

## ВЛИЯНИЕ IL-7 И IL-15 НА Т-РЕГУЛЯТОРНЫЕ КЛЕТКИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ *IN VITRO*

© 2019 г. Д. В. Шевырев<sup>1\*</sup>, В. А. Козлов<sup>1</sup>, В. О. Омельченко<sup>2</sup>

\*E-mail: dr.daniil25@mail.ru

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной  
и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал  
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского  
отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 27.03.2019

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния гуморальных факторов гомеостатической пролиферации IL-7 и IL-15 на Т-регуляторные (Treg) клетки условно здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом. Фенотипирование Treg проводилось методом проточной цитометрии с использованием маркеров Foxp3, CD127, CD4 и CD25 до и после культивирования в течение 7 дней в условиях стимуляции IL-7, IL-15, а также anti-CD3<sup>+</sup> IL-2. Выделенные методом иммуномагнитной сепарации Treg окрашивались CFSE для оценки пролиферации. Было обнаружено, что гуморальные факторы ГП способны эффективно поддерживать Treg численно и по фенотипу (CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>). При этом в группе пациентов было выявлено более высокое процентное содержание Treg в условиях стимуляции, что может отражать процесс индукции Treg клеток *de novo* из CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов. Также было обнаружено, что Treg пациентов под влиянием IL-7 и IL-15 имеют значительно более низкую пролиферативную активность, чем Treg доноров. Сниженная пролиферативная активность Treg-лимфоцитов пациентов с РА под действием гомеостатических факторов может вносить существенный вклад в развитие заболевания из-за наиболее медленного, чем у доноров восстановления пула Treg-лимфоцитов при лимфопении. В свою очередь, повышенная в сравнении с донорами индукция CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-лимфоцитов культурах МНК, выделенных из крови пациентов может играть роль в патогенезе РА, т.к. данные клетки обладают транзитной экспрессией FoxP3 и склонны к дифференцировке в патогенные exFoxP3-Th17 лимфоциты.

**Ключевые слова:** Т-регуляторные клетки, ревматоидный артрит, интерлейкин-7, интерлейкин-15, интерлейкин-2

DOI: 10.31857/S102872210007004-9

Адрес: 630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14, ФГБНУ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия, Козлов Владимир Александрович. Тел.: 8 (383) 222-26-74

E-mail: dr.daniil25@mail.ru

Авторы:

**Шевырев Д. В.**, аспирант, лаборатория клинической иммунопатологии, ФГБНУ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия;

**Козлов В. А.**, д. м. н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии, ФГБНУ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия;

**Омельченко В. О.**, м. н. с., лаборатория патологии соединительной ткани, Научно-исследовательский институт клини-

ческой и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Гомеостатическая пролиферация (ГП) это нормальный физиологический процесс, индуцируемый лимфопенией, и направленный на численное восполнение пула Т-лимфоцитов. Основными факторами, обеспечивающими ГП, являются: контакт Т-клеточного рецептора (TCR) с аутоантигеном в составе главного комплекса гистосовместимости и взаимодействие с цито-

кинами IL-7 и IL-15, уровень которых повышается при лимфопении [1]. Несмотря на то, что ГП это физиологический процесс, в последние годы ему отводится важная роль в контексте развития аутоиммунных заболеваний. Предполагается, что выраженность и продолжительность лимфопении могут качественно влиять на эффективность ГП и создавать предпосылки для возникновения аутоиммунных патологий. Хорошо известны такие следствия ГП, как: отбор лимфоцитов с высоким сродством их TCR к собственным антигенам, переход наивных Т-клеток в Т-клетки памяти без участия чужеродных антигенов, а также сужение репертуара TCR. Всё это приводит к изменениям в иммунной системе, которые могут увеличивать риск развития различных аутоиммунных патологий.

Ключевыми клетками, обеспечивающими периферическую ауто толерантность, являются Т-регуляторные лимфоциты (Treg). Учитывая, что интерлейкин-2 (IL-2) является первостепенным гуморальным фактором, обеспечивающим гомеостаз Treg, а также тот факт, что при лимфопении происходит снижение концентрации данного цитокина ввиду уменьшения числа клеток-продуцентов IL-2 (CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>) [2], возникает вопрос – способны ли гуморальные факторы – IL-7 и IL-15 эффективно поддерживать и восстанавливать пул Treg в процессе гомеостатической пролиферации? В данном исследовании мы изучили *in vitro* влияние IL-7 и IL-15 на фенотип и пролиферативную активность Treg в группах здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом (РА).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 15 условно здоровых доноров и 10 пациентов с РА (олиго- и полиартикулярным вариантами, средней и высокой степенью активности). Группы доноров и пациентов были сопоставимы по возрасту (средний возраст доноров 52±11 года, пациентов 56±14 лет). Диагностика РА производилась в соответствии с общепринятыми критериями. Материалом для исследования послужила периферическая кровь. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина, затем производилась иммуномагнитная сепарация Treg-клеток с применением набора фирмы Miltenyi Biotec по фенотипу CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>dim</sup> (чистота

