Медицинская Иммунология
2006, Т.8, № 1, стр 51-60
© 2006, СПб РО РААКИ

РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ С СУПРЕССОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ СЕПСИСЕ

Курганова Е.В., Тихонова М.А., Стрельцова Е.И.*, Останин А.А., Черных Е.Р., Козлов В.А.

ГУ НИИ Клинической Иммунологии СО РАМН, Новосибирск;

* *Областная клиническая больница г. Новосибирск, Россия*

Резюме. Работа посвящена изучению особенностей функционирования регуляторных Т-клеток с супрессорной активностью при хирургическом сепсисе. Показано, что у больных сепсисом со сниженной Т-клеточной пролиферацией наблюдается увеличение относительного количества $CD4^+CD25^+$ лимфоцитов, в том числе CD4 клеток с высокой экспрессией CD25 молекул. При этом между содержанием $CD4^+CD25^{+high}$ клеток и пролиферативной активностью мононуклеарных клеток (МНК) больных выявлена обратная корреляционная взаимосвязь. Увеличение доли $CD4^+CD25^+$ клеток ассоциируется с появлением супрессорной активности МНК, которая частично отменяется в присутствие экзогенного IL-2. В свою очередь истощение CD25-позитивных клеток приводит к усилению пролиферативной активности Т-лимфоцитов. Следовательно, снижение Т-клеточной пролиферации при сепсисе сопряжено с накоплением естественных регуляторных Т-клеток (Trn). Наряду с этим получены данные о способности МНК больных опосредовать супрессорную активность через продукцию растворимых факторов, в частности, IL-10. Так, у больных отмечается повышенный уровень продукции IL-10 и увеличение доли CD4 Т-лимфоцитов с внутриклеточным содержанием IL-10, а нейтрализующие антитела к IL-10 частично отменяют супрессорную активность супернатантов МНК. Данные факты позволяют предположить, что наряду с Trn важную роль в иммунопатогенезе сепсиса играют также индуцибельные супрессорные Т-клетки (Tr1).

Ключевые слова: регуляторные Т-клетки, Trn, Tr1, сепсис.

Kurganova E.V., Tikhonova M.A., Streltzova E.I., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kozlov V.A.

REGULATORY T-CELLS WITH SUPPRESSIVE ACTIVITY IN SURGICAL SEPSIS

Abstract. Present work aims to investigate functioning of the regulatory T-cells with suppressor activity in surgical sepsis. It has been shown that the septic patients with decreased T cell proliferation are characterized by enhanced relative contents of $CD4^+CD25^+$ lymphocytes, including $CD4^+CD25^{high}$. Moreover, a reverse correlation has been revealed between $CD4^+CD25^{high}$ and anti-CD3-induced proliferative response of mononuclear cells (MNC).

Increased ratio of $CD4^+CD25^+$ cells is associated with arising suppressive activity of MNC, which is partially abrogated by addition of rIL-2. It should be noted that the depletion of $CD25^+$ subpopulation is accompanied by increased T cell proliferation. Hence, a decrease in T cell proliferative activity in surgical sepsis is coupled with naturally occurring $CD4^+CD25^+$ regulatory T-cells (Trn).

Furthermore, it has been demonstrated that the suppressive activity of MNCs in septic patients is mediated by soluble factors, in particular, IL-10. Indeed, septic patients are characterized by increased level of IL-10 production and enhanced number of $CD4^+IL\text{-}10^+$ T-cells. Addition of neutralizing anti-IL-10 antibody partially abrogated the suppressive activity of MNC supernatants. Thus, our study demonstrated that inducible regulatory T cells (Tr1) coupled to the naturally occurring $CD4^+CD25^+$ regulatory T-cells (Trn) actively contribute to genesis of immune pathology in sepsis. ***(Med. Immunol., 2006, vol.8, № 1, pp 51-60)***

Адрес для переписки:
Черных Е.Р.
630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская 14,
НИИ клинической иммунологии СО РАМН.
Тел.: (383) 349-43-29, факс (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab @ mail.ru

Введение

Течение гнойно-септических заболеваний (ГСЗ) у больных хирургического профиля, особенно на фоне развития синдрома полиорганной недостаточности сопряжено с развитием иммунодепрессии, выраженность которой во многом определяет неблагоприятный исход заболевания [1, 13]. Формирование иммунной недостаточности при ГСЗ может быть обусловлено дисбалансом цитокинов за счет доминирования продукции противовоспалительных/иммуносупрессорных медиаторов в популяции моноцитов/макрофагов и Th1→Th2 переключения, а также повышенной гибелью иммунокомпетентных клеток вследствие апоптоза [4, 5, 8]. Кроме того, имеются основания полагать, что определенную роль в развитии иммунной недостаточности могут играть регуляторные Т-клетки с супрессорной активностью. Так, согласно проведенным нами ранее исследованиям и данным литературы пролиферативная активность Т-клеток и продукция IL-2 при стимуляции через Т-клеточный рецептор при ГСЗ существенно снижены, что указывает на состояние анергии Т-лимфоцитов. Причем категория больных с анергией Т-клеток характеризуется более выраженной иммуносупрессией и тяжестью течения бактериальной инфекции по сравнению с оппозитной группой [1, 2, 3, 13]. Характерно, что анергии при ГСЗ подвержены CD4 Т-клетки. Поскольку регуляторные CD4 Т-клетки с супрессорной активностью также характеризуются состоянием анергии [12, 22], можно полагать, что накапливающиеся анергичные Т-лимфоциты при ГСЗ могут включать субпопуляцию регуляторных Т-клеток.

