

## РОЛЬ $\gamma\epsilon$ -ЦИТОКИНОВ (IL-2, IL-7 И IL-15) В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПАМЯТИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ АКТИВАЦИЕЙ

© 2020 г. К. А. Юрова<sup>1</sup>, О. Г. Хазиахматова<sup>1</sup>, Н. М. Тодосенко<sup>1</sup>, Л. С. Литвинова<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Центр иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. И. Канта, Калининград, 236041 Россия

\*E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.02.2020 г.

После доработки 17.02.2020 г.

Принята к публикации 18.02.2020 г.

С использованием метода цитофлюориметрии изучена роль  $\gamma\epsilon$ -цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) в регуляции апоптотической гибели Т-лимфоцитов памяти в условиях культивирования *in vitro*. Выявлено, что действие IL-2 в сочетании с TCR-активатором направлено на увеличение числа зрелых CD45RO<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов с одновременным снижением количества жизнеспособных Т-клеток, что дает основание предполагать проапоптотическое действие IL-2 в условиях рестимуляции. Влияние IL-7 и IL-15 в активационной модели *in vitro*, напротив, приводит к увеличению числа живых Т-лимфоцитов в CD45RO-культурах (по сравнению с пробами, в которые добавлен только активатор) на фоне увеличения числа CD8<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>-Т-клеток с фенотипом центральной памяти (T<sub>CM</sub>). Изменения, индуцированные IL-15, направлены на снижение содержания CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов в CD45RO<sup>+</sup>-культурах Т-клеток иммунной памяти. Таким образом, показано дозозависимое позитивное влияние IL-2 на клональную экспансию и негативное – на жизнеспособность Т-клеток. Тогда как IL-7 и IL-15, напротив, сохраняют жизнеспособность Т-лимфоцитов, участвуя в генерации пула долгоживущих Т-клеток памяти.

**Ключевые слова:** Т-лимфоциты иммунной памяти, Т-лимфоциты центральной памяти, Т-лимфоциты эффекторной памяти,  $\gamma\epsilon$ -цитокины, активация, апоптоз, индуцированный активацией

**DOI:** 10.31857/S0041377120050107

Клональная экспансия Т-лимфоцитов памяти, индуцированная антигенами, опосредуется  $\gamma\epsilon$ -цитокинами (в том числе IL-2, IL-7 и IL-15) и находится под строгим контролем со стороны иммунной системы (Wakim, Bevan, 2010; Cieri et al., 2013). Завершением антигензависимой пролиферации является пополнение пула долгоживущих Т-лимфоцитов иммунной памяти, защищающих организм в случае повторного проникновения антигена, и гибель антиген-реактивных Т-клеток (Кудрявцев, 2014). В зависимости от рецепторного репертуара и функциональной активности, выделяют популяции Т-клеток центральной (T<sub>CM</sub>) и эффекторной (T<sub>EM</sub>) памяти (Ahlers, Belyakov, 2010).

T<sub>CM</sub> экспрессируют на своей поверхности молекулы костимуляции CD28, CD27 и маркеры, кото-

рые определяют миграцию клеток во вторичные лимфоидные органы – L-селектин (CD62L) и CCR7 (Yang et al., 2011). T<sub>CM</sub> имеют высокий пролиферативный потенциал и более длинные теломеры в сравнении с T<sub>EM</sub> (Mahnke et al., 2013). Для поддержания нормального состояния иммунной системы, процессы клеточной пролиферации должны строго регулироваться и быть сбалансированы процессами апоптотической гибели, для предотвращения развития аутоиммунных реакций и лимфоидной неоплазии (Kawadler et al., 2008). Ключевую роль в апоптотической гибели клеток, вызванной активацией (AICD), играет система Fas (APO-1/CD95)/FasL (Hieronymus et al., 2000; Kataoka et al., 2000). В физиологических условиях Fas-опосредованный апоптоз ограничивает выживание антиген-стимулированных Т-лимфоцитов и поддерживает гомеостаз Т-клеток (Hieronymus et al., 2000).

Таким образом, целью настоящего исследования явилось выявление роли цитокинов, имеющих общую  $\gamma\epsilon$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15), в регуляции клеточной гибели Т-лимфоцитов памяти, индуцированной активацией.

**Принятые сокращения:** АТ – антитела; АICD – клеточная гибель, индуцированная активацией (activation-induced cell death); IL – интерлейкин; TCR – Т-клеточный рецептор; IL-2R и IL-7R – соответственно рецептор IL-2 и IL-7; rIL-2, rIL-7 и rIL-15 – соответственно рекомбинантная форма IL-2, IL-7 и IL-15; T<sub>CM</sub> – Т-лимфоциты центральной памяти, T<sub>EM</sub> – Т-лимфоциты эффекторной памяти.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работу проводили согласно протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., а также Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете БФУ им. И. Канта (г. Калининград) № 5 от 05.11.2013 г.

Исследование проводили с использованием фракций Т-клеток CD45RO<sup>+</sup>, выделенных из мононуклеарных лейкоцитов венозной крови 58 условно здоровых доноров (29 мужчин и 29 женщин в возрасте от 22 до 35 лет) методом иммуномагнитной сепарации с помощью автоматического магнитного сепаратора AutoMACS Pro Separator Instrument (Miltenyi Biotec, Германия). Для сепарации использовали моноклональные антитела (АТ) CD45RO<sup>+</sup> с магнитными частицами (MicroBeads human; Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Критериями исключения из исследования являлись: возраст менее 18 и старше 35 лет; период обострения хронических воспалительных заболеваний; эндокринные, инфекционные, онкологические, наследственные и психические болезни; алкогольная и наркотическая зависимости.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов осуществляли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина (1.077 г/см<sup>3</sup>; Pharmacia, Швеция). Чистоту CD45RO<sup>+</sup>-популяций определяли с использованием моноклональных АТ, конъюгированных с фикоэритрином (PE) или флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (Abcam; Cambridge, Великобритания). Процентное содержание позитивных клеток выявляли на проточном цитометре MACSQuantAnalyzer (Miltenyi Biotec, Германия). Содержание целевой CD45RO<sup>+</sup>-фракции в исследуемых образцах составляло не менее 95%.

