

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ГОМЕОСТАТИЧЕСКОЙ
ПРОЛИФЕРАЦИИ НА Т-РЕГУЛЯТОРНЫЕ КЛЕТКИ *IN VITRO***

Д.В. Шевырев

Научный руководитель: Академик РАН, профессор, д.м.н. В.А. Козлов
Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии
Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14, 630099
E-mail: dr.daniil25@mail.ru

***IN VITRO* EVALUATION OF INFLUENCE OF HUMORAL FACTORS OF HOMEOSTATIC
PROLIFERATION ON T-REGULATORY CELLS**

D.V. Shevyrev

Scientific supervisor: Academician of RAS, MD, Prof., V.A. Kozlov
Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
Russia, Novosibirsk, Yadrintsevskaya str., 14, 630099
E-mail: dr.daniil25@mail.ru

Abstract. *Role of T-regulatory cells (Treg) in pathogenesis of different autoimmune diseases is widely known. A lot of studies have been dedicated to contribution of these cells in development of rheumatoid arthritis. It was shown that different abnormalities of these cells such as quantitative or qualitative may lead to beginning and progression of autoimmune pathology. At the same time some authors note the importance of homeostatic proliferation (HP) in beginning of autoimmune diseases. HP is normal physiological process caused by lymphopenia to support constant level of T cells. However, HP can make some negative contribution. This process accompanied by decrease of T-cell receptor (TCR) repertoire and selection of T-cell clones with relatively high affinity to selfantigens. In common this may increase the risk of development of autoimmune pathology. However, impact of homeostatic proliferation on Treg cells is not completely understood. In this study we performed the in vitro assay of influence of the main humoral factors of HP - IL7 and IL15 cytokines on Treg cells. We revealed these factors, especially IL7, can support surviving and stability Treg cells phenotype (by FoxP3 expression) and can increase the expression of functional molecules of Treg cells such as PD-L1 in experiment which was performed on cells obtained from healthy donors blood. So these results reflect the importance of homeostatic proliferation and its humoral factors in not only supporting of conventional T-cells but in influence on T-regulatory cells. It can play significant role in the development of autoimmune diseases. So we are going to continue our investigations with blood from rheumatoid arthritis patients.*

Введение. Ревматоидный артрит (РА) – это тяжелое заболевание соединительной ткани, которое часто приводит к инвалидности и сокращению продолжительности жизни. Основным патогенетическим звеном РА считается персистирующая активация аутореактивных Т-лимфоцитов, которая приводит к усилению продукции цитокинов, активации В-лимфоцитов и макрофагов. Установлено, что активность РА и выраженность повреждения суставов ассоциированы с повышением уровня пролиферации Т-клеток [1]. Однако нет однозначных данных о роли Т-регуляторных клеток (Трег) в этом процессе, которые в норме обеспечивают подавление избыточного иммунного ответа с помощью контактных и гуморальных

механизмов [2]. Во многих исследованиях *in vivo* было показано, что дефекты Treg-звена способствуют развитию аутоиммунных заболеваний и что эти процессы можно предотвратить путем адоптивного переноса функциональных Treg-клеток от здоровых животных [3]. Большинство исследований показывает обратную взаимосвязь между активностью РА и числом Treg-клеток, но эти результаты малочисленны и часто противоречивы [1]. Возможно, такие несоответствия стоит связывать со сложностью выделения данной клеточной популяции, её крайней неоднородностью и нестабильностью некоторых субпопуляций. В развитие РА вносит вклад гомеостатическая пролиферация (ГП) – процесс численного восстановления пула Т-лимфоцитов в условиях лимфопении с участием цитокинов IL-7 и IL-15, в результате которого снижается разнообразие репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) и происходит отбор потенциально аутореактивных Т-лимфоцитов [4]. Это приводит к нарушению периферической аутоотолерантности, которая в норме обеспечивается Treg-клетками. В настоящее время известно, что происходит изменение численности Treg при РА, которое коррелирует с тяжестью заболевания [1, 5]. Однако недостаточно данных о функциональной и пролиферативной активности Treg клеток при повышенных уровнях IL-7 и IL-15 в условиях ГП [6, 7]. Таким образом, целью данной работы стало изучение влияния факторов гомеостатической пролиферации на Treg-клетки *in vitro*.

Материалы и методы. Объектами исследования стали 6 условно здоровых доноров (средний возраст составил 39 лет). Мононуклеарные клетки выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина (1,078 г/мл). При определении оптимальной концентрации цитокинов IL-7 и IL-15 была произведена раститровка доз 10 нг/мл, 25 нг/мл, 50 нг/мл, 100 нг/мл для каждого цитокина в культурах мононуклеарных клеток 5 условно здоровых доноров. Оптимальной считалась доза, вызывающая максимальную пролиферацию Т-клеток. Как IL-7, так и IL-15 достоверно ($p < 0,05$) вызывали максимальный пролиферативный ответ в дозировках 50 нг/мл и 100 нг/мл, при этом между данными концентрациями достоверных отличий не было выявлено. Выбранные концентрации цитокинов в эксперименте составили 50 нг/мл для IL-7 и IL-15, для анти-CD3 антител – 0,5 мкг/мл, для IL-2 – 50 МЕ/мл. Для фенотипирования клеток использовался проточный цитофлуориметр FACS Canto II. Исследование Т-регуляторных клеток проводилось с использованием поверхностных маркеров ($CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$) и транскрипционного фактора FoxP3 ($CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$). Достоверность различий оценивалась с помощью Т-критерия Уилкоксона для зависимых выборок. Статистический анализ проводился с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0».

Результаты. Было достоверно ($p < 0,05$) обнаружено снижение процентного отношения FoxP3⁺Treg-клеток в контрольных лунках без стимуляции в сравнении с образцами до культивирования. Однако при стимуляции цитокинами IL-7 ($p < 0,05$) и совместно IL-7 + IL-15 ($p < 0,05$) относительное количество FoxP3⁺Treg-клеток было достоверно выше, чем в отсутствии стимуляции. При этом не было выявлено достоверных отличий при воздействии на клетки анти-CD3-антителами совместно с IL-2 в сравнении с контролем. Также было обнаружено увеличение уровня экспрессии PD-L1 на $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$ Treg-клетках под влиянием IL-15 ($p < 0,05$) и совместной стимуляции IL-7 + IL-15 ($p < 0,05$). Наибольшее увеличение экспрессии этой молекулы наблюдалось под воздействием анти-CD3-антител и IL-2 ($p < 0,05$). В то же время влияние IL-7 на увеличение экспрессии PD-L1 на Т-регуляторных клетках носило характер тенденции ($p = 0,07$).

Стоит отметить, что использование поверхностных маркеров (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻) для исследования Т-регуляторных клеток в культурах было осложнено тем фактом, что стимуляция цитокинами вызывала активацию эффекторных клеток, которая сопряжена с увеличением экспрессии рецептора к IL-2R (CD25) и снижением экспрессии рецептора к IL-7 (CD127) на этих клетках. Т.е. часть Т-эффекторных клеток при культивировании могла приобретать фенотип CD25⁺CD127⁻ и вносить некоторую погрешность. Поэтому дальнейшие исследования планируется проводить с использованием сортирования Т-регуляторных и Т-респондерных клеток с последующим окрашиванием соответствующей популяции витальными красителями CFSE и CMTMR для точной идентификации клеток в культурах и оценки их пролиферации.

Выводы. В данном исследовании было показано, что гуморальные факторы ГП способны обеспечивать выживание Трег-клеток через поддержание экспрессии FoxP3 – важного транскрипционного фактора, играющего основную роль в обеспечении функциональной активности Трег-лимфоцитов. Также впервые было показано, что факторы гомеостатической пролиферации, особенно IL-15, способны увеличивать экспрессию молекулы PD-L1 на Трег-клетках, влияя, таким образом, на функциональную активность этих клеток. В свете полученных данных представляется интересным более подробно изучить влияние IL-7 и IL-15 на Трег-клетки, оценивая их пролиферативный ответ, возможность перехода в патогенные exFoxP3 RORγt⁺-клетки, особенно у пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ и бюджета Новосибирской области, грант №17-44-540167.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Насонов Е.Л. Ревматология: Национальное руководство / Каратеев Д.Е, Балабанова Р.М. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2008 – 720.
2. Schmidt A., Oberle N., Krammer P.H. (2012) Molecular mechanisms of Treg-mediated T-cell suppression. *Front Immunol*, v. 3, no. 51, pp. 1-20.
3. Bolton H.A., Zhu E., Terry A.M., Guy T.V., Koh W.P., Tan S.Y., Power C.A., Bertolino P., Lahl K., Sparwasser T., Shklovskaya E., Fazekas de St Groth B (2015) Selective Treg reconstitution during lymphopenia normalizes DC costimulation and prevents graft-versus-host disease. *J Clin Invest*, v. 125, no. 9, pp. 3627–3641.
4. Козлов В.А. Гомеостатическая пролиферация как основа неизбежного формирования тотального иммунодефицита // *Медицинская иммунология*. – 2014 - Т. 16 - №5. – 403-408.
5. Firestein G.S. (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, v. 423, no. 6937, pp. 356–361.
6. Heninger A.K., Theil A., Wilhelm C., Petzold C., Huebel N., Kretschmer K., Bonifacio E., Monti P. (2012) IL-7 abrogates suppressive activity of human CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells and allows expansion of alloreactive and autoreactive T cells. *J. Immunol*, v.189, no. 15, pp. 5649-5658.
7. Tosiek M.J., Fiette L., El Daker S., Eberl G., Freitas A.A. (2016) IL-15-dependent balance between Foxp3 and RORγt expression impacts inflammatory bowel disease. *Nat Commun*, v. 7, Article number: 10888, doi:10.1038/ncomms10888.