В настоящее время выделяют две категории регуляторных Т-клеток. К первым относят субпопуляцию естественных регуляторных $CD4^+$ Т-клеток (Trn), образующихся в тимусе, характеризующихся высокой экспрессией на своей поверхности рецепторов к α-цепи IL-2 (CD25) и подавляющих иммунный ответ через прямое контактное взаимодействие с клетками-мишенями [6, 9, 7, 28]. Супрессорная активность указанных клеток может быть нивелирована in vitro добавлением больших доз экзогенного IL-2, IL-15 или анти-CD28-антител [9, 26]. Вторая категория представлена индуцибельными регуляторными CD4 Т-клетками, которые формируются на периферии и опосредуют свое действие через продукцию регуляторных факторов. Примером таких клеток являются так называемые регуляторные Т-клетки 1 типа (Tr1). Их супрессорный эффект реализуется через продукцию IL-10 [14, 20]. Повышенный уровень регуляторных Т-клеток с супрессорной активностью выявлен при онкологических заболеваниях и некоторых формах хронической вирусной инфекции [7, 23, 24, 30]. Однако роль их в патогенезе тяжелых и генерализованных форм внеклеточной бактериальной инфекции остается до сих пор не изученной. Исходя из вышесказанного, настоящая работа была нацелена на изучение особенностей функционирования естественных и индуцибельных регуляторных Т-клеток при гнойно-септической патологии.

Материалы и методы

В исследование были включены 54 больных с хирургическим сепсисом (57/43% мужчин и женщин, средний возраст 47,1 ± 3,6 лет). В сформированной группе у 41 пациента (76%) регистрировали абдоминальный, и у 5 (9%) – ангиогенный сепсис. Оставшиеся 8 больных (15%) были оперированы по поводу гнойно-деструктивных заболеваний бронхолегочного аппарата (абсцедирующая пневмония, пиопневмоторакс) и средостения (медиастенит). Диагностика сепсиса в соответствии с рекомендациями Чикагской согласительной конференции основывалась на выявлении 2 и более признаков синдрома системной воспалительной реакции при наличии очага инфекции. Контрольную группу составили 64 здоровых донора крови, сопоставимых по полу и возрасту. Обследование всех пациентов проводилось при получении информированного согласия.

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина. Клетки в концентрации $0{,}1 \times 10^6$/лунку культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических исследований в среде RPMI-1640 (Sigma, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глютамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 10% инактивированной сыворотки доноров AB(IY) группы крови при 37°С в CO_2-инкубаторе. Для стимуляции клеток использовали моноклональные анти-CD3 антитела ICO-90 (анти-CD3, «Медбиоспектр», Москва) в концентрации 1 мкг/мл или стафилококковый энтеротоксин В (SEB, Sigma, США) в концентрации 200 нг/мл. Интенсивность пролиферации оценивали радиометрически по включению ^{3}H-тимидина (1 мкКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования. В ряде экспериментов культивирование клеток проводили в присутствии IL-2 в указанной концентрации (10, 50 и 100 МЕ/мл «Ронколейкин», «Биотех», СПб). Относительное содержание $CD4^+CD25^+$ Т-клеток определяли методом проточной цитофлюориметрии на лазерном клеточном сортере-анализаторе FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием FITC-меченных анти-CD4 мАТ («Сорбент-сервис», Москва) и меченных фикоэритрином анти-CD25 антител (BD PharMingen, San Diego, США).

Для удаления $CD25^+$ лимфоцитов мононуклеарные клетки обрабатывали очищенными мышиными анти-CD25 антителами (Becton Dickinson,

США), затем инкубировали 30 минут с магнитными бусами М-450, нагруженными бараньими IgG антителами против мышиных иммуноглобулинов (Dynal), и далее производили разделение клеток на колонке.

Для оценки супрессорной активности регуляторных клеток их смешивали с МНК доноров ($0,1x10^6$/лунку) в соотношении 1:1 и оценивали пролиферативный ответ последних на анти-CD3 антитела в 3-суточных культурах. Источником регуляторных клеток служили МНК больных сепсисом, преинкубированные в течение 48 часов в присутствии или отсутствии анти-CD3 (1мкг/мл). Перед добавлением к отвечающим клеткам преинкубированные МНК обрабатывали в течение 45 минут при 37°С митомицином С (40мкг/мл; Serva, Feinbiochemica, Heidelberg, Германия). Индекс супрессорной активности рассчитывали по формуле (1 – А/Б) х 100%, где А – анти-CD3-стимулированный пролиферативный ответ (имп/мин) в опыте (культуры отвечающих клеток, содержащие клетки-регуляторы); Б – анти-CD3-стимулированный пролиферативный ответ в контроле (культуры, содержащие только отвечающие клетки). В этой же серии экспериментов оценивали способность 48 часовых супернатантов больных подавлять пролиферативный ответ отвечающих клеток. Для этого супернатанты стимулированных и нестимулированных МНК больных (50μl, 30% v/v) добавляли в культуры анти-CD3-стимулированных МНК доноров ($0,1x10^6$/лунку) и рассчитывали процент супрессии.

