

ГЕНЕРАЦИЯ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Курганова Е.В., Шевела Е.Я., Тихонова М.А.,
Останин А.А., Черных Е.Р.

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

Резюме. Работа посвящена оценке эффективности генерации и характеристике регуляторных Т-клеток (Treg), полученных из мононуклеарных клеток крови здоровых доноров при поликлональной активации анти-CD3-антителами и IL-2 в отсутствии (модель 1) и в присутствии (модель 2) иммуносупрессорных агентов (витамина D₃ и дексаметазона). Показано, что Т-клетки, генерированные в первой модели, характеризуются сниженным пролиферативным ответом на анти-CD3 и не проявляют супрессорной активности. Т-клетки, полученные в присутствии витамина D₃ и дексаметазона, находятся в состоянии анергии, которое частично нивелируется экзогенным IL-2, а также обладают супрессорной активностью, опосредуемой как через прямые межклеточные взаимодействия, так и через продукцию растворимых факторов, в частности, IL-10. Полученные данные позволяют отнести Т-клетки, генерированные во второй модели, к индуцибельным IL-10-продуцирующим регуляторным Т-клеткам (Tr1). Тем не менее, выявленное среди них увеличение FOXP3-экспрессирующих CD4⁺T-клеток свидетельствует также о возможной генерации естественных регуляторных клеток.

Ключевые слова: Treg, CD4CD25, CD4FOXP3, IL-10, витамин D₃, дексаметазон.

Kurganova E.V., Shevela E.Ya., Tihonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

IN VITRO GENERATION AND CHARACTERIZATION OF HUMAN REGULATORY T-CELLS

Abstract. The aim of present study was to evaluate efficacy of generation and characterization of regulatory T cells (Treg). The Treg were derived from peripheral mononuclear cells of healthy donors, using activation with anti-CD3mAb and IL-2, either in absence (model 1), or in the presence of immunosuppressive agents (vitamin D₃ and dexamethasone, model 2). It was shown, that the Treg, obtained in model 1, are characterized by decreased anti-CD3-induced proliferative response and lack of suppressive activity. Treg, obtained in presence of vitamin D₃ and dexamethasone, proved to be profoundly anergic. Such a state may be partially abolished by exogenic IL-2. These cells are also characterized by suppressive activity mediated by both cell-to-cell contacts and soluble factors, such as IL-10. Hence, the regulatory T cells generated in model 2, can be referred as inducible Treg (Tr1). Nevertheless, increased ratio of cells expressing CD4⁺FOXP3⁺ among Treg obtained by model 2, may also suggest an ability to generate natural regulatory cells. (*Med. Immunol.*, 2008, vol. 10, N 2-3, pp 173-180)

Регуляторные Т-клетки (Treg) привлекают все большее внимание в связи с их важной ролью в поддержании периферической толерантности

к собственным антигенам [2, 29]. Выделяют два типа Treg – естественные, которые образуются в тимусе, и индуцибельные регуляторные клетки, представленные активированными клетками периферической крови. Естественные регуляторные Т-клетки фенотипически представлены субпопуляцией CD4⁺CD25⁺Т-лимфоцитов, не отвечают пролиферацией на митогенные воздействия и подавляют *in vitro* пролиферативный ответ Т-клеток посредством прямого клеточного контакта [22, 27]. Супрессорной ре-

Адрес для переписки:

Курганова Екатерина Владимировна
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская 14,
НИИ клинической иммунологии СО РАМН.
Тел.: (383) 228-21-01.
Факс: (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru

гуляторной активностью обладает только часть CD4⁺ клеток с высокой экспрессией молекулы CD25 – так называемые CD4⁺CD25^{hi} [16]. Индуцибельные Treg также представлены CD4⁺ лимфоцитами, которые могут экспрессировать α -цепь рецептора к IL-2 и характеризуются функциональной ареактивностью. Ингибирующее действие индуцибельных Treg связано с продукцией иммуносупрессорных цитокинов. В зависимости от преобладающего типа продуцируемых цитокинов – IL-10 или TGF β – эти клетки обозначают соответственно как Tr1 и Tr2/(Th3) [10, 18].

Развитие аутоиммунных и аллергических заболеваний у человека ассоциировано со снижением количества и/или функциональной активности Treg [5, 6, 19, 20, 21, 26, 31]. С другой стороны, введение Treg экспериментальным животным в моделях аутоиммунной патологии приводит к реверсии или предотвращению аутоиммунного процесса, что обосновывает перспективу их использования в лечении целого ряда заболеваний [28, 30]. Поэтому актуальным является разработка воспроизводимых технологий генерации в культуре *in vitro* регуляторных Т-клеток с заданными функциями.