сортировки составила 93,2±4%). После этого Treg окрашивались витальным красителем CFSE и культивировались *in vitro* в течение 7 дней с МНК в соотношении 1:1 под влиянием IL-7 (25 нг/мл), IL-15 (25 нг/мл), а также при стимуляции anti-CD3-антителами (0,25 мкг/мл) совместно с IL-2 (25 МЕ/мл). Опытным путем были подобраны средние дозы цитокинов, вызывающие пролиферативный ответ CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-клеток. В качестве контроля культивирование происходило без стимуляции. Для фенотипирования, оценки экспрессии FoxP3 и изучения пролиферации Treg использовался проточный цитофлуориметр FACS Canto II. Статистический анализ проводился с использованием программы «Statistica 6.0». Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В периферической крови процент CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg у здоровых доноров составил 5,9±1,5% и достоверно не отличался от пациентов с РА – 5,2±1,8%. Согласно полученным результатам, IL-7 и IL-15 были способны поддерживать популяцию Treg по числу и фенотипу (экспрессия FoxP3 и CD25) в культуре на сопоставимом со стимуляцией анти-CD3<sup>+</sup> IL-2 уровне в группе доноров. В то время как в контроле без стимуляции процент CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-лимфоцитов значительно снижался. Аналогичная тенденция наблюдалась при стимуляции и для пациентов с РА, однако при этом происходило достоверное увеличение процента CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-лимфоцитов в сравнении с нативными образцами и контролем без стимуляции, что являлось достоверным отличием от доноров. Подобные изменения могли быть связаны с более высокой пролиферацией Treg под влиянием стимуляции в группе пациентов. Однако в следующем эксперименте, где изучался пролиферативный ответ Treg, этот показатель у пациентов оказался значительно ниже, чем у доноров. Под влиянием IL-7 в пролиферацию вступало 11,3±6,3% Treg в группе доноров против 3,2±2% Treg в группе пациентов с РА. В то время как при стимуляции IL-15 пролиферативный ответ Treg в группе доноров составил 7,7±2,9% против 3,6±2,9% в группе пациентов. При этом в обеих группах пролиферативная активность Treg была значимо выше при стимуляции anti-CD3<sup>+</sup> IL-2 и достоверно не отличалась между донорами (22,8±8,6%) и пациентами (18,5±13,4%).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В норме поддержание пула Treg в организме происходит в основном за счет IL-2, что подтверждается развитием тяжелых аутоиммунных расстройств у людей с генетическим дефицитом IL-2 или с различными дефектами его рецептора IL-2R [3]. Учитывая, что основными клетками, вырабатывающими данный цитокин, являются T-эффекторный клетки, и размер периферического пула Treg зависит от числа продуцентов IL-2, то выявленная нами *in vitro* способность IL-7 и IL-15 поддерживать экспрессию FoxP3 и число Treg в группах доноров и пациентов может быть альтернативным механизмом гомеостаза Treg при лимфопении. В целом это согласуется с большинством литературных данных, которые указывают на свойство цитокинов с общей  $\gamma$ -цепью положительно влиять на гомеостаз Treg, в частности за счет активации сигнального пути STAT5 [4].

Наблюдаемое увеличение процента CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-клеток в культурах МНК полученных от пациентов, скорее всего, связано с повышенной индукцией FoxP3 в CD4<sup>+</sup>-лимфоцитах пациентов. Однако вопрос о том, являются ли такие CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-лимфоциты полноценными T-регуляторными клетками, или же экспрессия FoxP3 в них носит транзитный характер, остается предметом дальнейших исследований. В то же время наблюдаемое явление может представлять определенный интерес в контексте патогенеза РА в связи с нестабильностью экспрессии гена FoxP3 в индуцированных Treg. Известно, что такие клетки в условиях воспаления склонны к дифференцировке в Th17-лимфоциты, значение которых в патогенезе аутоиммунных заболеваний продемонстрировано во многих исследованиях последнего времени [5].

Пролиферация Treg может происходить как через TCR-зависимые, так и через TCR-независимые механизмы [6]. Так стимуляция Treg антигеном соответствующей специфичности многократно усиливает пролиферацию только специфичного к данному антигену клона Treg. В то время как антигеннезависимая пролиферация, опосредованная гуморальными факторами (IL-7 и IL-15), является поликлональной и необходима для поддержания периферического пула Treg. Таким образом, нами была продемонстрирована антигеннезависимая пролиферация Treg под действием гомеостатических цитокинов

IL-7 и IL-15, схожая с процессом гомеостатической пролиферации T-лимфоцитов. При этом в группе пациентов она протекала в значительно меньшей степени. Что, по-видимому, может создавать предпосылки для более длительного восстановления пула Treg при лимфопении во время гомеостатической пролиферации, и вносить определенный вклад в развитие РА на начальных стадиях.