Отсутствие В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>) и моноцитов (CD14<sup>+</sup>) в культурах CD45RO<sup>+</sup>-клеток до и после культивирования было подтверждено с помощью проточной цитометрии с использованием моноклональных АТ, конъюгированных с FITC (CD3), PE (CD14) (Abcam, Великобритания) и с конъюгатом PE с цианином (PE-Cy7) (CD45RO) или с пиридинхлорофиллом (PerCP) (CD19) (e-Bioscience, США). Анализ поверхностных маркеров проводили на про-

точном цитометре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия) согласно протоколам производителей. В работе использовали культуры клеток, содержание в которых лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup> составляло в среднем  $98.5 \pm 1.5\%$ .

Для активации Т-лимфоцитов использовали реагент Т-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp) (Miltenyi Biotec, Германия) – антибиотинные частицы MACSiBead<sup>TM</sup> с биотинилированными антителами против CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> и CD28<sup>+</sup> человека. Клетки CD45RO<sup>+</sup> (10<sup>6</sup> кл./мл) культивировали в 48-луночном планшете в бессывороточной среде Искова (Sigma, США), содержащей 0.5% сывороточного альбумина человека (Микроген, Россия),  $5 \times 10^{-5}$  М  $\beta$ -меркаптоэтанола (Acros Organics, США) и 30 мкг/мл гентамицина в присутствии одной из рекомбинантных форм цитокина (rIL-2, rIL-7 или rIL-15) (Miltenyi Biotec, Германия) в разных концентрациях или без них (контроль). Реагент Ac/Exp добавляли в пробы в количестве 5 мкл, что соответствовало  $0.5 \times 10^6$  анти-биотинных частиц MACSiBead<sup>TM</sup>, соотношение клеток и активирующих частиц составляло 1 : 2. Клетки культивировали в течение 48 ч при 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

Варианты культивирования: 1) интактная проба без добавления цитокина и активатора; 2) контрольная проба с добавлением активатора Ac/Exp; 3) пробы с одновременным добавлением Ac/Exp и IL (rIL-2, rIL-7 или rIL-15). Все три rIL использовали в трех концентрациях: 0.1, 0.5 или 1.0 нг/мл. По истечении срока культивирования считали число клеток и регистрировали процентное содержание жизнеспособных лимфоцитов в исследуемых клеточных культурах с использованием ViaCount Reagent (Millipore, США) методом проточной лазерной цитофлуориметрии на проточном цитометре Guava EasyCite Plus (Millipore, США) согласно протоколу производителя.

Количество CD45RO<sup>+</sup>-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>, определяли с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием коктейля моноклональных АТ (eBioscience, США; Abcam, Великобритания; Miltenyi Biotec, Германия), приготовленных *ex tempore*:

CD3<sup>-</sup>Viabluе/CD4<sup>-</sup>PE/CD8<sup>-</sup>FITC/CD45RO<sup>-</sup>APC/CD62L<sup>-</sup>PerCp  
и CD3<sup>-</sup>Viabluе/CD4<sup>-</sup>PE/CD8<sup>-</sup>FITC/CD95<sup>-</sup>APC/HLA<sup>-</sup>DR<sup>-</sup>PerCp.

Результаты регистрировали на проточном цитометре MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия) и анализировали с помощью программы KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США).

**Статистическая обработка.** Полученные данные анализировали с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package

for the Social Sciences). Для оценки выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова–Смирнова). Для каждой выборки вычисляли средневыворочные характеристики: медиану (Me), первый и третий квартили (Q<sub>1</sub>, Q<sub>3</sub>). Статистически значимых гендерных различий выявлено не было. Для оценки достоверности различий

**Таблица 1.** Содержание Т-клеток CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> (%) в культурах CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, экспрессирующих мембранную молекулу апоптоза CD95, при культивировании с цитокинами, имеющими общую  $\gamma$ -цепь рецептора (rIL-2, rIL-7 и rIL-15)