Известно, что интенсивная активация Т-клеток через Т-клеточный рецептор уже сама по себе приводит к генерации Treg [15]. Именно этим объясняется кинетика пролиферации в анти-CD3-индуцированных культурах с пиком ответа на 3 сутки и снижением пролиферации к 6 дню. Причем после удаления CD25⁺Т-клеток ограничения пролиферации на 6 сутки не наблюдается [1]. Поэтому одним из способов генерации Treg является поликлональная активация Т-лимфоцитов с добавлением IL-2, приводящим к экспансии Treg [17, 22]. Кроме того, Treg могут индуцироваться *in vitro* в присутствии TGF β и IL-10 [7, 11, 14], однако внедрение таких подходов в клиническую практику ограничивается отсутствием фармакопейных форм указанных цитокинов. С другой стороны, имеются данные о возможности генерации Treg путем активации лимфоцитов периферической крови в присутствии глюкокортикоидов, разрешенных для медицинского использования [8]. Настоящее исследование посвящено оценке эффективности генерации и характеристике Treg, полученных при поликлональной активации Т-лимфоцитов с IL-2 в отсутствие и в присутствии дексаметазона и витамина D₃.

Материалы и методы

Для генерации Treg использовали мононуклеарные клетки (МНК) периферической

крови здоровых доноров. МНК выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколаверографина. Клетки в концентрации 10⁶/мл культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в среде DMEM («ICN», США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 20 ммоль HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 10% FCS. Для генерации регуляторных клеток использовали два подхода. В первом случае (модель 1) МНК культивировали в течение 7 дней с анти-CD3 антителами IC0-90 (анти-CD3, «Медбиоспектр», Москва; 1 мкг/мл) и рекомбинантным IL-2 (Ронколейкин, «Биотех», Санкт-Петербург; 50 МЕ/мл). Во втором случае (модель 2) активацию МНК анти-CD3 и IL-2 проводили в присутствии витамина D₃ (10⁻⁷ М, Sigma-Aldrich, Cat.N D4902) и дексаметазона (10⁻⁷ М). Контролем служили МНК, культивированные в течение 7 суток с IL-2 в дозе 50 МЕ/мл.

Полученные клетки однократно отмывали, оценивали их жизнеспособность и тестировали на пролиферативную и супрессорную активность. Жизнеспособность клеток определяли по окрашиванию 0,2% раствором трипанового синего. Пролиферативную активность оценивали радиометрически по интенсивности ответа в 3-суточных культурах, стимулированных анти-CD3-антителами (1 мкг/мл). Супрессорную активность определяли по способности полученных клеток или их 48-часовых супернатантов (33%, v/v) подавлять анти-CD3-стимулированный пролиферативный ответ аутологичных МНК, а также в 5-суточной аллогенной смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ). Супрессорную активность выражали в виде индекса влияния, рассчитанного как отношение пролиферативного ответа в опыте (отвечающие клетки + генерированные Treg или их супернатанты) к уровню ответа в контроле (культуры, содержащие только отвечающие клетки).

Продукцию IL-10 в супернатантах полученных клеток определяли методом иммуноферментного анализа, используя соответствующие тест-системы (минимальная пороговая чувствительность 5 пг/мл), согласно инструкции фирмы-производителя («Цитокин», Санкт-Петербург).

Относительное содержание CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} Т-клеток и внутриклеточную экспрессию FOXP3 в сгенерированных популяциях определяли методом проточной цитофлуориметрии (FACSCalibur, «Becton Dickinson», США) с помощью APC-меченных анти-CD3, FITC-меченных анти-CD25 («PharMingen», США) и PE-меченных анти-CD4 («Сорбент», Москва) моноклональных антител. Внутриклеточную экспрессию FOXP3 опреде-

ляли в популяции CD4⁺ клеток, используя процедуру пермеабиллизации клеток и PE-меченные анти-FOXP3 («Bioscience», США) моноклональные антитела.

Математическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ «Statistica 6.0».

