation cluster – супрамолекулярный активационный кластер

TGF β – transforming growth factor β – трансформирующий фактор роста β

Th – T-helpers – Т-хелперы

TNF – tumor necrosis factor – фактор некроза опухоли

TOX – thymocyte selection associated high mobility group box – высококомобильная группа, ассоциированная с селекцией тимоцитов

Treg – T-regulatory lymphocytes – Т-регуляторные лимфоциты

WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) – белок синдрома Вискотта-Олдрича

YAC-1 – Moloney murine leukemia cells virus (Mo-MuLV) induced – клетки лимфомы, индуцированной *in vivo* вирусом лейкемии Молони

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Тимус, являясь центральным органом иммунной системы, отвечает за дифференцировку и созревание Т-лимфоцитов. Протекающие в нем процессы играют немаловажную роль в нормальном функционировании организма и заслуживают всестороннего изучения. На сегодняшний день накоплен огромный объем литературных данных, посвященных различным аспектам структурно-функциональной организации тимуса, однако некоторые вопросы до сих пор остаются малоизученными.

На сегодняшний день общепринятая схема созревания и дифференцировки тимоцитов подвергается сомнениям, поскольку появляются все новые экспериментальные данные, не соответствующие устоявшейся теории. Так, одной из основных стадий дифференцировки тимоцитов является β -селекция, в ходе которой происходит реаранжировка β -цепи Т-клеточного рецептора, знаменующая коммитирование дифференцирующегося предшественника к Т-клеточной линии. Согласно общему мнению, клетки, неудачно завершившие данный этап, подвергаются апоптозу. Однако в литературе появляется все больше данных о том, что для таких клеток есть и альтернативные, не Т-клеточные пути.

Целью данной работы является обзор и анализ литературы, посвященной процессам, происходящим в тимусе с точки зрения формирования альтернативных клеточных популяций, отличных от CD4⁺ и CD8⁺ клеток.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Анализ популяции DN2 как одной из ключевых точек, в которой возможно переключение на альтернативный клеточный путь;
2. Анализ NK-клеток как одного из возможных боковых путей дифференцировки DN2 клеток;
3. Анализ тучных клеток одного из возможных боковых путей дифференцировки DN2 клеток;
4. Анализ Т-регуляторных лимфоцитов как модификации SP клеток.

Структура и объём работы. Работа изложена на 78 страницах текста, проиллюстрирована 17 рисунками, включая 16 цветных схем и 1 цитограмму. Список цитированной литературы содержит 190 источников, в том числе 6 на русском языке и 184 на иностранных языках.

ГЛАВА 1. КРАТКИЙ АНАЛИЗ СОЗРЕВАНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Т-клетки — популяция лимфоцитов, основные этапы развития которых проходят в тимусе, что и определило их название (тимусзависимые, или Т-лимфоциты). Для них характерен определенный способ распознавания антигенов (большинство Т-клеток распознают комплекс антигенов с молекулами МНС) и участие в реализации иммунного ответа в качестве исполнительных и регуляторных клеток.

Т-лимфоциты морфологически малоотличимы от В-лимфоцитов. Эти клетки дифференцируют по экспрессии на их поверхности маркерных молекул. Общий маркер для всех разновидностей Т-лимфоцитов, отсутствующий у других клеток — молекулярный комплекс TCR–CD3. Этот комплекс включает антигенраспознающий гетеродимер TCR и вспомогательный молекулярный комплекс CD3. Выявление CD3 константных молекул, общих для всех разновидностей Т-лимфоцитов применяют для идентификации Т-клеток (моноклональные анти-CD3-антитела обычно распознают ϵ -цепь этого комплекса) [190].

1.1. Основные этапы дифференцировки Т-лимфоцитов в тимусе (рис. 1)

1. Появление в тимусе клетки-предшественника.

Общепринятой точкой зрения на настоящий момент является суждение о том, что тимус не имеет собственной возобновляющейся популяции предшественников Т-клеток [17, 184]. Это утверждение основано на результатах экспериментов по трансплантации участка тимуса, Т-лимфоциты которого в течение 4 недель замещались клетками костномозгового происхождения реципиента [17]. В костном мозге обнаруживаются мультипотентные стволовые клетки, которые можно разделить на группы в соответствии с профилем экспрессии антигенов, которые при переносе в тимус способны давать начало клеточным линиям, позже дифференцирующимся в CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты. Однако остается нерешенным вопрос о том, какая именно популяция потенциальных Т-клеточных предшественников проникает в тимус и дает начало зрелым тимоцитам. Наиболее часто эту роль приписывают популяции общих лимфоидных предшественников (CLP), в которой выделяют подгруппу CLP-2, характеризующуюся фенотипом CD117^{-/low} B220⁺ [97]. и способную давать начало как В-, так и Т-лимфоцитам. Кроме того, в костном мозге выделяют популяцию мультипотентных клеток-предшественников, среди которых присутствует группа, коммитированная к дифференцировке по лимфоцитарному пути (LMPP). Данная группа примечательна наличием продуктов экспрессии генов *RAG* и *IL7Ra*, характерных для лимфоцитов [64]. Обе эти популяции способны к формированию зрелых тимоцитов при переносе в тимус, при этом гемопоэтические стволовые клетки (HSC), которые присутствуют в костном мозге и дают начало клеткам как лимфоидного, так и

миелоидного ряда, при переносе в тимус оказываются неспособными к дифференцировке в Т-лимфоциты [143]. Вполне возможно, что костномозговыми предшественниками Т-лимфоцитов могут являться как LMPP, так и CLP, поскольку обе эти популяции имеют хемокиновые рецепторы CCR7 и CCR9, которые играют ключевую роль в их проникновении в тимус [80, 86, 143, 184]. Стромальные клетки тимуса экспрессируют хемоаттрактанты к этим рецепторам, привлекая таким образом клетки-предшественники. CCR7 и CCR9 важны для проникновения предшественников в тимус, однако работы на мышцах нокаутных по генам этих рецепторов показали, что существуют и другие механизмы проникновения предшественников в тимус, которые на данный момент мало изучены [80, 184]. Тимус таких мышей имеет практически не отличимый от нормального клеточный состав, что по мнению авторов исследования, является следствием компенсаторного усиления пролиферации лимфоидных предшественников, проникших в тимус альтернативным путем.

Некоторые исследователи придерживаются иной точки зрения. Они полагают, что тимус не нуждается в костномозговых предшественниках для формирования полноценного пула иммунокомпетентных Т-лимфоцитов [20, 92, 118]. В недавних исследованиях было показано, что при пересадке тимуса мышам, у которых отсутствуют гемопоэтические стволовые клетки, дающие начало Т-клеточным предшественникам по причине мутации по генам RAG2, γ_c , c-kit (CD117), продукция функционально активных тимоцитов продолжается, как минимум, в течение нескольких месяцев после трансплантации [98].

2. Коммитирование к дифференцировке по Т-клеточному пути.

На данном этапе предшественники тимоцитов обозначаются как DN1 и имеют фенотип CD4⁻CD8⁻CD3⁻CD44⁺. Они обладают высоким пролиферативным потенциалом и способны давать начало популяциям $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов [49, 176]. Среди них выделяют ранних тимических предшественников (ETP), которые характеризуются фенотипом CD4⁻CD8⁻CD3⁻CD25⁻CD44⁺lin^{low}CD117^{high}, а также высокой экспрессией гена c-kit [3, 100, 122]. Примечательно, что эти ETP составляют всего 0,01% от всей популяции DN1. Исследования показывают, что популяция DN1 представлена мультипотентными клетками, способными давать начало не только Т-, но и В-лимфоцитам, а также клеткам миелоидного ряда [56, 66, 137] однако эта способность исчезает уже на следующей стадии DN2, что связано с появлением поверхностного маркера CD7 [56]

3. Индукция реаранжировки генов Т-клеточного рецептора.

На данной стадии клетки обозначают как DN2, они характеризуются фенотипом CD4⁻CD8⁻CD3⁻CD44⁺CD25⁺. Ключевым событием здесь является начало реаранжировки генов Т-клеточного рецептора (TCR) – процесса, приводящего к формированию популяций

$\alpha\beta$ и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов на стадии DN3, Это является одной из основных целей дифференцировки тимоцитов и приводит к появлению на стадии DN3 популяций $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$ Т-клеток.

4. Разделение альтернативных путей дифференцировки Т-клеток.

На стадии DN3 происходит разделение дифференцирующихся Т-клеток на популяции в зависимости от типа представленного на их поверхности TCR ($\gamma\delta$ – образован цепями γ и δ ; $\alpha\beta$ – образован цепями α и β). . Разделение на $\gamma\delta$ Т- и $\alpha\beta$ Т-клетки — наиболее фундаментальное проявление разнообразия Т-лимфоцитов. Типы Т-клеточного рецептора различаются по характеру распознаваемого антигена, а лимфоциты, несущие разные типы TCR, различаются по локализации в тканях и функциям. Так $\alpha\beta$ Т-лимфоциты локализуются главным образом в тимусе и периферических лимфоидных органах, тогда как $\gamma\delta$ Т-клетки являются основными Т-лимфоцитами кожи и слизистых оболочек [87]. На стадии DN3 на мембране Т-клетки появляется либо уже собранный $\gamma\delta$ TCR, либо β -цепь TCR вместе с суррогатной цепью $\rho\Gamma\alpha$ - это и есть переход к следующей стадии дифференцировки Т-лимфоцитов (DN4).

5. Позитивная селекция созревающих Т-лимфоцитов (β -селекция).

Клетки экспрессируют маркеры CD4 и CD8, параллельно утрачивая CD44 и CD25, и переходят в стадию DP. На основании способности тимоцитов распознавать молекулы МНС, экспрессируемые клетками стромы тимуса, осуществляется процесс позитивной селекции. Предполагается, что отбор проходят лишь клетки, обладающие умеренным (средним) уровнем аффинности TCR к комплексу «антиген-МНС», а клетки с высоким или низким уровнем аффинности гибнут путем апоптоза [171]

6. Разделение популяций CD⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Негативная селекция.

На данном этапе формируется популяция SP-лимфоцитов. Происходит реаранжировка α -цепи в составе $\alpha\beta$ TCR. Клетки мигрируют в медуллярную зону тимуса, и в ходе этого перехода осуществляется еще один ключевой процесс – негативная селекция. Смысл ее заключается в элиминации аутореактивных Т-лимфоцитов, способных к связыванию аутоантигенов и, следовательно, к атаке собственных клеток организма.

Таким образом, оба ключевых этапа дифференцировки Т-лимфоцитов – позитивная и негативная селекция – происходят при непосредственном участии аутоантигенов. Принципиальное различие заключается в том, что определяющим условием для прохождения позитивной селекции является способность распознавать молекулы МНС собственного организма, а для негативной селекции, напротив – толерантность к ним. Одновременно тимоциты делятся на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, экспрессирующие высокий

уровень TCR в комплексе с корецептором CD3, которые утрачивают молекулу CD44 и покидают тимус [37].

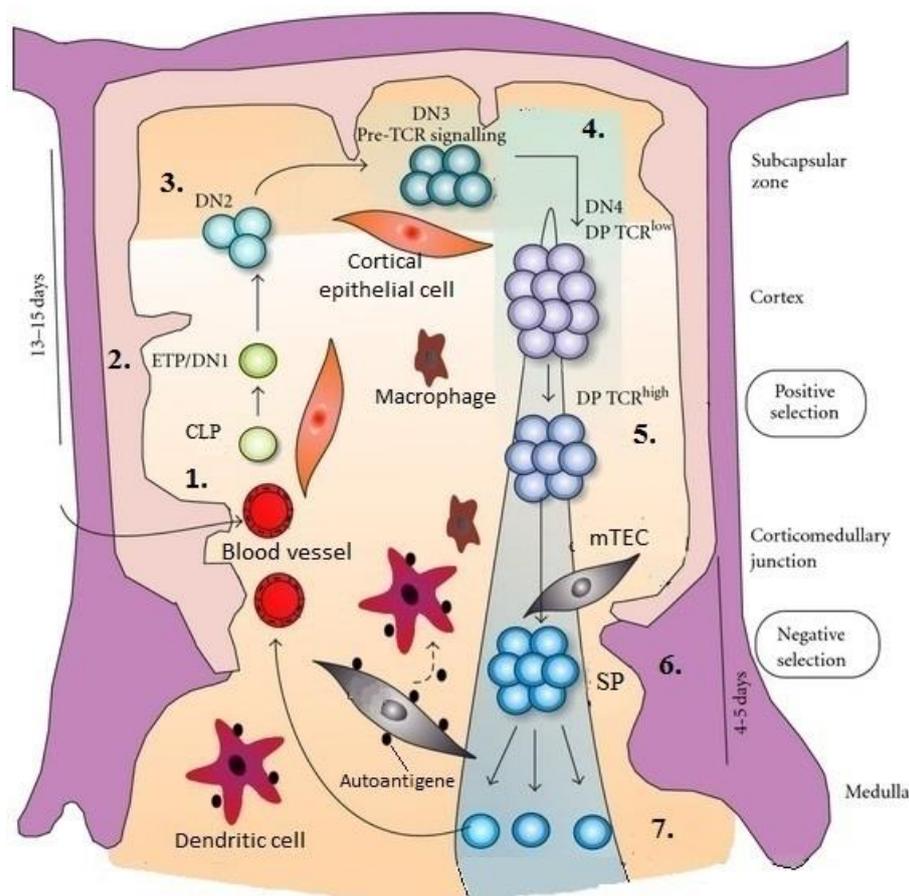


Рис. 1. Основные этапы дифференцировки Т-лимфоцитов в тимусе (De Meis, 2012) [102] с изменениями. Dendritic cell – дендритная клетка, autoantigene – аутоантиген, blood vessel – кровеносный сосуд, macrophage – макрофаг, cortical epithelial cell – эпителиальная клетка кортекса, pre-TCR-signaling – пре-TCR-сигнализация, subcapsular zone – субкапсулярная зона, cortex – кортекс (корковое вещество), corticomedullary junction – кортикомедуллярная граница, medulla – медулла (мозговое вещество), positive selection – позитивная селекция, negative selection – негативная селекция.

1.2. Краткий обзор основных популяций тимоцитов

Субпопуляции Т-клеток отличаются по поверхностным маркерам, способу распознавания антигена и функциям. Среди наивных Т-лимфоцитов (клеток, не контактировавших с чужеродным антигеном) выделяют две основные субпопуляции, отличающиеся по структуре TCR, о чем упоминалось выше, причем Т-клетка может нести только один вариант TCR. Выделяют еще несколько субпопуляций Т-клеток, обозначаемых как естественные, то есть формирующиеся в процессе нормального развития, независимо от поступления в организм чужеродных антигенов (рис. 2). Это важно для отличия этой

формы гетерогенности клеток от адаптивного разнообразия Т-клеток — их субпопуляций, формирующихся в ходе иммунного ответа [190]

В составе $\alpha\beta$ Т-клеток выделяют 4 субпопуляции. Две основные субпопуляции $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов различают по экспрессии корецепторов CD8 или CD4 и, соответственно, по способу распознавания антигена в составе молекул МНС-I или МНС-II. CD8+ Т-лимфоциты выполняют функции цитотоксических клеток, что и определило их название — цитотоксические Т-лимфоциты, или Т-киллеры. Большинство CD4+ Т-клеток относят к Т-хелперам - они поставляют вспомогательные сигналы при активации В-лимфоцитов и макрофагов. Взаимодействие Th с дендритными клетками (DC) является пусковым событием Т-зависимого иммунного ответа [190]. Но существуют также CD4+-клетки, главными функциями которых является ингибирование иммунного ответа и предупреждение аутоиммунных реакций. Эта особая субпопуляция тимоцитов получила название Т-регуляторных лимфоцитов (Treg).

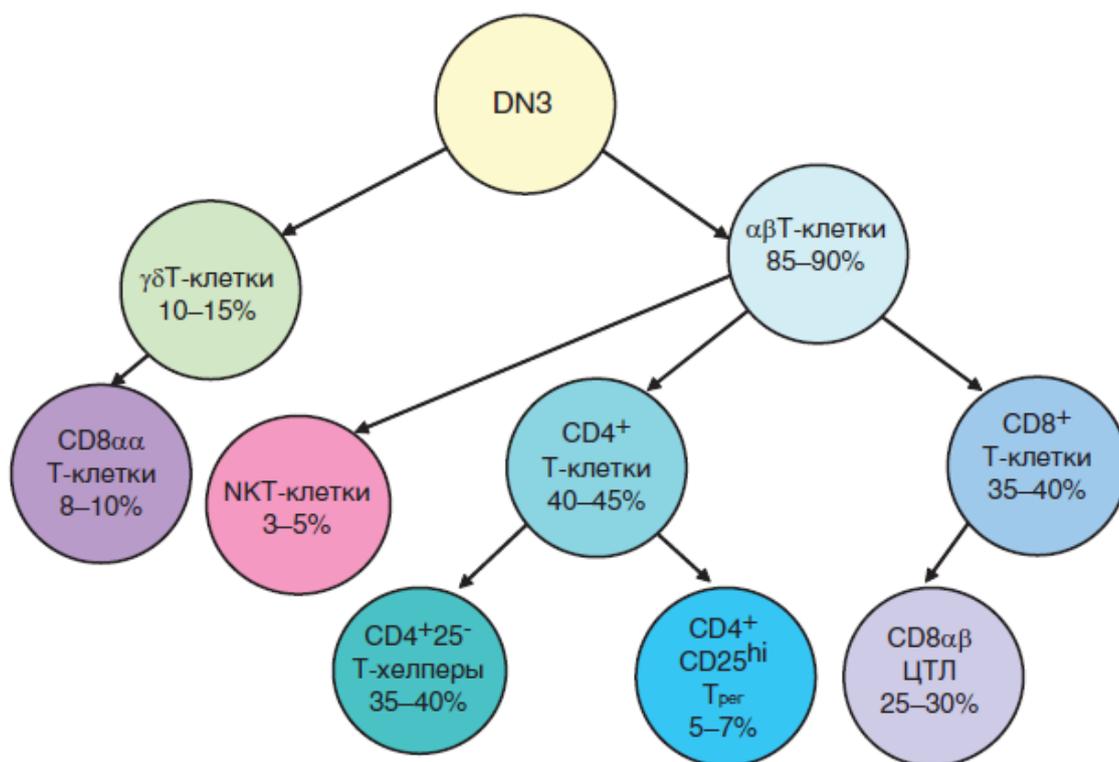


Рис. 2. Развитие естественных субпопуляций Т-лимфоцитов (Ярилин, 2010) [190]. Схематично представлена дифференцировка основных естественных субпопуляций Т-лимфоцитов, начиная от стадии DN3.

ГЛАВА 2. ПРОБЛЕМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ DN2 КЛЕТОК

2.1. Коммитирование предшественников Т-клеток

Изначально гемопоэтические стволовые клетки обладают потенциалом развития 10 или более различных клеточных линий, в том числе естественных киллеров (NK), Т- и В-лимфоцитов, а также их субпопуляций. При коммитировании к Т-клеточному пути происходит упорядоченная потеря доступа к этим судьбам. На момент прихода в тимус предшественники уже утрачивают способность к образованию эритроидных клеток и мегакариоцитов, но наиболее незрелые клетки тимуса сохраняют потенциал дендритных клеток, NK-клеток, макрофагов и гранулоцитов, а также потенциал тучных клеток и В-клеток в дополнение к потенциалу Т-клеток. При развитии Т-клеток эмбриона мыши потенциал В-клеток быстро утрачивается [28] еще до прихода клеток в тимус [39, 50]. Однако потенциал NK-клеток, DC и миелоидных клеток сохраняются до более поздней интратимической стадии, как в эмбриональном, так и в постнатальном периоде, если клетки находятся в соответствующих условиях. Эти NK- и DC-потенциалы затем исчезают при более позднем переходе между стадиями DN2 (c-Kit + CD44 + CD25 +) и DN3 (c-Kit^{low} CD44-CD25 +) (14-18), а точнее, между DN2a, (c-Kit ++)) и DN2b (c-Kit +) (19,20). Отдельные клетки на стадии DN2 (DN2a) все еще могут давать начало нескольким линиям, включая Т-клетки, а также NK-клетки, макрофаги, DC или даже гранулоциты [1, 26, 77, 82, 176]; напротив, клетки на следующей стадии (DN2b) утрачивают эту способность [51, 110]. Этот последний этап исключения альтернативных судеб завершает коммитирование к Т-клеточному пути.

2.2. Выделение DN2 клеток как отдельной субпопуляции

DN клетки сами по себе являются гетерогенными, однако комбинированный фенотипический и молекулярный анализ показывает, что их фенотипическая прогрессия от CD44+CD25- (DN1) через CD44+CD25+ (DN2) и CD44-CD25+ (DN3) и, наконец, к CD25-CD44- (DN4) клеткам является частью схемы дифференцировки Т-клеток [29, 50].

DN1 и DN2 клетки также были описаны как клетки CD4^{low} [176]. CD44+CD25- DN1 клетки составляют около 10% от общего количества DN клеток, но при этом остаются гетерогенной популяцией, содержащей зрелые клетки, а также предшественники других линий, таких как NK-клетки, [26] DC, [7] макрофаги, [82] и В-клетки [176]. Стратегии, при которых DN клетки окрашиваются специфическими для линии маркерами, использовались ранее, но общепринятая стратегия не была выработана [29]. Некоторое время назад Godfrey et al. (1992). использовали экспрессию CD117 (C-kit) для

идентификации DN1 клеток с потенциалом предшественника Т-клеток [51] CD117+ DN1-клетки, пролиферирующие *in vitro* в присутствии цитокинов, включая IL-7, отлично воссоздали линию Т-клеток и содержали клетки с генами TCR β во врожденной конфигурации, свойственные ранним предшественникам [50]

Как уже было сказано выше, потенциал миелоидной линии присутствует не только в ETP/DN1a/b-клетках [29, 81, 137], но сохраняется также на развивающихся тимоцитах, пока они дифференцируют до CD117++, CD44++, CD25++, Lin- , CD135- , DN2 тимоцитов. Действительно, некоторые отдельные колонии макрофагов, полученные из DN2-timoцитов, содержали (D)J- реаранжировки Т-клеточного рецептора (TCR) β [13]. Потенциал ранних тимических предшественников хорошо согласуется с последовательной моделью детерминации HSC [24] Тем не менее, правильная идентификация DN2 тимоцитов проблематична и сведения о их переходе на следующую стадию развития тимоцитов (DN3), где коммитирование к развитию по Т-клеточной линии фактически завершено, все еще отрывочны [27]

Первоначально клетки DN2, то есть клетки post-DN1, экспрессирующие как CD44, так и CD25 (цепь IL2Ra), были описаны Лесли и Хайманом [83]. В последствии, субпопуляция CD3- CD4- CD8-, так называемых "трижды отрицательных" тимоцитов, экспрессирующих как CD44, так и CD25, была названа Godfrey et al. DN2 клетками и определены как CD117 гомогенно яркие, CD24 гомогенно яркие, CD90 гетерогенные клетки равномерно большого размера [49]. Позже эта же группа показала, что клетки DN2 содержали реаранжировки обеих цепей TCR (γ и δ), но мало перестроек гена TCR β . По данным авторов, правильно определенные DN2 тимоциты однородно велики во всех исследованных до сих пор линиях мышей, включая нокаутированных по гену *pT α* мышей, и являются наиболее быстро циркулирующей субпопуляцией ранних тимоцитов [27].

Дополнительные эксперименты касались событий, происходящих в клетках DN2. Так, у мышей-нокаутов по гену цепи γ (γ c) общего рецептора цитокинов наблюдалось лишь частичное развитие тимоцитов, а у мышей с двойным нокаутом γ c x *pT α* , оно оказалось полностью заблокированным на стадии DN2 [139]; экспрессия CD117 в этих экспериментах не анализировалась. Было показано, что экспрессия IL-7Ra (CD127) на DN2-клетках неоднородна, и что субпопуляция IL-7R^{hi} с большей вероятностью дифференцируется в $\gamma\delta$ Т-клетки. В последствии, и как недавно обсуждалось [79], было показано, что культивированные DN2 клетки в присутствии OP9 стромальных клеток и при отсутствии Notch-сигналинга, дают как TCR $\gamma\delta$, так и TCR $\alpha\beta$ клетки. Полученные из

DN2 TCR $\gamma\delta$ клетки оказались CD24^{low}, и как было показано на TCR δ EGFP-нокаутированных мышах [123], могут представлять собой зрелые TCR $\gamma\delta$ клетки среди DN2-тимоцитов.

Вопрос, который остается спорным, состоит в том, существуют ли DN2-клетки как отдельная популяция. DN2 клетки имеют фенотип CD3⁻, CD117⁺⁺, CD44⁺⁺ и CD25⁺ [13, 29]. Распределение CD117 на главных предшественниках тимоцитов показывает четкую точку перегиба (рис. 3) и идентификация клеток CD117⁺⁺ не вызывает трудностей. Тщательный анализ показал, что плотность CD117 на клетках DN2 аналогична таковой на ETP; явное увеличение экспрессии CD117 на клетках DN2 связано с их относительно большим размером. Однако экспрессия CD44 на поверхности DN2 действительно ниже, чем на DN1 клетках (рис. 3). Как DN2, так и DN3 тимоциты требуют Notch-сигналинга для роста и развития [12], но одно из ключевых событий перехода DN2/DN3 заключается в том, что, несмотря на сохранение Notch-сигналинга, развивающиеся DN3 клетки не в состоянии поддерживать высокий уровень экспрессии CD117, CD127 и CD44. Как именно распределяется сигнализация между Notch и этими генами на транскрипционном уровне, пока остается неясным [27].

В 1999 году появились данные о новом определении DN2-клеток: их стали идентифицировать как CD117⁺⁺, CD44⁺⁺ CD25⁺ трижды-отрицательные клетки, i.e. (внутриклеточно) CD3 ϵ ⁻, в то время как CD117^{+/-}, CD44⁺ CD25⁺ DN3 клетки были i.e. CD3 ϵ ⁺ [174]. В данной работе, было ясно, что экспрессия CD44 на i.e. CD3 ϵ ⁻ и CD3 ϵ ⁺ субпопуляциях, гейтированных по CD25⁺ клеткам перекрывается, но не учтена причина этого явления: могут ли некоторые DN2 клетки быть i.e. CD3 ϵ ⁺ или же некоторые DN3 клетки были i.e. CD3 ϵ ⁻. Тщательный анализ, проведенный Ceredig et al. [27] (рис. 3) показывает, что переход тимоцитов от стадии DN2 к DN3, определенных по экспрессии i.e. CD3 ϵ , не может основываться только на экспрессии CD44. Поэтому для различения CD44⁺⁺ (DN2) и CD44^{+/-} (DN3) клеток, использование вертикальной линии квадрантов флуоресценции CD44, как это до сих пор часто применяется во многих исследованиях [4, 99, 134], было бы некорректно. Экспрессия i.e. CD3 ϵ предшествует TCR β V(D)J реаранжировкам и последующей внутриклеточной экспрессии белка TCR β [79, 174]. В свою очередь, экспрессия белка TCR β [174] и коррелятивная экспрессия CD27 [4, 79] явно изменяют пролиферативное поведение субпопуляций DN3. Кроме того (рис. 3), некоторые клетки DN3 i.e. CD3 ϵ ⁻, представляют не T-клеточную линию [27].

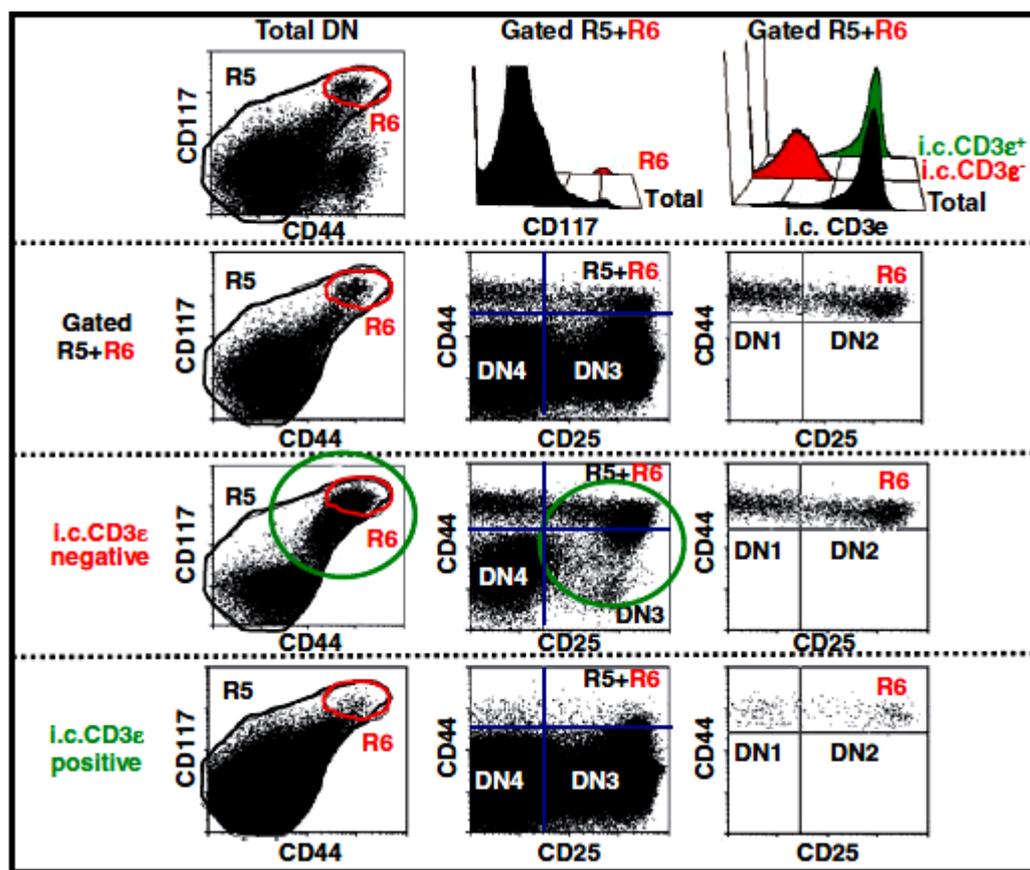


Рис. 3. Цитоплазматическое окрашивание CD3ε (Ceredig, R et al., 2008) [27].

На цитограммах показаны типичные результаты четырехцветного окрашивания клеток DN, окрашенных на CD117, CD44, CD25 и i.c. CD3ε. В верхнем ряду, слева CD117 vs CD44, гейты используются для определения T-линии (черный гейт, R5) и клеток CD117++ (красный гейт, R6). На средней верхней панели гистограмма CD117 клеток гейтированных по R5 и R6 (имеется отчетливая точка перегиба CD117++ клеток). На правой верхней гистограмме отображены все i.c. CD3ε клетки, гейтированные по R5+R6, а также субпопуляции CD3ε+ и CD3ε-. Во втором ряду – гейтированные профили всех клеток R5+R6, изображающие CD44 vs CD25 на всех субпопуляциях DN (R5+R6, средняя панель) или на DN1 и DN2-клетках (R6, крайняя правая цитограмма). Синие линии квадрантов на средней панели – типичные гейты четырех стадий DN. Положение горизонтальной синей линии определяется нижним уровнем экспрессии CD44 R6-клетками. При создании дополнительного гейта для CD3ε - клеток (третий ряд), ясно, что i.c. CD3ε клетки перекрываются с горизонтальной синей линией, входя в область DN3 (средняя панель, показано зеленым). Кроме того, отмеченная субпопуляция DN3-клеток является CD3ε -. Большая часть DN4 клеток также являющаяся i.c. CD3ε -, представляет клетки не T-клеточной линии. При анализе i.c. CD3ε + клеток (нижний ряд), некоторые i.c. CD3ε + клетки находятся явно выше синей горизонтальной линии и представляют собой смесь

DN1 и DN2 тимоцитов (нижняя правая панель, R6). Такие клетки, экспрессирующие TCR $\gamma\delta$, могут быть изолированы поверхностной экспрессией i.c CD3 ϵ .

Таким образом, с имеющимися в настоящее время стратегиями окрашивания и анализа, довольно трудно правильно выделить DN2 клетки из DN3. Для определения этой ключевой стадии в развитии тимоцитов, которая совпадает с полным коммитированием к Т-клеточной линии, необходимы дальнейшие исследования и поиск новых подходов к изучению. Кроме того, открытым остается вопрос о выделении DN2 как отдельной клеточной популяции

Далее будут рассмотрены некоторые альтернативные пути, возможные при дифференцировке DN2 клеток, в частности, NK- и тучные клетки.

ГЛАВА 3. НК-КЛЕТКИ

Естественные или натуральные киллеры (НК-клетки) – это гетерогенная популяция лимфоцитов, относящаяся к системе врожденного иммунитета. Отличительными особенностями этих клеток является способность к контактному цитолизу вирус-инфицированных и опухолевых клеток без предварительной иммунизации, а также продукция цитокинов и хемокинов, стимулирующих другие клетки иммунной системы и способствующих развитию иммунного ответа [190].

НК-клетки были описаны в 1976 г. как большие гранулярные лимфоциты, средний диаметр которых колеблется в диапазоне 7-12 мкм в зависимости от функционального состояния. Азурофильные гранулы НК-клеток содержат перфорины, гранзимы, гранулизины и другие активные вещества, посредством которых и осуществляется основная функция естественных киллеров – контактный цитолитиз. Помимо цитолитической активности НК-клетки обладают способностью к продукции ряда цитокинов и хемокинов и являются ключевыми участниками противовирусного и противоопухолевого иммунитета [113]. Их относят к короткоживущим клеткам: время жизни большинства из них составляет несколько дней, хотя в настоящее время обнаружено, что некоторые НК-клетки могут персистировать в организме до нескольких месяцев [103, 186].

Первоначально принципиальные различия между НК-клетками и Т-лимфоцитами оставались неясными, теперь же не вызывает сомнений тот факт, что НК-клетки представляют собой отдельную линию клеток, которая формируется из CLP в костном мозге. Они не несут на своей поверхности антигенспецифических рецепторов подобно клеткам адаптивного иммунитета, но экспрессируют различные рецепторы, с помощью которых могут распознавать собственные модифицированные и инфицированные клетки организма. НК-клетки играют важную роль в раннем иммунном ответе при вирусных инфекциях задолго до развития адаптивного иммунного ответа [113].

3.1. Фенотип и субпопуляции НК-клеток

НК-клетки не несут на своей поверхности рецепторов как у Т- и В-клеток, но обладают набором активирующих и ингибирующих рецепторов, не требующих V(D)J-реаранжировки генов. Экспрессия определенных маркеров связана со стадией дифференцировки НК-клеток либо с их активацией, поэтому их распределение в пуле НК-клеток неравномерно [186]. НК-клетки экспрессируют различные рецепторы, включая киллерные иммуноглобулиноподобные рецепторы (KIR) [181], лектиноподобные рецепторы естественной киллерной группы (NKG), цитотоксические рецепторы NKp30,

NKp44, NKp46 [90], а также различные молекулы адгезии (CD56, CD57, CD11a / CD18, CD11b, CD11c, CD54, CD58), рецепторы цитокинов (CD117, CD122, CD25), хемокинов (CXCR1, 3, 4, CCR1, 5, 7) и многие другие (рис.4). Однако наиболее часто зрелые циркулирующие естественные киллеры рассматриваются как CD3-CD16+CD56+CD2^{dim} лимфоциты, причем эти маркеры не являются для них высокоспецифичными. Например, молекулы CD16 (Fc-рецепторы для иммуноглобулина) могут быть обнаружены на моноцитах и некоторых дендритных клетках крови, а экспрессия CD56 (молекулы клеточной адгезии) встречается на определенных CD3+-клетках. На некоторых NK-клетках экспрессия CD16 снижена либо отсутствует. В настоящее время общепринятым способом идентификации NK-клеток человека является выявление CD3-CD14-CD19-CD56+лимфоцитов, но специфический маркер, позволяющий надежно идентифицировать популяцию NK-клеток, до сих пор не определен [185].

У человека выделяют две основные субпопуляции натуральных киллеров на основе уровня экспрессии CD56: (CD3-)CD56^{bright} и (CD3-)CD56^{dim} клетки. CD56^{bright} долгое время рассматривались только как производители цитокинов со слабой цитолитической активностью (которую, впрочем, они способны приобретать в присутствии IL-2), тогда как CD56^{dim} – как основные цитотоксические эффекторные клетки. Однако недавно было установлено, что цитотоксические клетки CD56^{dim} могут также высвобождать большое количество цитокинов при рецептор-опосредованной активации. Кроме того, сами они фенотипически и функционально неоднородны [108].

CD56^{bright} клетки составляют около 10–20% от общего количества NK-клеток и в основном локализованы во вторичных лимфоидных органах. Данная субпопуляция характеризуется отсутствием или низкой экспрессией литических гранул и соответствующим, но относительно поздним производством цитокинов, способных влиять на иммунные ответы. В пределах субпопуляции CD56^{bright} клеток, выделенных из разных органов, существуют небольшие различия как в фенотипических характеристиках, так и в реакции на стимуляцию цитокинами.

Относительно развития CD56^{bright} и CD56^{dim} мнения и данные долгое время были спорными. Однако в недавних работах было высказано предположение о том, что CD56^{bright} клетки дифференцируются в CD56^{dim}. Такой вывод был сделан на основе измерения длины теломер: в клетках CD56^{bright}CD16- теломеры значительно длиннее, чем в клетках CD56^{dim}CD16^{bright} [132]. Кроме того, анализ развития NK-клеток человека в организме мышей с гуманизированной иммунной системой показал, что их развитие из CD34+ клеток прогрессирует с CD56^{bright}CD16-KIR- до CD56^{dim}CD16+KIR- и приводит, наконец, к CD56^{dim}CD16+KIR+ клеткам [63]. При введении CD56^{bright} клеток крови NOD /

SCID или NOD / SCID / $\gamma c^{-/-}$ мышам, они дифференцировались до CD56^{dim} клеток и приобретали экспрессию CD16 и KIR [30, 63, 70]. Кроме того, независимые исследования выявили клетки с фенотипическими и функциональными свойствами, характерными как для клеток CD56^{bright}, так и для CD56^{dim}, что указывает на существование промежуточных стадий в прогрессии от CD56^{bright} к клеткам CD56^{dim}.

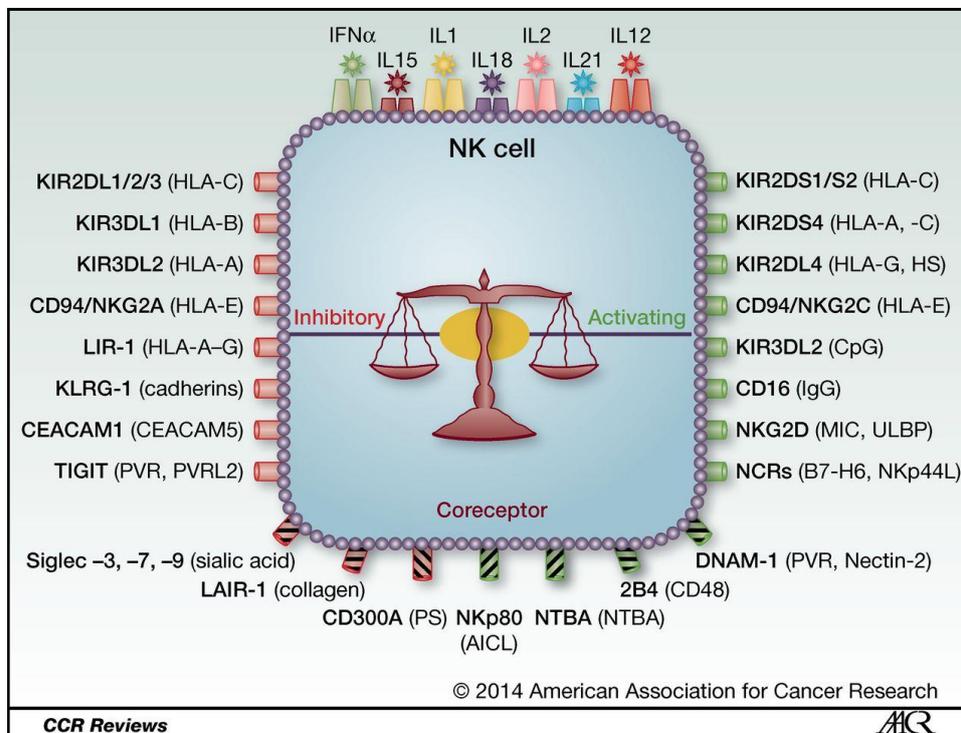


Рис. 4. Поверхностные рецепторы NK-клеток человека и их лиганды (W. Leung, 2014) [84]. В верхней части рисунка показаны рецепторы цитокинов NK-клеток. Другие рецепторы показаны в разных цветах в соответствии с их функцией (ингибирующие рецепторы показаны в красном цвете, активирующие рецепторы – в зеленом, ингибирующие корецепторы – в черно-красном и активирующие корецепторы – в черно-зеленом цвете). Их лиганды показаны в круглых скобках. Многие другие известные рецепторы не показаны, включая хемотаксические рецепторы (CCR-2, -5, -7; CXCR-1, -3, -4, -6, CX3CR1 и Chem23R), адгезионные рецепторы (CD2 и b1 и b2 интегрины) и активирующие корецепторы (CD96, CS1 и TLR). Inhibitory – ингибирующие рецепторы, activating – активирующие рецепторы.

3.1.1. Выделение субпопуляций NK-клеток на основе экспрессии маркера CD27

Как уже обсуждалось выше, зрелые NK-клетки человека делятся на две субпопуляции: CD56^{dim} и CD56^{bright}. Однако NK-клетки мышей не экспрессируют антиген CD56, следовательно, экстраполяция данных о NK-клетках мыши на человеческие

НК-клетки не совсем корректно. Между тем развитие НК-клеток мыши широко изучалось с использованием клеток-предшественников.

В недавних исследованиях сообщается, что молекула CD27, принадлежащая семейству TNFR (рецепторов фактора некроза опухолей), и интегрин CD11b (Mac-1) является важным маркером для выделения субпопуляций НК-клеток [58, 167].

Молекула CD11b рассматривалась как маркер зрелых НК-клеток мыши и человека [42, 74], а CD27 – как маркер для разделения зрелых НК-клеток на две субпопуляции [58]. На основе экспрессии этих двух молекул впоследствии и выделили четыре субпопуляции зрелых НК-клеток мыши [33, 57]. Эти новые субпопуляции быстро привлекли большое внимание, поскольку для человеческих НК-клеток также было показана экспрессия CD27, что упрощает сравнительные интерпретации в отношении НК-клеток мыши и человека [58, 167]. Таким образом, НК-клетки мыши можно разделить на CD27⁻CD11b^{low}, CD27^{hi} CD11b^{low}, CD27^{hi} CD11b^{hi} и CD27^{low} CD11b^{hi}. Показано, что дифференцировка НК-клеток идет от CD27^{hi} CD11b^{low} через CD27^{hi} CD11b^{hi} к CD27^{low} CD11b^{hi} [33]. У человека приблизительно 6% НК-клеток периферической крови экспрессируют CD27, 14% CD27 + НК-клеток присутствуют в костном мозге и более 30% CD27 + НК-клеток – в селезенке и миндалинах [167]. Группа китайских ученых Fu B., Tian Z. & Wei H. [43] охарактеризовала четыре новые популяции на основе экспрессии CD11b и CD27, которые могут представлять собой отдельные стадии развития НК-клеток человека из разных тканей. Более 90% НК-клеток периферической крови относятся к популяции CD11b + CD27⁻, тогда как НК-клетки пуповинной крови на 80% представляют CD11b + CD27⁻ и на 20% CD11b⁺ CD27⁺. По сравнению с этими двумя типами НК-клеток децидуальные НК-клетки менее зрелые и представлены почти на 60% CD11b⁻CD27⁻ и более чем на 20% CD27⁺ клетками. НК-клетки из инфильтрирующих опухоль тканей также показали высокие уровни субпопуляции CD11b⁻CD27⁻ [67], что указывает на гетерогенность НК-клеток (рис. 5). Каждая популяция характеризуется уникальными функциональными и фенотипическими признаками: у CD11b⁻CD27⁺ и CD11b⁺ CD27⁺ НК-клеток наиболее выражена способность к секретированию цитокинов, CD11b⁺ CD27⁻ НК-клетки проявляют высокую цитолитическую функцию, а CD11b⁻CD27⁻ НК-клетки характеризуются незрелым фенотипом и экспрессируют высокие уровни NKG2A [67].

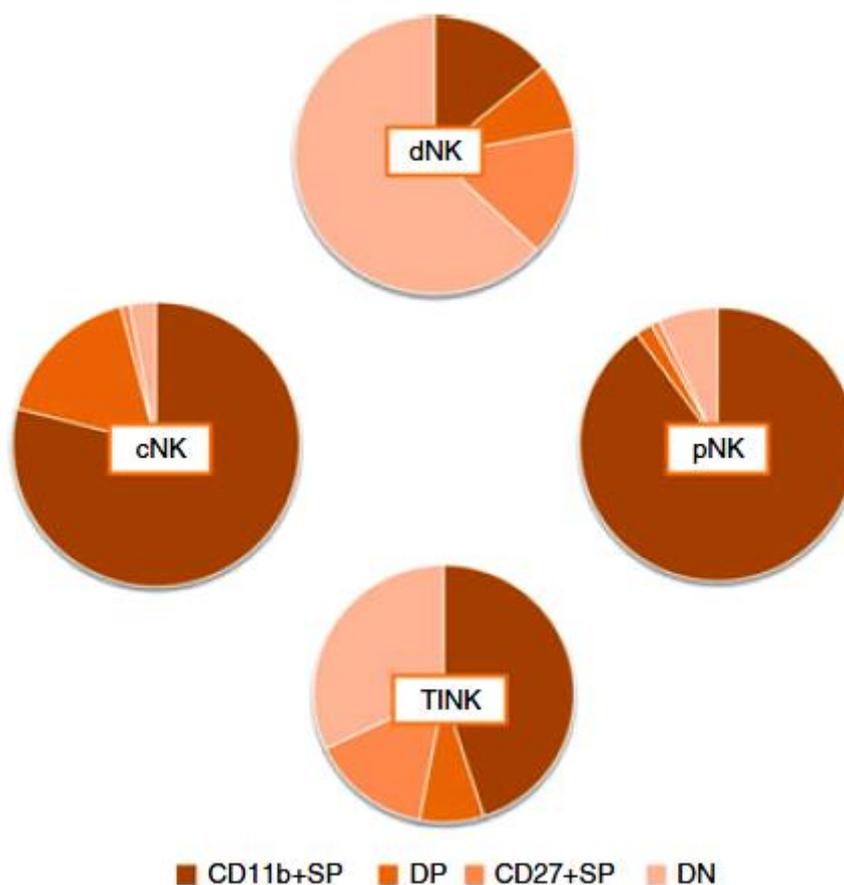


Рис. 5. Субпопуляции NK-клеток человека, выделяемые по маркерам CD11b и CD27 (B. Fu, Z. Tian, H. Wei et al., 2014). CD11b + CD27- (CD11b + SP), CD11b + CD27 + (DP), CD11b- CD27 + (CD27 + SP) и CD11b- CD27- (DN). dNK – децидуальные NK-клетки, cNK - NK-клетки пуповинной крови, pNK - NK-клетки периферической крови, TINK - NK-клетки инфильтрирующих опухоль тканей. Здесь названия SP (single positive), DP (double positive) и DN (double negative) применяются по отношению к NK-клеткам, несущим маркеры CD11b и CD27.

Кроме того, по взаимодействию с различными микросредами и сигналами, NK клетки можно разделить на три функциональных субпопуляции: NK-толерантные (NK-клетки с преобладанием ингибирующих сигналов), NK-цитотоксические (NK-клетки с преобладанием активирующих сигналов, клетки-мишени с высокой экспрессией стимул-индуцированных лигандов) и NK-регуляторные (NK-клетки с преобладанием активирующих сигналов, клетки-мишени с высокой экспрессией воспалительных молекул) [43] (рис. 6). По фенотипу субпопуляция цитотоксических NK-клеток представляет собой в основном CD56^{dim} или CD11b+CD27- NK-клетки, определенные на основе относительной экспрессии маркеров CD11b и CD27. Субпопуляция толерантных NK-клеток представлена, в основном, CD56^{bright} или CD27-CD11b- NK-клетками. В

субпопуляции регуляторных NK-клеток преобладают CD56^{bright} или CD27 + NK-клетки. Кроме того, эти различные NK-субпопуляции локализуются в различных тканях или органах, что отражает их функциональное разнообразие [144]. Например, NK-клетки печени могут опосредовать иммунную толерантность или иммунные нарушения [119, 149, 157], децидуальные NK-клетки могут опосредовать иммунную регуляцию взаимодействия материнского организма и плода или ремоделирование сосудов матки [6] и инфильтрирующие опухоль NK-клетки, могут опосредовать избегание опухолью иммунного надзора или прямой киллинг [94].

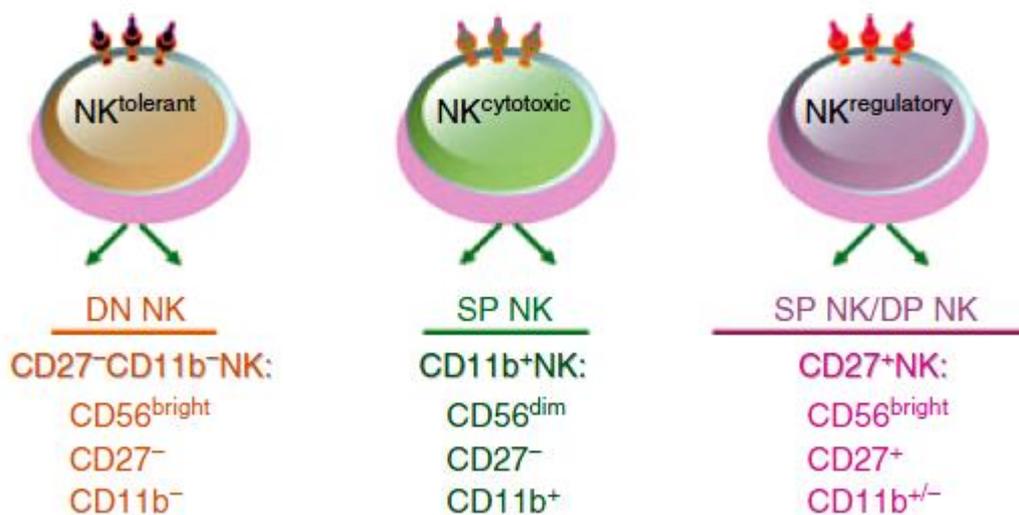


Рис. 6. Субпопуляции NK-клеток человека в соответствии с фенотипом и функцией (B. Fu, Z. Tian, H. Wei et al., 2014). NK-толерантные клетки (CD56^{bright} или CD27-CD11b-); NK-цитотоксические, (CD56^{dim} или CD11b + CD27-); NK-регуляторные (CD56^{bright} или CD27 +).

3.1.2. NK-клетки памяти

В настоящее время многие исследователи говорят о возможности существования NK-клеток памяти, которые могут быть образованы как CD56^{bright}, так и CD56^{dim} NK-клетками [133] и, возможно, являются конечной стадией дифференцировки NK-клеток. Первые данные о них появились в ходе моделирования гаптен-индуцированной контактной гиперчувствительности у мышей, нокаутированных по гену рекомбинации Rag2 [115]. Некоторые ученые указывают на три возможных варианта NK-клеток памяти, которые отличаются механизмом формирования и функциональными характеристиками: вирусной зависимой индукцией, индукцией цитокинов и наличием специализированной популяции NK-клеток памяти в печени [104]. Описана способность NK-клеток, ранее

активированных цитокинами IL-12 и IL-18, при повторной стимуляции цитокинами через определенный промежуток времени (7-21 сут.), продуцировать большее количество IFN γ по сравнению с контролем, при этом цитотоксичность НК-клеток, оцененная по маркеру CD107a, не отличается между НК-клетками памяти и интактными НК-клетками [133].

Термин «memory-like NK-cells», используемый в литературе, означает, что НК-клетки, в некотором роде подобны Т- и В-клеткам памяти. Поскольку НК-клетки не претерпевают антиген-зависимой дифференцировки, наиболее корректно было бы называть их «предварительно активированными НК-клетками» [103]. В настоящее время не обнаружено уникальных маркеров для предварительно активированных НК-клеток, однако определена корреляция между способностью продуцировать IFN γ предварительно активированными CD56^{bright} НК-клетками и экспрессией рецептора NKG2A / CD94, а также корреляция между способностью продуцировать IFN γ предварительно активированными НК-клетками обеих популяций (CD56^{bright} и CD56^{dim}) и экспрессией рецептора NKp46. Следует отметить, что популяция предварительно активированных НК-клеток CD56^{bright} продуцирует больше IFN γ , чем CD56^{dim} НК-клетки после повторной стимуляции как цитокинами, так и клетками линии лейкемии K562 [133]. Эти факторы указывают на изменение функциональных свойств НК-клеток в результате предварительной активации цитокинами и сохранения этих изменений в течение нескольких дней [103]. Имеются данные о преактивации НК-клеток не только *in vitro*, но и *in vivo*: у людей происходит адаптивное изменение свойств НК-клеток, индуцированных цитомегаловирусной инфекцией (CMV), что подразумевает изменение секреции цитокинов и активацию экспрессии рецептора NKG2C [131]. Механизмы, определяющие явление преактивации НК-клеток, плохо изучены. В настоящее время показано, что предварительно активированные НК-клетки не отличаются от интактных НК-клеток по содержанию фосфорилированных форм белков STAT4 и STAT3, а также по их содержанию мРНК IFN γ , что указывает на наличие посттранскрипционных и посттрансляционных механизмов индукции памяти в НК-клетках [133].

3.2. Дифференцировка НК-клеток на периферии

Дифференцировка и развитие НК-клеток связана с последовательным изменением репертуара рецепторов, характерных для клеток как миелоидного, так и лимфоидного происхождения, и приобретением ими соответствующих функциональных свойств. При этом они не обладают антигенспецифическими рецепторами, подобных тем, которые экспрессируют Т- и В-клетки [103, 186].

НК-клетки ведут свое происхождение от CD34⁺ гемопоэтических стволовых клеток (ГСК, HSC), проходя дискретные стадии развития, характеризующиеся

последовательной сменой рецепторного репертуара и функций. NK-клетки в своем развитии сохраняют связи с клетками других линий. Коммитирование к развитию по NK-клеточному пути требует экспрессии определенных транскрипционных факторов, таких как Nfil3 (E4BP4) и TOX [2, 47, 71]. Более того, они происходят из Id2+ (DNA-binding protein inhibitor) предшественника, подобного другим врожденным лимфоидным клеткам, T-лимфоцитам и дендритным клеткам [147]. Было также показано, что общий миелоидный предшественник и общий гранулоцитарно-моноцитарный предшественник сохраняют способность дифференцироваться *in vitro* в NK-клетки [55, 120, 165].

Имеющиеся на настоящий момент знания о дифференцировке NK-клеток человека в основном происходят из исследований *in vitro*. При культивировании в присутствии соответствующих цитокинов NK-клетки могут быть получены *in vitro* из HSC или более поздних предшественников [41]. Долгое время костный мозг считался единственным местом дифференцировки NK-клеток человека, однако имеются данные о том, что развитие NK-клеток из HSC может происходить и в других тканях. При правильном культивировании CD34+ клетки, выделенные из периферической и пуповинной крови, тимуса, вторичных лимфоидных органов, эмбриональной или взрослой печени и децидуальной оболочки матки, могут давать зрелые NK-клетки [40, 105, 112, 161]. Более того, с помощью цитометрического анализа клеток, выделенных из различных периферических тканей, можно идентифицировать NK-клетки на разных стадиях дифференцировки. Предполагается, что CD34+ клетки или NK-предшественники могут рециркулировать из костного мозга на периферию, где они в конечном итоге подвергаются дифференцировке до NK-клеток. [41, 112, 161].

Последовательное приобретение рецепторов, а, следовательно, и функциональных возможностей при дифференцировке NK-клеток *in vitro* возможно отслеживать с помощью метода проточной цитометрии. Выделяют три основные стадии развития NK-клеток: предшественники NK-клеток (NKP), незрелые NK-клетки (iNK) и зрелые NK-клетки (mNK). Хотя в начале культивирования зрелые NK-клетки отсутствуют, на более поздних стадиях все три клеточные субпопуляции могут сосуществовать в одной и той же культуре, поскольку дифференцировка в ней не полностью синхронизирована. На рис. 7 приведена последовательность получения маркеров клеточной поверхности при развитии NK-клеток *in vitro*.

Экспрессия CD122, указывающая на принадлежность к NK-клеткам, довольно трудно обнаруживается методом проточной цитометрии [41]. Однако предшественников NK-клеток можно идентифицировать как CD34-(CD33+) CD117+CD244+CD161+CD56-. Хотя CD117 и CD244 могут экспрессироваться уже на CD34+ клетках, появление CD161

во время дифференцировки NK-клеток *in vitro* характерно для стадии NKP [15]. Впоследствии предшественники NK-клеток приобретают экспрессию CD56. Следует отметить, что на этой и последующих стадиях дифференцировки NK-клетки могут коэкспрессировать CD33 – маркер, типичный для миелоидной линии. По ряду данных, миелоидные предшественники CD33+ (CD13+CD115+/-) могут переключаться на линии NK-клеток, особенно в присутствии кортикостероидов или CXCL8 [107, 164, 165]. Первым ингибирующим рецептором, который экспрессируется при дифференцировке NK-клеток *in vitro* (и *in vivo*), является CD94 / NKG2A (42). Одновременно с этим iNK-клетки снижают уровень CD117, а затем экспрессируют молекулы адгезии CD11a / CD18 (LFA-1) [107, 183]. Эти события отмечают достижение зрелого фенотипа, напоминающий таковой у CD56^{bright} NK-клеток. Полученные *in vitro* зрелые NK-клетки приобретают цитолитическую активность и экспрессируют высокие уровни CD94 / NKG2A, LFA-1 и активирующих рецепторов, тогда как они являются CD117^{low} / +, и могут претерпевать частичное снижение уровня CD161 (по сравнению с NKP или iNK). CD16 и экспрессия KIR представляют собой последние стадии дифференцировки NK-клеток; однако эти рецепторы не всегда четко обнаруживаются в NK-клетках, полученных *in vitro*. В отличие от зрелых NK-клеток, в NKP и iNK-клетках CD244 действует как ингибирующий рецептор, так как на этих стадиях созревания клетки не экспрессируют молекулу SAP-адаптера, которая отвечает за трансдукцию коактивирующих сигналов в зрелых NK-клетках [146]. Хотя небольшая популяция CD161+ CD56- NKP способна уничтожать клетки-мишени посредством TRAIL-зависимого механизма [182], экспрессия ингибирующего CD244 вместе с отсутствием или низкой экспрессией перфорина и гранзимов и LFA-1 объясняет слабую цитолитическую активность незрелых NK-клеток. Также NKP и iNK-клетки отличаются от зрелых NK-клеток специфическим профилем секреции цитокинов. NKP-клетки производят GM-CSF, IL-5 и IL-13, тогда как клетки iNK секретируют IL-22 и большие количества CXCL8 [89, 107]. Незрелые NK-клетки также экспрессируют цитоплазматический TNF α . Этот цитокин вместе с IFN- γ секретируется и выделенными *in vitro* и *ex vivo* зрелыми NK-клетками.

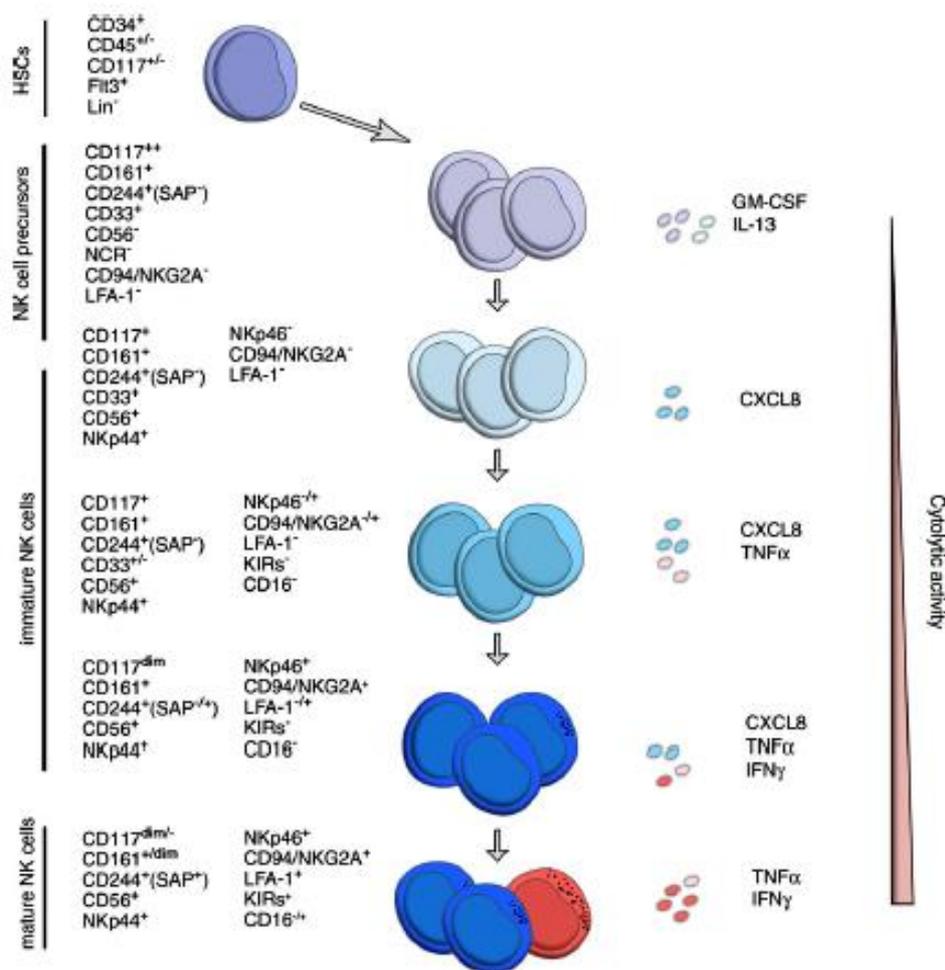


Рис. 7. Схема дифференцировки NK-клеток (E. Montaldo, G. Del Zotto, M. Chiesa et al., 2013). CD34⁺ клетки, культивированные в присутствии SCF, Flt3-L, IL-7, IL-15, дифференцируются в NK-клетки путем последовательного приобретения рецепторов / маркеров и функциональных свойств. Можно выделить три основные субпопуляции: предшественники NK-клеток, незрелые NK-клетки и зрелые NK-клетки.

3.3. Тимические NK-клетки

Обнаружение NK-клеток в тимусе, навело ученых на мысль о роли в этом органа в их происхождении и развитии. С одной стороны, NK-клетки тимуса могут представлять собой зрелые периферические NK-клетки, которые рециркулировали в тимус. С другой стороны, NK-клетки тимуса могут отражать лимфоидный потенциал предшественников Т-клеток, которые не прошли отбор в процессе основного развития Т-клеток. В современной литературе предпочтение отдается модели, в которой ранние тимические предшественники имеют одинаковые шансы стать как Т-, так и не-Т-клеткой [45]. В фетальном тимусе было идентифицировано несколько типов лимфоидных предшественников с потенциалом NK-клеток (включая NKP и бипотентные Т / NK

предшественники) [25, 142]. При культивировании со стромальными клетками и цитокинами или после переноса в культуру эмбрионального тимуса эти предшественники могут продуцировать зрелые цитолитические NK-клетки. Тем не менее, они являются довольно редкими во взрослом тимусе, открывая возможность развития тимических NK-клеток во время фетальной волны, близкой к описанной для некоторых $\gamma\delta$ T-клеточных субпопуляций [140].

Предположение, о том, что тимические NK-клетки рециркулируют из периферического пула mNK-клеток селезенки оказалось несостоятельным, поскольку NK-клетки тимуса экспрессируют существенно более низкие уровни CD11b и CD43 и, похоже, представляют гораздо менее развитый фенотип, чем наблюдаемый в NK-клетках селезенки [169]. Таким образом, появились основания рассматривать возможность внутритимического происхождения NK-клеток. Поскольку Gata-3 необходим для образования ранних предшественников T-клеток [61, 158] предполагали, что этот транскрипционный фактор может также участвовать в дифференцировке NK-клеток тимуса. Экспериментально было показано, что тимические NK-клетки были Gata-3^{high}, тогда как костномозговые NK-клетки оказались Gata-3^{low} [61].

Маркер CD127 (IL7Ra) четко определяется на тимических NK-клетках, тогда как NK-клетки селезенки являются CD127- [169]. Молекула CD127, по-видимому, является продуктом Notch-индуцированного Gata-3-зависимого гена-мишени в незрелых тимоцитах. Функционально тимические NK-клетки проявляли меньшую цитотоксичность, чем NK-клетки селезенки, но продуцировали большее количество разнообразных цитокинов. Все эти наблюдения показывают, что тимические NK-клетки явно отличаются от NK-клеток селезенки и дают основание предполагать, что они развиваются внутритимически путем Notch \rightarrow Gata-3 \rightarrow CD127 [140]. Факт экспрессии CD127 тимическими NK-клетками навел на вопрос о необходимости IL-7 для развития данной субпопуляции NK-клеток. Исследования на мышах с дефицитом IL-7 не выявили требования к этому цитокину для развития NK-клеток в костном мозге [60, 126, 168], зато тимические CD127+ NK-клетки, напротив, оказались зависимы от IL-7 [169]. Зависимость тимических CD127+ NK-клеток от Gata-3 и IL-7 является дополнительными отличительными признаками этой субпопуляции и является аргументом в пользу различий внутритимического и экстра тимического путей развития NK-клеток. Тот факт, что дефицит Gata-3 (но не IL-7) оказывает частичное воздействие на дифференцировку NK-клеток в костном мозге, подчеркивает комплексность транскрипционной активности Gata-3 в развитии NK-клеток в различных органах. Клетки, которые развиваются в отсутствие Gata-3, имеют фенотип CD11b^{low}CD43^{low} с цитолитической активностью в

отношении клеток линии YAC-1 и слабой цитокин-продуцирующей функцией [138]. Напротив, тимические НК-клетки полностью зависят от Gata-3, то есть их порог для этого транскрипционного фактора намного ниже [169].

3.3.1. Выбор пути дифференцировки НК-клеток во время раннего тимопоэза

Успешное коммитирование и дифференцировка по Т-клеточной линии зависят от взаимодействия нескольких различных факторов транскрипции (Notch1, Gata-3, Bcl11b и др.), которые экспрессируются на ранних стадиях развития Т-клеток. Недавние исследования продемонстрировали необходимость продолжительной экспрессии некоторых из этих факторов для поддержания «идентичности» Т-клеток, предполагая, что постоянное подавление других клеточных судеб (по крайней мере, для линии НК-клеток) может иметь место даже в зрелых Т-клетках [85]. Инициирование дифференцировки Т-клеток зависит от сигнала Notch1: без них предшественники Т-клеток не могут быть определены и дальнейший путь приводит к образованию В-клеток [124]. Однако DN1 клетки, которые получали сигналы Notch (даже в течение длительных периодов времени), не полностью потеряли потенциал В-клеток [152]. Это указывает на существование, по крайней мере, одного дополнительного фактора, взаимодействующего с Notch1, при переходе клеток DN1 на стадию DN2, где потенциал В-клеток полностью утрачивается [180]. Одним из таких факторов является Gata-3. Интересно, что Gata-3 подавляет В-клеточный путь развития, но не потенциал миелоидных клеток в большинстве DN2 клеток. Kawamoto et. al [73] для описания этой характеристики использовали термин «DN2mt клетки». Совсем недавно эта группа сообщила, что дальнейшее коммитирование DN2mt клеток к Т-клеточной линии была связана с Bcl11b-опосредованной транскрипционной репрессией экспрессии миелоидного гена [65]. Тот факт, что DN2 клетки также обладают НК-потенциалом в различных экспериментах, еще более усиливает гетерогенность на этой стадии развития. Недавняя работа позволила связать потенциал НК-клеток этой субпопуляции с определенным поверхностным фенотипом клетки. Yiu et al. [180] продемонстрировали, что НК-клеточный потенциал DN2 клеток избирательно находится в субпопуляции DN2a, экспрессирующих высокие уровни CD117, в то время как DN2b клетки являются CD117^{low}, коммитируются к дифференцировке по Т-клеточному пути и не обладают потенциалом НК-клеток. Логично было бы предположить, что DN2a

клетки являются предшественниками клеток DN2b, хотя экспериментальных доказательств данного предположения пока нет, поэтому остается возможность независимого получения обеих субпопуляций. Bcl11b, вероятно, играет ключевую роль в этом переходе, поскольку Bcl11b подавляет характерные особенности линии NK-клеток и может также модулировать экспрессию CD117 (c-Kit) наряду с другими цитокиновыми рецепторами, включая CD122 и CD127 [85]. Устойчивая сигнализация Notch1 на стадии DN2 может сыграть роль в переходе к субпопуляции DN2b, поскольку Notch влияет на Bcl11b [151].

Все вышеупомянутые сигналы четко направляют DN2 по пути Т-клеток. Несмотря на это, одной из субпопуляций клеток, по-видимому, удастся сделать выбор в пользу развития по линии NK-клеток. И здесь модуляция цитокинового рецептора и экспрессия транскрипционного фактора, вероятно, играют определяющие роли. Фактор транскрипции Runx3 на высоком уровне экспрессируется в субпопуляции DN1 и, как было показано, контролирует экспрессию CD122 (IL-2R β) в развивающихся NK-клетках [116]. Часть DN2 клеток, вероятно, способна активировать экспрессию CD122, возможно, из-за продолжительной экспрессии Runx3. Соответственно, эти клетки станут чувствительными к локально продуцируемому в тимусе IL-15. Как может IL-15 влиять на выбор программы развития по линии NK-клеток? Nfil3 может быть индуцирован в гемопоэтических предшественниках после того, как они подверглись воздействию IL-15 [47]. Тем не менее, дополнительные обязательные сигналы необходимы для коммитирования к NK-клеточной линии, поскольку Nfil3 также экспрессируется не-NK клетками (включая DC и миелоидные клетки) и может быть индуцирован при стимуляции в В-клетках [71, 72]. Одним из вариантов могла бы быть Nfil3-индуцированная экспрессия Id2 [47]. Более того, Nfil3 также может участвовать в регуляции экспрессии Gata-3 [179]. Поскольку повышение активности Nfil3 может значительно повлиять на внутритимическое развитие NK-клеток за счет ингибирования В-клеточного потенциала (через Gata-3 совместно с Notch1) и блокады Т (и В) -клеточного потенциала через Id2-опосредованное подавление активности белка E-box. В этой модели Nfil3, Id2 и Gata-3 могут действовать сообща, чтобы обеспечить внутритимическое развитие NK-клеток. Дефицит Bcl11b приводит к увеличению уровня Nfil3 в ранних предшественниках тимоцитов, что указывает на возможное существование между этими двумя факторами кросс-ингибирующей регуляционной петли (рис. 8). Повышение активности Bcl11b на стадии DN2b может ингибировать экспрессию

Nfil3 и Id2, что приводит к подавлению судьбы НК-клеток, в то время как повышение активности Nfil3 (и впоследствии Id2) может противодействовать потенциалу Т-клеток, индуцируемому Bcl11b, путем подавления активности E-box [85] и тем самым способствуя выбору НК-клеточного пути. Таким образом, относительные уровни Bcl11b и Nfil3 в DN2a клетках могут быть главными детерминантами судеб Т- и НК-клеток в этот критический момент. При этом DN2a и DN2b клетки экспрессируют аналогичные количества мРНК Bcl11b [180]. Это не обязательно означает сопоставимые уровни белка Bcl11b в этих субпопуляциях, но может указывать на потребность в дополнительных сигналах для продвижения судьбы Т- и подавления судьбы НК-клеток. Однако, как только выбор в пользу Т-клеточного пути совершен, Bcl11b оказывается достаточным для обеспечения этого, поскольку устранение только Bcl11b в зрелых, периферических Т-клетках приводит к преобразованию этих клеток в НК-клетки [85].

В соответствии с этой моделью, согласно которой относительные уровни экспрессии Nfil3 / Bcl11b определяют выбор DN2 в пользу судьбы НК / Т-клеток, было обнаружено, что Nfil3 также экспрессируется всеми субпопуляциями DN [45]. Хотя уровни Nfil3 ниже, чем в НК-клетках (включая НК-клетки тимуса), самые высокие уровни экспрессии обнаруживаются среди субпопуляции DN2 и снижаются на последующих этапах дифференцировки Т-клеток. Подобное явление может объяснить экспрессию Bcl11b частью тимических НК-клеток (123), которая могла бы говорить об их происхождении от DN2, затем она снижается, поскольку эти клетки продолжают процесс созревания. Похоже, что большая часть последних данных указывает на четкое расхождение между судьбами Т- и НК-клеток тимуса на стадии DN2. Означает ли это, что все НК-клетки тимуса проходят через промежуточную стадию DN2? Это маловероятно, поскольку тимические НК-клетки могут нормально развиваться в отсутствие Notch-сигналов, в отсутствие клеток ETP и DN2 [129]. Таким образом, этап DN2, вероятно, не является обязательной стадией развития тимических НК-клеток. Альтернативными источниками для DN2-независимых НК-клеток тимуса могут быть другие костномозговые мультипотентные гемопоэтические предшественники или сами НКР. Повышенная экспрессия Nfil3 в любом из этих предшественников будет способствовать их НК-потенциалу при достаточном количестве IL-15 в тканевом микроокружении. Процент тимических НК-клеток, экспрессирующих Bcl11b (как возможный показатель прохождения через стадию DN2), может служить индикатором относительного вклада этих путей [45].

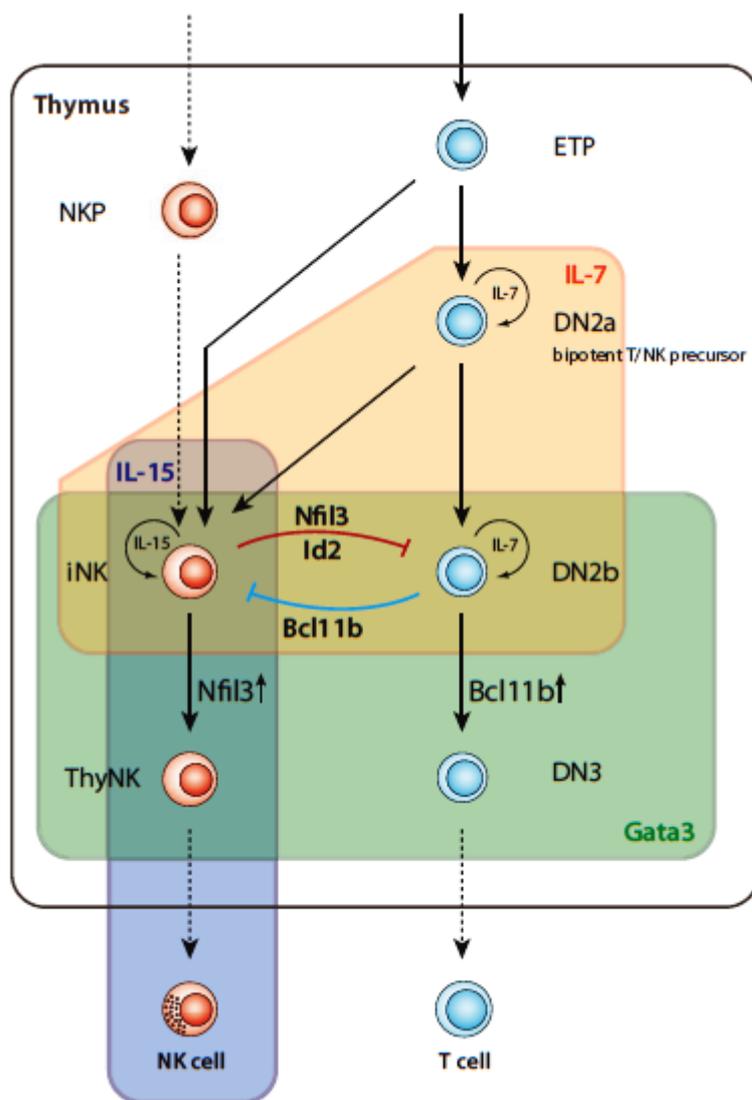


Рис. 8. Развитие T- и NK-клеток от ранних предшественников тимоцитов (ETPs) (Garci, Vosshenrich, Santo, 2010) [45]. DN2a клетки сохраняют потенциал T- и NK-клеток и пролиферируют в ответ на IL-7 (клетки, восприимчивые к IL-7 обозначены оранжевым). Субпопуляция DN2b также реагирует на IL-7, но утрачивает NK-потенциал в процессе, который включает в себя активацию Gata-3 (обозначено зеленым). Усиление Bcl11b сопровождается потерей реактивности IL-7 и указывает на прогрессию до стадии DN3, где предшественники полностью коммитированы к T-клеточному пути. Незрелые NK-клетки (iNK) могут быть получены из нескольких путей, включая прямое дифференцирование от ETP, через DN2a или из предшественников NK-клеток (NKP), которые заселяют тимус. Дифференцирование клеток тимических NK-клеток (ThyNK) зависит от Nfil3 и требует IL-15 (показано синим). Bcl11b и Nfil3 / Id2 взаимно ингибируют пути NK-клеток и T-клеток соответственно.

3.3.2. Модели развития тимических НК-клеток

Ранее предлагались различные модели коммитирования НК-клеток в тимусе, которые не являются взаимоисключающими (рис. 9). Ключевая роль в них отводилась Notch- и Id2-сигналингу. Первая модель – Id2 → Notch, согласно которой ELP или TSP первоначально получают сигналы, индуцирующие экспрессию Id2. Id2 регулируют факторы E-box – важные критические медиаторы Т- и В- лимфопоэза. и, таким образом, происходит коммитирование NKPs к НК-линии. NKPs также могут заселять тимус непосредственно из костного мозга. Затем NKPs получают Notch-сигналы, вызывающие экспрессию Gata-3 и повышающие экспрессию CD127. Индуцирование CD127 также возникает при образовании и последующем развитии iNK клеток.

По другой модели, Notch → Id2, TSP сначала получают Notch-сигналы (тем самым индуцируя Gata-3 и CD127), как это обычно происходит при переходе от DN1 до DN2. Индукция экспрессии Id2 затем индуцировала эти клетки к выбору НК-линии, генерируя CD127+ NKP, которые затем продолжают фенотипическое созревание [140].

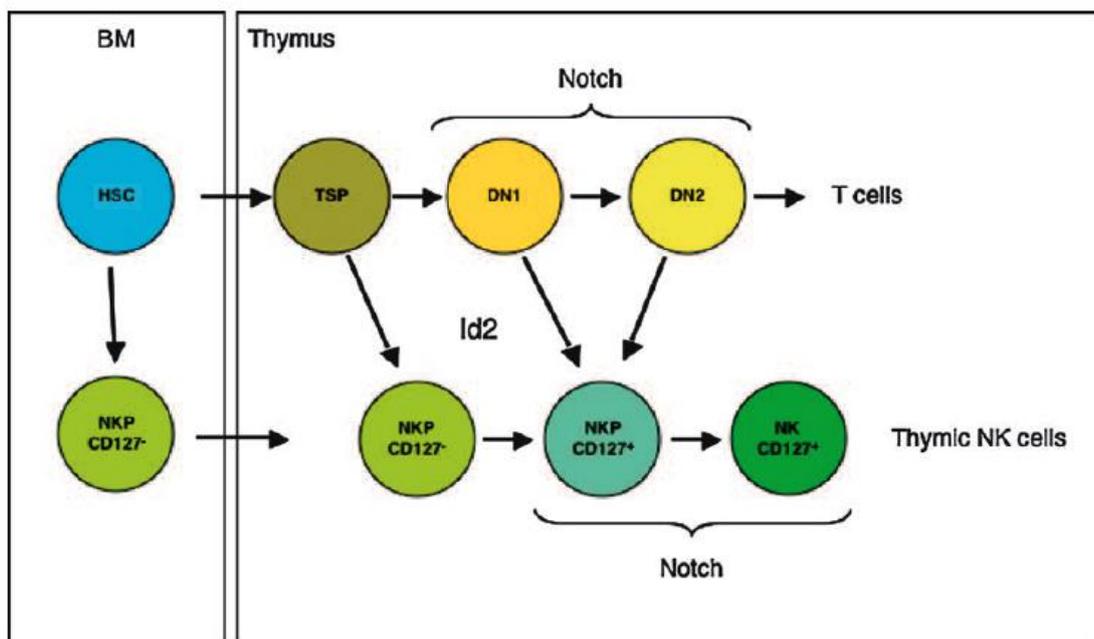


Рис. 9. Модели возникновения тимических НК-клеток из внутритимических предшественников (Di Santo, J. P., Vosshenrich, C. A. J., 2006) [140]. Notch-сигналинг управляет развитием Т-клеток из TSP через стадии DN1 и DN2. NK-клеточный потенциал зависит от экспрессии Id2, который регулирует активность транскрипционного фактора E-box, инициирующего развитие NKP. Неизвестно, какой именно сигнал, Id2 или Notch, является первым при образовании тимических NKPs.

3.3.3. Тимические NK-клетки на периферии

Молекула CD127 экспрессируется большинством NK-клеток тимуса и может быть маркером NK-клеток, которые экспортируются на периферию. Пересадка тимуса реципиентам с дефицитом NK-клеток продемонстрировала, что тимус экспортирует CD127+ NK-клетки, заселяющие периферические лимфоидные органы, в том числе селезенку, печень и лимфатические узлы [169]. Напротив, в стационарных условиях повышенный уровень CD127+ NK-клеток был обнаружен только в лимфатических узлах, где 20-30% NK-клеток имели фенотип CD127+. Как и тимические NK-клетки, CD127+ NK-клетки в лимфоузлах функционально являются производителями цитокинов. Эти данные свидетельствуют о том, что события, связанные с Gata-3 / CD127 в тимусе накладывают отпечаток на дальнейшее развитие NK-клеток, что ведет к формированию специализированной субпопуляции NK-клеток, сохраняющейся в периферических лимфоидных органах. Эта модель согласуется с данными Veinotte et al. [163], в которых описаны перегруппировки γ -цепи рецептора TCR в NK-клетках фетального тимуса и лимфатических узлов. Тот факт, что эти CD127+ NK-клетки в лимфоузлах остаются Ly49^{low}CD11b^{low}, несмотря на полноценность эффекторных функций (производство цитокинов), служит еще одним примером расхождения между экспрессией CD11b и функциональной зрелостью. Тимический путь развития NK-клеток дает четкую функциональную субпопуляцию периферических NK-клеток с особыми характеристиками хоуминга. Имеют ли CD127+ NK-клетки определенные функциональные роли в лимфатических узлах во время первичных иммунных реакций, еще предстоит выяснить [140].

3.4. Функции NK-клеток

Натуральным киллерам присущи две основные функции: цитолитическая активность в отношении вирус-инфицированных или модифицированных клеток и регуляция иммунных ответов (как врожденного, так и адаптивных) посредством продуцирования цитокинов (IFN- γ , TNF α , IL-10), хемокинов (CCL3, 4, 5, XCL1, CXCL8) и ростовых факторов (GM-CSF, G-CSF и IL-3). [185]

Для осуществления лизиса NK-клетки должны отличать инфицированные или измененные клетки от нормальных. Каждая отдельная NK-клетка экспрессирует различные комбинации активирующих и ингибирующих рецепторов, взаимодействующих одновременно с множеством лигандов на поверхности предполагаемой клетки-мишени, и в совокупности динамический баланс сигналов от этих рецепторов определяет дальнейшую её судьбу (рис. 4) [113].

Рецепторы NK-клеток обнаруживают изменения в плотности различных поверхностных молекул возможной клетки-мишени. Активирующие рецепторы распознают поверхностные молекулы, экспрессия которых вызвана специфическими клеточными событиями (тепловой шок, повреждение ДНК, сигналинг от TLR и т.п.), метаболическим стрессом, злокачественной трансформацией или вирусной инфекцией («stress-induced self»). Стимуляция активирующих рецепторов инициирует киллерную активность NK-клеток, а также приводит к продуцированию NK-клетками цитокинов. Ингибирующие рецепторы NK-клеток, напротив, распознают поверхностные молекулы, которые в норме большинство клеток экспрессируют конститутивно на высоком уровне. Утрата этих молекул называется «missing self» или феномен «потери своего». Пока наиболее изученными являются ингибирующие рецепторы, распознающие молекулы МНС I, которые экспрессируются в норме большинством клеток организма (за исключением эритроцитов) [88, 113].

Сигнал от ингибирующих рецепторов при взаимодействии с МНС I, предотвращает атаку натуральных киллеров на нормальные клетки организма. Причем плотность молекул МНС I на поверхности клетки, коррелирует с надежностью защиты от атаки NK-клетки. Интерфероны здесь играют немаловажную роль: они стимулируют экспрессию молекул МНС I здоровыми клетками и способствуют активации цитотоксической функции NK-клеток. Стоит отметить, что вирусы и некоторые другие внутриклеточные патогены избирают неординарную тактику во избежание обнаружения их Т-лимфоцитами: они способны снижать экспрессию МНС I, препятствуя вынесению на поверхность клетки комплекса «антиген – МНС I». NK-клетки восполняют этот пробел в иммунной защите, реагируя на снижение экспрессии МНС I. Интенсивность сигналинга от их ингибирующих рецепторов падает, а активирующие сигналы больше не подавляются, поэтому баланс смещается в пользу активации NK-клеток [14, 93].

Этот случай является типичным примером «потери своего», при котором увеличивается вероятность уничтожения NK-клеткой клетки-мишени [113].

На фоне слабого ингибирующего сигнала или его отсутствия начинают преобладать сигналы активации, что приводит к атаке клетки-мишени и продукции цитокинов. В то же время нормальная экспрессия МНС I не является гарантированной защитой клетки: при наличии достаточно интенсивного активирующего сигнала может произойти лизис клетки-мишени. Таким образом, NK-клетки интегрируют сигналы от активирующих и ингибирующих поверхностных рецепторов, которые вместе контролируют цитолитическую активность NK-клеток и секрецию цитокинов [185].

В последнее время в литературе обсуждается процесс, называемый «образованием» НК-клеток (от «education»), который представляет собой тонкую настройку, их цитолитической функции. При этом активный потенциал каждой НК-клетки уравнивается ее чувствительностью к ингибированию молекулами МНС I [22].

Первоначально «образованные» НК-клетки характеризовались их способностью распознавать клетки-мишени, у которых отсутствуют молекулы МНС I [88, 113]. Известно, что распознавание «потери своего» требует коэкспрессии активирующих лигандов для стимулирования НК-клеток. «Образованные» НК-клетки проявляют наиболее высокую реакцию на МНС I-отрицательные мишени, в то же время они восприимчивы к ингибированию поврежденными клетками, которые сохраняют экспрессию МНС I [22]. «Образованными» считаются НК-клетки, экспрессирующие ингибирующие молекулы Lu49 (у мышей) и KIR (у человека), которые взаимодействуют с МНС-лигандами [5]. Хотя они имеют более низкий порог реактивности к клеткам-мишеням с пониженной или отсутствующей экспрессией МНС I, «образованные» клетки избегают аутореактивности посредством ингибирующего сигналинга при распознавании МНС I. Наряду с «образованными» существует и популяция «необразованных» НК-клеток: у них отсутствуют рецепторы, специфичные для МНС I и, следовательно, снижена восприимчивость к активации [5, 75]. На самом деле «образование» НК-клеток происходит постоянно, а отдельные НК-клетки проявляют градуированные уровни реактивности, соответствующие их количественной чувствительности к ингибированию молекулами МНС I [22, 23].

Детали данного процесса до сих пор остаются не до конца ясными и нуждаются в более глубоком изучении.

3.4.1. Контактный цитолиз

Контактный цитолиз клеток, несущих признаки модификации, инфицирования или клеточного стресса в совокупности с пониженной экспрессией или отсутствием на них собственных молекул МНС I является основной функцией натуральных киллеров. Этот механизм не уникален только для НК-клеток – его также используют цитотоксические Т-клетки, а также очень редко макрофаги и нейтрофилы, и заключается он в индуцировании гибели клеток-мишеней посредством доставки в них цитотоксических компонентов или поставки им летальных сигналов.

Контактный цитоллиз включает следующие этапы [190]:

1. распознавание НК-клеткой клетки-мишени и формирование иммунного синапса;
2. активация НК-клетки посредством сигналинга от ее активирующих рецепторов при взаимодействии с лигандами на поверхности клетки-мишени;
3. программирование гибели клетки-мишени: доставка через образованную перфорином трансмембранную пору литических гранул, содержащих гранзимы, или сигнализация через апоптотические рецепторы; гибель клетки-мишени после данного этапа неминуема даже при нарушении контакта с НК-клеткой;
4. уничтожение клетки-мишени (лизис или апоптоз).

3.4.1.1. Иммунный синапс

Индукция многих эффекторных функций НК-клеток, включая цитотоксичность, требует, чтобы НК-клетка контактировала с клеткой-мишенью. Это обеспечивает точное нацеливание цитолитического процесса на одну инфицированную/трансформированную клетку без затрагивая соседних здоровых клеток. События, которые происходят после взаимодействия между киллерной клеткой и ее клеткой-мишенью включают доставку и секрецию цитолитических эффекторных молекул на границе между цитотоксической клеткой и ее клеткой-мишенью посредством процесса, известного как направленная секреция [117].

Понимание явления направленной секреции было достигнуто благодаря открытию иммунного синапса. Иммунный синапс первоначально был определен в конце 1990-х годов [53, 106] как контакт между Т-клеткой и антиген-презентирующей клеткой (АРС) ,при котором TCR взаимодействуют с молекулами МНС. Последующие исследования расширили эти наблюдения и выявили соответствующие взаимодействия между различными типами иммунных клеток, а также между иммунными клетками и неиммунными клетками.

Таким образом, иммунный синапс можно определить как упорядоченную перегруппировку молекул в иммунной клетке на границе с другой клеткой. В этом взаимодействии участвуют многочисленные молекулы, в том числе рецепторы, адгезионные и сигнальные молекулы, элементы цитоскелета и клеточные органеллы. Эти компоненты аккумулируются в отдельных областях активирующего иммунологического синапса с образованием супрамолекулярного активационного кластера (SMAC), который

может быть разделен на периферические (pSMAC) и центральные (cSMAC) зоны. [113, 117, 190]

Предполагается, что формирование функционального НК-клеточного иммунного синапса можно разделить на три основных этапа: инициация, эффекторная фаза и терминация, каждая из которых подразделяется на несколько этапов [117] Этап инициации включает адгезию (при участии $\beta 2$ -интегринов (LFA-1, Mac-1) и их рецепторов (ICAM-1, 2), молекулы CD2 и ее рецептора CD58), а также сигналы начала активации клеток. Во время эффекторной фазы ключевые этапы состоят в реорганизации актина при участии белка WASP (Wiskott–Aldrich syndrome protein), кластеризации рецепторов, поляризации центра организации микротрубочек, транспортировке по микротрубочкам литических гранул к плазматической мембране и слиянии с ней последних. На этапе терминации происходит инактивация и обособление НК-клетки. В среднем процесс контактного цитолиза может занимать 1–2 часа, по другим данным 30-60 минут [117, 190].

Возможно также формирование ингибирующего иммунного синапса, который способен тормозить процесс образования литического синапса на поздних стадиях инициации (активационная сигнализация) и ранних стадиях эффекторной фазы (реорганизация актина и кластеризация рецепторов) [101, 162]

В совокупности вышеперечисленные этапы образования иммунного синапса обеспечивают направленную доставку содержимого литических гранул к клетке-мишени.

Хотя механизмы формирования и действия иммунных синапсов НК- и Т-клеток схожи, сохраняются некоторые различия. В частности, НК-клетки готовы к атаке без предварительной иммунизации, и в качестве регулятора их цитотоксической функции выступает баланс сигналов от ингибирующих и активирующих рецепторов, тогда как Т-клетки нуждаются в костимуляции APC, используют и другие пути уничтожения клетки-мишени и формируют иммунологическую память.

3.4.1.2. Механизмы контактного цитолиза НК-клеток

При распознавании НК-клетки уничтожают клетки-мишени двумя классическими цитотоксическими механизмами: гранулозависимым (перфорин-зависимым) и гранулонеzависимым (рецепторным) путем.

Гранулозависимый путь инициируется после установления контакта (иммунного синапса) НК-клетки с клеткой-мишенью с последующей доставкой цитотоксических гранул, содержащих порообразующий белок перфорин, гранзимы – сериновые протеазы и гранулизины (изоформы 15 и 9 кДа, содержатся в гранулах зрелых НК-клеток), к клетке-мишени [91, 190]. У человека выделяют пять различных типов гранзимов (А, В, Н, К и М),

и каждый из них активирует различные пути гибели клеток, как апоптотические, так и неапоптотические. В присутствии ионов Ca^{2+} перфоны изменяют свою конформацию и встраиваются в мембрану клетки-мишени, где полимеризуются, образуя поровые комплексы, через которые способны проходить белковые молекулы – гранзимы и гранулизины. Наиболее изучены гранзимы А и В. В то время как гранзим В активирует апоптоз посредством активации Casp3 или высвобождения цитохрома С из митохондрий при участии гранулизина, по-видимому, гранзим А активирует неапоптотическую гибель клеток [150]; однако имеются противоречивые результаты в отношении его цитотоксической функции, есть данные о его провоспалительных свойствах [68]. Другие гранзимы менее изучены, хотя было показано, что гранзим К продуцируется $CD56^{bright}$ клетками, опосредующими неапоптотическую гибель опухолевых клеток [62]. Имеющиеся данные о гранзиме М весьма противоречивы. Помимо цитотоксичности предполагается его провоспалительный эффект, и даже его участие в росте опухолей и метастазировании [172]. Гранзим В при участии гранзима Н индуцирует гибель инфицированных аденовирусом клеток [173]; и гранулизин, который является еще одной цитотоксической молекулой НК, высвобождаемой цитотоксическими гранулами, активирует стресс эндоплазматического ретикулума клетки-мишени, что в совокупности приводит к её гибели [135].

Итак, после распознавания клетки-мишени и активации НК-клетки секретируют перфорины и гранзимы в иммунный синапс. Связывание этих белков с поверхностью клетки-мишени вызывает их поглощение в эндосомы, которые затем лизируются перфорином, что приводит к высвобождению в цитоплазму индуцирующих апоптоз гранзимов [154, 155]. Описано три пути, по которым гранзим В опосредует гибель клеток-мишеней. В первом случае гранзим В расщепляется и непосредственно активирует эффекторные каспазы (например, Casp 3 и 7), которые впоследствии индуцируют апоптоз клеток-мишеней путем разрушения белков, участвующих в репарации ДНК (например, полимераза PARP) и активации эндонуклеазы CAD (рис. 10 А (1)). Помимо непосредственной активации Casp 3 и 7, гранзим В может активировать их косвенно, расщепляя агонист смерти BID до его усеченной формы tBID, который приводит к высвобождению цитохрома С в митохондриях. Присутствие цитохрома С вместе с другими проапоптотическими белками в цитозоле клетки-мишени приводит к активации Casp 9, которая опосредует гибель клеток путем расщепления и активации Casp 3 и 7 (рис. 10 А (2)). Также гранзим В может вызвать независимую от каспаз гибель клеток путем прямого расщепления белков, участвующих в репарации ДНК: PARP, iCAD (inhibitor of caspase-activated DNase) и ядерного белка ламина В (рис. 10 А (3)).

Помимо классического перфорин-зависимого механизма цитолиза некоторый вклад в гибель клетки-мишени вносит рецепторный путь. Он индуцирует апоптоз через лиганд-рецепторное взаимодействие мембранных молекул TRAIL (TNF-related apoptosis-including ligand), Fas-лиганда (FASL, CD95L), которые экспрессируются на NK-клетках [153, 190], и соответствующих молекул на поверхности клеток-мишеней. Взаимодействие FasL с Fas и TRAIL с TRAIL-рецепторами формирует сигнальный комплекс, который включает Fas-ассоциированный белок домена смерти (FADD), Casp 8 и Casp 10 [16]. Активация Casp 8 приводит либо к прямой активации других каспаз, либо к протеолизу проапоптотического фактора BID, с высвобождением цитохрома С и последующей активацией каспазы (рис. 10 В) [59]. Этот механизм, по-видимому, имеет второстепенное значение, поскольку при инактивации гена перфорина NK-клетки практически утрачивают киллерную активность [190]. Долгое время считалось, что активация этих рецепторов ведет исключительно к апоптозу, однако выяснилось, что при этом могут быть активированы другие, неапоптотические, типы клеточной смерти [31, 114].

Таким образом, различные цитотоксические механизмы, которые демонстрируют NK-клетки, позволяют им элиминировать широкий спектр типов клеток с различными характеристиками.

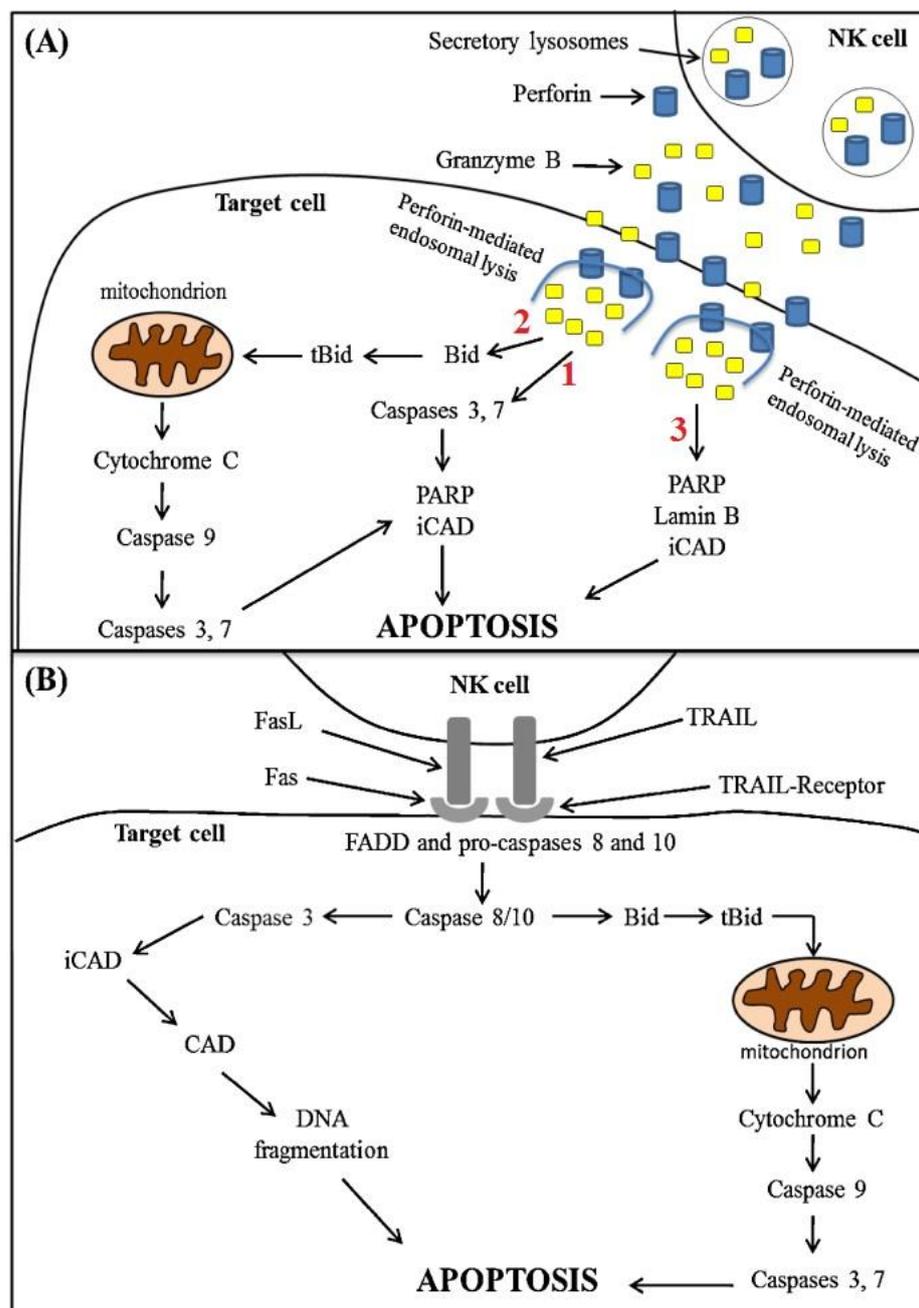


Рис. 10. Механизмы цитотоксичности естественных киллеров (J. Hazeldine, J. Lord, 2013 с изменениями) [59].

А. Гранулозависимый путь. (1) Гранзим В непосредственно активирует эффекторные каспазы; (2) Гранзим В косвенно активирует эффекторные каспазы; (3) Гранзим В вызывает независимую от каспаз гибель клеток.

В. Рецепторный путь.

Target cell – клетка-мишень, secretory lysosomes – секреторные лизосомы, perforin-mediated endosomal lysis – перфорин-опосредованный эндосомальный лизис, mitochondrion – митохондрия, apoptosis – апоптоз, DNA fragmentation – фрагментация ДНК.

3.4.2. Антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ, ADCC)

Существует также процесс, который может предшествовать перфорин-зависимому пути цитолиза, известный как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC).

Ее запуск осуществляется при распознавании Fc-рецепторами на поверхности NK-клеток (FcγRIII, CD16) Fc-фрагментов антител (IgG), опсонизирующих клетку-мишень. Индукция сигнала активации при этом происходит через вспомогательные молекулы в составе Fc-рецептора — ζ-цепь CD3 или γ-цепь. Эффективность цитолиза при таком предварительном взаимодействии существенно повышается. Антителозависимая клеточная цитотоксичность свойственна всем зрелым NK-клеткам (CD56^{dim}CD16^{bright}), экспрессирующим молекулы CD16 (т.е. зрелая NK-клетка фенотипа) [113, 190].

3.4.3. Продукция цитокинов

Цитотоксическая функция NK-клеток первоначально была описана как основная, и ее роль в защите организма не вызывает сомнений, однако позже естественные киллеры были признаны одними из главных производителей цитокинов во многих физиологических и патологических состояниях. Помимо IFN-γ NK-клетки также продуцируют множество других цитокинов, как провоспалительных, так и иммуносупрессорных, таких как TNF-α и IL-10 соответственно, а также факторы роста такие как GM-CSF, G-CSF и IL-3. NK-клетки также выделяют разнообразные хемокины, включая CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP1-α), CCL4 (MIP1-β), CCL5 (RANTES), XCL1 (лимфотактин) и CXCL8 (IL-8) [170]. В то время как биологическую функцию факторов роста, секретируемых NK-клетками, еще предстоит выяснить, секреция хемокинов является ключом к их колокализации с другими гематопозитическими клетками, такими как DC в сайтах воспаления [111]. Кроме того, продуцирование IFN-γ клетками NK помогает формировать ответы T-клеток в лимфатических узлах, возможно, путем прямого взаимодействия между наивными T-клетками и NK-клетками, мигрирующими в вторичные лимфоидные клетки из воспаленных периферических тканей и косвенным воздействием на DC [96]. Уничтожение NK-клетками клеток-мишеней также влияет на ответы T-клеток, возможно, путем снижения антигенной нагрузки (и/или посредством того, что фрагменты клеток-мишеней могут способствовать презентации антигена CD8+ цитотоксическим T-клеткам [78, 130]. NK-клетки, так или иначе, способны влиять на адаптивный иммунитет в зависимости от природы антигена, следовательно, их некорректно рассматривать только как цитолитические эффекторные клетки. Скорее, цитотоксичность NK-клеток и продукция цитокинов влияют на DC, макрофаги и

нейтрофилы [111] и определяют регуляторную функцию НК-клеток, влияя на последующие антиген-специфичные ответы Т- и В-клеток (рис. 11) Таким образом, «естественная» эффекторная функция НК-клеток отчасти была пересмотрена: НК-клетки всё же требуют предварительной стимуляции различными факторами, такими как IL-15, выделяемый DC или макрофагами, IL-12 или IL-18 для достижения их полного эффекторного потенциала, взаимодействия между НК-клетками и другими компонентами иммунного ответа [166].

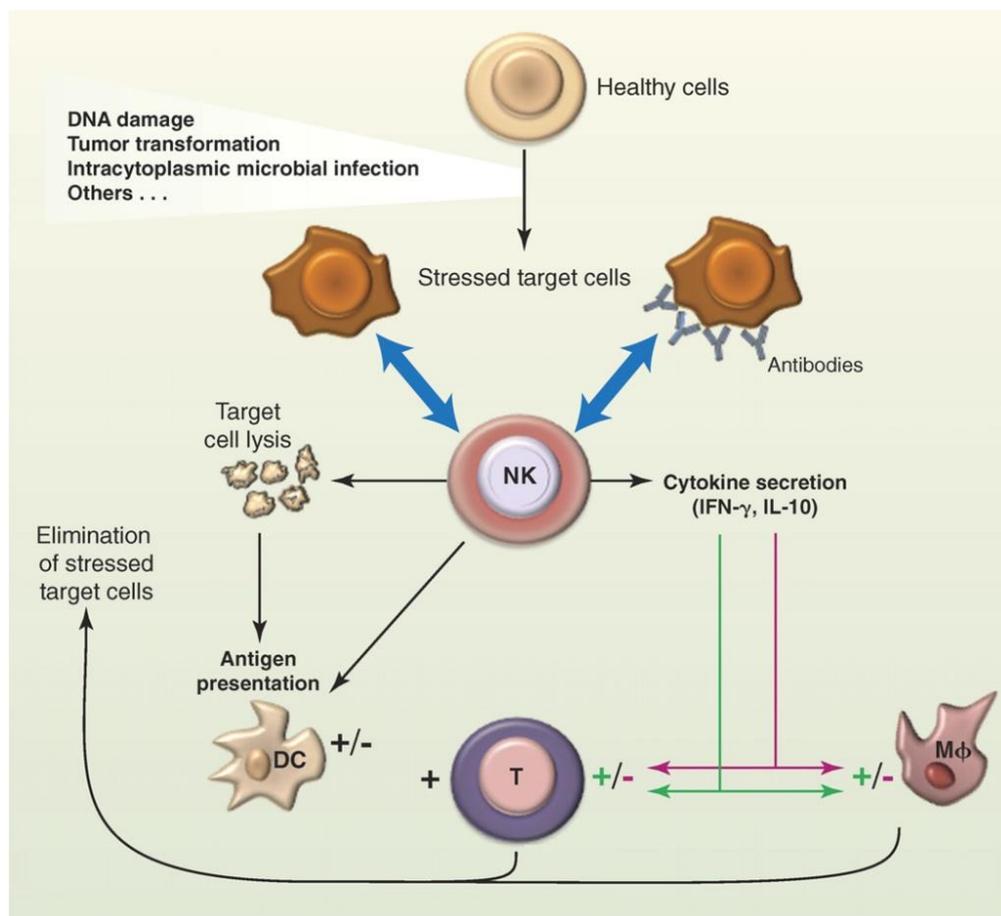


Рис. 11. Функции NK-клеток (E. Vivier, D. Raulet., A. Moretta et al., 2011) [166].

NK-клетки распознают подвергшиеся стрессу (stressed target cells) или инфицированные (intracytoplasmic microbial infection) клетки в отсутствии или в присутствии антител (antibodies) (синие стрелки). Вызванная этим активация NK-клеток может привести к лизису клетки-мишени (target cell lysis) и продуцированию различных цитокинов и хемокинов (cytokine secretion) в зависимости от природы стимуляции. В то время как NK-клетки преимущественно продуцируют IFN- γ , в случае хронической или системной инфекции увеличивается секреция IL-10. NK-клетки также могут перекрестно взаимодействовать с DC, уничтожая незрелые DC и стимулируя созревание DC с помощью IFN- γ и TNF- α , что способствует презентации антигена T-клеткам (antigen presentation). NK-клетки активируют или ингибируют макрофаги (Mφ) и T-клеточные ответы через секрецию IFN- γ (зеленые стрелки) или IL-10 (красные стрелки) соответственно. Благодаря этим воздействиям NK-клетки участвуют в формировании последующего иммунного ответа. DNA damage – повреждение ДНК, tumor transformation – опухолевая трансформация, healthy cell – здоровая клетка, elimination of stressed target cells – элиминация подвергшейся стрессу клетки.

ГЛАВА 4. ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ

4.1. Тучные клетки: определение, фенотип, функции

Тучные клетки (ТК, мастоциты) являются специализированной тканевой популяцией клеток миелоидного ряда, которая участвует в поддержании локального гомеостаза и осуществлении воспалительных реакций, а также защиты организма от многоклеточных паразитов. Это клетки овальной формы с ворсинчатой поверхностью, для которых характерен некоторый полиморфизм, связанный с их локализацией. Диаметр клеток широко варьирует - от 6 до 24 мкм [187, 190]. Ядро тучных клеток относительно крупное, несегментированное, с умеренным содержанием гетерохроматина и 1-2 ядрышками. Основной морфологической особенностью тучных клеток является наличие в цитоплазме базофильных гранул, содержащих предварительно сформированные медиаторы, такие как гистамин, гепарин, различные ферменты (протеазы, пероксидаза, дегидрогеназа и др.) серотонин, хондроитинсульфат, а также синтезированные *de novo* при стимуляции простагландины, пейкотириены, интерлейкины, факторы роста. Тучные клетки широко представлены в эпителиях, в частности, в тех, что находятся на границе с внешней средой и наиболее часто подвергаются воздействиям антигенов. Например, в коже, подслизистом слое слизистых оболочек, (в частности, в кишечнике), серозных оболочках, селезенке, периваскулярной соединительной ткани. При нарушениях целостности тканей медиаторы способствуют развитию воспалительной реакции, рекрутируя другие эффекторные иммунные клетки к месту повреждения, и обеспечивают тем самым защиту организма от различных патогенов, при этом медиаторы, выделяемые тучными клетками, вовлечены в регенеративные процессы [187, 190].

Мембранный фенотип тучных клеток определяется как FcεRI⁺ CD13⁺ CD29⁺ CD45⁺ CD117⁺ CD123⁺. Они также несут на своей поверхности рецепторы к IgG (FcγRI) и рецепторы для белков комплемента C3b и C3d и многие другие молекулы (рис.12) [145]. Благодаря наличию на поверхности, помимо молекул МНС I, МНС II и костимулирующих молекул CD86, тучные клетки способны презентировать антигены.

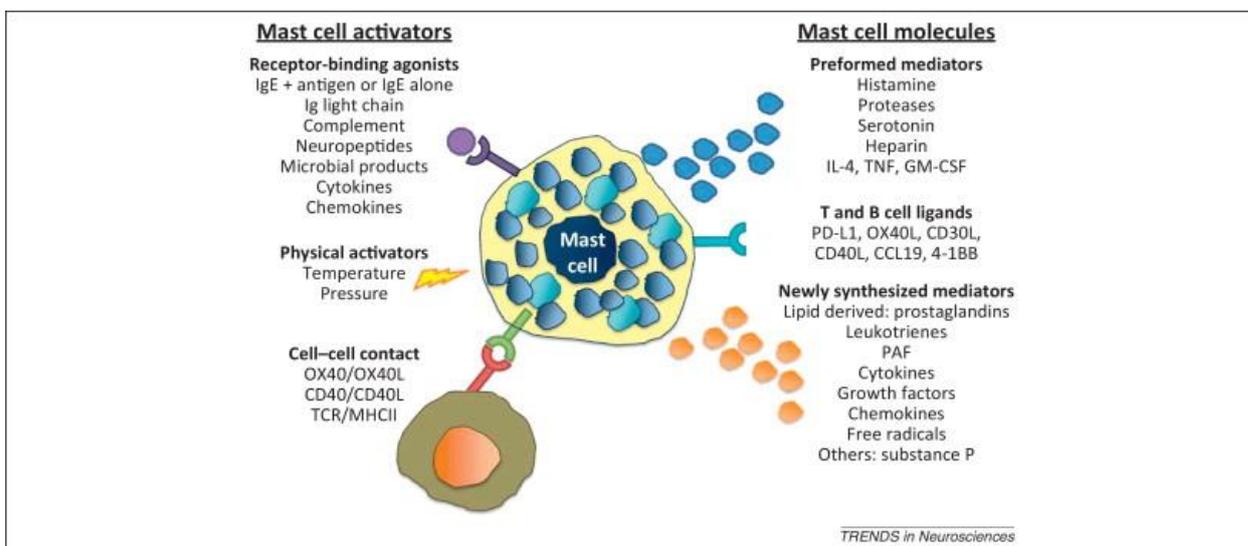


Рис. 12. Молекулы и факторы, активирующие тучные клетки, а также способы их ответа на активацию (Silver R., Curley J. P., 2013) [145]. Тучные клетки могут быть активированы с помощью разнообразных лигандов, физических факторов и взаимодействий с другими клетками. Время ответа на активацию неодинаково, и может занимать несколько минут при высвобождении предварительно синтезированных медиаторов, происходить быстро с последующим синтезом липидных медиаторов и более медленно, с синтезом цитокинов и хемокинов *de novo*. Активированные тучные клетки способны также рекрутировать другие ТК и могут увеличивать экспрессию лигандов, опосредующих взаимодействия с Т- и В-клетками. Mast cell activators – активаторы ТК, receptor-binding agonists – лиганды рецепторов, physical activators – физические активаторы ТК (температура давление), cell-cell contact – взаимодействие с другой клеткой, mast cell molecules – компоненты гранул ТК, mast cell molecules – вещества, содержащиеся в гранулах ТК, T- and B-cell ligands – лиганды Т- и В-клеток, newly synthesized mediators – синтезированные *de novo* медиаторы.

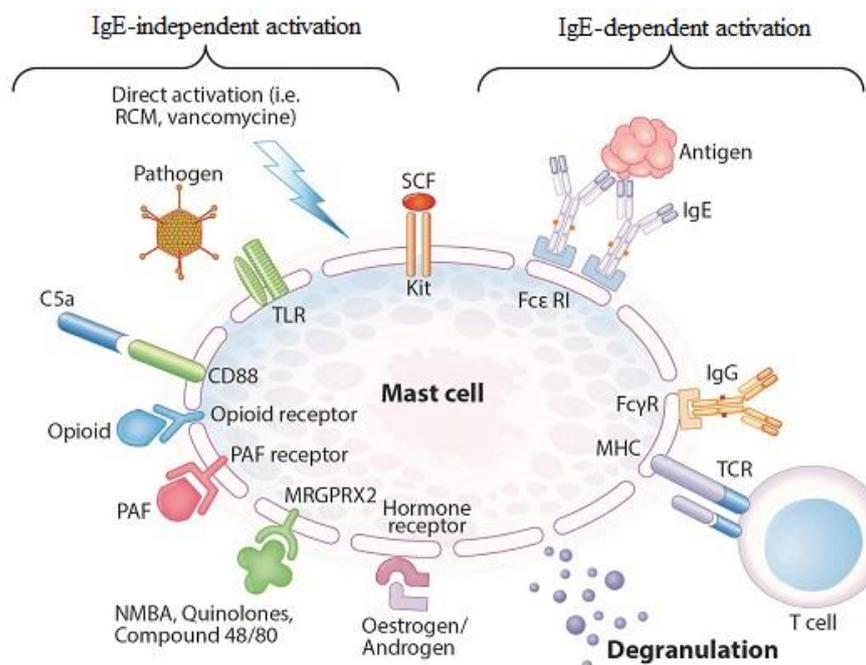


Рис. 13. IgE-зависимая и IgE-независимая активация тучных клеток по Spoerl D. et al. 2017 [148] с изменениями

В настоящее время у мышей выделяют две субпопуляции тучных клеток: ТК соединительной ткани (ТКСТ или типичные ТК) и ТК слизистых оболочек (ТКСО или атипичные ТК). Первые локализуются, главным образом, в коже и серозных оболочках, вторые – в собственной пластинке слизистой кишечника. Основными протеогликанами являются гепарин и хондроитинсульфат соответственно. Различия между ними состоят также в разной устойчивости к фиксации, морфологических характеристиках, количестве содержащихся медиаторов, чувствительности к действию определенных веществ и т.д. Существуют данные о том, что эти субпопуляции могут обратимо изменять свой фенотип на фоне паразитической инвазии и канцерогенеза [48, 187].

Наиболее важным с точки зрения осуществления функций является рецептор к IgE – FcεRI. Активация мастоцитов осуществляется двумя основными механизмами: IgE-зависимым и IgE-независимым (рис. 13). В первом случае би- или поливалентный антиген связывается с молекулой IgE, которая прикреплена к рецептору FcεRI. IgE-независимая активация может быть вызвана взаимодействием антигена с низкоаффинными рецепторами IgG, TLR-2, 3, 4, воздействием цитокинов, анафилатоксинов. При активации ТК каскад реакций приводит к дегрануляции – высвобождению содержимого гранул, которая также осуществляется двумя способами. Первый – анафилактическая дегрануляция – подразумевает массовый выброс содержимого гранул экзоцитозом. Анафилактическая дегрануляция имеет место при реакциях гиперчувствительности

немедленного типа. Второй механизм – частичная или постепенная дегрануляция – происходит с постепенным выделением небольших количеств медиаторов в межклеточное пространство, при этом они транспортируются к мембране тучной клетки с помощью микровезикул [127]. Дегрануляция не приводит к гибели тучных клеток, более того, они способны восстанавливать гранулы и их содержимое [177].

4.2. Тимические тучные клетки

С 1970-х гг стали появляться данные о тучных клетках в тимусе животных [18, 19, 178]. Причем локализация тучных клеток в пределах тимической долики может быть различной у разных видов, на разных стадиях развития органа, в норме и при патологии. В целом, литературные данные указывают, на то, что в большинстве случаев у взрослых животных мастоциты локализуются в пределах капсулы и септ тимуса [19, 95].

Несмотря на то, что со времени обнаружения тучных клеток в тимусе прошло почти 50 лет, вопрос об их функциях в тимусе продолжает оставаться открытым. ТК накапливаются в медулле тимуса и контактируют с DC, при этом наблюдается их частичная дегрануляция. В связи с этим предполагается, что тучные клетки принимают участие в селекции Т-клеток [34]. Также предполагается, что тимические тучные клетки участвуют в процессе тимопоэза, оказывая влияние на межклеточные взаимодействия, проницаемость гематотимического барьера и миграцию лимфоцитов за счет высвобождения разнообразных цитокинов и факторов роста (IL-1, 2, 3, 4, 6, TNF α , GM-CSF, NGF и др.) [128]. В пользу данной гипотезы свидетельствует локализация тучных клеток вблизи кровеносных сосудов тимуса [125, 187].

Сравнительно недавно были получены данные о поведении тучных клеток при развитии возрастной или индуцированной инволюции тимуса. Группа ученых под руководством О. С. Арташяна в ходе комплексного исследования популяции мастоцитов при стресс-реакции показала снижение количества тимических тучных клеток при стресс-индуцированной инволюции тимуса и одновременно их активацию. Авторы предполагают, что тимус является местом формирования и депонирования тучных клеток, которые в ответ на стрессовый фактор мигрируют на периферию [188]. Существенно возрастает уровень тимических ТК у человека в ходе атрофии, вызванной инфекционными заболеваниями: они распределяются по всей строме тимуса и характеризуются увеличением секреции NGF (фактора роста нервов). При этом, чем больше выражена атрофия тимуса, тем более широко распространяются в нем тучные клетки и возрастает экспрессия NGF [95].

Экспериментальные данные комплексного исследования, недавно проведенного Гусельниковой В. В., показывают, что тучные клетки в ходе онтогенеза и в ходе индуцированной атрофии тимуса у грызунов созревают непосредственно в тимусе, появляясь в нем на поздних стадиях эмбриогенеза, и завершают свое созревание к периоду половой зрелости. При этом по мере созревания тучные клетки перемещаются из медуллы и глубокого кортекса в сторону капсулы и септ тимуса. В ходе индуцированной атрофии тимуса также наблюдалось усиление дегрануляции тучных клеток, что свидетельствует об их активации. Автор предполагает, что одной из вероятных функций тучных клеток при этом является участие в разрушении соединительной ткани кортекса за счет активности протеазы mMCP-4 [187].

Эти данные позволяют предположить немаловажную роль тучных клеток в изменениях морфологии тимуса в ходе инволюции.

4.3. Дифференцировка предшественников тучных клеток

В ранее существовавших моделях дифференцировки тучных клеток не было единого мнения об их предшественнике. В экспериментах на мышах с мутантными генотипами было показано, что трансплантация костного мозга от интактных здоровых животных нивелирует дефицит тучных клеток у мышей с мутацией гена, кодирующего *c-kit* (CD117) [76]. Это дало основания предполагать, что коммитированные предшественники тучных клеток имеют костномозговое происхождение, и с кровотоком мигрируют в периферические органы и ткани, где и приобретают свой конечный фенотип. Однако детали процесса созревания тучных клеток долгое время оставались неизвестными.

Так, по одной версии, в качестве предшественника рассматривался общий миелоидный предшественник (CMP), а наличие коммитированного предшественника тучных клеток (MCP) только предполагалось, и не было подтверждено экспериментально. Согласно другой модели, MCP происходят непосредственно от HSC, однако эта гипотеза так и не стала общепринятой, так как в проводившемся параллельно исследовании был обнаружен бипотентный предшественник тучных клеток и базофилов (BMCP). Исходя из этого, было выдвинуто предположение о том, миграции гранулоцитарно-макрофагального предшественника (GMP) из костного мозга в селезенку и дальнейшей его дифференцировке в BСMP, который, в свою очередь, может выходить в кровоток, где дает коммитированного предшественника базофилов (BaP), либо направляется в периферические ткани, где дифференцируется в MCP. Кроме того, BaP был идентифицирован в костном мозге – возможно, он развивается непосредственно из GMP,

либо из мигрировавших в костный мозг из селезенки ВМСР. Также предполагается возможность дифференцировки GMP в МСР в тканях [8, 32].

На сегодняшний день приоритетной является модель дифференцировки тучных клеток, предложенная в 2010 году (рис.14) [35, 109], в которой авторы попытались объединить мировые данные. Согласно данной модели, коммитированный предшественник тучных клеток (МСР) формируется в костном мозге из HSC через последовательное прохождение стадий мультипотентного предшественника (MPP), общего миелоидного предшественника (CMP) и гранулоцитарно-макрофагального предшественника (GMP). GMP при этом способен давать начало МСр либо напрямую (через стадию FcεRI⁺ GMP), либо через формирование бипотентного предшественника тучных клеток и базофилов (ВМСР). Таким образом, тучные клетки, развившиеся напрямую, имеют костномозговое происхождение, а клетки, прошедшие стадию ВМСР, представляют боковую ветвь миелоидной линии.

В настоящее время считается, что МСР циркулируют на периферии и затем заселяют различные ткани и органы, где под влиянием локальных факторов микроокружения приобретают свой конечный фенотип [35, 187]

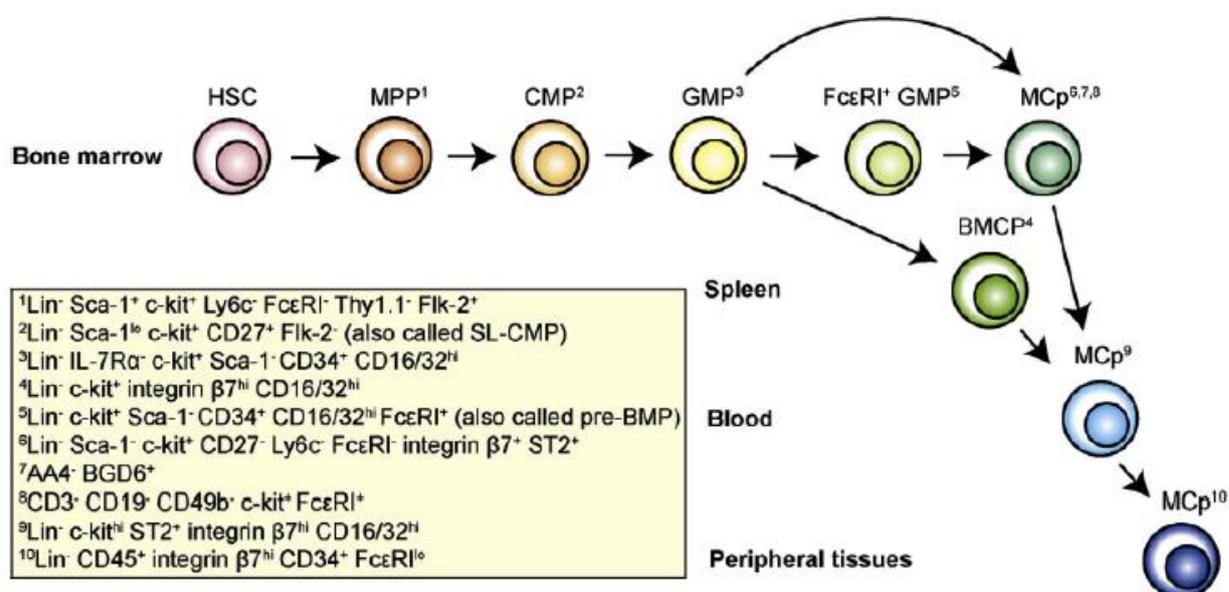


Рис. 14. Модель развития тучных клеток (Dahlin, Hallgren, 2015) [35]. HSC – гемопоэтическая стволовая клетка, MPP – мультипотентный предшественник, CMP – общий миелоидный предшественник, GMP – гранулоцитарно-макрофагальный предшественник, FcεRI⁺ GMP - гранулоцитарно-макрофагальный предшественник, экспрессирующий рецептор к IgE, ВМСР – бипотентный предшественник тучных клеток и базофилов, МСР – коммитированный предшественник тучных клеток.

В дополнение к существующим данным о костномозговом происхождении тучных клеток, все чаще обсуждается возможность их альтернативного пути развития в тимусе [151]. Предполагается, что тучные клетки дифференцируются в тимусе из ранних тимоцитов на стадии DN1 и DN2 (тогда как DN3 уже утрачивает потенциалы развития не Т-клеток) при обязательной сверхэкспрессии транскрипционного фактора Gata-3 (рис. 15).

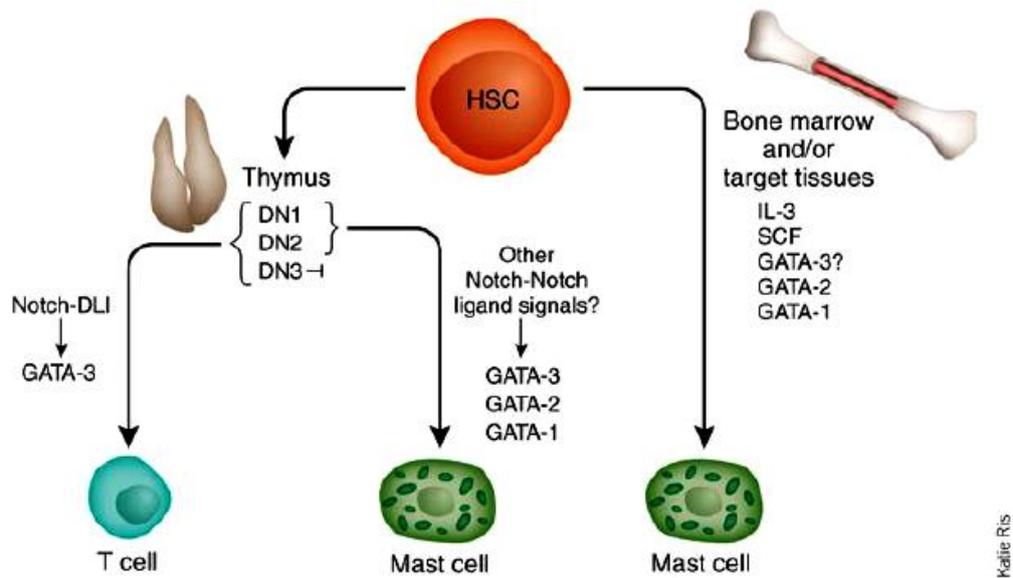


Рис. 15. Возможные пути формирования тучных клеток в ККМ и тимусе (Winandy, Brown, 2007) [175]. Развитие ТК в тимусе возможно из DN1 и DN2, но не из DN3 клеток.

ГЛАВА 5. Т-РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЛИМФОЦИТЫ

5.1. История открытия Treg-клеток

Обнаружение на периферии аутореактивных клонов Т-лимфоцитов, потенциально способных вызвать аутоиммунные заболевания, натолкнуло исследователей на мысль о том, что должны существовать некие механизмы, обеспечивающие поддержание аутоотолерантности. В 70-х гг. прошлого века общепринятой стала концепция супрессорных Т-клеток. Она основывалась на данных о продуцировании Т-клеток, подавляющих дифференцировку Т-хелперов или антигенспецифичных эффекторов, в ответ на стимулирование иммунной системы. Однако существовавшие долгие годы представления о Т-супрессорах с фенотипом CD8⁺ к 1988 г. были признаны несостоятельными. В последующие годы в связи с развитием парадигмы дихотомии Th1/Th2 наиболее вероятной казалась гипотеза взаимной регуляции этих двух субпопуляций, продуцирующих цитокины с альтернативной биологической активностью: IL-4 ингибирует некоторые типы Th1-опосредованного иммунного ответа, IFN γ ингибирует Th2-опосредованный ответ [189].

Начиная с 1995 г. появились описания вновь идентифицированных Т-регуляторных клеток (Treg) среди CD4⁺ Т-клеток, конститутивно экспрессирующих молекулу CD25. Они отличались от Th1 и Th2 по секреции цитокинов, были способны ингибировать функции обеих субпопуляций Th, блокировать аутоиммунные процессы, обеспечивая доминантную иммуноотолерантность к собственным антигенам. Было показано, что периферическую аутоотолерантность поддерживают CD25+CD4⁺Treg клетки, которые супрессируют активацию и экспансию потенциально патогенных аутореактивных клонов Т-лимфоцитов, присутствующих в норме в иммунной системе [189]

5.2. Фенотип Treg-клеток

Среди поверхностных молекул на CD4⁺ регуляторных клетках (CD5, CD45RB, CD25, CD62L, CD38), экспрессия CD25 оказалась наиболее постоянной и наиболее характерной для протективной роли этих клеток при аутоиммунных заболеваниях [9].

Однако CD25 не может считаться надёжным маркером Treg в силу того, что при иммунном ответе на инфекцию или при аутоиммунных процессах на всех активированных Т-клетках усиливается экспрессия CD25, CD28, CTLA-4 (CD152) и других молекул, характерных для поверхностного фенотипа Treg. Экспрессия CD25 может служить маркером субпопуляции Treg лишь у неиммунизированных людей и животных. Поэтому CD25 не может рассматриваться как основной маркер Treg. В связи с этим начались поиски другого молекулярного маркера Treg, с помощью которого можно

было бы надежно идентифицировать их. Вместе с тем оставался актуальным вопрос, являются ли Treg-клетки отдельной субпопуляцией Т-лимфоцитов или же они возникают в процессе изменения фенотипа Т-клеток под влиянием микроокружения. Проведенный “array”- анализ экспрессии генов Treg показал большое разнообразие маркеров, но ни один из них не подходил на роль уникального маркера только для этих клеток [189].

Foxp3 в качестве маркера Treg-клеток.

Ответ на этот вопрос был получен при изучении мутации гена, кодирующего Foxp3, как причины фатального аутоиммунного заболевания – X-ассоциированной иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии, энтеропатии (IPEX). В возрасте 3-4 недель у больных наблюдается массивная лимфопролиферация, тиреоидит, экзема, энтеропатия, пищевая аллергия, гемолитическая анемия, тромбоцитопения, тяжелые инфекции. Данная мутация с развитием сходной клинической картины была воспроизведена у мышей. При этом была обнаружена поликлональная активация CD4+ Т-клеток и в меньшей степени – CD8+ Т-клеток, увеличение секреции провоспалительных цитокинов. У нокаутированных по этому гену мышей снижалось общее количество Т-клеток, при этом они не отвечали на связывание TCR. Эти результаты позволили предположить, что Foxp3 играет важную роль в общем механизме негативной регуляции Т-клеток [38, 189].

Foxp3 принадлежит к большому семейству генов Fox (forkhead box – ДНК-связывающий домен) функционально различных факторов транскрипции, регулирующих эмбриогенез (определение оси тела и гистогенез) [69]. У человека мутации в генах Fox ведут к серьезным заболеваниям, таким как врожденная глаукома, агенез щитовидной железы и другие. Эти белки классифицируются в субсемейства, обозначенные цифрами. Их структура свидетельствует о высокой консервативности функций. Связываясь с ДНК, Foxp3 действует как репрессор транскрипции, выступая антагонистом функций NFAT за счет конкуренции за места связывания с ДНК. В результате Foxp3 ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов. Была показана высокая экспрессия Foxp3 у CD25+CD4+ Treg и низкая – у других Т-клеток. Развитие Treg критически зависит от экспрессии Foxp3. Менее 10% CD25–CD4+ Т-клеток экспрессируют Foxp3 и отвечают на стимуляцию через TCR экспрессией CD25 и Foxp3^{hi}, приобретая активность Treg-клеток. Но их происхождение и связь с CD25+ Treg не изучены [38, 189].

Таким образом, было доказано, что Treg представляют собой особую субпопуляцию Т-клеток, выполняющую жизненно важные функции медиаторов иммунологической толерантности, а фактор транскрипции Foxp3 является наиболее характерным и единственным надежным маркером Treg-клеток. Foxp3 является ключевым контрольным геном в развитии и функциях Treg-клеток. Субпопуляция

CD4+CD25+Foxp3+ Treg-клеток активно участвует в негативном контроле разных форм иммунного ответа.

Естественные периферические Treg CD25+CD4+ конститутивно экспрессируют Foxp3 в отличие от других Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, NK и NKT-клеток. Этот механизм доминантной ауто толерантности является физиологической функцией организма [9].

Таким образом, в норме иммунная система эндогенно продуцирует в качестве нормальной субпопуляции CD4+ Т-клетки, высоко специализированные на супрессорных функциях. Большая часть эндогенных Treg продуцируются в нормальном тимусе как функционально отличные, зрелые Т-клетки (естественные Treg-клетки), а меньшая часть Treg индуцируются из наивных Т-клеток после их встречи с антигеном на периферии (адаптивные Treg-клетки) [36]

5.3. Субпопуляции Treg-клеток

5.3.1. Естественные Treg-клетки

Вопрос о разделении Treg на субпопуляции является в известной степени дискуссионным и связан с широким распространением и достижениями в применении метода проточной цитометрии. Субпопуляция естественных Treg-клеток формируется в тимусе. Продукция Treg-клеток была названа третьей функцией тимуса. Предшественники Treg-клеток были выявлены в тимусе среди CD4+CD25+ клеток. Формирование естественной субпопуляции Treg-клеток индуцируется ответом аутореактивных TCR с высокой авидностью на комплексы собственных пептидов с МНС примерно в тех же условиях, при которых происходит позитивная и негативная селекция (рис. 16). Treg-клетки проявляют большую резистентность к TCR-индуцированному апоптозу и их количество может увеличиваться за счет избирательной элиминации нерегуляторных CD4+ Т-клеток. Возможно, в дальнейшем эпителиальные клетки тимуса поддерживают дифференцировку Treg-клеток [36]. Формирование естественной субпопуляции Treg-клеток зависит не только от TCR, но и от костимулирующих молекул CD28, взаимодействующих с CD80/CD86 – от них зависит величина пула Treg-клеток. Дефекты CD28 ведут к недостаточности Treg-клеток и к развитию аутоиммунных заболеваний. Цитокиновые сигналы, безусловно, также влияют на развитие Treg-клеток в тимусе. Высокие концентрации TGFβ индуцируют приобретение регулирующих функций TCR-стимулированными Т-клетками *in vitro*, а *in vivo* он влияет на количество и функциональную активность Treg-клеток [44]. Сигналы IL-2-IL2R способствуют развитию и экспансии Treg-клеток. Источником IL-2 служат другие Т-клетки, в том числе, аутореактивные. Таким образом, IL-2 обеспечивает контроль с обратной связью между Т-

эффекторами и Treg-клетками, которые, в свою очередь, ингибируют продукцию этого цитокина [136].

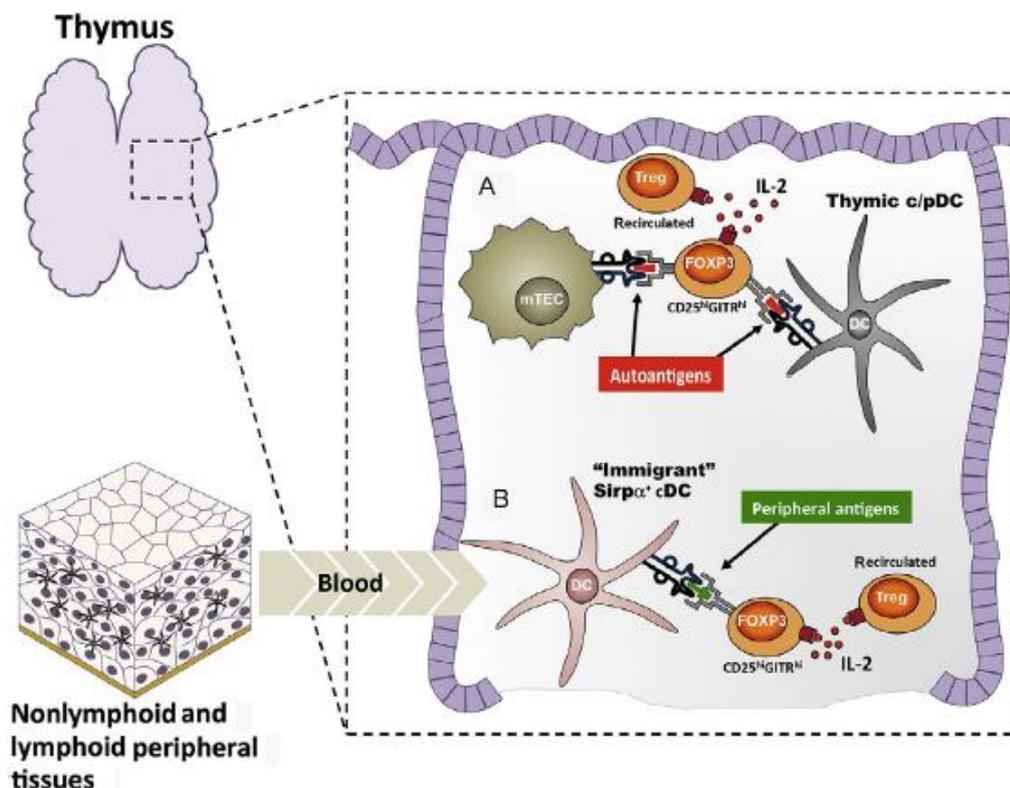


Рис.16. Селекция Treg-клеток в тимусе (Ulges et al. 2016) [160].

Презентация антигена и селекция антигена в тимусе: (А) Медуллярные тимические эпителиальные клетки (mTEC) и тимические дендритные клетки (thymic c/p DC) (обычные и плазматоидные ДК) презентируют антигены и вносят вклад в индукцию экспрессии FoxP3 в CD4+CD25^{hi}GITR^{hi} тимоцитах и позитивную селекцию Treg-клеток. (В) Иммигрировавшие Sirpα⁺ cDC являются дополнительным фактором, важным для селекции Treg путём презентирования антигена из тканей или микробиоты. После индукции экспрессии FoxP3 развивающиеся Treg конкурируют за IL-2 с рециркулирующими зрелыми Treg-клетками с периферии, предположительно регулируя популяцию Treg. Nonlymphoid and lymphoid peripheral tissues – нелимфоидные и лимфоидные периферические ткани, blood – кровь, thymus – тимус, autoantigenes – аутоантигены, peripheral autoantigenes – периферические антигены.

Естественные Treg-клетки предупреждают иммунный ответ против аутоантигенов, это физиологический конститутивный механизм доминантной толерантности к собственным антигенам. Возможно, что генетически детерминированная повышенная чувствительность к аутоиммунным заболеваниям ассоциирована с

дефектностью естественных Treg-клеток, которые в норме поддерживают ауто толерантность [121]. Так, при диабете I типа или рассеянном склерозе избирательно снижено количество естественных Treg-клеток [10]. Естественные Treg-клетки могут дифференцироваться в адаптивные под влиянием IL-10, но и Th могут дифференцироваться в Treg-клетки под влиянием TGF β или IL-10 [159].

Допускается использование Treg-клетками разных механизмов иммуносупрессии. Супрессия *in vitro* зависит от межклеточного контакта: естественные Treg-клетки рассматриваются как антиген-специфические T-супрессоры, которые после распознавания антигена могут действовать через CTLA-4 – ингибирующие рецепторы, супрессируя T-клеточную активность. Кроме того, активированные Treg-клетки могут проявлять цитолитическую активность и уничтожать активированные CD4⁺ и CD8⁺ T-лимфоциты перфорин-гранзимным путем.

Разные костимулирующие молекулы и цитокины контролируют тимическое развитие, выживание на периферии и активацию естественных Treg-клеток, меняя интенсивность опосредованной Treg-клетками супрессии и поддерживая ауто толерантность на стабильном уровне [141].

5.3.2. Адаптивные Treg-клетки

Адаптивные Treg-клетки могут дифференцироваться на периферии из предшественников общих с T-эффекторами при условии субоптимальной презентации антигена и недостаточной костимуляции. На периферии наивные T-клетки могут трансформироваться в CD4⁺CD25⁺ при неполноценной презентации аутоантигенов, связанной с недостатком костимуляции [22]. В некоторых тканях Treg, по-видимому, участвуют даже в генерировании популяции резидентных T-клеток [52]. Для Treg-клеток характерна экспрессия поверхностных молекул CD4, CD25, CTLA-4, GITR, CD28, секреция IL-10, IL-4, TGF β и низкий уровень IFN γ [54].

Описана особая субпопуляция адаптивных Treg-клеток с фенотипом CD4⁺CD25^{high}, присутствие которых в человеческой крови может вести к изменениям в соотношениях субпопуляций T-клеток и к индукции аутоиммунных заболеваний. Они не секретируют IFN γ , IL-13, IL-10, но, напротив, способны ингибировать их секрецию в кокультурах с активированными CD4⁺ T-клетками. Их супрессорный механизм не зависит от цитокинов (IL-10, TGF β). Эти клетки экспрессируют MHC II, что делает возможной T-T-презентацию с последующим развитием анергии [11].

Некоторые пути введения антигена (оральный или интраназальный) селективно индуцируют появление Treg-клеток, например, попадание инсулина и других

компонентов в грудное молоко. Возможно, появление Treg-клеток может быть вызвано молекулярной мимикрией аутоантигена с чужеродным антигеном микробного происхождения. Индукция Treg-клеток, как правило, происходит в областях, разграничивающих внутреннюю среду от внешней среды, куда относятся кожные и слизистые покровы. Тканевые Treg-клетки мыши и человека приспособляются к своему расположению, в частности с помощью полученных от тканей сигналов, приводящих к активированию киназы и экспрессии, активации и ядерной транслокации определенных факторов транскрипции [159]. Несмотря на различные транскрипционные программы, показано, что популяции тканевых резидентных T-клеток разделяют некоторые свойства эффекторных T-клеток памяти, предполагается, что обе популяции происходят от общих предшественников. В частности, инфицированные барьерные ткани, такие как кожа, кишечник и легкие кажутся предрасположенными для развития популяций местных резидентных T-клеток. Из-за их генерации в процессе иммунных реакций против некоторых патогенных микроорганизмов эти популяции являются патоген-специфичными. Однако наблюдения в других тканях, таких как центральной нервной система, поджелудочная железа, почки или сердце позволяют предположить, что условия окружающей среды для создания T-клеток-резидентов существуют также в других тканях и при условии отсутствия инфекции [156].

Что же касается супрессивного действия большинства адаптивных Treg-клеток, его зависимость от влияния цитокинов не вызывает сомнений. Цитокины могут подавлять иммунный ответ, особенно, аутоиммунный и в меньшей степени – аллоиммунный ответ. TGF β и IL-10 ингибируют Th1 и Th2 –опосредованный ответ *in vivo*. Более широким спектром супрессирующего действия обладает TGF β . Одновременно наблюдается снижение экспрессии костимулирующих молекул [10].

Точкой приложения супрессирующего действия может служить транскрипционный контроль продукции IL-2 эффекторными клетками, или Treg-клетки конкурентно связывают IL-2, т.к. экспрессируют большее количество IL-2R. Конкуренция за IL-2 может вести к супрессии пролиферации эффекторных клеток [46].

5.4. Функции Treg-клеток

Таким образом, все субпопуляции Treg-клеток и продуцируемые ими цитокины активно регулируют периферическую толерантность.

Предполагается, что механизмы супрессорного действия CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток включают (рис. 17):

1. Подавление созревания и функций дендритных клеток – осуществляется посредством прямого контакта через связывание молекулы CTLA-4 на Treg-клетках с CD80/CD86 молекулами на антигенпрезентирующих клетках (АПК), или на активированных клетках-эффекторах;

2. Секрецию ингибирующих цитокинов (TGF β , IL-10);

3. Цитолитическую активность. При контакте с клеткой-мишенью Treg высвобождают перфорины, образующие поры в мембране. Через эти поры в клетку поступают гранзимы – сериновые протеазы, индуцирующие каспазы и, в конечном счёте, запуск апоптоза;

4. Индукцию метаболических нарушений. Например, Treg клетки могут потреблять IL-2, лишая активированные эффекторные T-клетки этого важного фактора и, таким образом, подавляя их экспансию.

CD4+CD25+ Treg-клетки способны селективно супрессировать разные свойства T-эффекторов: секрецию цитокинов, экспрессию хемокиновых рецепторов, цитолитическое действие, т.е. они обратимо интерферируют с TCR-сигналами проксимально в отношении разных факторов транскрипции, индуцирующих разные функции [21].

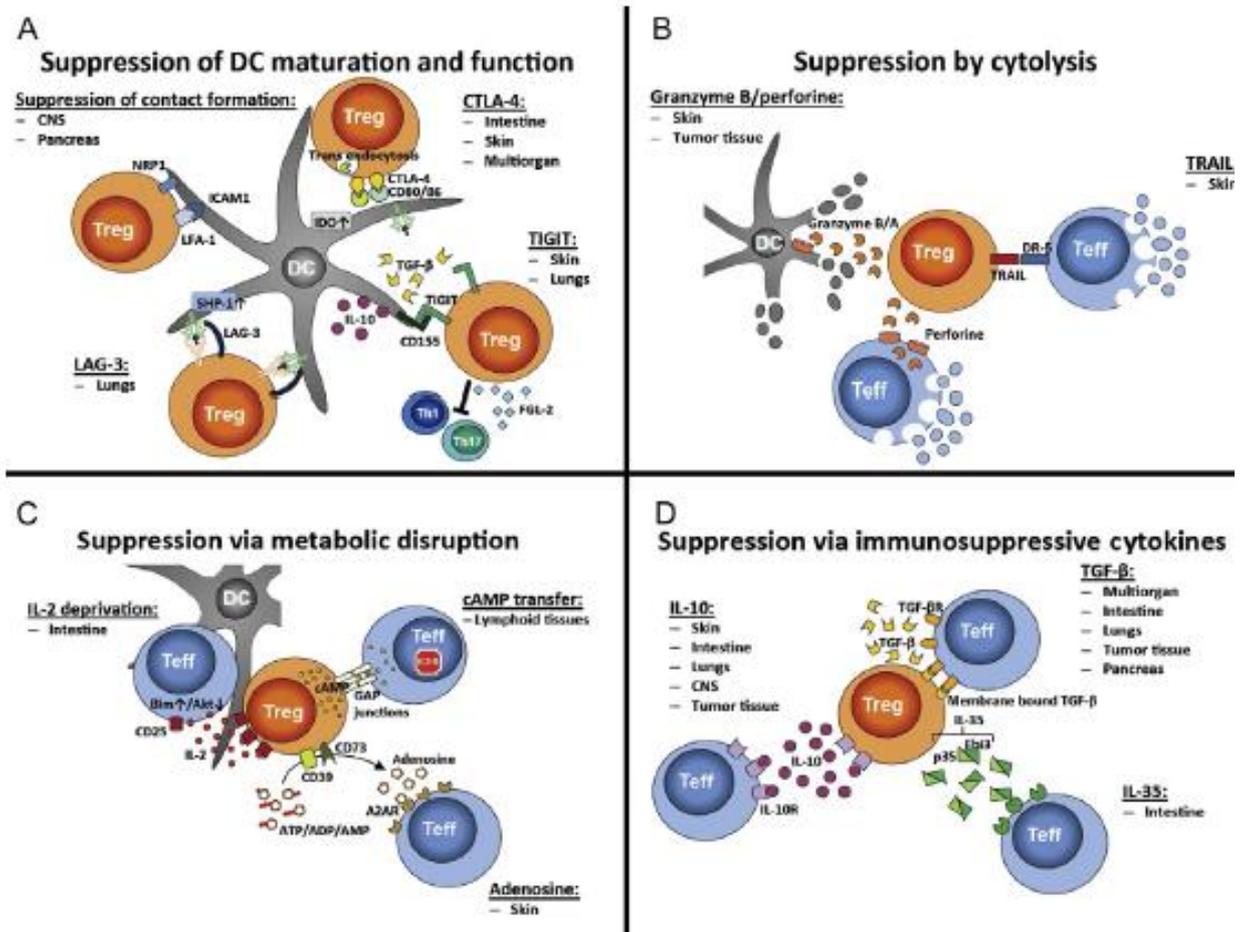


Рис. 17. Супрессирующие механизмы Треггов (Ulges et al, 2016) [160].
 (A) подавление созревания и функций дендритных клеток; (B) супрессия путём цитотоксичности; (C) супрессия путём индукции метаболических нарушений; (D) супрессия путём секреции ингибирующих цитокинов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Суммируя данные литературы, стоит отметить, что базовая концепция созревания и дифференцировки Т-лимфоцитов в настоящее время не имеет однозначного объяснения. В частности, обращает на себя внимание разрыв в структуре DN2 клеток и проблема их идентификации как отдельной субпопуляции клеток. Последние исследования, касающиеся DN2 клеток, показывают, что данные, полученные с использованием ранее обнаруженных маркеров DN2, как минимум, некорректны, поскольку известные на сегодняшний день стратегии идентификации этих клеток не учитывают некоторые проблемные моменты, такие как перекрывание экспрессии по некоторым маркерам (например, CD44 и i.c CD3ε) [27]. Правильная идентификация субпопуляции DN2 (DN2a и DN2b) имеет немаловажное значение еще и в силу того, что данная субпопуляция является одной из ключевых точек созревания тимоцитов. На этом этапе происходит важное событие дифференцировки Т-клеток – реаранжировка V-генов TCR, при этом экспрессируются гены Rag1, Rag2 и tdt. Перестройка генов происходит сначала в одной хромосоме, затем, если она завершилась неудачно, процесс повторяется во второй хромосоме. В случае успешного прохождения реаранжировки на одной из хромосом, клетка экспрессирует пре-TCR и становится полностью коммитированной к Т-линии (при обязательном участии Notch-сигналинга), утрачивая потенциал развития в другие клетки (DN2b). В случае неудачи, как принято считать, клетка подвергается апоптозу [190]. Однако экспериментальные данные позволяют предполагать, что существуют и альтернативные пути для развития клеток, не прошедших отбор развития по Т-клеточной линии. Одним из возможных боковых путей дифференцировки является НК-клеточный путь.

Несмотря на то, что микроокружение тимуса создает условия, поддерживающие развитие Т-клеток и одновременно подавляющие другие клеточные судьбы, на этапах DN1/ETP и DN2 возможно переключение на альтернативные клеточные пути, в том числе на путь НК-клеток [39]. Этот процесс требует присутствия цитокинов IL-7, 15, а также, по разным данным, транскрипционных факторов Runx3, Nfil3, Id2 и GATA-3 [4, 71, 126, 169]. Сигналы Notch, которые, как полагали ранее, считаются необходимыми для прохождения клеткой Т-клеточного пути и угнетают переключение на другие линии, по всей видимости, и также необходимы для развития НК-клеток [140]. Транскрипционный фактор Bcl11b, напротив, действует в противовес им, и совместно эти факторы детерминируют развитие Т- и НК-клеточных путей. Интересно, что DN2 является важным, особенно в контексте данной работы, но не единственным источником

образования NK-клеток в тимусе. Это могут быть ETP (DN1) клетки, так как они тоже сохраняют NK-потенциал, или костномозговые предшественники (NKP) [45]. Специфические события, происходящие в тимусе при формировании NK-клеток (влияние определенных транскрипционных факторов, в частности, GATA-3 и цитокинов) формируют отдельную субпопуляцию тимических NK-клеток, сохраняющуюся на периферии. Их отличает экспрессия CD127 (IL7RA), а также их цитокин-продуцирующая функция [140]. Однако функциональные роли тимических NK-клеток нуждаются в более тщательном изучении, так как вполне вероятно, что NK –клетки тимуса могут играть особую роль как в тимусе, так и в периферических органах. Предполагается, что функциональная гетерогенность NK-клеток может быть достигнута именно посредством различных путей развития NK-клеток в тимусе и костном мозге [45].

Другим возможным вариантом бокового ответвления от магистрального пути дифференцировки может быть путь тучных клеток. Литературных данных касательно их локализации и дифференцировки в тимусе гораздо меньше, и единичные комплексные исследования представляют особую ценность. Так, например, экспериментально была подтверждена гипотеза о созревании тучных клеток в тимусе [187]. Что касается их внутритимической дифференцировки, то расхождений в данных не выявляется: тучные клетки так же, как и NK-клетки, отходят от магистрального пути на стадиях DN1 и DN2. Их развитие тоже требует GATA-3, но, по-видимому, в существенно больших количествах, а также сигналов Notch-DLI. Доподлинно неизвестны детали выбора между разными клеточными линиями на одних тех же стадиях предшественников. Скорее всего, ключевая роль в этих процессах принадлежит балансу и уровню экспрессии транскрипционных факторов и их сочетанному действию. ТК, наряду со своей обычной локализацией в пограничных тканях, где особенно велика вероятность взаимодействия с разнообразными антигенами, хорошо представлены в тимусе. Согласно устоявшейся иммунологической теории тимус изолирован (по крайней мере, в области кортекса) от контакта с антигеном гематотимическим барьером, несмотря на это он по количеству тучных клеток занимает второе место после кожи, а по функциональной активности (степени дегрануляции и синтетической активности) сопоставим с ней. При этом данные о популяции тимических ТК отрывочны, а вопрос об их функциях на сегодняшний день продолжает оставаться открытым [187].

Варианты развития клеток, вопреки общему мнению, возможны не только на этапе некоммутированного предшественника, но и на гораздо более поздних стадиях развития. В качестве примера возможного выбора клеточного пути на стадии SP CD4+

было рассмотрено формирование Т-регуляторных лимфоцитов. Данные клетки, как и все SP, формируются в тимусе и представляют конечные этапы дифференцировки Т-клеток. Их предшественники характеризуются фенотипом CD4+CD25+. Интересно, что в процессе дифференцировки они используют механизм позитивной селекции, сходный с таковым на этапе DP клеток, но не проходят негативную селекцию, сохраняя способность распознавать аутоантигены с высокой степенью сродства (агонистзависимая селекция) [190]. Это обуславливает основную функцию Т-регуляторных лимфоцитов – поддержание аутоотолерантности и элиминацию аутореактивных клонов, избежавших негативной селекции. Дифференцировка Treg требует наличия IL-2, Notch3 и STAT-5-сигналинга и костимуляции CD28. Индукция FoxP3 может происходить как на стадии SP CD4+, так и на более ранней стадии DP CD4+ CD8+. Это подтверждает сходство процессов позитивной селекции для DP и SP-клеток. Также отмечается способность естественных Treg-клеток дифференцироваться в субпопуляцию адаптивных Treg под влиянием IL-10, при этом и Th тоже могут дифференцироваться в адаптивные Treg-клетки в присутствии TGFβ или IL-10 [160]. Более подробные детали дифференцировки Treg-клеток описываются сложными эпигенетическими механизмами, заслуживающими отдельного рассмотрения. Таким образом, несмотря на наличие в литературе достаточного количества общей информации, процесс дифференцировки Т-регуляторных клеток нуждается в более пристальном изучении с точки зрения цитологии.

На протяжении долгого времени тимус считался органом, ответственным исключительно за формирование и дифференцировку Т-лимфоцитов. Эта функция, несомненно, является ведущей и имеет огромное значение в защите организма от разнообразных патогенов и поддержании гомеостаза, однако, судя по анализу современных литературных данных, она не является единственной для тимуса. Кроме того, на сегодняшний день принято считать, что тимус не имеет собственных стволовых клеток, однако все больше данных свидетельствует об обратном, и вопрос о наличии в тимусе собственных стволовых клеток и остается открытым.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обзор и анализ литературных данных, посвященной процессам, происходящим в тимусе с точки зрения формирования альтернативных клеточных популяций, отличных от CD4⁺ и CD8⁺ клеток, позволяет сделать следующие выводы:

1. Тимус – одно из вероятных мест формирования НК- и тучных клеток. Кроме того, есть несколько точек созревания, где развитие может пойти по НК-клеточной линии;
2. При неудачном прохождении магистрального пути дифференцировки клетка не всегда уходит в апоптоз: она сохраняет потенциал некоторых клеточных линий и, следовательно, возможность развития по альтернативному пути.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Akashi K. B Lymphopoiesis in the Thymus / K. Akashi, L. I. Richie, T. Miyamoto, W. H. Carr, I. L. Weissman // *J. Immunol.* – 2000. – V.164 – № 10 – 5221–5226p.
2. Aliahmad P. Shared dependence on TOX for development of lymphoid tissue inducer cell and NK cell lineages / P. Aliahmad, B. De Torre, J. Kaye // *Nat Immunol* – 2010. – V.11 – № 10 – 945–952p.
3. Allman D. Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors / D. Allman, A. Sambandam, S. Kim, J. P. Miller, A. Pagan, D. Well, A. Meraz, A. Bhandoola // *Nat. Immunol.* – 2003. – V.4 – № 2 – 168–174p.
4. Anderson M.K. At the crossroads: Diverse roles of early thymocyte transcriptional regulators // *Immunol. Rev.* – 2006. – V.209. – 191–211p.
5. Anfossi N. Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I / N. Anfossi, P. André, S. Guia, C. S. Falk, S. Roetynck, C. A. Stewart, V. Bresò, C. Frassati, D. Vireton, D. Middleton, F. Romagné, S. Ugolini, E. Vivier // *Immunity* – 2006. – V.25 – № 2 – 331–342p.
6. Arck P.C. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health / P. C. Arck, K. Hecher // *Nat. Med.* – 2013. – V.19 – № 5 – 548–556p.
7. Ardavin C. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population / C. Ardavin, L. Wu, C.-L. Li, K. Shortman // *Nature* – 1993. – V.362 – № 6422 – 761–763p.
8. Arinobu Y. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. / Y. Arinobu, H. Iwasaki, M. F. Gurish, S. Mizuno, H. Shigematsu, H. Ozawa, D. G. Tenen, K. F. Austen, K. Akashi // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2005. – V.102 – № 50 – 18105–10p.
9. Athanassakis I. T-regulatory cells: Are we re-discovering T suppressors? / I. Athanassakis, S. Vassiliadis // *Immunol. Lett.* – 2002. – V.84 – № 3 – 179–183p.
10. Bach J.-F. Regulatory T cells under scrutiny. / J.-F. Bach, J. François Bach // *Nat. Rev. Immunol.* – 2003. – V.3 – № 3 – 189–98p.
11. Baecher-Allan C. CD4⁺CD25^{high} Regulatory Cells in Human Peripheral Blood / C. Baecher-Allan, J. a. Brown, G. J. Freeman, D. a. Hafler // *J. Immunol.* – 2001. – V.167 – № 3 – 1245–1253p.
12. Balciunaite G. The role of Notch and IL-7 signaling in early thymocyte proliferation and differentiation / G. Balciunaite, R. Ceredig, H. J. Fehling, J. C. Zúñiga-Pflücker, A. G. Rolink // *Eur. J. Immunol.* – 2005. – V.35 – № 4 – 1292–1300p.
13. Balciunaite G. The earliest subpopulation of mouse thymocytes contains potent T , significant macrophage , and natural killer cell but no B-lymphocyte potential / G. Balciunaite,

- R. Ceredig, A. G. Rolink – 2018. – V.105 – № 5 – 1930–1937p.
14. Bauer S. Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA / S. Bauer // *Science* (80-.). – 1999. – V.285 – № 5428 – 727–729p.
15. Bennett I.M. Definition of a natural killer NKR-P1A+/CD56-/CD16- functionally immature human NK cell subset that differentiates in vitro in the presence of interleukin 12. / I. M. Bennett, O. Zatssepina, L. Zamai, L. Azzoni, T. Mikheeva, B. Perussia // *J. Exp. Med.* – 1996. – V.184 – № 5 – 1845–56p.
16. Berghie T. Vanden Regulated necrosis: The expanding network of non-apoptotic cell death pathways // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2014. – V.15. – № 2. – 135–147p.
17. Berzins S.P. The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool. / S. P. Berzins, R. L. Boyd, J. F. Miller // *J. Exp. Med.* – 1998. – V.187 – № 11 – 1839–1848p.
18. Bigaj J. Argentaffin mast cells in the thymus of the frog. / J. Bigaj, M. Urbańska-Stopa, B. Płytycz // *Folia Histochem. Cytobiol.* – 1991. – V.29 – № 1 – 45–47p.
19. Bodey B. Development and histogenesis of the thymus in dog. A light and electron microscopical study / B. Bodey, W. Calvo, O. Prummer, T. M. Fliedner, M. Borysenko // *Dev. Comp. Immunol.* – 1987. – V.11 – № 1 – 227–238p.
20. Boehm T. Self-renewal of thymocytes in the absence of competitive precursor replenishment: Figure 1. / T. Boehm // *J. Exp. Med.* – 2012. – V.209 – № 8 – 1397–1400p.
21. Boehmer H. Von Mechanisms of suppression by suppressor T cells // *Nat. Immunol.* – 2005. – V.6. – № 4. – 338–344p.
22. Boudreau J.E. Natural Killer Cell Education and the Response to Infection and Cancer Therapy: Stay Tuned / J. E. Boudreau, K. C. Hsu // *Trends Immunol.* – 2018. – V.xx – 1–18p.
23. Boudreau J.E. KIR3DL1 and HLA-B Density and Binding Calibrate NK Education and Response to HIV / J. E. Boudreau, T. J. Mulrooney, J.-B. Le Luduec, E. Barker, K. C. Hsu // *J. Immunol.* – 2016. – V.196 – № 8 – 3398–3410p.
24. Brown G. The sequential determination model of hematopoiesis / G. Brown, P. J. Hughes, R. H. Michell, A. G. Rolink, R. Ceredig // *Trends Immunol.* – 2007. – V.28 – № 10 – 442–448p.
25. Carlyle J.R. Natural killer cell development and function precede $\alpha\beta$ T cell differentiation in mouse fetal thymic ontogeny / J. R. Carlyle, A. M. Michie, S. K. Cho, J. C. Zúñiga-Pflücker // *J. Immunol.* – 1998. – V.160 – № 2.
26. Carlyle J.R. Regulation of NK1.1 expression during lineage commitment of progenitor thymocytes / J. R. Carlyle, J. C. Zúñiga-Pflücker // *J. Immunol.* – 1998. – V.161 – № 12 – 6544–6551p.
27. Ceredig R. Problems defining DN2 thymocytes / R. Ceredig, N. Bosco, T. Rolink //

- Immunol. Cell Biol. – 2008. – V.86 – № 7 – 545–547p.
28. Ceredig R. Expression of interleukin-2 receptors as a differentiation marker on intrathymic stem cells / R. Ceredig, J. W. Lowenthal, M. Nabholz, H. R. MacDonald // *Nature* – 1985. – V.314 – № 6006 – 98–100p.
29. Ceredig R. A positive look at double-negative thymocytes // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – V.2. – № 11. – 888–896p.
30. Chan A. CD56bright Human NK Cells Differentiate into CD56dim Cells: Role of Contact with Peripheral Fibroblasts / A. Chan, D.-L. Hong, A. Atzberger, S. Kollnberger, A. D. Filer, C. D. Buckley, A. McMichael, T. Enver, P. Bowness // *J. Immunol.* – 2007. – V.179 – № 1 – 89–94p.
31. Chávez-Galán L. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. / L. Chávez-Galán, M. C. Arenas-Del Angel, E. Zenteno, R. Chávez, R. Lascurain // *Cell. Mol. Immunol.* – 2009. – V.6 – № 1 – 15–25p.
32. Chen C.-C. Identification of mast cell progenitors in adult mice. / C.-C. Chen, M. A. Grimbaldeston, M. Tsai, I. L. Weissman, S. J. Galli // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2005. – V.102 – № 32 – 11408–13p.
33. Chiossone L. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program / L. Chiossone, J. Chaix, N. Fuseri, C. Roth, E. Vivier, T. Walzer // *Blood* – 2009. – V.113 – № 22 – 5488–5496p.
34. Crivellato E. The thymus is a site of mast cell development in chicken embryos / E. Crivellato, B. Nico, M. Battistig, C. A. Beltrami, D. Ribatti // *Anat. Embryol. (Berl.)* – 2005. – V.209 – № 3 – 243–249p.
35. Dahlin J.S. Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues // *Mol. Immunol.* – 2015. – V.63. – № 1. – 9–17p.
36. Dhuban K. Bin Functional dynamics of Foxp3⁺ regulatory T cells in mice and humans. / K. Bin Dhuban, M. Kornete, E. S Mason, C. a Piccirillo // *Immunol. Rev.* – 2014. – V.259 – № 1 – 140–58p.
37. Dzhagalov I. How to find your way through the thymus: A practical guide for aspiring T cells // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2012. – V.69. – № 5. – 663–682p.
38. Fontenot J.D. A well adapted regulatory contrivance: Regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3 // *Nat. Immunol.* – 2005. – V.6. – № 4. – 331–337p.
39. Fowlkes B.J. Early T lymphocytes. Differentiation in vivo of adult intrathymic precursor cells. / B. J. Fowlkes, L. Edison, B. J. Mathieson, T. M. Chused // *J. Exp. Med.* – 1985. – V.162 – № 3 – 802–22p.
40. Freud A.G. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into

- CD56bright natural killer cells / A. G. Freud, B. Becknell, S. Roychowdhury, H. C. Mao, A. K. Ferketich, G. J. Nuovo, T. L. Hughes, T. B. Marburger, J. Sung, R. A. Baiocchi, M. Guimond, M. A. Caligiuri // *Immunity* – 2005. – V.22 – № 3 – 295–304p.
41. Freud A.G. Human natural killer cell development // *Immunol. Rev.* – 2006. – V.214. – № 1. – 56–72p.
42. Freud A.G. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo / A. G. Freud, A. Yokohama, B. Becknell, M. T. Lee, H. C. Mao, A. K. Ferketich, M. A. Caligiuri // *J. Exp. Med.* – 2006. – V.203 – № 4 – 1033–1043p.
43. Fu B. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects / B. Fu, Z. Tian, H. Wei // *Immunology* – 2014. – V.141 – № 4 – 483–489p.
44. Fu S. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. / S. Fu, N. Zhang, A. C. Yopp, D. Chen, M. Mao, D. Chen, H. Zhang, Y. Ding, J. S. Bromberg // *Am. J. Transplant* – 2004. – V.4 – № 10 – 1614–27p.
45. Garcı M.E. The intrathymic crossroads of T and NK cell differentiation / M. E. Garcı, C. A. J. Vosshenrich, J. P. Di Santo – 2010. – V.238 – 126–137p.
46. Garib F.Y. T-Regulatory Cells as Part of Strategy of Immune Evasion by Pathogens. / F. Y. Garib, A. P. Rizopulu // *Biochem. Biokhimiia* – 2015. – V.80 – № 8 – 957–71p.
47. Gascoyne D.M. The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development / D. M. Gascoyne, E. Long, H. Veiga-Fernandes, J. de Boer, O. Williams, B. Seddon, M. Coles, D. Kioussis, H. J. M. Brady // *Nat. Immunol.* – 2009. – V.10 – № 10 – 1118–1124p.
48. Gilead L. Fibroblasts induce heparin synthesis in chondroitin sulfate E containing human bone marrow-derived mast cells. / L. Gilead, O. Bibi, E. Razin // *Blood* – 1990. – V.76 – № 6 – 1188–95p.
49. Godfrey D.I. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. / D. I. Godfrey, J. Kennedy, T. Suda, A. Zlotnik // *J. Immunol.* – 1993. – V.150 – № 10 – 4244–52p.
50. Godfrey D.I. Control points in early T-cell development // *Immunol. Today.* – 1993. – V.14. – № 11. – 547–553p.
51. Godfrey D.I. Phenotypic and functional characterization of c-kit expression during intrathymic T cell development. / D. I. Godfrey, A. Zlotnik, T. Suda // *J. Immunol.* – 1992. – V.149 – № 7 – 2281–5p.
52. Graham J.B. Regulatory T cells shape the resident memory T cell response to virus infection in the tissues. / J. B. Graham, A. Da Costa, J. M. Lund // *J. Immunol.* – 2014. – V.192 – № 2 –

683–90p.

53. Grakoui A. The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation / A. Grakoui // *Science* (80-). – 1999. – V.285 – № 5425 – 221–227p.

54. Grant C.R. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: Challenges, controversies and-yet-unanswered questions / C. R. Grant, R. Liberal, G. Mieli-Vergani, D. Vergani, M. S. Longhi // *Autoimmun. Rev.* – 2015. – V.14 – № 2 – 105–116p.

55. Grzywacz B. Natural killer-cell differentiation by myeloid progenitors / B. Grzywacz, N. Kataria, N. Kataria, B. R. Blazar, J. S. Miller, M. R. Verneris // *Blood* – 2011. – V.117 – № 13 – 3548–3558p.

56. Hao Q.L. Human intrathymic lineage commitment is marked by differential CD7 expression: Identification of CD7- lympho-myeloid thymic progenitors / Q. L. Hao, A. A. George, J. Zhu, L. Barsky, E. Zielinska, X. Wang, M. Price, S. Ge, G. M. Crooks // *Blood* – 2008. – V.111 – № 3 – 1318–1326p.

57. Hayakawa Y. Functional subsets of mouse natural killer cells // *Immunol. Rev.* – 2006. – V.214. – № 1. – 47–55p.

58. Hayakawa Y. CD27 Dissects Mature NK Cells into Two Subsets with Distinct Responsiveness and Migratory Capacity / Y. Hayakawa, M. J. Smyth // *J. Immunol.* – 2006. – V.176 – № 3 – 1517–1524p.

59. Hazeldine J. The impact of ageing on natural killer cell function and potential consequences for health in older adults // *Ageing Res. Rev.* – 2013. – V.12. – № 4. – 1069–1078p.

60. He Y.W. Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + T cells, but not natural killer cells. / Y. W. He, T. R. Malek // *J. Exp. Med.* – 1996. – V.184 – № 1 – 289–93p.

61. Hendriks R.W. Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus / R. W. Hendriks, M. C. Nawijn, J. D. Engel, H. Van Doorninck, F. Grosveld, A. Karis // *Eur. J. Immunol.* – 1999. – V.29 – № 6 – 1912–1918p.

62. Hua G. Ignition of p53 bomb sensitizes tumor cells to granzyme K-mediated cytolysis. / G. Hua, S. Wang, C. Zhong, P. Xue, Z. Fan // *J. Immunol.* – 2009. – V.182 – № 4 – 2152–9p.

63. Huntington N.D. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo / N. D. Huntington, N. Legrand, N. L. Alves, B. Jaron, K. Weijer, A. Plet, E. Corcuff, E. Mortier, Y. Jacques, H. Spits, J. P. Di Santo // *J. Exp. Med.* – 2009. – V.206 – № 1 – 25–34p.

64. Igarashi H. Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow / H. Igarashi, S. C. Gregory, T. Yokota, N. Sakaguchi, P. W. Kincade // *Immunity*

– 2002. – V.17 – № 2 – 117–130p.

65. Ikawa T. An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage / T. Ikawa, S. Hirose, K. Masuda, K. Kakugawa, R. Satoh, A. Shibano-Satoh, R. Kominami, Y. Katsura, H. Kawamoto // *Science* (80-.). – 2010. – V.329 – № 5987 – 93–96p.

66. Isaacson P.G. The Human Thymus Contains a Novel Population of B Lymphocytes / P. G. Isaacson, A. J. Norton, B. J. Addis // *Lancet* – 1987. – V.330 – № 8574 – 1488–1491p.

67. Jin J. CD11b-CD27- NK Cells Are Associated with the Progression of Lung Carcinoma / J. Jin, B. Fu, X. Mei, T. Yue, R. Sun, Z. Tian, H. Wei // *PLoS One* – 2013. – V.8 – № 4.

68. Joeckel L.T. Are all granzymes cytotoxic in vivo? // *Biol. Chem.* – 2014. – V.395. – № 2. – 181–202p.

69. Josefowicz S.Z. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function / S. Z. Josefowicz, L.-F. Lu, A. Y. Rudensky // *Annu. Rev. Immunol.* – 2012. – V.30 – № 1 – 531–564p.

70. Juelke K. CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dimNK cells / K. Juelke, M. Killig, M. Luetke-Eversloh, E. Parente, J. Gruen, B. Morandi, G. Ferlazzo, A. Thiel, I. Schmitt-Knosalla, C. Romagnani // *Blood* – 2010. – V.116 – № 8 – 1299–1307p.

71. Kamizono S. Nfil3/E4bp4 is required for the development and maturation of NK cells in vivo / S. Kamizono, G. S. Duncan, M. G. Seidel, A. Morimoto, K. Hamada, G. Grosveld, K. Akashi, E. F. Lind, J. P. Haight, P. S. Ohashi, A. T. Look, T. W. Mak // *J. Exp. Med.* – 2009. – V.206 – № 13 – 2977–2986p.

72. Kashiwada M. IL-4-induced transcription factor NFIL3/E4BP4 controls IgE class switching / M. Kashiwada, D. M. Levy, L. McKeag, K. Murray, A. J. Schroder, S. M. Canfield, G. Traver, P. B. Rothman // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2010. – V.107 – № 2 – 821–826p.

73. Kawamoto H. A map for lineage restriction of progenitors during hematopoiesis: The essence of the myeloid-based model / H. Kawamoto, T. Ikawa, K. Masuda, H. Wada, Y. Katsura // *Immunol. Rev.* – 2010. – V.238 – № 1 – 23–36p.

74. Kim S. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation / S. Kim, K. Iizuka, H.-S. P. Kang, A. Dokun, A. R. French, S. Greco, W. M. Yokoyama // *Nat. Immunol.* – 2002. – V.3 – № 6 – 523–528p.

75. Kim S. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules / S. Kim, J. Poursine-Laurent, S. M. Truscott, L. Lybarger, Y. J. Song, L. Yang, A. R. French, J. B. Sunwoo, S. Lemieux, T. H. Hansen, W. M. Yokoyama // *Nature* – 2005. – V.436 – № 7051 – 709–713p.

76. Kitamura Y. Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice / Y. Kitamura, M. Shimada, K. Hatanaka, Y. Miyano // *Nature* – 1977. – V.268 – № 5619 – 442–

443p.

77. Kondo M. Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow / M. Kondo, I. L. Weissman, K. Akashi // *Cell* – 1997. – V.91 – № 5 – 661–672p.
78. Krebs P. NK-cell-mediated killing of target cells triggers robust antigen-specific T-cell-mediated and humoral responses / P. Krebs, M. J. Barnes, K. Lampe, K. Whitley, K. S. Bahjat, B. Beutler, E. Janssen, K. Hoebe // *Blood* – 2009. – V.113 – № 26 – 6593–6602p.
79. Kreslavsky T. T cell receptor-instructed alphabeta versus gammadelta lineage commitment revealed by single-cell analysis. / T. Kreslavsky, A. I. Garbe, A. Krueger, H. von Boehmer // *J. Exp. Med.* – 2008. – V.205 – № 5 – 1173–1186p.
80. Krueger A. CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus / A. Krueger, S. Willenzon, M. Łyszkiewicz, E. Kremmer, R. Förster // *Blood* – 2010. – V.115 – № 10 – 1906–1912p.
81. Laiosa C. V. Reprogramming of Committed T Cell Progenitors to Macrophages and Dendritic Cells by C/EBP α and PU.1 Transcription Factors / C. V. Laiosa, M. Stadtfeld, H. Xie, L. de Andres-Aguayo, T. Graf // *Immunity* – 2006. – V.25 – № 5 – 731–744p.
82. Lee C.-K. Generation of Macrophages from Early T Progenitors In Vitro / C.-K. Lee, J. K. Kim, Y. Kim, M.-K. Lee, K. Kim, J.-K. Kang, R. Hofmeister, S. K. Durum, S. S. Han // *J. Immunol.* – 2001. – V.166 – № 10 – 5964–5969p.
83. Lesley J. Kinetics of thymus repopulation by intrathymic progenitors after intravenous injection: Evidence for successive repopulation by an IL-2R⁺, Pgp-1⁻ and by an IL-2R⁻, Pgp-1⁺ progenitor / J. Lesley, R. Schulte, R. Hyman // *Cell. Immunol.* – 1988. – V.117 – № 2 – 378–388p.
84. Leung W. Infusions of allogeneic natural killer cells as cancer therapy // *Clin. Cancer Res.* – 2014. – V.20. – № 13. – 3390–3400p.
85. Li P. Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion / P. Li, S. Burke, J. Wang, X. Chen, M. Ortiz, S. C. Lee, D. Lu, L. Campos, D. Goulding, B. L. Ng, G. Dougan, B. Huntly, B. Gottgens, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, F. Colucci, P. Liu // *Science* (80-.). – 2010. – V.329 – № 5987 – 85–89p.
86. Liu C. Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization / C. Liu, F. Saito, Z. Liu, Y. Lei, S. Uehara, P. Love, M. Lipp, S. Kondo, N. Manley, Y. Takahama // *Blood* – 2006. – V.108 – № 8 – 2531–2539p.
87. Liu Y. A Plant Homeodomain in Rag-2 that Binds Hypermethylated Lysine 4 of Histone H3 Is Necessary for Efficient Antigen-Receptor-Gene Rearrangement / Y. Liu, R. Subrahmanyam, T. Chakraborty, R. Sen, S. Desiderio // *Immunity* – 2007. – V.27 – № 4 – 561–571p.
88. Ljunggren H.G. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition /

- H. G. Ljunggren, K. Kärre // *Immunol. Today* – 1990. – V.11 – № C – 237–244p.
89. Loza M.J. Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells / M. J. Loza, L. Zamai, L. Azzoni, E. Rosati, B. Perussia // *Blood* – 2002. – V.99 – № 4 – 1273–1281p.
90. Lysakova-Devine T. Tissue-specific NK cell populations and their origin / T. Lysakova-Devine, C. O'Farrelly // *J. Leukoc. Biol.* – 2014. – V.96 – № 6 – 981–990p.
91. Mace E.M. Elucidation of the integrin LFA-1-mediated signaling pathway of actin polarization in natural killer cells / E. M. Mace, J. Zhang, K. A. Siminovitch, F. Takei // *Blood* – 2010. – V.116 – № 8 – 1272–1279p.
92. Mackall C.L. Age, Thymopoiesis, and CD4+ T-Lymphocyte Regeneration after Intensive Chemotherapy / C. L. Mackall, T. A. Fleisher, M. R. Brown, M. P. Andrich, C. C. Chen, I. M. Feuerstein, M. E. Horowitz, I. T. Magrath, A. T. Shad, S. M. Steinberg, L. H. Wexler, R. E. Gress // *N. Engl. J. Med.* – 1995. – V.332 – № 3 – 143–149p.
93. Malnati M.S. Recognition of virus-infected cells by natural killer cell clones is controlled by polymorphic target cell elements. / M. S. Malnati, P. Lusso, E. Ciccone, a Moretta, L. Moretta, E. O. Long // *J. Exp. Med.* – 1993. – V.178 – № 3 – 961–9p.
94. Man Y.G. Tumor-infiltrating immune cells promoting tumor invasion and metastasis: Existing theories // *J. Cancer.* – 2013. – V.4. – № 1. – 84–95p.
95. Marinova T. Nerve growth factor immunoreactivity of mast cells in acute involuted human thymus / T. Marinova, S. Philipov, L. Aloe // *Inflammation* – 2007. – V.30 – № 1–2 – 38–43p.
96. Martín-Fontecha A. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. / A. Martín-Fontecha, L. L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia, F. Sallusto // *Nat. Immunol.* – 2004. – V.5 – № 12 – 1260–5p.
97. Martin C.H. Efficient thymic immigration of B220+ lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential / C. H. Martin, I. Aifantis, M. L. Scimone, U. H. von Andrian, B. Reizis, H. von Boehmer, F. Gounari // *Nat. Immunol.* – 2003. – V.4 – № 9 – 866–873p.
98. Martins V.C. Thymus-autonomous T cell development in the absence of progenitor import / V. C. Martins, E. Ruggiero, S. M. Schlenner, V. Madan, M. Schmidt, P. J. Fink, C. von Kalle, H.-R. Rodewald // *J. Exp. Med.* – 2012. – V.209 – № 8 – 1409–1417p.
99. Masuda K. T Cell Lineage Determination Precedes the Initiation of TCR Gene Rearrangement / K. Masuda, K. Kakugawa, T. Nakayama, N. Minato, Y. Katsura, H. Kawamoto // *J. Immunol.* – 2007. – V.179 – № 6 – 3699–3706p.
100. Matsuzaki Y. Characterization of c-kit positive intrathymic stem cells that are restricted to lymphoid differentiation. / Y. Matsuzaki, J. Gyotoku, M. Ogawa, S. Nishikawa, Y. Katsura, G. Gachelin, H. Nakauchi // *J. Exp. Med.* – 1993. – V.178 – № 4 – 1283–1292p.

101. McCann F.E. The Size of the Synaptic Cleft and Distinct Distributions of Filamentous Actin, Ezrin, CD43, and CD45 at Activating and Inhibitory Human NK Cell Immune Synapses / F. E. McCann, B. Vanherberghen, K. Eleme, L. M. Carlin, R. J. Newsam, D. Goulding, D. M. Davis // *J. Immunol.* – 2003. – V.170 – № 6 – 2862–2870p.
102. Meis J. De Thymus atrophy and double-positive escape are common features in infectious diseases / J. De Meis, D. Aurélio Farias-De-Oliveira, P. H. Nunes Panzenhagen, N. Maran, D. M. S. Villa-Verde, A. Morrot, W. Savino // *J. Parasitol. Res.* – 2012. – V.2012 – 1–9p.
103. Mikhailova V.A. Peculiarities of NK cells differentiation: CD56dim and CD56bright NK cells at pregnancy and in non-pregnant state / V. A. Mikhailova, K. L. Belyakova, S. A. Selkov, D. I. Sokolov // *Med. Immunol.* – 2017. – V.19 – № 1 – 19–26p.
104. Min-Oo G. Natural killer cells: Walking three paths down memory lane // *Trends Immunol.* – 2013. – V.34. – № 6. – 251–258p.
105. Mingari M.C. Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: Selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor / M. C. Mingari, C. Vitale, C. Cantoni, R. Bellomo, M. Ponte, F. Schiavetti, S. Bertone, A. Moretta, L. Moretta // *Eur. J. Immunol.* – 1997. – V.27 – № 6 – 1374–1380p.
106. Monks C.R.F. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells / C. R. F. Monks, B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, A. Kupfer // *Nature* – 1998. – V.395 – № 6697 – 82–86p.
107. Montaldo E. Human NK cells at early stages of differentiation produce CXCL8 and express CD161 molecule that functions as an activating receptor / E. Montaldo, C. Vitale, F. Cottalasso, R. Conte, T. Glatzer, P. Ambrosini, L. Moretta, M. C. Mingari // *Blood* – 2012. – V.119 – № 17 – 3987–3996p.
108. Montaldo E. Human NK cell receptors/markers: A tool to analyze NK cell development, subsets and function / E. Montaldo, G. Del Zotto, M. Della Chiesa, M. C. Mingari, A. Moretta, A. De Maria, L. Moretta // *Cytom. Part A* – 2013. – V.83 – № 8 – 702–713p.
109. Moon T.C. Advances in mast cell biology: New understanding of heterogeneity and function // *Mucosal Immunol.* – 2010. – V.3. – № 2. – 111–128p.
110. Moore T. a T-cell lineage commitment and cytokine responses of thymic progenitors. / T. a Moore, a Zlotnik // *Blood* – 1995. – V.86 – № 5 – 1850–1860p.
111. Moretta A. Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues // *Trends Immunol.* – 2005. – V.26. – № 12. – 668–675p.
112. Moroso V. NK cells can generate from precursors in the adult human liver / V. Moroso, F. Famili, N. Papazian, T. Cupedo, L. J. van der Laan, G. Kazemier, H. J. Metselaar, J. Kwekkeboom // *Eur J Immunol* – 2011. – V.41 – № 11 – 3340–3350p.

113. Murphy K. Janeway ' S 9 Th Edition / K. Murphy, C. Weaver – , 2016.– 927c.
114. Nikolettou V. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* – 2013. – V.1833. – № 12. – 3448–3459p.
115. O'Leary J.G. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells / J. G. O'Leary, M. Goodarzi, D. L. Drayton, U. H. von Andrian // *Nat. Immunol.* – 2006. – V.7 – № 5 – 507–516p.
116. Ohno S. Runx proteins are involved in regulation of CD122, Ly49 family and IFN-gamma expression during NK cell differentiation / S. Ohno, T. Sato, K. Kohu, K. Takeda, K. Okumura, M. Satake, S. Habu // *Int Immunol* – 2008. – V.20 – № 1 – 71–79p.
117. Orange J.S. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse / J. S. Orange // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – V.8 – № 9 – 713–725p.
118. Peaudecerf L. Thymocytes may persist and differentiate without any input from bone marrow progenitors / L. Peaudecerf, S. Lemos, A. Galgano, G. Krenn, F. Vasseur, J. P. Di Santo, S. Ezine, B. Rocha // *J. Exp. Med.* – 2012. – V.209 – № 8 – 1401–1408p.
119. Peng H. Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation / H. Peng, X. Jiang, Y. Chen, D. K. Sojka, H. Wei, X. Gao, R. Sun, W. M. Yokoyama, Z. Tian // *J. Clin. Invest.* – 2013. – V.123 – № 4 – 1444–1456p.
120. Perez S.A. A novel myeloid-like NK cell progenitor in human umbilical cord blood / S. A. Perez, P. A. Sotiropoulou, D. G. Gkika, L. G. Mahaira, D. K. Niarchos, A. D. Gritzapis, Y. G. Kavalakis, A. I. Antsaklis, C. N. Baxevanis, M. Papamichail // *Blood* – 2003. – V.101 – № 9 – 3444–3450p.
121. Peterson R.A. Regulatory T-Cells: Diverse Phenotypes Integral to Immune Homeostasis and Suppression / R. A. Peterson // *Toxicol. Pathol.* – 2012. – V.40 – № 2 – 186–204p.
122. Porritt H.E. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages / H. E. Porritt, L. L. Rumfelt, S. Tabrizifard, T. M. Schmitt, J. C. Zúñiga-Pflücker, H. T. Petrie // *Immunity* – 2004. – V.20 – № 6 – 735–745p.
123. Prinz I. Visualization of the earliest steps of gammadelta T cell development in the adult thymus. / I. Prinz, A. Sansoni, A. Kissenpfennig, L. Ardouin, M. Malissen, B. Malissen // *Nat. Immunol.* – 2006. – V.7 – № 9 – 995–1003p.
124. Radtke F. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1 / F. Radtke, A. Wilson, G. Stark, M. Bauer, J. Van Meerwijk, H. R. MacDonald, M. Aguet // *Immunity* – 1999. – V.10 – № 5 – 547–558p.
125. Raica M. Increased mast cell density and microvessel density in the thymus of patients with myasthenia gravis. / M. Raica, A. M. Cîmpean, S. Encică, T. Scridon, M. Bârsan // *Rom J*

Morphol Embryol – 2007. – V.48 – № 1 – 11–16p.

126. Ranson T. IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis / T. Ranson // Blood – 2003. – V.101 – № >12 – 4887–4893p.

127. Ribatti D. The controversial role of mast cells in tumor growth. / D. Ribatti, E. Crivellato // Int. Rev. Cell Mol. Biol. – 2009. – V.275 – 89–131p.

128. Ribatti D. The role of mast cell in tissue morphogenesis. Thymus, duodenum, and mammary gland as examples // Exp. Cell Res. – 2016. – V.341. – № 1. – 105–109p.

129. Ribeiro V.S.G. Cutting edge: Thymic NK cells develop independently from T cell precursors. / V. S. G. Ribeiro, M. Hasan, A. Wilson, L. Boucontet, P. Pereira, S. Lesjean-Pottier, N. Satoh-Takayama, J. P. Di Santo, C. a J. Vosshenrich // J. Immunol. – 2010. – V.185 – № 9 – 4993–4997p.

130. Robbins S.H. Natural killer cells promote early CD8 T cell responses against cytomegalovirus / S. H. Robbins, G. Bessou, A. Cornillon, N. Zucchini, B. Rupp, Z. Ruzsics, T. Sacher, E. Tomasello, E. Vivier, U. H. Koszinowski, M. Dalod // PLoS Pathog. – 2007. – V.3 – № 8 – 1152–1164p.

131. Rölle A. Immune Adaptation to Environmental Influence: The Case of NK Cells and HCMV // Trends Immunol. – 2016. – V.37. – № 3. – 233–243p.

132. Romagnani C. CD56brightCD16- Killer Ig-Like Receptor- NK Cells Display Longer Telomeres and Acquire Features of CD56dim NK Cells upon Activation / C. Romagnani, K. Juelke, M. Falco, B. Morandi, A. D'Agostino, R. Costa, G. Ratto, G. Forte, P. Carrega, G. Lui, R. Conte, T. Strowig, A. Moretta, C. Munz, A. Thiel, L. Moretta, G. Ferlazzo // J. Immunol. – 2007. – V.178 – № 8 – 4947–4955p.

133. Romee R. Cytokine activation induces human memory-like NK cells / R. Romee, S. E. Schneider, J. W. Leong, J. M. Chase, C. R. Keppel, R. P. Sullivan, M. A. Cooper, T. A. Fehniger // Blood – 2012. – V.120 – № 24 – 4751–4760p.

134. Rothenberg E. V. Launching the T-cell-lineage developmental programme // Nat. Rev. Immunol. – 2008. – V.8. – № 1. – 9–21p.

135. Saini R. V. Granulysin Delivered by Cytotoxic Cells Damages Endoplasmic Reticulum and Activates Caspase-7 in Target Cells / R. V. Saini, C. Wilson, M. W. Finn, T. Wang, A. M. Krensky, C. Clayberger // J. Immunol. – 2011. – V.186 – № 6 – 3497–3504p.

136. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self / S. Sakaguchi // Nat. Immunol. – 2005. – V.6 – № 4 – 345–352p.

137. Sambandam A. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors / A. Sambandam, I. Maillard, V. P. Zediak, L. Xu, R. M. Gerstein, J. C.

- Aster, W. S. Pear, A. Bhandoola // *Nat. Immunol.* – 2005. – V.6 – № 7 – 663–670p.
138. Samson S.I. GATA-3 promotes maturation, IFN- γ production, and liver-specific homing of NK cells / S. I. Samson, O. Richard, M. Tavian, T. Ranson, C. A. J. Vosshenrich, F. Colucci, J. Buer, F. Grosveld, I. Godin, J. P. Di Santo // *Immunity* – 2003. – V.19 – № 5 – 701–711p.
139. Santo J.P. Di The common cytokine receptor gamma chain and the pre-T cell receptor provide independent but critically overlapping signals in early alpha/beta T cell development / J. P. Di Santo, I. Aifantis, E. Rosmaraki, C. Garcia, J. Feinberg, H. J. Fehling, A. Fischer, H. von Boehmer, B. Rocha // *J. Exp. Med.* – 1999. – V.189 – № 3 – 563–574p.
140. Santo J.P. Di Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development / J. P. Di Santo, C. A. J. Vosshenrich // *Immunol. Rev.* – 2006. – V.214 – 35–46p.
141. Schmidt A. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. / A. Schmidt, N. Oberle, P. H. Krammer // *Front. Immunol.* – 2012. – V.3 – № March – 51p.
142. Schmitt T.M. Maintenance of T Cell Specification and Differentiation Requires Recurrent Notch Receptor–Ligand Interactions / T. M. Schmitt, M. Ciofani, H. T. Petrie, J. C. Zúñiga-Pflücker // *J. Exp. Med.* – 2004. – V.200 – № 4 – 469–479p.
143. Schwarz B.A. Trafficking from the bone marrow to the thymus: A prerequisite for thymopoiesis // *Immunol. Rev.* – 2006. – V.209. – 47–57p.
144. Shi F.-D. Organ-specific features of natural killer cells / F.-D. Shi, H.-G. Ljunggren, A. La Cava, L. Van Kaer // *Nat. Rev. Immunol.* – 2011. – V.11 – № 10 – 658–671p.
145. Silver R. Mast cells on the mind: New insights and opportunities / R. Silver, J. P. Curley // *Trends Neurosci.* – 2013. – V.36 – № 9 – 513–521p.
146. Sivori S. Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation. / S. Sivori, M. Falco, E. Marcenaro, S. Parolini, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, A. Moretta // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2002. – V.99 – № 7 – 4526–31p.
147. Spits H. review The expanding family of innate lymphoid cells : regulators and effectors of immunity and tissue remodeling / H. Spits, J. P. Di Santo // *Nat. Publ. Gr.* – 2010. – V.12 – № 1 – 21–27p.
148. Spoerl D. Reclassifying anaphylaxis to neuromuscular blocking agents based on the presumed Patho-Mechanism: IgE-Mediated, pharmacological adverse reaction or “innate hypersensitivity”? / D. Spoerl, H. Nigolian, C. Czarnetzki, T. Harr // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – V.18 – № 6 – 1–14p.
149. Sun H. NK cells in immunotolerant organs // *Cell. Mol. Immunol.* – 2013. – V.10. – № 3. – 202–212p.
150. Susanto O. Mouse granzyme A induces a novel death with writhing morphology that is

- mechanistically distinct from granzyme B-induced apoptosis / O. Susanto, S. E. Stewart, I. Voskoboinik, D. Brasacchio, M. Hagn, S. Ellis, S. Asquith, K. A. Sedelies, P. I. Bird, N. J. Waterhouse, J. A. Trapani // *Cell Death Differ.* – 2013. – V.20 – № 9 – 1183–1193p.
151. Taghon T. Mast cell lineage diversion of T lineage precursors by the essential T cell transcription factor GATA-3 / T. Taghon, M. A. Yui, E. V. Rothenberg // *Nat. Immunol.* – 2007. – V.8 – № 8 – 845–855p.
152. Taghon T.N. Delayed, asynchronous, and reversible T-lineage specification induced by Notch/Delta signaling / T. N. Taghon, E. S. David, J. C. Zúñiga-Pflücker, E. V. Rothenberg // *Genes Dev.* – 2005. – V.19 – № 8 – 965–978p.
153. Takeda K. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. / K. Takeda, Y. Hayakawa, M. J. Smyth, N. Kayagaki, N. Yamaguchi, S. Kakuta, Y. Iwakura, H. Yagita, K. Okumura // *Nat. Med.* – 2001. – V.7 – № 1 – 94–100p.
154. Thiery J. Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells / J. Thiery, D. Keefe, S. Boulant, E. Boucrot, M. Walch, D. Martinvalet, I. S. Goping, R. C. Bleackley, T. Kirchhausen, J. Lieberman // *Nat. Immunol.* – 2011. – V.12 – № 8 – 770–777p.
155. Thiery J. Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis / J. Thiery, D. Keefe, S. Saffarian, D. Martinvalet, M. Walch, E. Boucrot, T. Kirchhausen, J. Lieberman // *Blood* – 2010. – V.115 – № 8 – 1582–1593p.
156. Thome J.J.C. Emerging concepts in tissue-resident T cells: Lessons from humans // *Trends Immunol.* – 2015. – V.36. – № 7. – 428–435p.
157. Tian Z. Natural killer cells in liver disease. / Z. Tian, Y. Chen, B. Gao // *Hepatology* – 2013. – V.57 – № 4 – 1654–62p.
158. Ting C.N. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage / C. N. Ting, M. C. Olson, K. P. Barton, J. M. Leiden // *Nature* – 1996. – V.384 – № 6608 – 474–475p.
159. Ulges A. Protein kinase CK2 enables regulatory T cells to suppress excessive TH2 responses in vivo / A. Ulges, M. Klein, S. Reuter, B. Gerlitzki, M. Hoffmann, N. Grebe, V. Staudt, N. Stergiou, T. Bohn, T. J. Bruhl, S. Muth, H. Yurugi, K. Rajalingam, I. Bellinghausen, A. Tuettenberg, S. Hahn, S. Reissig, I. Haben, F. Zipp, A. Waisman, H. C. Probst, A. Beilhack, T. Buchou, O. Filhol-Cochet, B. Boldyreff, M. Breloer, H. Jonuleit, H. Schild, E. Schmitt, T. Bopp // *Nat Immunol* – 2015. – V.16 – № 3 – 267–275p.
160. Ulges A. Context- and Tissue-Specific Regulation of Immunity and Tolerance by

Regulatory T Cells / A. Ulges, E. Schmitt, C. Becker, T. Bopp – Elsevier Inc., 2016. Вып. 1– 1-46c.

161. Vacca P. CD34+ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells / P. Vacca, C. Vitale, E. Montaldo, R. Conte, C. Cantoni, E. Fulcheri, V. Darretta, L. Moretta, M. C. Mingari // Proc Natl Acad Sci U S A – 2011. – V.108 – № 6 – 2402–2407p.

162. Vanherberghen B. Human and murine inhibitory natural killer cell receptors transfer from natural killer cells to target cells. / B. Vanherberghen, K. Andersson, L. M. Carlin, E. N. M. Nolte-'t Hoen, G. S. Williams, P. Höglund, D. M. Davis // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2004. – V.101 – № 48 – 16873–16878p.

163. Veinotte L.L. Expression of rearranged TCR?? genes in natural killer cells suggests a minor thymus-dependent pathway of lineage commitment / L. L. Veinotte, C. P. Greenwood, N. Mohammadi, C. A. Parachoniak, F. Takei // Blood – 2006. – V.107 – № 7 – 2673–2679p.

164. Vitale C. Plasticity of NK-cell differentiation // Blood. – 2011. – V.117. – № 13. – 3482–3483p.

165. Vitale C. Methylprednisolone induces preferential and rapid differentiation of CD34+cord blood precursors toward NK cells / C. Vitale, F. Cottalasso, E. Montaldo, L. Moretta, M. C. Mingari // Int. Immunol. – 2008. – V.20 – № 4 – 565–575p.

166. Vivier E. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. / E. Vivier, D. H. Raulet, A. Moretta, M. A. Caligiuri, L. Zitvogel, L. L. Lanier, W. M. Yokoyama, S. Ugolini // Science – 2011. – V.331 – № 6013 – 44–9p.

167. Vossen M.T.M. CD27 Defines Phenotypically and Functionally Different Human NK Cell Subsets / M. T. M. Vossen, M. Matmati, K. M. L. Hertoghs, P. A. Baars, M.-R. Gent, G. Leclercq, J. Hamann, T. W. Kuijpers, R. A. W. van Lier // J. Immunol. – 2008. – V.180 – № 6 – 3739–3745p.

168. Vosshenrich C.A. Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo / C. A. Vosshenrich, T. Ranson, S. I. Samson, E. Corcuff, F. Colucci, E. E. Rosmaraki, J. P. Di Santo // J Immunol – 2005. – V.174 – № 3 – 1213–1221p.

169. Vosshenrich C.A.J. A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127 / C. A. J. Vosshenrich, M. E. García-Ojeda, S. I. Samson-Villéger, V. Pasqualetto, L. Enault, O. R. Le Goff, E. Corcuff, D. Guy-Grand, B. Rocha, A. Cumano, L. Rogge, S. Ezine, J. P. Di Santo // Nat. Immunol. – 2006. – V.7 – № 11 – 1217–1224p.

170. Walzer T. Natural-killer cells and dendritic cells: “L’union fait la force” // Blood. – 2005. –

V.106. – № 7. – 2252–2258p.

171. Wang F. Rapid deletion of rearranged T cell antigen receptor (TCR) Valpha-Jalpha segment by secondary rearrangement in the thymus: role of continuous rearrangement of TCR alpha chain gene and positive selection in the T cell repertoire formation. / F. Wang, C. Y. Huang, O. Kanagawa // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1998. – V.95 – № 20 – 11834–9p.

172. Wang H. Granzyme M expressed by tumor cells promotes chemoresistance and EMT in vitro and metastasis in vivo associated with STAT3 activation. / H. Wang, Q. Sun, Y. Wu, L. Wang, C. Zhou, W. Ma, Y. Zhang, S. Wang, S. Zhang // Oncotarget – 2015. – V.6 – № 8 – 5818–31p.

173. Waterhouse N.J. H is for helper: granzyme H helps granzyme B kill adenovirus-infected cells // Trends Immunol. – 2007. – V.28. – № 9. – 373–375p.

174. Wilson A. Unexpectedly late expression of intracellular CD3ε and TCR γδ proteins during adult thymus development / A. Wilson, M. Capone, H. R. MacDonald // Int. Immunol. – 1999. – V.11 – № 10 – 1641–1650p.

175. Winandy S. No DL1 Notch ligand? GATA be a mast cell / S. Winandy, M. Brown // Nat. Immunol. – 2007. – V.8 – № 8 – 796–798p.

176. Wu L. Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus / L. Wu, M. Antica, G. R. Johnson, R. Scollay, K. Shortman // J Exp Med – 1991. – V.174 – № 6 – 1617–27.p.

177. Xiang Z. Ige-mediated mast cell degranulation and recovery monitored by time-lapse photography / Z. Xiang, M. Block, C. Löfman, G. Nilsson // J. Allergy Clin. Immunol. – 2001. – V.108 – № 1 – 116–121p.

178. Xu L.R. Histochemistry and morphology of porcine mast cells / L. R. Xu, M. M. Carr, A. P. Bland, G. A. Hall // Histochem. J. – 1993. – V.25 – № 7 – 516–522p.

179. Yu N.L. GATA factors are essential for transcription of the survival gene E4bp4 and the viability response of interleukin-3 in Ba/F3 hematopoietic cells / N. L. Yu, Y. J. Chiang, J. J. Y. Yen // J. Biol. Chem. – 2002. – V.277 – № 30 – 27144–27153p.

180. Yui M.A. Fine-Scale Staging of T Cell Lineage Commitment in Adult Mouse Thymus / M. A. Yui, N. Feng, E. V. Rothenberg // J. Immunol. – 2010. – V.185 – № 1 – 284–293p.

181. Yun S. Oxygen tension regulates NK cells differentiation from hematopoietic stem cells in vitro. / S. Yun, S. H. Lee, S.-R. Yoon, P.-K. Myung, I. Choi // Immunol. Lett. – 2011. – V.137 – № 1–2 – 70–7p.

182. Zamai L. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. / L. Zamai, M. Ahmad, I. M. Bennett, L. Azzoni, E. S. Alnemri, B. Perussia // J. Exp. Med. – 1998. – V.188 – № 12 – 2375–80p.

183. Zamai L. Cytotoxic functions and susceptibility to apoptosis of human CD56(bright) NK cells differentiated in vitro from CD34⁺ hematopoietic progenitors. / L. Zamai, G. Del Zotto, F. Buccella, L. Galeotti, B. Canonico, F. Luchetti, S. Papa // *Cytometry. A* – 2012. – V.81 – № 4 – 294–302p.
184. Zlotoff D.A. CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus / D. A. Zlotoff, A. Sambandam, T. D. Logan, J. J. Bell, B. A. Schwarz, A. Bhandoola // *Blood* – 2010. – V.115 – № 10 – 1897–1905p.
185. Абакушина Е. В. Метод проточной цитометрии для оценки НК-клеток и их активности / Абакушина Е. В. // *Клиническая лабораторная диагностика* – 2015. – Т.60 – № 11 – 37–44с.
186. Абакушина Е. В. Основные свойства и функции НК-клеток человека / Абакушина Е. В., Кузьмина Е. Г., Коваленко Е. И. // *Иммунология* – 2012. – № 4 – 220–224с.
187. Гусельникова В. В. Морфофункциональная характеристика популяции тучных клеток тимуса мыши. Дисс. к-та биол. наук / Гусельникова В.В. – 2016.
188. О.С. Арташян, Б.Г. Юшков Е.А.М. Изучение функциональной активности тучных клеток при иммобилизационном стрессе / Е. А. М. О.С. Арташян, Б.Г. Юшков // *Цитология* – 2006. – Т.48 – № 8 – 665–668с.
189. Фрейдлин И.С. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функции / И. С. Фрейдлин // *Медицинская Иммунология* – 2005. – Т.7 – № 4 – 347–354с.
190. Ярилин А. А.Иммунология / Ярилин А. А. – 2010.– 177с.