| Добавки в среду культивирования | Популяции в культуре CD3 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> |  |  |
|---------------------------------|---|--|--|
|                                 | CD95  | CD4/CD95                               | CD8/CD95                               |
| Нет (Контроль)                  | 20.84<br>(16.22–25.60)                                    | 12.01<br>(10.96–14.67)                 | 7.43<br>(6.11–9.96)                    |
| Активатор Ас/Ехр                | 34.45<br>(26.36–39.48)<br>$P_0 < 0.05$                    | 21.47<br>(14.62–23.09)<br>$P_0 < 0.05$ | 14.90<br>(12.63–16.05)<br>$P_0 < 0.05$ |
| Ас/Ехр + IL-2 (0.1)             | 33.50<br>(27.27–36.22)                                    | 19.18<br>(18.09–22.31)                 | 13.62<br>(11.90–16.30)                 |
| Ас/Ехр + IL-2 (0.5)             | 38.87<br>(29.50–43.83)<br>$P_1 < 0.05$                    | 17.03<br>(16.89–23.86)                 | 21.52<br>(17.47–27.29)<br>$P_1 < 0.05$ |
| Ас/Ехр + IL-2 (1)               | 46.37<br>(31.34–50.51)<br>$P_1 < 0.05$                    | 22.77<br>(18.02–25.51)                 | 24.74<br>(15.55–28.48)<br>$P_1 < 0.05$ |
| Ас/Ехр + IL-7 (0.1)             | 31.99<br>(27.96–35.88)                                    | 18.14<br>(15.94–21.74)                 | 14.25<br>(12.98–16.96)                 |
| Ас/Ехр + IL-7 (0.5)             | 40.12<br>(33.22–47.46)<br>$P_1 < 0.05$                    | 21.77<br>(20.17–24.20)                 | 19.35<br>(13.05–28.57)<br>$P_1 < 0.05$ |
| Ас/Ехр + IL-7 (1)               | 42.25<br>(36.26–49.48)<br>$P_1 < 0.05$                    | 18.36<br>(17.85–25.48)                 | 21.29<br>(18.79–23.73)<br>$P_1 < 0.05$ |
| Ас/Ехр + IL-15 (0.1)            | 36.60<br>(24.82–37.61)                                    | 23.73<br>(19.87–28.52)                 | 14.73<br>(10.40–18.66)                 |
| Ас/Ехр + IL-15 (0.5)            | 32.42<br>(25.71–38.95)                                    | 19.05<br>(16.05–26.80)                 | 13.69<br>(10.24–17.35)                 |
| Ас/Ехр + IL-15 (1)              | 33.18<br>(22.89–35.06)                                    | 10.29<br>(7.36–12.60)<br>$P_1 < 0.05$  | 24.11<br>(16.57–27.29)<br>$P_1 < 0.05$ |

Примечание. Использована активационная модель культивирования *in vitro*. Содержание Т-клеток выражено в % и представлено медианой Me, первым и третьим квартилем (Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>). Концентрация цитокина в нг/мл указана в скобка.  $P_0$  – достоверность различий по сравнению показателем в контроле;  $P_1$  – достоверность различий по сравнению с аналогичным показателем в культуре при добавлении только Т-клеточного активатора (Ас/Ехр).

между выборками, которые не подчиняются закону нормального распределения, использовали критерий для зависимых выборок Вилкоксона. Для выявления связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ Спирмена. Различия считали статистически значимыми при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В интактных пробах клеток CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> содержание лимфоцитов CD45RO<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> было равным 20.84% (16.22–25.60), при этом количество CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>-Т-клеток памяти превышало число лимфоцитов CD8<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> более чем в 1.5 раза (табл. 1).

Содержание живых Т-клеток в культуре лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> составило 87.56% (83.23–90.10). Соотношение центральных (T<sub>CM</sub>) и эффекторных (T<sub>EM</sub>) Т-клеток памяти, экспрессирующих молекулу CD95 в хелперных популяциях было равным и составляло в среднем 25 и 79% соответственно. В популяции цитотоксических лимфоцитов 70% лимфоцитов с фенотипом CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> и 85% CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> клеток экспрессировали маркер CD95 (табл. 1).

Внесение в среду культивирования лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Т-клеточного активатора Ас/Ехр, наряду с увеличением общего числа клеток (в 1 мл), сопровождалось снижением содержания живых

лимфоцитов (в среднем на 33%) ( $P < 0.05$ ). Увеличение числа CD95<sup>+</sup>-клеток наблюдалось преимущественно в популяциях Т-клеток CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (рис. 1).

Сокультивирование CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-лимфоцитов с анти-CD2/CD3/CD28-частицами и rIL-2 в концентрации 1.0 нг/мл приводило к снижению числа живых CD45RO<sup>+</sup>-клеток по сравнению с пробой, в которую добавляли только TCR-активатор ( $P < 0.05$ ). Увеличение числа Т-клеток CD95<sup>+</sup> регистрировалось преимущественно за счет Т-лимфоцитов CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> во всем диапазоне действующих концентраций rIL-2 (рис. 1).

Добавление максимальных концентраций (1.0 нг/мл) rIL-7 и rIL-15 в культуру активированных Т-клеток, напротив, увеличивало количество жизнеспособных CD45RO<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов памяти по сравнению с пробами, в которые вводили только активатор (в среднем на 20%;  $P < 0.05$ ). Действие rIL-7 в концентрациях 0.5–1.0 нг/мл на активированные CD45RO<sup>+</sup>-Т-клетки приводило к увеличению общего числа CD95<sup>+</sup> Т-клеток за счет популяции цитотоксических лимфоцитов (по сравнению с вариантом добавления только;  $P < 0.05$ ) (табл. 1). Добавление 1.0 нг/мл rIL-15 в активированные культуры CD45RO<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов сопровождалось достоверным увеличением CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>-клеток, экспрессирующих молекулу CD95 ( $p < 0.05$ ), на фоне снижения общего числа CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>-лимфоцитов (рис. 1).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточная гибель, индуцированная активацией (AICD), регистрируется в фазу сокращения иммунного ответа (Ramaswamy et al., 2009). Считается, что физиологической функцией AICD, опосредованной TCR-сигнализацией, является супрессия аутоиммунных реакций в случае встречи Т-клеток с антигеном в высокой концентрации (Rajusto et al., 2004). Известно, что рецепторный путь гибели клеток, инициируемый через FAS(APO-1/CD95)/FasL-сигналинг, является преобладающим при AICD (Hieronymus et al., 2000; Kataoka et al., 2000). Однако по некоторым данным, Fas-опосредованная апоптотическая гибель реализуется только в условиях хронической рестимуляции Т-клеток (Ramaswamy et al., 2009).

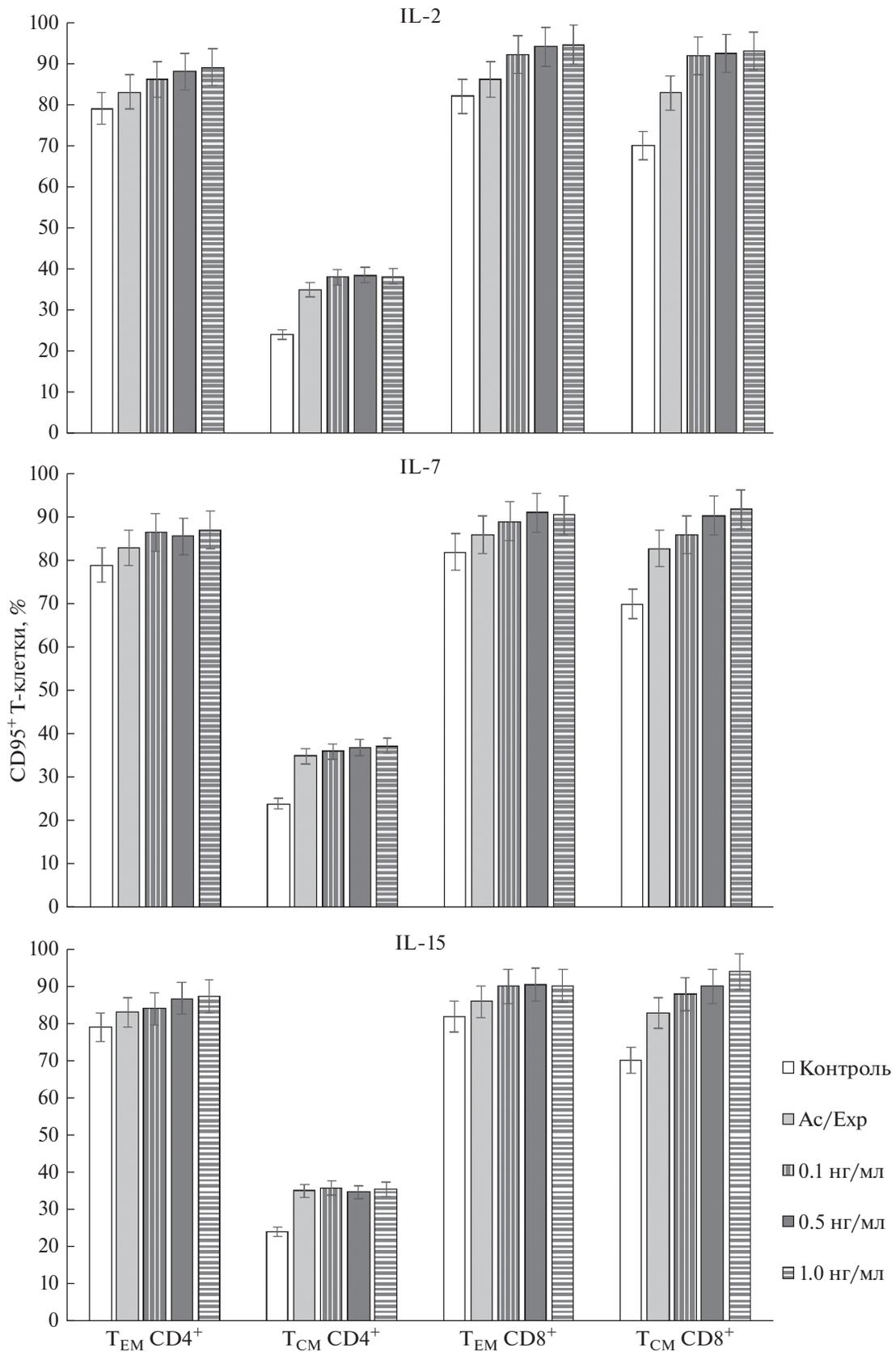
В то же время, конститутивная экспрессия молекулы CD95 Т-клетками памяти является не только признаком, определяющим их готовность к запуску активационного апоптоза, но также маркером их дифференцировки и созревания (Hieronymus et al., 2000; Kataoka et al., 2000). Вышесказанное подтверждает факт конститутивной экспрессии молекулы CD95 клетками центральной (в популяции CD8<sup>+</sup>) и эффекторной (в популяциях CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) памяти, выявленный нами в настоящем исследовании.

Как уже упоминалось ранее, эффективный иммунный ответ и генерацию долгоживущих Т-клеток памяти в условиях реинвазии патогена обеспечивает TCR-сигнализация и биологические медиаторы, в частности цитокины с общей  $\gamma$ -цепью – IL-2, IL-7 и IL-15 (Patke, Farber, 2005; van Leeuwen et al., 2009; Kim et al., 2012). IL-2, наиболее известный как фактор роста Т-клеток, инициирует запуск сигнальных событий, регулирующих вступление покоящихся Т-лимфоцитов в клеточный цикл и усиливает TCR-сигнализацию (Benczik, Gaffen, 2004).

Интересно отметить, что rIL-2-опосредованное изменение содержания CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>-Т-клеток имело выраженную взаимосвязь с числом мертвых клеток ( $r = 0.78$ ,  $P < 0.5$  для CD45RO<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов при действии rIL-2 в концентрации 1.0 нг/мл).

Цитокины характеризуются способностью взаимодействовать с разными рецепторами (так называемой избыточностью), благодаря чему функции одного цитокина, в случае нарушения иммунного баланса, могут заменить другие цитокины или их комбинации. Так, при нокауте гена, кодирующего IL-2, не выявлено серьезных изменений *клональной экспансии* антиген-реактивных Т-клеток памяти в условиях повторного воздействия патогена в связи с тем, что пролиферацию лимфоцитов могут обеспечить интерлейкины с общей  $\gamma$ -цепью, в том числе IL-7 и IL-15, а также их комбинации. Однако *проапоптотические эффекты* IL-2 не могут быть заменены другими цитокинами, что доказывают тяжелые лимфопротроферативные и аутоиммунные заболевания, развивающиеся у нокаутных мышей с нарушенной продукцией IL-2, или лишенных  $\alpha/\beta$ -субъединиц IL-2R (Refaeli et al., 1998). Рестимуляция TCR в присутствии IL-2 может опосредовать периферическую толерантность путем элиминации (посредством AICD) зрелых Т-клеток. В противоположность этому, IL-15 способствует усилению реакции иммунологической памяти посредством ингибирования AICD и приводит к селективному выживанию клеток памяти во время фазы контракции (Saligrama et al., 2014). Однако механизмы восприимчивости клеток к AICD при влиянии различных иммунорегуляторных цитокинов изучены не до конца.

Цитокины IL-7 и IL-15 оказывают влияние на скорость гомеостатической пролиферации и клональной экспансии Т-лимфоцитов памяти во время вторичного иммунного ответа (MacLeod et al., 2010). IL-7 действует синергически с IL-15 на популяцию CD4<sup>+</sup>-Т-клеток памяти, инициируя пролиферацию T<sub>EM</sub> и T<sub>CM</sub>, увеличивая не только экспрессию рецепторов IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2/IL-15R $\beta$  (CD122), но и Fas (CD95) (Geginat et al., 2001; Managlia et al., 2005; Amsen et al., 2013; Кудрявцев, 2014), что, в целом, согласуется с результатами проведенного исследования. Однако несмотря на увеличение экспрессии мембранной молекулы CD95, IL-15 способен ингибировать апоптотическую гибель клеток, что обу-



**Рис. 1.** Относительное содержание Т-клеток  $CD3^+CD4^+CD95^+$  и  $CD3^+CD8^+CD95^+$  в популяциях  $T_{CM}$  и  $T_{EM}$  в культуре клеток  $CD45RO$  при добавлении  $\gamma$ -цитокинов ( $IL-2$ ,  $IL-7$  или  $IL-15$ ) в разных концентрациях. Активационная модель культивирования *in vitro*. Вертикальные отрезки на каждом столбце показывают пределы погрешностей.

словливает его участие в патогенезе аутоиммунных заболеваний (Waldmann, Tagaya, 1999).

Избыточная продукция IL-7, ключевого фактора на определенном этапе Т-лимфопоэза (Li et al., 2004), также приводит к серьезным дефектам в регуляции Т- и В-клеточного гомеостаза, включая развитие лимфопролиферативных заболеваний (Vudattu et al., 2009). Однако описан регуляторный механизм обратной связи, ограничивающей чувствительность клеток к IL-7: транскрипция  $\alpha$ -субъединицы рецептора IL-7R в Т-лимфоцитах памяти подавляется после непрерывной стимуляции IL-7, что может приводить к истощению пула Т-клеток (Swainson et al., 2006). Помимо ауторегуляции субъединицы IL-7R $\alpha$  было показано, что экспрессия  $\alpha$ -цепи IL-7 резко снижается после стимуляции TCR (Franchimont et al., 2002; Swainson et al., 2006) или при сокультивировании Т-лимфоцитов с IL-2 (Xue et al., 2002). Уменьшение экспрессии  $\alpha$ -субъединицы рецептора IL-7R приводит к снижению доступности для лимфоцитов IL-7, способствующего поддержанию их жизнеспособности (Xue et al., 2002). Аналогичный, но менее выраженный эффект на экспрессию субъединицы IL-7R $\alpha$  был выявлен при воздействии на Т-клетки IL-15 (Xue et al., 2002).

Наряду с IL-15-сигнализацией, IL-7 в большей степени увеличивает цитотоксический потенциал CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов и в меньшей степени поддерживает их гомеостаз (Xue et al., 2002; Zambricki et al., 2005; Vranjkovic et al., 2011). Кроме того, было показано, что комбинированная активация TCR и сигнализация, запускаемая IL-7 и IL-2, подавляют проапоптотические пути во время генерации CD4<sup>+</sup>-Т-клеток иммунной памяти (Gasper et al., 2014). В литературе представлены приоритетные данные, доказывающие, что сочетанная сигнализация TCR и рецепторов цитокинов IL-7/IL-2 (IL-7R/IL-2R) ингибирует проапоптотические пути, индуцируя фосфорилирование, которое снижает активность проапоптотической мишени FoxO3a, предотвращая тем самым транскрипцию проапоптотических белков, в том числе Vim и FasL (Riou et al., 2007). Высокий уровень pFOXO3a, прежде всего в T<sub>CM</sub>, частично объясняет устойчивость этой субпопуляции (в сравнении с T<sub>EM</sub>) к Fas-опосредованному апоптозу (Riou et al., 2007). С другой стороны, значительная регуляция FasL в T<sub>EM</sub>, индуцируемая активацией, указывает на их высокую чувствительность к процессу апоптотической гибели и характеризуется ограниченной выживаемостью при TCR-сигнализации (Riou et al., 2007).

AICD ассоциирована с активацией нескольких каспаз, в том числе каспазы 3, 8 и 9 (Fuentes-Prior, Salvesen 2004; Saligrama et al., 2014). Цитокины, согласно данным из литературы, способны модулировать активность каспазы 3 в Т-лимфоцитах (Saligrama et al., 2014). В работах есть данные, подтверждающие, что IL-15, в отличие от IL-2, способен прямо или косвенно индуцировать процесс S-нитро-

зилирования, ингибируя тем самым апоптотический каскад, опосредованный активацией каспазы 3 и снижая восприимчивость к AICD (Saligrama et al., 2014).

Помимо посттрансляционных модификаций, опосредующих ингибирование активности каспаз, известны молекулы (“ингибиторы апоптоза”), которые также могут предотвращать Fas-опосредованную гибель клеток. Так, покоящиеся Т-клетки экспрессируют высокий уровень FLIP (Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme inhibitory protein), который связывается либо с доменом смерти Fas, либо с одной из эффекторных каспаз, тем самым прерывая апоптотический каскад. После распознавания антигена Т-клетками, продукция IL-2 и экспрессия рецептора IL-2R $\alpha$  приводят к подавлению экспрессии FLIP (Algeciras-Schimnich et al., 1999; Vallejo et al., 2000) на фоне увеличения поверхностной экспрессии FasL (Refaeli et al., 1998; Algeciras-Schimnich et al., 1999), что обуславливает чувствительность активированных Т-клеток к Fas-опосредованному апоптозу (Algeciras-Schimnich et al., 1999; Vallejo et al., 2000). Вышесказанное согласуется с результатами настоящего исследования, поскольку индукция FasL и понижающая регуляция экспрессии FLIP являются IL-2-зависимыми процессами (Algeciras-Schimnich et al., 1999).

Цитокиновая сигнализация опосредуется конформационными изменениями  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей рецепторов цитокинов, индуцирующих активацию Jakкиназа, реализующих свое действие через фосфорилирование факторов STAT3 и STAT5. Были описаны сигнальные пути, доказывающие участие STAT5 в усилении пролиферации Т-клеток и антиапоптотической сигнализации (Morcinek et al., 2002) и продемонстрировано значительное увеличение уровней фосфорилирования STAT5a с последующей индукцией некоторых антиапоптотических молекул (PIM-1 и PIM-2) в T<sub>CM</sub> (как в популяции хелперных, так и цитотоксических лимфоцитов) в ответ на сочетанную сигнализацию TCR и рецепторов цитокинов IL-2R, IL-7R (Riou et al., 2007). Напротив, в T<sub>EM</sub> защитные функции, опосредованные этими путями, оказались менее эффективными (Willinger et al., 2005; Riou et al., 2007).

В других работах было показано, что в реализации проапоптотического эффекта IL-2 основную роль играет  $\beta$ -цепь и сигнальный путь белков STAT5, в то время как  $\gamma$ -цепь, индуцируя PKB/P13K-путь, ингибирует IL-2-зависимую индукцию апоптоза (Dai et al., 1999; Cheng et al., 2002). Вероятно, для апоптоз-индуцирующего действия IL-2 на лимфоциты крови в условиях *in vitro* необходим определенный порог концентрации цитокина.

Кроме того, показано, что IL-7 и IL-15 посредством активации сигнальных путей JAK/STAT способны усиливать в Т-клетках экспрессию антиапоптотических молекул, в том числе Bcl-2 и Mcl-1 (Marsden, Strasser, 2003; Shenoy et al., 2014), ингибируя

проапоптогенные факторы Вах и Bad (Konrack et al., 2003; Cai, Wei, 2013), а также усиливая эффективность функционирования антиоксидантных систем (Kaur et al., 2011; Saligrama et al., 2014).

Сообщается, что STAT5 является индуктором IL-2R $\alpha$ , на основании чего высказано предположение об участии STAT5 в поддержании сигнализации IL-2, что, вероятно, приводит к снижению регуляции FLIP и повышенной восприимчивости клеток к Fas-опосредованному апоптозу (Imbert, Renauld, 1999; Vallejo et al., 2000).

В одной из работ убедительно доказывается, что индукция IL-2R $\alpha$  зависит от продолжительности активации STAT5 (Imbert, Renauld, 1999).

Таким образом, клональная экспансия Т-лимфоцитов, опосредованная IL-2-сигнализацией, активируется во время иммунного ответа, однако при увеличении концентрации IL-2 или времени стимуляции IL-2R потенцирование AICD становится доминирующим, что приводит к активации ингибирующей обратной связи. Способность IL-7 и IL-15 ограничивать AICD имеет решающее значение для генерации пула долгоживущих Т-клеток памяти, но чрезмерное накопление Т-клеток в среде, обогащенной этими цитокинами, может привести к развитию аутоиммунных патологий и неоплазий.

В целом, крайне важно сохранить баланс биологических медиаторов, которые, с одной стороны, способствуют удалению эффекторных клеток, а с другой – способствуют обеспечению эффективного иммунного ответа при реинвазии патогена.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Балтийского федерального университета им. И. Канта, а также государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации НШ-2495.2020.7

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с биоматериалом человека проводили согласно протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., а также Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете БФУ им. И. Канта (г. Калининград) № 5 от 05.11.2013 г.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Кудрявцев И.В. 2014. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки. Российский иммунологический журнал. Т. 8. № 17. С. 947. (Kudryavtsev I.V.

2014. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. Russ. J. Immuno. V. 8. № 17. P. 947.)

Ahlers J.D., Belyakov I.M. 2010. Memories that last forever: strategies for optimizing vaccine T-cell memory. Blood. V. 115. № 9. P. 1678.

Algeciras-Schimmich A., Griffith T.S., Lynch D.H., Paya C.V. 1999. Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. J. Immunol. V. 162. P. 5205.

Amsen D., Backer R.A., Helbig C. 2013. Decisions on the road to memory. Adv. Exp. Med. Biol. V. 785. P. 107.

Benczik M., Gaffen S.L. 2004. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. Immunol. Invest. V. 33. P. 109.

Cai K., Wei R. 2013. Interleukin-7 expression in tears and orbital tissues of patients with Graves' ophthalmopathy. Endocrine. V. 44. № 1. P. 140.

Cheng L.E., Ohlén C., Nelson B.H., Greenberg P.D. 2002. Enhanced signaling through the IL-2 receptor in CD8<sup>+</sup> T cells regulated by antigen recognition results in preferential proliferation and expansion of responding CD8<sup>+</sup> T cells rather than promotion of cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 99. № 5. P. 3001.

Cieri N., Camisa B., Cocchiarella F., Forcato M., Oliveira G., Provasi E., Bondanza A., Bordignon C., Peccatori J., Ciceri F., Lupo-Stanghellini M.T., Mavilio F., Mondino A., Biccato S., Recchia A., Bonini C. 2013. IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. Blood. V. 121. № 4. P. 573.

Dai Z., Arakelov A., Wagener M., Konieczny B.T., Lakkis F.G. 1999. The role of the common cytokine receptor gamma-chain in regulating IL-2-dependent, activation-induced CD8<sup>+</sup> T cell death. J. Immunol. V. 163. № 6. P. 3131.

Franchimont D., Galon J., Vacchio M.S., Fan S., Visconti R., Frucht D.M., Geenen V., Chrousos G.P., Ashwell J.D., O'Shea J.J. 2002. Positive effects of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor alpha. J. Immunol. V. 168. № 5. P. 2212.

Fuentes-Prior P., Salvesen G.S. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. Biochem. J. V. 384. № 2. P. 201.

Gasper D.J., Tejera M.M., Suresh M. 2014. CD4 T-cell memory generation and maintenance. Crit. Rev. Immunol. V. 34. № 2. P. 121.

Geginat J., Sallusto F., Lanzavecchia A. 2001. Cytokine-driven Proliferation and Differentiation of Human Naive, Central Memory, and Effector Memory CD4<sup>+</sup> T Cells. J. Exp. Med. V. 194. № 12. P. 1711.

Hieronimus T., Blank N., Gruenke M., Winkler S., Haas J.P., Kalden J.R., Lorenz H.M. 2000. CD 95-independent mechanisms of IL-2 deprivation-induced apoptosis in activated human lymphocytes. Cell Death Differ. V. 7. № 6. P. 538.

Imbert V., Renauld P.R. 1999. Duration of STAT5 activation influences the response of interleukin-2 receptor alpha gene to different cytokines. Eur. Cytokine Netw. V. 10. № 1. P. 71.

- Kataoka T., Budd R.C., Holler N., Thome M., Martinon F., Irmeler M., Burns K., Hahne M., Kennedy N., Kovacs M., Tschopp J.* 2000. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr. Biol.* V. 10. № 11. P. 640.
- Kaur N., Naga O.S., Norell H., Al-Khami A.A., Scheffel M.J., Chakraborty N.G., Voelkel-Johnson C., Mukherji B., Mehrotra S.* 2011. T cells expanded in presence of IL-15 exhibit increased antioxidant capacity and innate effector molecules. *Cytokine.* V. 55. P. 307.
- Kawadler H., Gantz M.A., Riley J.L., Yang X.* 2008. The paracaspase MALT1 controls caspase-8 activation during lymphocyte proliferation. *Mol. Cell.* V. 31. № 3. P. 415.
- Kim C., Jay D.C., Williams M.A.* 2012. Stability and function of secondary Th1 memory cells are dependent on the nature of the secondary stimulus. *J. Immunol.* V. 189. № 5. P. 2348.
- Kondrack R.M., Harbertson J., Tan J.T., McBreen M.E., Surh C.D., Bradley L.M.* 2003. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J. Exp. Med.* V. 198. № 12. P. 1797.
- Li W.Q., Jiang Q., Khaled A.R., Keller J.R., Durum S.K.* 2004. Interleukin-7 inactivates the pro-apoptotic protein Bad promoting T cell survival. *J. Biol. Chem.* V. 279. № 28. P. 29160.
- MacLeod M.K., Kappler J.W., Marrack P.* 2010. Memory CD4 T cells: generation, reactivation and reassignment. *Immunology.* V. 130. № 1. P. 10.
- Mahnke Y.D., Brodie T.M., Sallusto F., Roederer M., Lugli E.* 2013. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.* V. 43. № 11. P. 2797.
- Managlia E.Z., Landay A., Al-Harhi L.* 2005. Interleukin-7 signalling is sufficient to phenotypically and functionally prime human CD4 naive T-cells. *Immunol.* V. 114. № 3. P. 322.
- Marsden V.S., Strasser A.* 2003. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu. Rev. Immunol.* V. 21. P. 72–105.
- Morcinek J.C., Weisser C., Geissinger E., Scharl M., Wellbrock C.* 2002. Activation of STAT5 triggers proliferation and contributes to anti-apoptotic signalling mediated by the oncogenic Xmrk kinase. *Oncogene.* V. 21. P. 1668.
- Pajusto M., Ihalainen N., Pelkonen J., Tarkkanen J., Mattila P.S.* (2004). Human in vivo-activated CD45RO(+) CD4(+) T cells are susceptible to spontaneous apoptosis that can be inhibited by the chemokine CXCL12 and IL-2, -6, -7, and -15. *Eur. J. Immunol.* V. 34. № 10. P. 2771.
- Patke D.S., Farber D.L.* 2005. Modulation of memory CD4 T cell function and survival potential by altering the strength of the recall stimulus. *J. Immunol.* V. 174. P. 5433.
- Ramaswamy M., Cleland S.Y., Cruz A.C., Siegel R.M.* 2009. Many checkpoints on the road to cell death: regulation of Fas-FasL interactions and Fas signaling in peripheral immune responses. *Results Probl. Cell Differ.* V. 49. P. 17.
- Refaeli Y., Van Parijs L., London C.A., Tschopp J., Abbas A.K.* 1998. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity.* V. 8. P. 615.
- Riou C., Yassine-Diab B., Van Grevenynghe J., Somogyi R., Grellet L.D., Gagnon D., Gimmig S., Wilkinson P., Shi Y., Cameron M.J., Campos-Gonzalez R., Balderas R.S., Kelvin D., Sekaly R.P., Haddad E.K.* 2007. Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4<sup>+</sup> central memory T cells. *J. Exp. Med.* V. 204. № 1. P. 79.
- Saligrama P.T., Fortner K.A., Secinaro M.A., Collins C.C., Russell J.Q., Budd R.C.* 2014. IL-15 maintains T-cell survival via S-nitrosylation-mediated inhibition of caspase-3. *Cell Death Differ.* V. 21. № 6. P. 904.
- Shenoy A.R., Kirschnek S., Häcker G.* 2014. IL-15 regulates Bcl-2 family members Bim and Mcl-1 through JAK/STAT and PI3K/AKT pathways in T-cells. *Eur. J. Immunol.* V. 44. № 8. P. 2500.
- Swainson L., Verhoeyen E., Cosset F.L., Taylor N.* 2006. IL-7R alpha gene expression is inversely correlated with cell cycle progression in IL-7-stimulated T lymphocytes. *J. Immunol.* V. 176. № 11. P. 6702.
- Vallejo A.N., Schirmer M., Weyand C.M., Goronzy J.J.* 2000. Clonality and longevity of CD4 + CD28 null T cells are associated with defects in apoptotic pathways. *J. Immunol.* V. 165. № 11. P. 6301.
- van Leeuwen E.M., Sprent J., Surh C.D.* 2009. Generation and maintenance of memory CD4(+) T Cells. *Current Opinion Immunol.* V. 21. № 2. P. 167.
- Vranjkovic A., Crawley A.M., Patey A., Angel J.B.* 2011. IL-7-dependent STAT-5 activation and CD8+ T cell proliferation are impaired in HIV infection. *J. Leukoc. Biol.* V. 89. № 4. P. 499.
- Vudattu N.K., Magalhaes I., Hoehn H., Pan D., Maeurer M.J.* 2009. Expression analysis and functional activity of interleukin-7 splice variants. *Genes Immun.* V. 10. № 2. P. 132.
- Wakim L.M., Bevan M.J.* 2010. From the thymus to longevity in the periphery. *Curr. Opin. Immunol.* V. 22. № 3. P. 274.
- Waldmann T.A., Tagaya Y.* 1999. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev. Immunol.* V. 17. P. 19.
- Willinger T., Freeman T., Hasegawa H., McMichael A.J., Callan M.F.* 2005. Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T-cell subsets. *J. Immunol.* V. 175. № 9. P. 5895.
- Xue H.H., Kovanen P.E., Pise-Masison C.A., Berg M., Radovich M.F., Brady J.N., Leonard W.J.* 2002. IL-2 negatively regulates IL-7 receptor alpha chain expression in activated T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 99. № 21. P. 13759.
- Yang S., Liu F., Wang Q.J., Rosenberg S.A., Morgan R.A.* 2011. The Shedding of CD62L (L-Selectin) Regulates the Acquisition of Lytic Activity in Human Tumor Reactive T Lymphocytes. *PLoS One.* V. 6. № 7. e22560. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00393.x>
- Zambricki E., Shigeoka A., Kishimoto H., Sprent J., Burakoff S., Carpenter C., Milford E., McKay D.* 2005. Signaling T-cell survival and death by IL-2 and IL-15. *Am. J. Transplant.* V. 5. № 11. P. 2623.

## ROLE OF $\gamma$ C-CYTOKINES (IL-2, IL-7, AND IL-15) IN THE REGULATION OF CELL DEATH OF MEMORY T-LYMPHOCYTES INDUCED BY ACTIVATION

K. A. Yurova<sup>a</sup>, O. G. Khaziakhmatova<sup>a</sup>, N. M. Todosenko<sup>a</sup>, and L. S. Litvinova<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236029 Russia*

*\*e-mail: larisalitvinova@yandex.ru*

The role of  $\gamma$ c-cytokines (IL-2, IL-7, and IL-15) in the regulation of apoptotic death of memory T-cells induced by activation under *in vitro* cultivation was evaluated. It was revealed that the action of IL-2 in combination with a TCR activator is aimed at increasing the number of CD45RO<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> T-lymphocytes with a simultaneous decrease in the number of viable T-cells, which suggests a pro-apoptotic effect of IL-2 under conditions of restimulation. The effect of IL-7 and IL-15 in the *in vitro* activation model, in contrast, leads to an increase in the number of live T-lymphocytes in CD45RO cultures (compared to samples with the addition of activator only) amid an increase in the number of CD8<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> T-cells with phenotype central memory (TCM). Changes induced by IL-15 are aimed at reducing the content of CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> T cells in CD45RO<sup>+</sup> cultures. Thus, a dose-dependent positive effect of IL-2 on clonal expansion and negative on T-cell viability was shown. Whereas IL-7 and IL-15, on the contrary, retain the viability of T-lymphocytes by participating in the generation of a pool of long-lived memory T-cells.

**Keywords:** memory T-lymphocytes, central memory T-cells, effector memory T-cells, common gamma chain ( $\gamma$ ) cytokines, activation, activation-induced cell death