Результаты

Оценка жизнеспособности клеток показала, что к исходу 7 суток количество живых клеток в контрольных культурах с IL-2 составляло $91,7 \pm 8,3\%$ ($n = 6$), в анти-CD3-стимулированных культурах – $93,5 \pm 4,3\%$ ($n = 6$), а при активации МНК в присутствии витамина D₃ и дексаметазона – $91,2 \pm 5,6\%$ ($n = 6$). Таким образом, выживаемость клеток в анализируемых культурах была сходной. Учитывая, что одним из характерных свойств регуляторных Т-клеток является пребывание их в состоянии анергии, далее была проведена оценка пролиферативной активности полученных клеток (рис. 1). МНК контрольных культур полностью сохраняли способность отвечать пролиферацией на стимуляцию анти-CD3 антителами. Уровень ответа варьировал в диапазоне 6430–62910 имп/мин, составляя в среднем 31430 ± 7220 имп/мин. По сравнению с контрольными культурами клетки, полученные в результате культивирования МНК с анти-CD3 и IL-2 (модель 1) характеризовались достоверным сни-

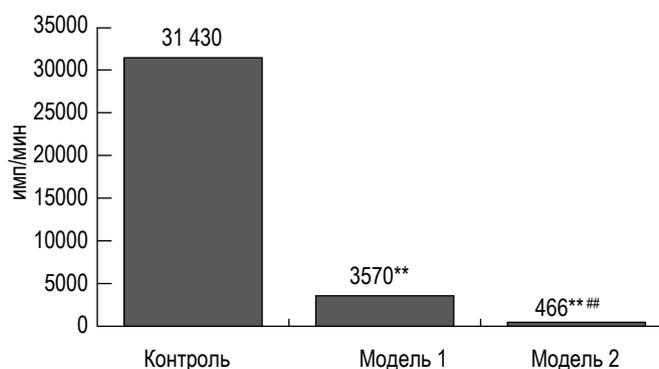


Рисунок 1. Анти-CD3-стимулированный пролиферативный ответ клеток, генерированных при различных условиях

Примечания. Контроль – МНК, культивированные в присутствии IL-2 ($n = 9$), модель 1 – МНК, культивированные в присутствии IL-2 и анти-CD3 антител ($n = 9$), модель 2 – МНК, генерированные в присутствии IL-2, анти-CD3, витамина D₃ и дексаметазона ($n = 12$). После генерации клетки однократно отмывали DMEM, и дополнительно культивировали в дозе $0,1 \times 10^6$ клеток/лунку при стимуляции анти-CD3 антителами (1 мкг/мл). Уровень пролиферации оценивали через 72 часа. Результаты представлены в виде средних значений.

** и # – $p_U < 0,001$ – достоверность различий по сравнению с контролем и моделью 1, соответственно (p_U – непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

жением пролиферативного ответа. В этом случае средний уровень анти-CD3-стимулированной пролиферации составлял 3570 ± 860 имп/мин (от 360 до 7820 имп/мин). Клетки, полученные во второй модели, не отвечали на стимуляцию анти-CD3 (466 ± 235 имп/мин) и значительно отличались от клеток как в контроле, так и в первой модели. Таким образом, если в первой модели генерировались клетки со сниженной пролиферативной реактивностью, то клетки, полученные во второй модели, характеризовались полной функциональной анергией.

Известно, что дефект пролиферативного ответа Т-клеток вследствие их анергии может частично корректироваться экзогенным IL-2 [13]. Поэтому в отдельной серии экспериментов было исследовано влияние IL-2 на уровень анти-CD3-стимулированной пролиферации полученных клеток. Усиление пролиферативного ответа в присутствии субоптимальных доз IL-2 (50 МЕ/мл) проявлялось в виде тенденции в культурах клеток первой модели (с 3570 ± 860 до 9480 ± 3480 имп/мин) и достоверного увеличения в культурах клеток второй модели (с 466 ± 235 до 6340 ± 2990 имп/мин; $p = 0,04$), что свидетельствовало о состоянии анергии Т-клеток, полученных в заданных культуральных условиях.

Исследование супрессорной активности генерируемых клеток показало, что МНК контрольных культур не обладали ингибирующим

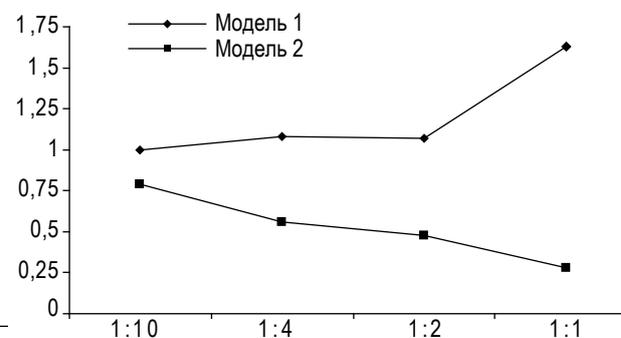


Рисунок 2. Супрессорная активность клеток, генерированных с анти-CD3 и IL-2 в отсутствии (модель 1) и в присутствии витамина D₃ и дексаметазона (модель 2)

Примечания. Генерированные МНК (МНКген) однократно отмывали, добавляли к аутологичным МНК (МНКотвеч) в различных соотношениях и стимулировали анти-CD3-антителами (1 мкг/мл). Уровень пролиферации оценивали через 72 часа. Индекс влияния рассчитывали как отношение пролиферативного ответа в опыте (МНКотвеч в присутствии МНКген) к уровню ответа в контроле (МНКотвеч в отсутствие генерированных клеток). По оси абсцисс – соотношение МНКген : МНКотвеч. По оси ординат – значения индекса влияния.

действием, а напротив усиливали анти-CD3-стимулированную пролиферацию аутологических клеток. Так, при добавлении контрольных МНК к отвечающим клеткам в соотношении 1 : 2 пролиферативный ответ увеличивался в 2 раза (ИВ = $2,0 \pm 0,3$; $n = 8$). МНК, полученные в первой модели, при добавлении к аутологичным клеткам в соотношении 1 : 2 значительно не влияли на пролиферативную активность отвечающих клеток (рис. 2). Индекс влияния в этом случае составил $1,1 \pm 0,2$ ($n = 8$). При увеличении дозы вносимых клеток регистрировалось усиление анти-CD3-стимулированного пролиферативного ответа в среднем на 63% (ИВ = $1,63 \pm 0,3$ при соотношении 1 : 1). В то же время МНК, полученные во второй модели, обладали четкой дозозависимой супрессорной активностью. Двукратное подавление ответа отмечалось при соотношении вносимых и отвечающих клеток 1 : 2. Интенсивность супрессии возрастала до 70% при равном соотношении генерированных и отвечающих клеток, и сохранялась на уровне 20% даже при минимальном содержании МНКген в культуре (при соотношении 1 : 10). Таким образом, несмотря на наличие признаков анергии Т-клеток, полученных в обеих моделях, генерация клеток с супрессорной активностью наблюдалась только в модели 2, предусматривающей активацию МНК анти-CD3-антителами с ИЛ-2 в присутствии комбинации иммуносупрессорных агентов (дексаметазона и витамина D₃).

Чтобы выяснить, является ли супрессорная активность клеток исключительно контактно-зависимой, или может опосредоваться через продукцию растворимых факторов, далее было исследовано влияние супернатантов полученных МНК на интенсивность пролиферативного отве-

та аутологических клеток на анти-CD3 и в смешанной культуре лимфоцитов. Как видно из данных таблицы 1, супернатанты нестимулированных (СН₀) и анти-CD3-стимулированных (СН_{анти-CD3}) клеток контрольных культур и модели 1 практически не обладали супрессорной активностью. Незначительная супрессорная активность факторов выявлялась лишь в СН₀ клеток, полученных в первой модели (ИВ $0,76 \pm 0,16$; $p > 0,05$). В то же время супернатанты от МНК модели 2 обладали выраженным ингибирующим действием. Так, индексы влияния СН₀ и СН_{анти-CD3} варьировали в диапазонах от 0,2 до 0,69 и от 0,27 до 0,83, соответственно. Наряду с угнетением анти-CD3-стимулированной пролиферации аутологических клеток, супернатанты МНК, полученных во второй модели, эффективно ингибировали ответ в СКЛ. В этом случае средние значения индексов влияния СН₀ и СН_{анти-CD3} составили $0,44 \pm 0,05$ ($n = 8$) и $0,46 \pm 0,1$ ($n = 8$), соответственно. Таким образом, ингибирующее действие клеток, генерированных в присутствии витамина D₃ и дексаметазона, может отчасти опосредоваться через растворимые факторы.

Поскольку супрессорная активность индуцибельных Treg может опосредоваться ИЛ-10, далее был проведен анализ содержания ИЛ-10 в супернатантах МНК, полученных в первой и второй моделях (рис. 3). Концентрация ИЛ-10 в супернатантах нестимулированных и анти-CD3-активированных клеток, полученных в модели 2, составила $5,5 \pm 2,2$ и $11,8 \pm 4,2$ пкг/мл ($n = 4$), что было в 2 раза выше, чем в аналогичных супернатантах клеток первой модели ($2,0 \pm 0,6$ и $4,9 \pm 0,7$ пкг/мл; $n = 4$, соответственно). Кроме того, предварительные исследования показали, что культивирование МНК в присут-

ТАБЛИЦА 1. СУПРЕССОРНАЯ АКТИВНОСТЬ СУПЕРНАТАНТОВ ГЕНЕРИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Варианты генерации	СН ₀	СН _{анти-CD3}
Контроль ($n = 7$)	$1,08 \pm 0,09$	$1,59 \pm 0,37$
Модель 1 ($n = 4$)	$0,76 \pm 0,16$	$0,99 \pm 0,45$
Модель 2 ($n = 9$)	$0,44 \pm 0,06^*$	$0,52 \pm 0,07^*$

Примечание. После генерации клетки однократно отмывали DMEM и дополнительно культивировали в течение 48 ч в дозе 10^6 /мл без добавления в присутствии анти-CD3 антител. Представлены индексы влияния ($M \pm S.E.$) супернатантов нестимулированных (СН₀) и анти-CD3-стимулированных клеток (СН_{анти-CD3}), которые рассчитывали как отношение интенсивности анти-CD3-стимулированной пролиферации отвечающих МНК в присутствии супернатанта (33%, v/v) к уровню пролиферации МНК в отсутствие супернатанта. * – $p_0 < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контролем.

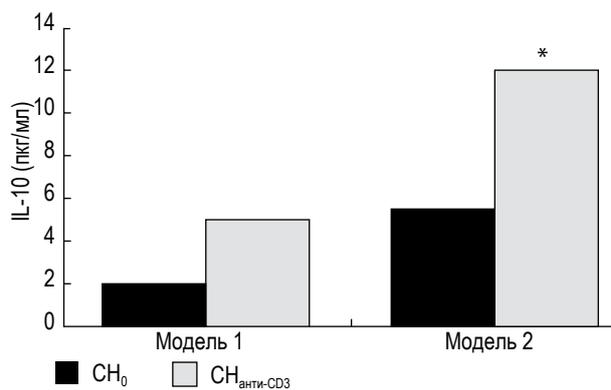


Рисунок 3. Концентрация ИЛ-10 в нестимулированных (СН₀) и анти-CD3-стимулированных супернатантах (СН_{анти-CD3}) генерированных клеток

Примечания. Результаты представлены в виде средних значений. Модель 1 – МНК, культивированные в присутствии ИЛ-2 и анти-CD3, модель 2 – МНК, генерированные в присутствии ИЛ-2, анти-CD3, витамина D₃ и дексаметазона. * – $p_0 < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с моделью 1.

ствии иммуносупрессорных агентов сопровождается 3-кратным увеличением доли CD4⁺Т-лимфоцитов с внутриклеточной экспрессией IL-10 (с 1,29±0,24 до 4,14±2,07%; n = 2). В целом, полученные данные указывают на то, что среди МНК, генерируемых в присутствии витамина D₃ и дексаметазона, присутствуют также индуцибельные Treg, секретирующие IL-10.

Чтобы охарактеризовать фенотип получаемых клеток, на следующем этапе было проведено сравнительное исследование относительного содержания CD4⁺CD25⁺Т-клеток, в том числе с высокой экспрессией CD25 (CD4⁺CD25^{high}), и CD4⁺Т-клеток с внутриклеточной экспрессией FOXP3 в исследуемых культурах МНК. Из данных таблицы 2 видно, что культивирование МНК с IL-2 (контроль) сопровождалось достоверным увеличением доли CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25^{high} Т-клеток по сравнению с исходным уровнем в свежeweделенных МНК периферической крови. В культурах МНК, полученных в первой и второй модели, относительное содержание CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25^{high} Т-клеток увеличивалось еще в большей степени. Однако в культурах МНК, обладающих супрессорной активностью (модель 2), относительное количество этих клеток было таким же, как и в культурах МНК, лишенных супрессорной активности (модель 1). Следовательно, можно полагать, что выявленное увеличение CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25^{high} Т-клеток в используемых культуральных условиях, по-видимому, отражает не столько появление Treg, сколько процессы активации Т-лимфоцитов. В то же время анализ экспрессии более специфического маркера естественных регуляторных клеток – транскрипционного фактора FOXP3 [25, 33] – выявил максимальный (2-кратный) прирост CD4⁺FOXP3⁺ клеток именно в культурах МНК, обладающих супрессорной активностью (модель 2). Количество CD4⁺FOXP3⁺ клеток в культурах МНК, полученных в модели 1, было достоверно ниже, тогда как в контрольных культурах их содержание не отличалось от исходного уровня среди свежeweделенных

МНК. Таким образом, супрессорная активность МНК, генерированных в присутствии витамина D₃ и дексаметазона, ассоциируется с увеличением численности CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток, но не CD4⁺CD25⁺ или CD4⁺CD25^{high} Т-клеток.

Обсуждение

Полученные в целом результаты свидетельствуют о том, что 7-суточная активация МНК анти-CD3-антителами с IL-2 приводит к снижению реактивности Т-клеток к последующей стимуляции через Т-клеточный рецептор. Тем не менее, эффективная генерация клеток с дозозависимой супрессорной активностью регистрируется только при активации Т-клеток в присутствии иммуносупрессорных агентов, в частности, дексаметазона и витамина D₃. Генерируемые в этом случае супрессорные Т-клетки характеризуются состоянием анергии и проявляют свою активность как в условиях контактного взаимодействия, так и опосредованно через продукцию растворимых факторов. При этом супрессорная активность генерированных клеток ассоциируется с увеличением продукции IL-10, а также с повышением относительного содержания CD4⁺FOXP3⁺ клеток.

Генерация *in vitro* регуляторных Т-клеток с супрессорной активностью представляет большой интерес в плане разработки новых технологий лечения аутоиммунных/аллергических заболеваний и контроля трансплантационных реакций. Учитывая, что IL-2 обеспечивает экспансию естественных Treg тимического происхождения, одним из методов генерации Treg является активация Т-клеток через Т-клеточный рецептор в присутствии IL-2 [9, 12]. Согласно полученным нами данным, стимуляция МНК анти-CD3 антителами с IL-2 сопровождалась индукцией анергии Т-клеток, однако полученные клетки не обладали супрессорной активностью, что может объясняться использованием низких доз IL-2 (50 МЕ/мл) и относительно коротким сроком культивирования (7 сут.). В то же время, клетки, полученные при аналогичной стимуляции, но в присутствии дексаметазона и витамина D₃

ТАБЛИЦА 2. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ КОЛИЧЕСТВО CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25^{hi} И CD4⁺FOXP3⁺Т-ЛИМФОЦИТОВ СРЕДИ СВЕЖЕWEДЕЛЕННЫХ МНК И ГЕНЕРИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Группы	CD4 ⁺ CD25 ⁺ , %	CD4 ⁺ CD25 ^{hi} , %	CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ , %
МНК ПК (n = 6)	5,5±1,2	0,93±0,16	3,0±0,6
Контроль (n = 10)	9,7±1,0*	3,1±0,5	3,0±1,5
Модель 1 (n = 7)	34,1±7,6*#	1,9±0,96	4,5±1,0
Модель 2 (n = 10)	25,7±5,0*#	1,65±0,4	6,6±1,0*#

Примечание: МНК ПК – свежeweделенные МНК периферической крови, контроль – МНК, культивированные в присутствии IL-2, модель 1 – МНК, культивированные в присутствии IL-2 и анти-CD3, модель 2 – МНК, культивированные в присутствии IL-2, анти-CD3, витамина D₃ и дексаметазона. * – p₀ < 0,05 – достоверность различий по сравнению с МНК ПК; # – p₀ < 0,05 – достоверность различий по сравнению с контролем.

обладали четким дозозависимым супрессорным эффектом.

Генерация ИЛ-10-продуцирующих регуляторных клеток в присутствии витамина D₃ и дексаметазона из популяции наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов впервые была описана Barrat с соавт. в 2002 г. [8]. Выбор такой комбинации основывался на известных фактах об ингибирующем действии витамина D₃ и дексаметазона на пролиферацию Т-клеток и продукцию ими цитокинов за счет подавления активации ряда транскрипционных факторов [4, 8]. С другой стороны, известно, что генерация ИЛ-10-продуцирующих Treg может индуцироваться незрелыми миелоидными дендритными клетками, а витамин D₃ и дексаметазон подавляют созревание дендритных клеток [14, 23, 24]. Таким образом, еще одним механизмом действия этих иммуносупрессорных агентов может быть их не прямое влияние на Т-клетки, опосредованное через антигенпрезентирующие клетки [32]. Поскольку в проведенных нами исследованиях использовались не наивные CD4⁺ Т-клетки, а популяции несепарированных МНК, данный механизм индукции Tg1 представляется вполне возможным.

Кроме того, применение в качестве источника генерации Treg мононуклеарных клеток не исключает присутствия среди них и последующей экспансии естественных Treg тимического происхождения. Действительно, супрессорный эффект проявлялся как при добавлении супернатантов клеток, так и при прямом межклеточном контакте. Кроме того, генерация супрессорной активности ассоциировалась с увеличением численности CD4⁺FOXP3⁺ клеток. Данный факт, тем не менее, не является прямым доказательством генерации естественных Treg, поскольку в последние годы появились данные об экспрессии FOXP3 не только естественными, но и индуцированными регуляторными клетками периферической крови [3].

В заключение следует отметить еще один факт. Несмотря на увеличение относительного количества CD4⁺FOXP3⁺ клеток в процессе генерации Treg в присутствии витамина D₃ и дексаметазона, содержание CD4⁺CD25^{hi} клеток, с которыми обычно связывают популяцию естественных регуляторных клеток, значимо не увеличивалось по сравнению с контрольными культурами. С другой стороны, прирост CD4⁺CD25⁺ наблюдался при активации МНК как в присутствии (модель 2), так и в отсутствии иммуносупрессорных агентов (модель 1) и, следовательно, не был сопряжен с генерацией супрессорной активности. По-видимому, полученные в процессе культивирования Т-лимфоциты с фенотипом CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25^{hi} представлены, главным образом,

популяцией активированных Т-клеток и не связаны с Treg, обладающими супрессорной активностью.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что активация Т-клеток анти-CD3 и ИЛ-2 в присутствии витамина D₃ и дексаметазона является относительно доступным и простым методом генерации *in vitro* популяции Т-клеток, характеризующихся состоянием анергии и содержащих Treg с супрессорной активностью. Вопрос о том, с каким типом регуляторных клеток связана супрессорная активность — с индуцированными Treg или с индуцированными и естественными Treg, пока остается открытым и требует дальнейших исследований.

Список литературы

1. Курганова Е.В., Тихонова М.А., Стрельцова Е.И., Останин А.А., Черных Е.Р., Козлов В.А. Регуляторные Т-клетки с супрессорной активностью при хирургическом сепсисе // Мед. иммунология. — 2006. — Т. 8, № 1. — С. 51-60.
2. Ярилин А.А., Донецкова А.Д. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3 // Иммунология. — 2006. — № 3. — С. 176-188.
3. Allan S.E., Crome S.Q., Crellin N.K., Passerini L., Steiner T.S., Vacchetta R., Roncarolo M.G., Levings M.K. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production // International Immunology. — 2007. — Vol. 19, N 4. — P. 345-354.
4. Alroy I., Towers T.L., Freedman L.P. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor // Mol. Cell. Biol. — 1995. — Vol. 15. — P. 5789-5799.
5. Baecher-Allan C., Hafler D.A. Suppressor T cells in human diseases // J. Exp. Med. — 2004. — Vol. 200, N 3. — P. 273-276.
6. Balandina A., Lecart S., Darteville P., Saoudi A., Berrih-Aknin S. Functional defect of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis // Blood. — 2005. — Vol. 105. — P. 735-741.
7. Baratelli F., Lin Y., Zhu L., Yang S.C., Heuze-Vourc'h N., Zeng G., Reckamp K., Dohadwala M., Sharma S., Dubinett S.M. Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4⁺ T cells // J. Immunol. — 2005. — Vol. 175. — P. 1483-1490.
8. Barrat F.J., Cua D.J., Boonstra A., Richards D.F., Crain C., Savelkoul H.F., de Waal-Malefyt R., Coffman R.L., Hawrylowicz C.M., O'Garra A. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4⁺ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and

- Th2-inducing cytokines // *J. Exp. Med.* – 2002. – Vol. 195, N 5. – P. 603-616.
9. Bisikirska B.C., Herold K.C. Use of anti-CD3 monoclonal antibody to induce immune regulation in type 1 diabetes // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2004. – Vol. 1037. – P. 1-9.
10. Dieckmann D., Bruett C.H., Ploettner H., Lutz M.B., Schuler G. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells // *J. Exp. Med.* – 2002. – Vol. 196, N 2. – P. 247-253.
11. Fantini M.C., Becker C., Monteleone G., Pallone F., Galle P.R., Neurath M.F. TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁺ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7 // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172, N 9. – P. 5149-5153.
12. Hoffmann P., Eder R., Kunz-Schughart L.A., Andreesen R., Edinger M. Large-scale *in vitro* expansion of polyclonal human CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells // *Blood.* – 2004. – Vol. 104, N 3. – P. 895-903.
13. Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M., Tuettenberg A., Knop J., Enk A.H. Identification and functional characterization of human CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood // *J. Exp. Med.* – 2001. – Vol. 193, N 11. – P. 1285-1294.
14. Jonuleit H., Schmitt E., Schuler G., Knop J., Enk A.H. Induction of interleukin 10-producing, non-proliferating CD4⁺ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol. 192. – P. 1213-1222.
15. Kohm A.P., Williams J.S., Bickford A.L., McMahon J.S., Chatenoud L., Bach J.F., Bluestone J.A., Miller S.D. Treatment with nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody induces CD4⁺ T cell unresponsiveness and functional reversal of established experimental autoimmune encephalomyelitis // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 174. – P. 4525-4534.
16. Levings M.K., Sangregorio R., Sartirana C., Moschin A.L., Battaglia M., Orban P.C., Roncarolo M.G. Human CD4⁺CD25⁺ T suppressor cell clones produce transforming growth factor β , but not IL-10, and are distinct from type 1 T regulatory cells // *J. Exp. Med.* – 2002 – Vol. 196, N 10. – P. 1335-1346.
17. Levings M.K., Sangregorio R., Roncarolo M.G. Human CD25⁺CD4⁺ T cells suppress naive and memory T-cell proliferation and can be expanded *in vitro* without loss of suppressor function // *J. Exp. Med.* – 2001. – Vol. 193. – P. 1295-1302.
18. Levings M.K., Roncarolo M.G. T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2000. – Vol. 106. – P. 109-112.
19. Lindley S., Dayan C.M., Bishop A., Roep B.O., Peakman M., Tree T.I. Defective suppressor function in CD4⁺CD25⁺ T-cells from patients with type 1 diabetes // *Diabetes.* – 2005. – Vol. 54. – P. 92-99.
20. Ling E.M. Relation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease // *Lancet.* – 2004. – Vol. 363. – P. 608-615.
21. Morgan M.E., Suttmuller R.P., Witteveen H.J., van Duivenvoorde L.M., Zanelli E., Melief C.J., Snijders A., Offringa R., de Vries R.R., Toes R.E. CD25⁺ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis // *J. Arthritis Rheum.* – 2003. – Vol. 48. – P. 1452-1460.
22. Ng W.F., Duggan P.J., Ponchel F., Matarese G., Lombardi G., Edwards A.D., Isaacs J.D., Lechler R.I. Human CD4⁺CD25⁺ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells // *Blood.* – 2001. – Vol. 98. – P. 2736-2744.
23. Penna G., Roncari A., Amuchastegui S., Daniel K.C., Berti E., Colonna M., Adorini L. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 // *Blood.* – 2005. – Vol. 106, N 10. – P. 3490-3497.
24. Piemonti L., Monti P., Sironi M., Fraticelli P., Leone B.E., Dal Cin E., Allavena P., Di Carlo V. Vitamin D3 affect differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells // *J. Immunol.* – 2000. – Vol. 164. – P. 4443-4451.
25. Ramsdell F. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? // *Immunity.* – 2003. – Vol. 19. – P. 165-168.
26. Robinson D.S., Larche M., Durham S.R. Tregs and allergic disease // *J. Clin. Invest.* – 2004. – Vol. 114, N 10. – P. 1389-1397.
27. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses // *Annu. Rev. Immunol.* – 2004. – Vol. 22. – P. 531-562.
28. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance // *Cell.* – 2002. – Vol. 101. – P. 455-458.
29. Shevach E.M. Regulatory T cells in autoimmunity // *Annu. Rev. Immunol.* – 2000. – Vol. 18. – P. 423-449.
30. Suri-Payer E., Amar A.Z., Thornton A.M., Shevach E.M. CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 160. – P. 1212-1218.

31. Viglietta V., Baecher-Allan C., Weiner H.L., Hafler D.A. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis // J. Exp. Med. – 2004. – Vol. 199, N 7. – P. 971-979.

32. Xystrakis E., Kusumakar S., Boswell S., Peek E., Urry Z., Richards D.F., Adikibi T., Pridgeon C., Dallman M., Loke T.K., Robinson D.S., Barrat F.J., O'Garra A., Lavender P., Lee T.H., Corrigan C., Hawrylowicz C.M. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma

patients // J. Clin. Invest. – 2006. – Vol. 116, N 1. – P. 146-155.

33. Yagi H., Nomura T., Nakamura K., Yamazaki S., Kitawaki T., Hori S., Maeda M., Onodera M., Uchiyama T., Fujii S., Sakaguchi S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells // Int. Immunol. – 2004. – Vol. 16, N 11. – P. 1643-1656.

поступила в редакцию 13.11.2007

принята к печати 27.12.2007