В проведенном исследовании *in vitro* было изучено влияние гуморальных факторов ГП IL-7 и IL-15 на экспрессию главного транскрипционного фактора T-регуляторных клеток FoxP3, а также была исследована способность этих факторов вызывать пролиферацию Treg, которая оказалась значительно ниже в группе пациентов. Тем не менее, для более полного понимания роли ГП в гомеостазе Treg требуются дополнительные исследования, включающие изучение воздействия IL-7 и IL-15 на супрессорный потенциал T-регуляторных клеток.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Moxham V.F., Karegli J., Phillips R.E., Brown K.L., Tapmeier T.T., Hangartner R., Sacks S.H., Wong W. Homeostatic proliferation of lymphocytes results in augmented memory-like function and accelerated allograft rejection. *J Immunol.* 2008, Mar 15; 180(6):3910–8. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.3910>.
2. Duarte J.H., Zelenay S., Bergman M.L., Martins A.C., Demengeot J. Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *Eur. J. Immunol.* 2009, 39:948–955. DOI: 10.1002/eji.200839196.
3. Chinen T., Kannan A.K., Levine A.G., Fan X., Klein U., Zheng Y., Gasteiger G., Feng Y., Fontenot J.D., Rudensky A.Y. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat Immunol.* 2016 Nov; 17(11):1322–1333. DOI: 10.1038/ni.3540.
4. Vang K.B., Yang J., Mahmud S.A., Burchill M.A., Vegoe A.L., Farrar M.A. Interleukin-2, -7 and -15, but not TSLP, Redundantly Govern CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cell Development. *J Immunol.* 2008 Sep 1; 181(5): 3285–3290.
5. Komatsu N., Okamoto K., Sawa S., Nakashima T., Oh-hora M., Kodama T., Tanaka S., Bluestone J.A., Takayanagi H. Pathogenic conversion of Foxp3<sup>+</sup> T-cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat. Med.* 2014, 20:62–70. DOI: 10.1038/nm.3432.
6. Zou T., Caton A.J. Dendritic Cells Induce Regulatory T Cell Proliferation through Antigen-Dependent and Independent Interactions. *The Journal of Immunology.* 2010, 185: 2790–2799. DOI: 10.4049/jimmunol.0903740.

## THE INFLUENCE OF IL-7 AND IL-15 ON T-REGULATORY CELLS OF DONORS AND PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS *IN VITRO*

© 2019 D. V. Shevyrev<sup>1\*</sup>, V. A. Kozlov<sup>1</sup>, V. O. Omelchenko<sup>2</sup>

\*E-mail: dr.daniil25@mail.ru

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

<sup>2</sup>Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – a branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 27.03.2019

The aim of this study was to assess the influence of homeostatic factors IL-7 and IL-15, that induced homeostatic proliferation (HP), on the phenotypic characteristics of T-regulatory cells (Treg) from healthy donors and patients with rheumatoid arthritis (RA) *in vitro*. Analysis of Treg phenotype was performed by flow cytometry, using Foxp3, CD127, CD4 and CD25. Isolated from the blood cells were cultured with and without stimulation during 7 days. IL-7, IL-15 and anti-CD3 antibodies supplemented IL-2 were chosen as activators. Purified Treg cells were labeled with CFSE dye to assess proliferation. We estimated that HP factors effectively maintain the number and phenotype (CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) of Treg *in vitro*. Also, in patients group we showed an increasing of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells under all stimulation condition that may indicate the induction of Treg from conventional T cells. Herewith under IL-7 and IL-15 Treg cells from RA patients had a low proliferative activity than Treg from donors. The reduced proliferative activity of Treg in the group of RA-patients under IL-7 and IL-15 perhaps make a significant contribution to the development of the disease due to the delay of Treg pool reconstitution in the lymphopenia conditions on the initial stage. Furthermore, increased induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells in PBMC cultures in patients group associated with pathogenesis of RA, since induced Treg have transient and unstable expression of FoxP3.

*Key words:* T-regulatory cells, rheumatoid arthritis, interleukin-7, interleukin-15, interleukin-2

### Authors:

**Shevyrev D. V.**, ✉ PhD student, laboratory of clinical immunopathology, Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia. **E-mail:** dr.daniil25@mail.ru;

**Kozlov V. A.**, Full Member of the Russian Academy of Sciences, doctor of medical sciences, professor, Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

**Omelchenko V. O.**, junior researcher, laboratory of connective tissue pathology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – a branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia.