

**УЧАСТИЕ ЛИМФОЦИТОВ CD8 В ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОМ
ИММУННОМ ОТВЕТЕ У МЫШЕЙ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ВОСПРИИМЧИВОСТИ К ИНФЕКЦИИ**

Логунова Н. Н. ¹,

Капина М. А. ¹,

Линге И. А. ¹,

Кондратьева Е. В. ¹,

Апт А. С. ¹

¹ ФГБНУ «ЦНИИТ», Москва, Россия.

**CD8 T CELLS IN MICE WITH DIFFERENT GENETIC SUSCEPTIBILITY
TO ANTI-TUBERCULOUS IMMUNE RESPONSE**

Logunova N. ^a,

Kapina M. ^a,

Linge I. ^a,

Kondratieva E. ^a,

Apt A. ^a

^a Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia.

Резюме

Роль Т-лимфоцитов CD8⁺ в иммунном ответе на туберкулезную инфекцию (ТБ) остается не до конца понятной, несмотря на десятки лет работы над этой проблемой. Почти ничего не известно о влиянии на их участие в ответе на инфекцию уровня генетической восприимчивости хозяина к ТБ. В нашей лаборатории выведены конгенные по МНС-II линии мышей с разным уровнем генетической чувствительности к ТБ, обусловленным исключительно количественными и качественными отличиями в составе популяции Т-клеток CD4 и не несущие грубых дефектов в иммунной системе. В данной работе мы исследовали, как влияет избирательное отсутствие клеток CD8⁺ на уровень протекции у этих животных. Для этого была получена новая двойная конгенная линия мышей B6.I-9.3- β_2 M-/-, которая не имеет Т-клеток CD8 из-за нокаут-мутации в гене, кодирующем β_2 -микроглобулин, и отличается от родительской линии B6 по аллелю гена *H2-A* МНС класса II. Мы провели сравнительный анализ течения ТБ и иммунного ответа на инфекцию, используя четыре линии мышей – исходную пару B6 и B6.I-9.3 и лишенную Т-клеток CD8 пару B6- β_2 M-/- и B6.I-9.3- β_2 M-/- . Дефицит Т-клеток CD8 не влиял на размножение микобактерий в легких в течение первых четырех недель после заражения, но через 90 дней в легких мышей B6 β_2 M-/- популяция микобактерий вырастала достоверно сильнее, чем у мышей B6. Срок выживания мышей обеих линий с дефицитом клеток CD8 оказался гораздо короче, чем мышей дикого типа. В целом, негативное влияние отсутствия клеток CD8 сильнее проявлялось на фоне аллеля МНС-II, обеспечивающего более эффективный защитный ответ на инфекцию. Кроме того, при отсутствии клеток CD8⁺ на четвертой неделе после заражения достоверно снижалась доля TNF-положительных клеток CD4 у мышей обеих линий, несущих мутацию β_2 M-/-, указывая на ранее не

описанную вспомогательную роль клеток CD8 в синтезе TNF клетками CD4. Полученные данные обсуждаются в контексте динамических взаимодействий между популяциями Т-лимфоцитов при хронической туберкулезной инфекции.

Ключевые слова: туберкулез, Т-лимфоциты CD8, конгенные линии мышей, нокаут-мутация, ген β_2 -микроглобулина, патология легких, иммунный ответ.

Abstract

In spite of decades of studying the role for CD8⁺ T-cells in response to tuberculosis (TB) infection, it remains only partly understood. Even less is known how the level of host genetic susceptibility to TB infection influences the involvement of these cells in immune response. Our lab established MHC-II-congenic mouse strains with different levels of genetic susceptibility to TB infection dependent exclusively upon quantitative and qualitative differences in organization of relevant CD4 T-cell populations and lacking major defects in immune systems. In the present work, we investigated how the in vivo lack of CD8⁺ T-cells affects related capacity to combat TB infection. To this end, we developed a novel double-congenic mouse strain B6.I-9.3- $\beta_2M^{-/-}$ that lacks CD8 T cells due to a knockout mutation in the gene encoding β_2 -microglobulin and differs from the parental B6 strain by the MHC-II allele. We performed a comparative study of TB development and immune response using four mouse strains: the ancestor B6 and B6.I-9.3 pair vs. CD8-deficient B6- $\beta_2M^{-/-}$ and B6.I-9.3- $\beta_2M^{-/-}$ pair. CD8 T-cell deficiency did not alter lung mycobacterial multiplication during the first 4 weeks post TB challenge; however, at day 90 lung mycobacterial population increased to significantly higher levels in B6 $\beta_2M^{-/-}$ compared to B6 mice. Post-infection life span of both CD8 T-cell-deficient mouse strains was dramatically shorter than that of the wild type animals. *En mass*, negative effects of CD8 cell deficiency looked more pronounced on the MHC-II allele background, which in the presence of CD8 cells is associated with better protection against infection. In addition, the lack of CD8⁺ cells resulted in significantly decreased size of TNF-positive CD4⁺ T-cell populations in mice from both $\beta_2M^{-/-}$ strains at week 4 post-challenge. This is consistent with a previously non-described helper function of CD8 cells for the TNF synthesis by CD4 cells. We discuss the results obtained within

the context of dynamical interactions between T-cell populations during chronic TB infection.

Keywords: tuberculosis, CD8 T-lymphocytes, congenic mouse strains, knockout mutation, β 2-microglobulin, lung pathology, immune response.

1 Введение

Т-лимфоциты CD8⁺ играют важнейшую роль в клеточном иммунитете при защите от внутриклеточных патогенов. Общепринято, что эти защитные свойства Т-клеток CD8 реализуется за счет двух основных механизмов – продукции ими IFN- γ и уничтожения зараженных клеток организма-хозяина и самих патогенов за счет цитотоксической активности [1]. Тем не менее, роль Т-лимфоцитов CD8⁺ в иммунном ответе на туберкулезную инфекцию (ТБ) остается не до конца расшифрованной, несмотря на десятки лет работы над этой проблемой.

Первые аналитические работы в этом направлении, появившиеся в 1990-е годы, были проведены на мышах, несущих нокаут-мутации либо в гене, кодирующем β_2 -микроглобулин, т. е. легкую цепь молекул МНС-I, на которых проходит селекция самих Т-клеток CD8, либо в генах, кодирующих главные эффекторные молекулы этих клеток. Эти исследования ясно показали, во-первых, что Т-клетки CD8 безусловно участвуют в защитном ответе на инфекцию [2], и во-вторых, что иммунная защита больше зависит не от продукции ими цитотоксических факторов, таких как перфорин и гранзим [3, 4], а от выработки IFN- γ [5]. Тогда же было показано, что клетки CD8 человека обладают способностью напрямую убивать микобактерии за счет еще одного антимикробного фактора – пептида гранулизина [6], но ген, кодирующий этот фактор, отсутствует у мышей, поэтому детали данного биохимического механизма остаются до сих пор не изученными до конца. Попытка провести подобный анализ путем введения в геном мыши кодирующий гранулизин ген человека оказалась не вполне удачной, поскольку экспрессия искусственно введенного в геном трансгена обнаруживалась преимущественно не в Т-клетках CD8, а в NK-клетках [7].

Еще одна объективная трудность в исследовании роли Т-клеток CD8⁺ в моделях на мышах состоит в значительной гетерогенности популяций этих клеток и далеко неполной аналогии между мышью и человеком в данном аспекте. Классические Т-клетки CD8, распознающие антигенные пептиды микобактерий в контексте молекул МНС-Ia, сходны по принципам распознавания у мыши (в контексте молекул H2-K, -D, -L) и человека (в контексте молекул HLA-A, -B, -C), так что моделирование иммунного ответа на мышах в этой части представляется адекватным [8]. Однако имеются убедительные данные о преимущественном участии в иммунном ответе на инфекции неклассических клеток CD8⁺ [9, 10], в том числе клеток распознающих липидные антигены в контексте молекулы CD1 [11]. Учитывая, что в отличие от человека, имеющего пять генов, кодирующих разные молекулы CD1, у мыши имеется только один такой ген [11], а также чрезвычайно широкий спектр липидных антигенов микобактерий, распознаваемых в контексте CD1 (см. ссылки 45-53 в недавнем обзоре Jaisewal et al. [12]), исследование на мышах иммунного ответа Т-лимфоцитов CD8 на липидные антигены микобактерий следует признать не вполне соответствующим картине ответа у человека.

Практически ничего не известно и о распознавании в организме мыши пептидных антигенов микобактерий в контексте мономорфной молекулы МНС-I, аналогичной молекуле HLA-E человека, хотя этот каскад иммунного ответа представляет значительный интерес [13]. Следует отметить также, что аналитической избирательности не обеспечивает и наиболее распространенный исследовательский подход – генетическое «выключение» изучаемой популяции клеток. Введение в геном подопытных животных нокаут-мутаций либо в ген, кодирующий β₂-микроглобулин [2], либо в ген для самой молекулы CD8 (как, например,

у коммерчески доступных мышей линии B6.129S2-cd8a^{tm1Mak}), приводит к элиминации всех популяций клеток CD8⁺, что не позволяет добиться удовлетворительной точности при анализе механизмов. По-видимому, наиболее детальные знания о роли Т-клеток CD8 при ТБ принесли работы лаборатории С. Бехара, в которых с помощью комбинации методов, включившей использование трансгенных животных, создание радиационных химер и адоптивные переносы Т-клеток, была охарактеризована способность Т-клеток CD8 распознавать инфицированные микобактериями макрофаги, а также их взаимодействие и сравнительная защитная эффективность по сравнению с клетками CD4 [14-17].

Несмотря на большой объем полученных данных, один из аспектов проблемы – а именно, роль генетической восприимчивости организма-хозяина к инфекции и степень тяжести ее течения – остается мало исследованным. Практически все процитированные выше работы были выполнены либо только на мышах линии В6 (одной из самых резистентных к туберкулезу, см. ссылку [18]), либо на ее мутантных дериватах, имеющих серьезные системные нарушения в иммунной системе, например, экспрессию только трансгенных Т-рецепторов со специфичностью к одному единственному антигену микобактерий. Имея возможность использовать линии мышей с разным уровнем генетической чувствительности к ТБ, обусловленным исключительно количественными и качественными отличиями в составе популяции Т-клеток CD4 и не несущих грубых дефектов в иммунной системе [18-20], мы сочли интересным исследовать, насколько повлияет избирательное отсутствие клеток CD8⁺ на уровень протекции у таких животных. Изначально мы предполагали, что у лишенных Т-клеток CD8⁺ мышей со сниженным защитным потенциалом клеток CD4 (конгенная линия B6.I-9.3-β₂M-/-, H2-Aⁱ H2-E⁰) туберкулезная

инфекция будет протекать тяжелее, чем у мышей линии B6- β_2 M-/- (*H2-A^b H2-E⁰*), поскольку отсутствие клеток CD8 у последних будет отчасти компенсировано нормально функционирующим пулом Т-клеток CD4. Кроме того, у генетически чувствительного хозяина дополнительные дефекты иммунного ответа, как правило, проявляются сильнее, чем у резистентного, поэтому можно было рассчитывать на более высокую «разрешающую способность» предлагаемой тест-системы. Как будет показано ниже, эти ожидания не оправдались, и результаты оказались во многом неожиданными.

Для выполнения данной работы была получена новая двойная конгенная линия мышей B6.I-9.3- β_2 M-/-, которая не имеет Т-клеток CD8 из-за нокаут-мутации в гене, кодирующем β_2 -микроглобулин, и отличается от родительской линии B6 по аллелю гена *H2-A* МНС класса II. Мы провели сравнительный анализ течения ТБ и иммунного ответа на инфекцию, используя четыре линии мышей – исходную пару B6 и B6.I-9.3 и лишенную Т-клеток CD8 пару B6- β_2 M-/- и B6.I-9.3- β_2 M-/-.

2 Материалы и методы

Мыши, генетическое типирование и содержание иммунных клеток в органах. В работе были использованы родительская линия C57BL/6 (B6) и конгенная рекомбинантная линия B6.I-9.3, подробно описанная ранее [18, 19]. Обе линии мышей поддерживаются в виварии ФГБНУ «ЦНИИТ» братско-сестринскими скрещиваниями в обычных, не-SPF условиях. Скрещивающиеся пары линии мышей B6 с нокаутированным геном, кодирующем β_2 -микроглобулин (B6- β_2 M-KO) были изначально получены из Джексонской лаборатории (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Для получения линии, несущей нокаут-мутацию в гене β_2 M на генетической основе линии B6.I-9.3 были получены гибриды F2 между

линиями B6- β_2 M-KO и B6.I-9.3, среди которых отобраны потомки несущие одновременно мутацию β_2 M-KO и область генома мышей B6.I-9.3 на 17-й хромосоме, от которых мы повели гомозиготную линию B6.I-9.3- β_2 M-KO.

Для генетического типирования выделяли ДНК из кончиков хвостов с использованием набора Promega и проводили ПЦР на приборе Applied Biosystems с помощью следующих праймеров: oIMRO160, B₂m-oIMR184 и B₂m-oIMR185 для идентификации нокаут-мутации в гене для β_2 -микроглобулина и варианта дикого типа; D17Mit103, D17Mit21 и D17Mit22 для идентификации аллелей *H2^d* геномной области 17-й хромосомы. Все последовательности праймеров и протоколы для ПЦР находятся в открытом доступе на сайте <http://www.jax.org>.

Методы приготовления суспензий клеток лимфоидных органов и легких детально описаны в ранней работе нашей лаборатории [21]. Для работы с первичными культурами клеток легкого, лимфоузлов или селезенки выделенные клетки помещали в среду для культивирования (RPMI-1640, содержащая 5% FCS, 1 mM пируват, 4 mM L-глутамат, 50 мкг/мл смеси антибиотиков стрептомицина и пеницилина, 5×10^{-5} M β -меркаптоэтанола, 10 mM HEPES, все компоненты производства HiClone (Logan, UT, USA). Оценку содержания в тимусе, селезенке и легких Т-лимфоцитов CD4⁺, CD8⁺ и В-лимфоцитов CD19⁺ проводили методом проточной цитометрии на приборе BD Canto II после окрашивания клеток антителами анти-CD3-APC, анти-CD4-pe-Cy7, анти-CD8-PP, анти-CD19-BV510 (все антитела BD Biosciences, Biolegend).

Заражение и параметры инфекции. Вирулентный штамм *M. tuberculosis* H37Rv выращивался и готовился для заражения по

описанному нами ранее протоколу [22]. Животных заражали в аэрозольной камере (Glas-Col, США) в дозе 50-100 КОЕ на мышь, как подробно описано ранее [23]. Количество КОЕ микобактерий в легких и селезенке оценивали через 4 и 13 недель после заражения. Выделяли легкие и селезенки зараженных животных, гомогенизировали в 2 мл физиологического раствора, а затем готовили серийные десятикратные разведения гомогенатов органов и высевали на чашки Петри с агаром Дюбо («Difco», США) по 50 мкл на чашку. Чашки инкубировали при 37°C, через 21 дней подсчитывали количество колоний на чашке и пересчитывали их количество на орган.

Гибель животных фиксировалась ежедневно, начиная с 12-й недели после заражения. Кривые выживания сравнивались статистически с использованием log-rank-теста. Для оценки патологии легких среднюю долю правого легкого замораживали в режиме температурного градиента -60°C -20°C в течение 10 минут в электронном криотоме (ThermoShandon, Великобритания). Срезы толщиной 8-10 мкм высушивали на воздухе, фиксировали в этаноле и окрашивали гематоксилином и эозином.

Внутриклеточное определение IFN- γ и TNF. $1,5 \times 10^6$ клеток легкого инкубировали в среде культивирования в присутствии 10 $\mu\text{g/ml}$ ультразвукового дезинтеграта микобактерий [21] 36 часов, добавляя на последние 12 часов 1 $\mu\text{g/ml}$ блокатора аппарата Гольджи (GolgiPlug, BD Biosciences). После отмывки окрашивали поверхность клеток антителами анти-CD4-PerCp, а внутриклеточные цитокины – наборами Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) анти-IFN- γ -APC и анти-TNF-FITC (BD Biosciences) с соблюдением рекомендаций фирмы-производителя.

Статистика. Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.) методами ANOVA, log-rank и критерия Манна-Уитни. Достоверными считали различия при $P < 0,05$.

3 Результаты и обсуждение

Новая конгенная линия мышей. В первой серии экспериментов мы провели проверку того, насколько успешно рекомбинационный перенос нокаут-мутации по гену $\beta 2M$ с генетической основы мышей В6 на основу В6.І-9.3 и последующая селекция гомозиготных мышей воспроизводит дефект Т-клеток $CD8^+$ у новой линии мышей. Для этого мы сначала определили количество Т-клеток $CD4^+$ и $CD8^+$ в лимфоидных органах мышей исходных линий В6 и В6.І-9.3, а также у носителей нокаут-мутации по гену $\beta 2M$ на обеих генетических основах. Как показано на Рис. 1А, в тимусе мышей двух линий дикого типа обнаруживалось приблизительно одинаковое содержание клеток $CD4^+CD8^+$ (около 2,5%). При этом, относительное содержание клеток $CD4^+CD8^-$ было в 2,5 раза выше у мышей линии В6, что совпадает с результатами, полученными ранее [19]. В соответствии с ожидаемым, нокаут-мутация по гену $\beta 2M$ привела к практически полному исчезновению популяции клеток $CD4^+CD8^+$. Тотальная элиминация Т-клеток $CD8$ у мышей обеих мутантных линий подтвердилась и при исследовании селезенки (Рис. 1Б), причем в этом вторичном лимфоидном органе у мышей линии В6.І-9.3 дикого типа с их врожденным пониженным содержанием Т-клеток $CD4$ [19] относительное содержание клеток $CD8$ было выше, согласно общим правилам иммунного гомеостаза.

Поскольку основные иммунные реакции при ТБ проходят в легочной ткани, далее мы оценили эффективность элиминации Т-

клеток CD8 в легких мутантов $\beta 2M^{-/-}$. Как показано на Рис. 2, по сравнению с мышами дикого типа у носителей мутации $\beta 2M^{-/-}$ на обеих генетических основах произошло приблизительное 20-кратное уменьшение легочной популяции Т-клеток CD8, практически до следовых значений. Избирательность генетического дефекта подтверждается не только приведенными на Рис. 1 и 2 данными по Т-клеткам CD4, содержание которых не уменьшилось, но и полным отсутствием влияния нокаут-мутации на содержание в селезенке и легких В-лимфоцитов (Табл. 1). Таким образом, нами получена новая линия мышей, конгенная по МНС-II с классической линией В6 и дефектная по Т-лимфоцитам CD8⁺. Все четыре описанные здесь линии поддерживаются в виварии ФГБНУ «ЦНИИТ» и могут быть предоставлены заинтересованным исследователям.

Влияние дефицита Т-клеток CD8 на фенотипы инфекционного процесса. Чаще всего особенности течения ТБ в эксперименте характеризуют по трем основным показателям: динамике размножения микобактерий в легких, патологическим изменениям в легочной ткани и продолжительности жизни зараженных животных. Мы выбрали для оценки две временные точки туберкулезного процесса – 4 недели после заражения, когда начинают стабильно проявляться все количественные отличия параметров адаптивного иммунного ответа на инфекцию между мышами В6 и В6.I-9.3, связанные с различиями функционирования Т-клеток CD4⁺ [24], и 12-13 неделю инфекции, когда поражение легочной ткани уже сильно выражено, но животные остаются физиологически активными и внешне здоровыми, причем количество микобактерий в легких остается все еще стабильным и у мышей В6, и у мышей В6.I-9.3, хотя и на разных уровнях [20].

Как показано на Рис. 3А, дефицит Т-клеток CD8 не сказывается на размножении микобактерий в легких в течение первых четырех недель после заражения: достоверные отличия в размере популяций возбудителя обнаруживаются между мышами, несущими разные аллели МНС-II (как и было обнаружено ранее [18], мыши с генотипом *H2-A^b* лучше контролируют размножение микобактерий), но не между мышами $\beta 2M^{-/-}$ и $\beta 2M^{+/+}$. Через 90 дней после заражения картина изменялась: в легких мышей $B6\beta 2M^{-/-}$ популяция микобактерий выросла и стала достоверно больше, чем у мышей B6 (Рис. 3Б). В паре линий $\beta 2M^{-/-}$ и $\beta 2M^{+/+}$ на генетической основе B6.I-9.3 такого различия не наблюдалось и количество микобактерий в легких осталось одинаковым у мутантов и мышей дикого типа. Этот результат стал первым косвенным указанием на возможный вклад Т-клеток CD8 в защиту хозяина на поздней стадии инфекции, а также на возможные количественные различия этого вклада, зависящие от аллелей МНС-II, т. е. от ответа Т-клеток CD4⁺.

Оценка продолжительности жизни мышей после заражения показала, что на самом деле роль клеток CD8 в защите от ТБ совсем не второстепенна. Как показано на Рис. 3В, срок выживания мышей обеих линий с дефицитом клеток CD8 оказался гораздо короче, чем линий дикого типа ($P < 0,001$ для пары B6.I-9.3 – $B6.I-9.3\beta 2M^{-/-}$ и $P < 0,0001$ для пары B6 – $B6\beta 2M^{-/-}$). Таким образом, при использовании для оценки тяжести течения заболевания такого интегрального позднего фенотипа, как кривая выживания, участие в иммунной защите клеток CD8 становится весьма заметным. Интересно отметить одну отличительную особенность пары линий B6 – $B6\beta 2M^{-/-}$ от второй пары. Мыши линии B6 дикого типа достоверно ($P < 0,001$) более резистентны к инфекции, чем мыши линии B6.I-9.3, но генетическая элиминация клеток CD8 полностью нивелирует это различие: обе линии, несущие

нокаут-мутацию $\beta 2M^{-/-}$, имеют одинаковое время выживания после заражения (Рис. 3В). Это означает, что негативное влияние отсутствия клеток CD8 сильнее проявляется на фоне, в принципе, более эффективно организованного защитного ответа; положение, которое количественно проиллюстрировано в Таблице 2. Сам этот результат вполне соответствует более резкому снижению способности контролировать размножение микобактерий на поздней фазе инфекции у мышей B6 $\beta 2M^{-/-}$ (Рис. 3Б).

Динамика взаимодействий между Т-клетками CD4⁺ и CD8⁺ при туберкулезе *in vivo* исследована недостаточно подробно, но в некоторых моделях инфекций, особенно вирусных, получены убедительные данные о преимущественном участии Т-клеток CD4 в раннем, а клеток CD8 – в позднем защитном иммунном ответе. Например, сравнительно недавно была разработана модель гепатита С на мышах [25], которая воспроизводит как раннюю острую, так и хроническую, фазы инфекции. В этой модели было показано, что клетки CD4 выступают в роли незаменимых Т-хелперов для клеток CD8 в острой фазе инфекции, но затем нарастающая противовирусная активность последних уже не нуждается в помощи [26]. С этими данными перекликаются и результаты, полученные при исследовании активности клеток памяти CD8⁺, персистирующих в легких после ответа на вирус гриппа [27]. Безусловно, проводить совсем близкие аналогии здесь не вполне уместно, хотя бы потому, что течение туберкулезной инфекции невозможно четко разделить на острую и хроническую фазы, но общая идея о нарастающей роли Т-клеток CD8⁺ по мере развития инфекционного процесса представляется заслуживающей внимания.

Патология легких и ключевые цитокины воспаления.

На Рис. 4 представлены обзорные гистологические срезы ткани легких мышей всех четырех исследуемых линий, полученные через 4 и 13 недель после заражения. На позднем сроке существенных различий между животными обнаружено не было: у мышей всех четырех линий легочная патология была представлена сильно выраженными, диффузными инфильтратами ткани миелоидными и лимфоидными клетками, занимающими большую площадь, т. е. слабо структурированной пневмонией, значительно снижающей дыхательную функцию. На ранней фазе инфекции обнаружилась одно явное отличие между животными двух линий с дефицитом Т-клеток CD8. Ранние типичные признаки туберкулезного воспаления, представленные кольцевыми инфильтратами иммунных клеток вокруг мелких бронхов [28, 29], не обнаруживались у мышей *B6 β 2M*^{-/-} (Рис. 4). Очевидно, именно мышам более резистентной к ТБ линии для ранней компактной инфильтрации перибронхиального пространства, реакцию обычно считающуюся началом защитного ответа связанным с ограничением диссеминации возбудителя [28], необходимо наличие в циркуляции клеток CD8⁺. Выяснение причин отсутствия подобного фенотипа у мышей *B6.I-9.3 β 2M*^{-/-} потребует дополнительных экспериментов, скорее всего связанных с переносами иммунных клеток, но на наш взгляд данное наблюдение перекликается с описанным выше более сильным влиянием дефицита клеток CD8 на продолжительность выживания после заражения именно мышей *B6 β 2M*^{-/-}.

Мы считаем, что высокая резистентность к ТБ мышей B6 обеспечивается, в частности, оптимальным соотношением между популяциями Т-клеток CD4 и CD8, близким к 1: 1 в селезенке и 1,5: 1 в лимфатических узлах [19]. При таком соотношении в полной мере реализуется и роль клеток CD4 в качестве клеток-хелперов для

функционирования клеток CD8, поэтому их генетическое удаление сильно сказывается на тяжести течения инфекции. Значительный дефицит Т-клеток CD4 у мышей B6.I-9.3, обусловленный носительством аллеля *j* их единственного гена класса II *H2-A* [18-20], приводит к инверсии соотношения CD4: CD8 (~1: 2 и в селезенке, и в лимфоузлах [19]) и, вероятно, неоптимальному функционированию клеток CD4 в качестве хелперов. У таких мышей нокаут-мутация $\beta 2M$ /- удаляет из организма клетки CD8, которые все равно функционируют не совсем эффективно, по крайней мере на фазе раннего ответа на инфекцию.

Регуляция воспаления и межклеточные взаимодействия в иммунной системе зависят, прежде всего, от множества эффекторных и регуляторных цитокинов, среди которых при ТБ наиболее заметную роль играют IFN- γ и TNF. Первый выступает в качестве основного активатора зараженных микобактериями макрофагов, индуцируя работу фермента iNOS и выработку активных азотистых радикалов, главных факторов элиминации микобактерий у мыши [30]. Второй, помимо множества других функций, необходим для образования и поддержания структуры туберкулезных гранул, что критически важно для предотвращения диссеминации инфекции [31]. Кроме того, оба этих медиатора продуцируются разными типами клеток иммунной системы, и физиологический эффект весьма сильно зависит от конкретного источника цитокина при разных обстоятельствах. В частности, при туберкулезе защитный эффект TNF, продуцируемого миелоидными клетками, проявляется преимущественно на ранних фазах инфекции, а TNF из Т-лимфоцитов действует в течение длительного времени [32]. Исходя из этих соображений, мы сравнили не тотальную продукцию этих факторов всеми легочными клетками, а

количество клеток CD4⁺, синтезирующих IFN- γ и TNF, в легких мышей исследуемых линий через 4 и 13 недель после заражения.

Как показано на Рис. 5, на ранней фазе инфекции ни различие по аллелям МНС-II, ни нокаут-мутация, элиминирующая клетки CD8⁺, никак не повлияли на долю IFN- γ -положительных клеток среди всех легочных клеток CD4⁺, которая оказалась одинаковой у всех животных (Рис. 5А). Напротив, при отсутствии клеток CD8⁺ на той же четвертой неделе после заражения достоверно снизилась доля TNF-положительных клеток CD4 у мышей обеих линий, несущих мутацию $\beta 2M^{-/-}$. Этот – вполне неожиданный – результат косвенно указывает на необходимость клеток CD8 для быстрой дифференцировки/активации/миграции в легкое TNF-положительных клеток CD4, то есть на вероятность существования некоей реверсной хелперной функции. Он вполне может оказаться связан с феноменом развития полифункциональных Т-клеток CD4⁺, продуцирующих одновременно IFN- γ , TNF и IL-2, которым в последнее время, особенно разработчиками вакцин, уделяется большое внимание как чуть ли не главным факторам защитного противотуберкулезного ответа [33, 34]. Так или иначе, вопрос, несомненно, заслуживает детального изучения.

В заключение хотелось бы отметить, что наши знания о динамике иммунного ответа и взаимодействии между разными типами лимфоцитов при ТБ остаются далеко неполными. Особенно много пробелов в понимании клеточных и молекулярных механизмов взаимодействия «микобактерия-хозяин» на ранних стадиях инфекции, хотя их важность не вызывает сомнений [35] и природы достаточно резкого падения эффективности ответа на поздних стадиях инфекции. Феномен иммунного истощения довольно хорошо исследован в отношении Т-клеток CD8 при онкологических заболеваниях и

368 хронических вирусных инфекциях (см. обзор [36]), но лишь недавно
369 стал изучаться в отношении Т-клеток CD4 при туберкулезе [24, 37].
370 Взаимодействие же CD4 – CD8 в этом аспекте вообще практически не
371 исследовано и заслуживает пристального внимания.

372 **Благодарности**

373 Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 23-
374 14-00030 (АСА).

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Относительное содержание В-лимфоцитов* в органах мышей дикого типа и мутантов $\beta 2M^{-/-}$.

Table 1. Relative B-lymphocyte content* in the organs of wild type and $\beta 2M^{-/-}$ mutant mice.

Линия мышей Mouse strain	B6	B6.I-9.3	B6- $\beta 2M$ -КО	B6.I-9.3- $\beta 2M$ - КО
Селезенка Spleen	51,4 $\pm$ 1,6	54,3 $\pm$ 0,7	51,1 $\pm$ 1,5	56,6 $\pm$ 1,2
Легкие Lung	28,7 $\pm$ 3,5	34,4 $\pm$ 4,6	27,4 $\pm$ 4,6	31,3 $\pm$ 4,3

Примечания: * Относительное содержание В-лимфоцитов определяли методом проточной цитометрии, для селезенки от общего количества клеток, для легких от всех Т- и В-лимфоцитов ($CD3^{+}$ и $CD19^{+}$). Межлинейные различия недостоверны для каждого органа. N = 4-5 на группу.

Notes: * The percentile of $CD19^{+}$ B-cells was assessed by flow cytometry, for spleen cells – among all splenocytes; for lung cells – among T- plus B-lymphocytes ($CD4^{+}$ and $CD19^{+}$). Inter-strain differences were non-significant for both organs. N = 4-5 for each group.

Таблица 2. Генетическая элиминация Т-клеток CD8⁺ сильнее нарушает противотуберкулезную защиту мышей более резистентной к инфекции линии.
Table 2. Genetic depletion of CD8⁺ T-cells impairs TB defense more severely in the more resistant mouse strain.

Линия мышей (N)	Срок выживания ± SEM (дни)	Относительное сокращение срока выживания (%)
Mouse strain (N)	Survival time ± SEM (days)	Relative decrease in the life span (%)
B6 (11)	311,5 ± 9,7	39,9
B6-β ₂ M-KO (23)	184,3 ± 6,7	
B6.I-9.3 (18)	242,7 ± 6,7	25,8
B6.I-9.3-β ₂ M-KO (21)	180,6 ± 6,0	

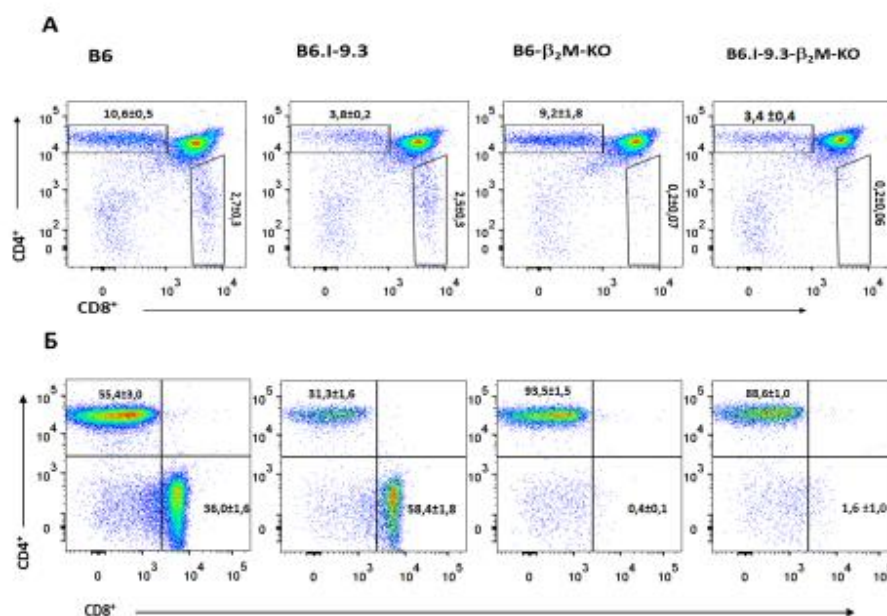
Примечания: *Приведены суммарные результаты двух независимых экспериментов.

Notes: *The results of two independent experiments were summarized.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Нокаут-мутация по гену для β_2 -микроглобулина отменяет экспрессию маркера CD8 на поверхности дифференцированных (single positive) Т-лимфоцитов тимуса (А) и всех лимфоцитов селезенки (Б).

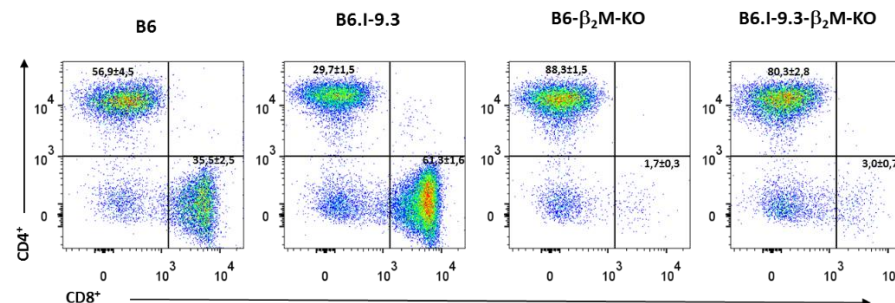
Figure 1. Knockout mutation in the gene for β_2 -microglobulin eliminates differentiated single-positive CD8 T-lymphocytes from thymus (A) and all CD8 cells from spleen (B). The results of two independent flow cytometry experiments (3-4 mice per mouse strain each, $N_{\text{total}} = 6-8$) are expressed as mean $\pm$ SEM.



Результаты проточной цитометрии приведены в виде среднего $\pm$ SEM двух независимых экспериментов, по 3-4 мыши каждой линии в каждом эксперименте ($N_{\text{total}} = 6-8$).

Рисунок 2. Фенотип CD8⁺ у носителей мутации $\beta 2M^{-/-}$ проявляется и в легких.

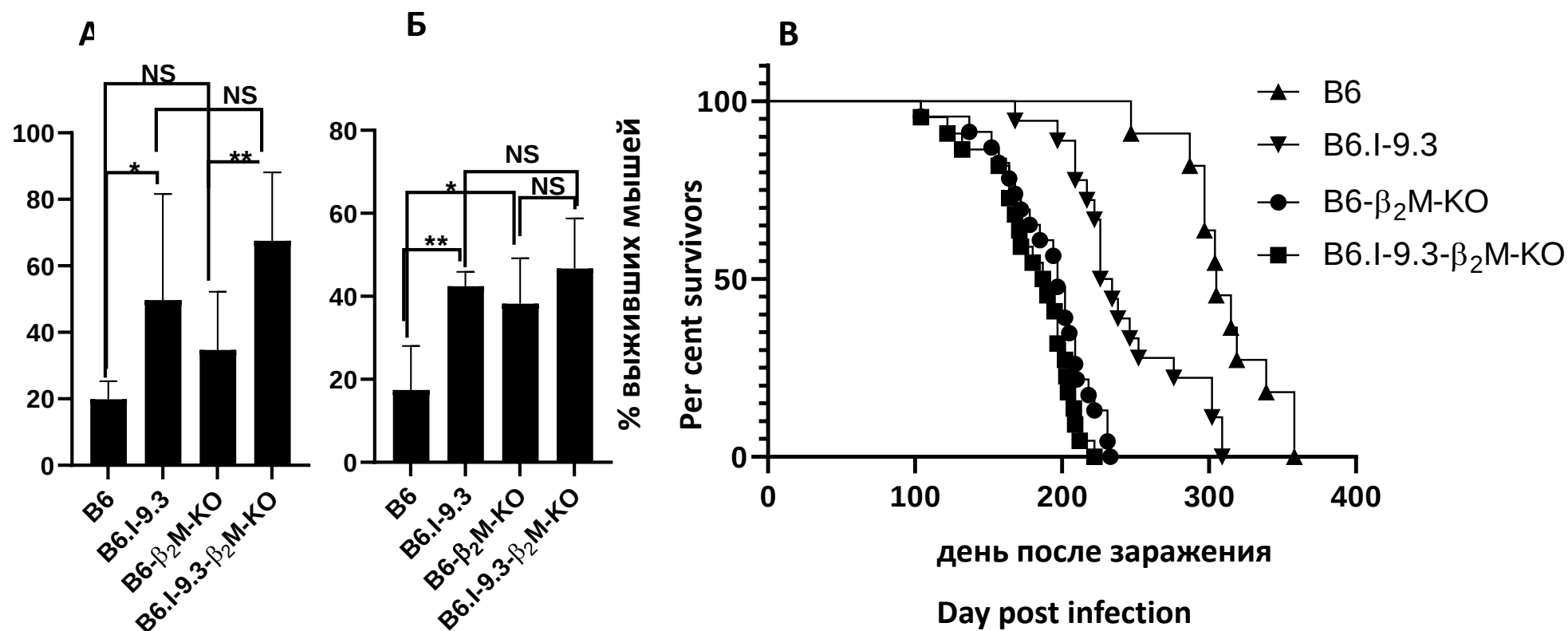
Figure 2. The CD8⁺ phenotype is expressed in the lungs. See the statistic in the footnote to Fig. 1.



Результаты проточной цитометрии приведены в виде среднего $\pm$ SEM двух независимых экспериментов, по 3-4 мыши каждой линии в каждом эксперименте ($N_{\text{total}} = 6-8$).

Рисунок 3. Различия в тяжести течения туберкулезной инфекции у мышей исследуемых линий.

Figure 3. Differences in TB infection severity between mice of the strains under study.



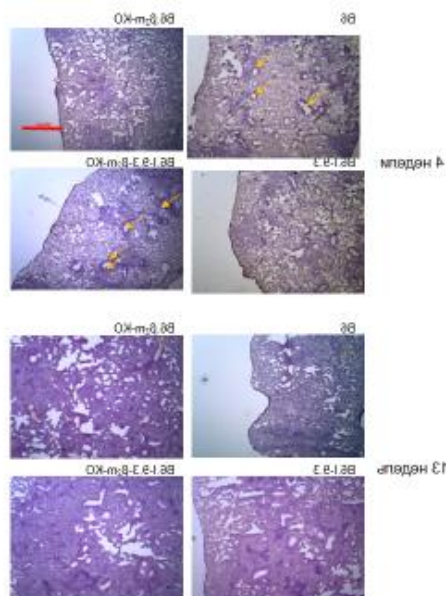
(A) – на ранней стадии инфекции на размножение микобактерий влияет различие по аллелям MHC-II, но не отсутствие клеток CD8⁺. (Б) – На поздней стадии инфекции дефицит клеток CD8 приводит к снижению способности тормозить рост

микобактерий в легких мышей B6- β_2 M-KO, но не B6.I- 9.3- β_2 M-KO. (B) – выживаемость после заражения мышей B6 дикого типа значительно ($P < 0.001$, log rank test) продолжительнее, чем мышей B6.I-9.3, но элиминация Т-клеток CD8 полностью нивелирует это различие. А, Б – по оси X указана средняя бактериальная нагрузка (млн. КОЕ на легкое) $\pm$ SEM, определенная в двух независимых экспериментах ($N_{\text{total}} = 7$ в каждой группе, *, ** = $P < 0,05$ и $< 0,01$, соответственно, критерий Манн-Уитни). В – каждый символ изображает индивидуальное животное, суммированы результаты двух независимых экспериментов.

(A) – At the early infection phase, mycobacterial multiplication in lungs depends upon the MHC-II allele but not on the presence of CD8 cells. (B) – At the late infection phase, CD8 deficiency diminishes lung capacity to control mycobacterial growth in B6- β_2 M-KO, but not B6.I- 9.3- β_2 M-KO, mice. (C) – the life span of the wild type B6 mice is considerably ($P < 0.001$, log rank test) longer than that of B6.I-9.3 mice, but CD8 cell elimination abrogates this difference totally. A, B – X-axis displays bacterial load per lung (mean $\times 10^6 \pm$ SEM for two summarized independent experiments, $N_{\text{total}} = 7$ for each group, *, ** = $P < 0.05$ и < 0.01 , respectively, Mann-Whitney test). Each symbol represents an individual mouse, the results of two independent experiments were summarized.

Рисунок 4. Обзорные микрофотографии (x 37, масштаб приведен на правом верхнем снимке) срезов правого легкого мышей исследуемых линий.

Figure 4. Synopsys photos (x 37, the scale bar is displayed on right upper panel) of right mouse lungs slides.

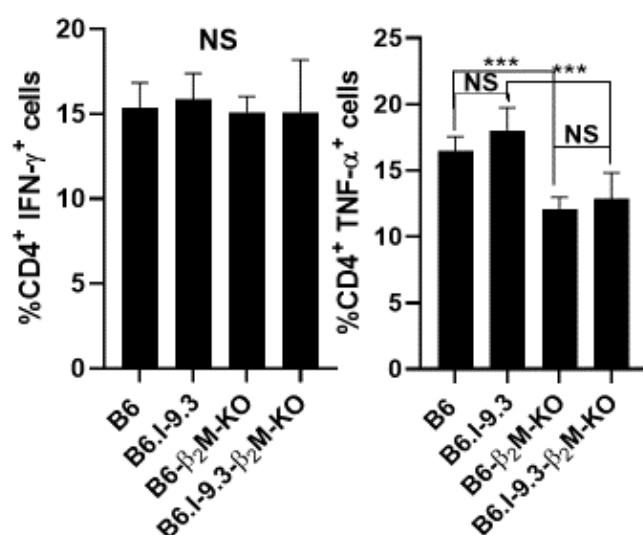


Желтые стрелки указывают на кольцевидные инфильтраты клеток иммунной системы вокруг просветов малых бронхов. См. пояснения в тексте.

Yellow arrows indicate immune cell cuffs around small bronchi. See text for details.

Рисунок 5. Отсутствие Т-клеток CD8 не влияет на содержание в легких клеток CD4, продуцирующих IFN- γ , но приводит к достоверному снижению содержания TNF-положительных клеток.

Figure 5. The lack of CD8 T-cells does not alter the content of lung CD4⁺ IFN- γ -producing, but leads to a significant decrease in CD4⁺ TNF-producing, T-cells.



Приведены суммы результатов двух независимых экспериментов ($N_{\text{total}} = 6$), полученных методом внутриклеточного окрашивания с последующей цитометрией через 4 недели после заражения. *** = $P < 0,001$, тест Манн-Уитни.

The results of two independent experiments are summarized ($N_{\text{total}} = 6$). Intracellular staining with subsequent flow cytometry at week 4 of infection. *** = $P < 0.001$, Mann-Whitney test.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Апт Александр Соломонович, д. б. н., профессор, зав. лабораторией иммуногенетики;

Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза (ФГБНУ «ЦНИИТ»);

адрес: Россия, 107564 Москва, Яузская аллея, 2;

телефон: 89163502082;

e-mail: alexapt0151@gmail.com

Alexander Apt, PhD, Professor and Head, Laboratory for Immunogenetics,

Central Tuberculosis Research Institute;

address: 2, Yauza alley, 107564 Moscow, Russia;

telephone: 89163502082;

e-mail: alexapt0151@gmail.com

Блок 2. Информация об авторах

Н. Н. Логунова, к. м.н., с. н. с.;

Nadezhda Logunova, PhD, MD, Senior Staff Scientist;

М. А. Капина, к. б. н., с. н. с.;

Marina Kapina, PhD, Senior Staff Scientist;

И. А. Линге, к. б. н., в. н. с.;

Irina Linge, PhD, Leading Scientist;

Е. В. Кондратьева, к. б. н., с. н. с.;

Elena Kondratieva, PhD, Senior Staff Scientist.

Блок 3. Метаданные статьи

УЧАСТИЕ ЛИМФОЦИТОВ CD8 В ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОМ
ИММУННОМ ОТВЕТЕ У МЫШЕЙ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ВОСПРИИМЧИВОСТИ К ИНФЕКЦИИ

CD8 CELLS IN ANTI-TUBERCULOUS IMMUNE RESPONSE IN MICE WITH
DIFFERENT GENETIC SUSCEPTIBILITY TO INFECTION

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

Т-КЛЕТКИ CD8 В ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОМ ИММУНИТЕТЕ
CD8 T-CELLS IN TUBERCULOSIS IMMUNITY

Ключевые слова: туберкулез, Т-лимфоциты CD8, конгенные линии мышей, нокаут-мутация, ген β_2 -микроглобулина, патология легких, иммунный ответ.

Keywords: tuberculosis, CD8 T-lymphocytes, congenic mouse strains, knockout mutation, β_2 -microglobulin, lung pathology, immune response.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 14,

количество таблиц – 0,

количество рисунков – 5.

09.07.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1	Allie N., Grivennikov S.I., Keeton R., Hsu N.J., Bourigault M.L., Court N., Fremond C., Yermeev V., Shebzukhov Y, Ryffel B., Nedospasov S.A., Quesniaux V.F., Jacobs M. Prominent role for T cell-derived tumour necrosis factor for sustained control of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection. Sci. Rep., 2013, vol. 3, pp. 1809.	doi: 10.1038/srep01809
2	Billerbeck E., Wolfisberg R., Fahnoe U., Xiao J.W., Quirk C., Luna J.M., Cullen J.M., Hartlage A.S., Chiriboga L., Ghoshal K., Lipkin W. I., Bukh J., Scheel T., Kapoor A., Rice C. M. Mouse models of acute and chronic hepatitis virus infection. Science 2017, vol. 357, no. 6347, pp. 204–208.	doi: 10.1126/science.aal1962
3	Cadena A. M., Flynn J.L., Fortune S.M. The importance of first impressions: early events in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection influence outcome. mBio 2016, vol. 7, no. 2, pp. e00342-16.	doi: 10.1128/mBio.00342-16

4	Chan E.D., Chan J., Schluger N.W. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2001, vol. 25, no. 5, pp. 606-612.	doi: 10.1165/ajrcmb.25.5.4487
5	Chang E., Cavallo K., Behar S.M. CD4 T cell dysfunction is associated with bacterial recrudescence during chronic tuberculosis. Nat. Commun. 2025, vol. 16, no. 1 pp. 2636.	doi: 10.1038/s41467-025-57819-1
6	Cooper A. M., D'Souza C., Frank A. A., Orme I. M.. The course of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection in the lungs of mice lacking expression of either perforin- or granzyme-mediated cytolytic mechanisms. Infect. Immun. 1997, vol. 65, no. 4 pp. 1317–1320.	doi: 10.1128/iai.65.4.1317-1320.1997
7	Derrick S.C., Yabe I.M., Yang A., Morris S.L. Vaccine-induced anti-tuberculosis protective immunity in mice correlates with the magnitude and quality of multifunctional CD4 T cells. Vaccine 2011, vol. 29 no. 16, pp. 2902–2909.	doi: 10.1016/j.vaccine.2011.02.010

8	Dutronc Y., Porcelli S. A. The CD1 family and T cell recognition of lipid antigens. <i>Tissue Antigens</i> 2002, vol. 60, no. 5, pp. 337-353.	doi: 10.1034/j.1399-0039.2002.600501.x
9	Flynn J. L., Goldstein M. M., Triebold K. J., Koller B., Bloom B. R. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 1992, vol. 89, no. 24, pp. 12013–12017.	doi: 10.1073/pnas.89.24.12013
10	Hunter R.L., Actor J.K., Hwang S.A., Khan A., Urbanowski M.E., Kaushal D., Jagannath C. Pathogenesis and animal models of post-primary (bronchogenic) tuberculosis, A review. <i>Pathogens</i> 2018, vol. 7 no.1, pp. 19.	doi: 10.3390/pathogens7010019
11	Jaiswal S., Fatima S., de la Cruz E. V., Kumar S. Unraveling the role of the immune landscape in tuberculosis granuloma. <i>Tuberculosis (Edinb.)</i> 2025, vol. 152, pp. 102615.	doi: 10.1016/j.tube.2025.102615
12	Kireev F.D., Lopatnikova J.A., Alshevskaya A.A., Sennikov S.V. Role of tumor necrosis factor in tuberculosis. <i>Biomolecules</i> 2025, vol. 15 no.5, pp. 709.	doi: 10.3390/biom15050709

13	Kondratieva E., Logunova N., Majorov K., Averbakh M., Apt A. Host genetics in granuloma formation: human-like lung pathology in mice with reciprocal genetic susceptibility to <i>M. tuberculosis</i> and <i>M. avium</i> . PLoS One 2010, vol. 5, no. 5, pp. e10515.	doi: 10.1371/journal.pone.0010515
14	Laochumroonvorapong P., Wang C.-C., Liu W, Ye A. L., Moreira K. B., Elkon V., Freedman H., Kaplan G. Perforin, a cytotoxic molecule which mediates cell necrosis, is not required for the early control of mycobacterial infection in mice. Infect. Immun. 1997, vol. 65, no. 1, pp. 127–132.	doi: 10.1128/iai.65.1.127-132.1997
15	Lewinsohn D.A., Winata E., Swarbrick G.M., Tanner K.E., Cook M.S., Null M. D., Cansler M.E., Sette A., Sidney J., Lewinsohn D. M. Immunodominant tuberculosis CD8 antigens preferentially restricted by HLA-B. PLoS Pathog. 2007, vol. 3, no. 9, pp. 1240-1249.	doi: 10.1371/journal.ppat.0030127

16	Lin P. L., Flynn J. L. CD8 T cells and <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection. Semin. Immunopathol. 2015, vol. 37, no.3, pp. 239-249.	doi: 10.1007/s00281-015-0490-8
17	Logunova N., Kapina M., Dyatlov A., Kondratieva T., Rubakova E., Majorov K., Kondratieva E., Linge I., Apt A. Polygenic TB control and the sequence of innate/adaptive immune responses to infection: MHC-II alleles determine the size of the S100A8/9-producing neutrophil population. Immunology 2024, vol. 173, no.2, pp. 381-393.	doi: 10.1111/imm.13836.
18		
19	Logunova N., Korotetskaya M., Polshakov V., Apt A. The QTL within the H2 complex involved in the control of tuberculosis Infection in mice Is the classical Class II H2-Ab1 gene. PLoS Genet. 2015, vol. 11, no. 11, pp. e1005672.	doi: 10.1371/journal.pgen.1005672.
20	Logunova N.N., Kriukova V.V., Shelyakin P.V., Egorov E.S., Pereverzeva A., Bozhanova N.G., Shugay M., Shcherbinin D.S., Pogorelyy M.V., Merzlyak E.M., Zubov V.N., Meiler J., Chudakov D.M., Apt A.S., Britanova O.V. MHC-II alleles	doi: 10.1073/pnas.2003170117.

	shape the CDR3 repertoires of conventional and regulatory naïve CD4 ⁺ T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2020, vol. 117, no. 24, pp. 13659-13669.	
21	Lopez-Scarim J., Mendoza D., Nambiar S.M., Billerbeck E. CD4 ⁺ T cell help during early acute hepatitis virus infection is critical for viral clearance and the generation of a liver-homing CD103 ⁺ CD49a ⁺ effector CD8 ⁺ T cell subset. PLoS Pathog. 2024, vol. 20, no. 10, pp. e1012615.	doi.org/10.1371/journal.ppat.1012615.
22	Lu Y.J., Barreira-Silva P., Boyce S., Powers J., Cavallo K., Behar S.M. CD4 T cell help prevents CD8 T cell exhaustion and promotes control of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection. Cell Rep. 2021, vol. 36, no. 11, pp. 109696.	doi: 10.1016/j.celrep.2021.109696.
23	Lyadova I.V., Eruslanov E.B., Khaidukov S.V., Yermeev V.V., Majorov K.B., Pichugin A.V., Nikonenko B.V., Kondratieva T.K., Apt A.S. Comparative analysis of T lymphocytes recovered from the lungs of mice genetically susceptible, resistant, and hyperresistant to <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -triggered disease. J. Immunol. 2000, vol. 165, no.10, pp. 5921-5931.	doi: 10.4049/jimmunol.165.10.5921

24	Majorov K .B., Lyadova I.V., Kondratieva T.K., Eruslanov E.B., Rubakova E.I., Orlova M.O., Mischenko V.V., Apt A.S. Different innate ability of I/St and A/Sn mice to combat virulent <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : phenotypes expressed in lung and extrapulmonary macrophages. Infect. Immun. 2003, vol. 71. No. 2, pp. 697-707.	doi: 10.1128/IAI.71.2.697-707.2003
25	McLane L.M., Abdel-Hakeem M.S., Wherry E.J. CD8 T cell exhaustion during chronic viral infection and cancer. Annu. Rev. Immunol. 2019, vol. 37, pp. 457–495.	doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055318
26	Mott D., Yang J., Baer C., Papavinasasundaram. K, Sasseti. C.M., Behar S.M. High bacillary burden and the ESX-1 type VII secretion system promote MHC Class I presentation by <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Infected macrophages to CD8 T cells. J. Immunol. 2023, vol. 210, no.10, pp.1531-1542.	doi: 10.4049/jimmunol.2300001

27	Patankar Y.R., Sutiwisesak R., Boyce S., Lai R., Lindestam Arlehamn C.S., Sette A., Behar S.M. Limited recognition of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -infected macrophages by polyclonal CD4 and CD8 T cells from the lungs of infected mice. <i>Mucosal Immunol.</i> 2020, vol. 13, no.1, pp.140-148.	doi: 10.1038/s41385-019-0217-6
28	Paterson R.L., La Manna M.P., Arena De Souza V., Walker A., Gibbs-Howe D., Kulkarni R., Fergusson J.R., Mulakkal N.C., Monteiro M., Bunjobpol W., Dembek M., Martin-Urdiroz M., Grant T., Barber C., Garay-Baquero D.J., Tezera L.B., Lowne D., Britton-Rivet C., Pengelly R., Chepisiuk N., Singh P.K., Woon A.P., Powlesland A.S., McCully M.L., Caccamo N., Salio M., Badami G.D., Dorrell L., Knox A., Robinson R., Elkington P., Dieli F., Lepore M., Leonard S., Godinho L.F.. An HLA-E-targeted TCR bispecific molecule redirects T cell immunity against <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 2024, vol. 121, no. 19, pp. e2318003121.	doi: 10.1073/pnas.2318003121
29	Radaeva T.V., Nikonenko B.V., Mischenko V.V., Averbakh M.M. Jr, Apt A.S. Direct comparison of low-dose and Cornell-like models of chronic and	doi: 10.1016/j.tube.2004.09.014

	reactivation tuberculosis in genetically susceptible I/St and resistant B6 mice. Tuberculosis (Edinb) 2005, vol. 85, no 1-2, pp. 65-72.	
30	Reilly E.C., Sportiello M., Emo K.L., Amitrano A.M., Jha R., Kumar A.B.R., Laniewski N.G., Yang H., Kim M., Topham D.J. CD49a Identifies polyfunctional memory CD8 T cell subsets that persist in the lungs after influenza infection. Front. Immunol. 2021, vol.12, pp. 728669.	doi: 10.3389/fimmu.2021.728669.
31	Rodo M.J., Rozot V., Nemes E., Dintwe O., Hatherill M., Little F., Scriba T.J. A comparison of antigen-specific T cell responses induced by six novel tuberculosis vaccine candidates. PLoS Pathog. 2019, vol. 15, no. 3, pp. e1007643.	doi: 10.1371/journal.ppat.1007643.
32	Stenger S., Hanson D.A., Teitelbaum R., Dewan P., Niazi K.R., Froelich C.J., Ganz T., Thoma-Uszynski S., Melián A., Bogdan C., Porcelli S.A., Bloom B.R., Krensky A.M., Modlin R.L. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science 1998, vol. 282 no. 5386, pp. 121-125.	doi: 10.1126/science.282.5386.121

33	Silva B.D.S., Trentini M.M., da Costa A.C., Kipnis A., Junqueira-Kipnis A.P. Different phenotypes of CD8+ T cells associated with bacterial load in active tuberculosis. Immunol. Lett. 2014, vol. 160, no. 1, pp. 23-32.	doi: 10.1016/j.imlet.2014.03.009.
34	Tascon R.E., Stavropoulos E., Lukacs K.V., Colston M.J. Protection against <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection by CD8+ T cells requires the production of gamma interferon. Infect. Immun. 1998, vol. 66, no.2, pp. 830-834.	doi: 10.1128/IAI.66.2.830-834.1998
35	Thakur P., Sutiwisesak R., Lu Y.J., Behar S.M. Use of the human granulysin transgenic mice to evaluate the role of granulysin expression by CD8 T cells in immunity to <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . mBio 2022, vol. 13, no. 6, pp. e0302022.	doi: 10.1128/mbio.03020-22
36	Vats D., Rani G., Arora A., Sharma V., Rathore I., Mubeen S.A., Singh A. Tuberculosis and T cells: Impact of T cell diversity in tuberculosis infection. Tuberculosis (Edinb). 2024, vol. 149, pp. 102567.	doi: 10.1016/j.tube.2024.

37	Yang J.D., Mott D., Sutiwisesak R., Lu Y.J., Raso F., Stowell B., Babunovic G.H., Lee J., Carpenter S.M., Way S.S., Fortune S.M., Behar S.M. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -specific CD4+ and CD8+ T cells differ in their capacity to recognize infected macrophages. PLoS Pathog. 2018, vol. 14, no. 5, pp. e1007060.	doi: 10.1371/journal.ppat.1007060
----	---	-----------------------------------