Для исследования роли IL-10 в реализации супрессорной активности супернатантов в ряде экспериментов оценивали влияние нейтрализующих анти-IL-10 антител (20нг/мл, R&D systems, США) на выраженность супрессии в культурах МНК доноров. Уровень продукции IL-10 в 48 часовых супернатантах нестимулированных и анти-CD3 стимулированных МНК оценивали методом проточной флюориметрии на 2-х лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (BioPlex Protein Assay System, Bio-Rad, США, определяемый динамический диапазон 2 – 32000 пкг/мл) с использованием коммерческих тест-систем в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Определение экспрессии внутриклеточных цитокинов (IL-10, IFNγ, IL-4) в МНК периферической крови проводили методом проточной цитометрии (FACSCalibur, Becton Dickinson). С целью селективной активации Т-клеток и индукции синтеза цитокинов МНК культивировали в 24-луночных планшетах в течение 4 ч в присутствии форболмиристатацетата (PMA, 30 нг/мл, ICN) и иономицина (2мкМ, ICN), а также брефелдина А (10мкг/мл, ICN, блокатора транспорта протеинов из аппарата Гольджи), затем клетки инкубировали с моноклональными антителами к поверхностным маркёрам (CD3-APC, CD4-PerCP, CD25-FITC). После пермеабилизации клеток с 0,2% раствором Твин-20 их инкубировали с моноклональными анти-IL-10 антителами, коньюгированными с фикоэретрином (BD PharMingen, San Diego,CA, США), или с моноклональными анти-IFNγ, коньюгированными с FITC, и с анти-IL-4 антителами, меченными PE (Becton Dickinson). Образцы анализировали на проточном цитометре с использованием программы Cellquest. Относительное количество клеток с внутриклеточным IL-10 в популяциях $CD4^+$ и $CD4^-$ Т-клеток, в субпопуляциях $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^-$, оценивались по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Аналогично оценивали относительное количество IL-4 и IFNγ экспрессирующих клеток в популяции CD4-Т-лимфоцитов.

Математическая обработка полученных результатов проводилась методами описательной, параметрической и непараметрической статистики на персональном компьютере с использованием программы «Statistica 5.0».

Результаты

Пролиферативный ответ МНК на митогенную стимуляцию

Проведенными ранее исследованиями было показано, что у больных сепсисом пролиферативный ответ лимфоцитов при стимуляции через Т-клеточный рецептор анти-CD3 антителами или стафилококковым энтеротоксином В (SEB) снижен. Причем при индивидуальном анализе выделяется группа больных с выраженным угнетением пролиферации (более чем в 2 раза), которая характеризуется более тяжелым течением и менее благоприятным прогнозом [3]. Данная категория больных была отобрана для изучения регуляторных Т-клеток с супрессорной активностью. Интенсивность пролиферативного ответа на анти-CD3 в сформированной группе (n=54) варьировала в диапазоне от 309 до 16640 имп/мин, составляя в среднем 9600 ± 700 имп/мин, что указывало на состояние анергии Т-клеток. Поскольку пролиферативная активность анергичных Т-клеток может быть частично или полностью восстановлена в присутствии экзогенного IL-2 [26], мы исследовали влияние рекомбинантного IL-2 на уровень пролиферации у больных со сниженным анти-CD3 ответом. Добавление IL-2 в субоптимальной дозе (25 МЕ/мл) приводило к усилению ответа у 76% (41/54) обследованных пациентов. В результате интенсивность ответа в целом по группе возрастала с 9600±700 до 14640±1170 имп/мин (p_U=0,0001). Следовательно, анергия Т-клеток у больных сепсисом является обратимым состоянием и может быть преодолена с помощью экзогенного IL-2.

$CD4^+CD25^+$ естественные регуляторные клетки у больных сепсисом

Согласно данным литературы состояние анергии является характерным свойством субпопуляции естественных регуляторных CD4-клеток, ко-экспрессирующих рецептор к IL-2 ($CD4^+CD25^+$). Поэтому представлял большой интерес анализ количественного содержания $CD4^+CD25^+$ клеток у больных сепсисом. У здоровых доноров количество $CD4^+CD25^+$ клеток варьировало от 1,0% до 10%, составляя в среднем 4,96±0,41% (n=37), что согласуется с данными литературы [9, 31]. В группе «анергичных» больных с хирургическим сепсисом относительное количество $CD4^+CD25^+$ клеток в периферической крови варьировало от 3,9 до 20,1%, составляя в среднем 11,6±0,8%, что более чем в 2 раза превышало средний нормативный уровень (P_U=0,0001).

Следует отметить, что субпопуляция $CD4^+CD25^+$ клеток является гетерогенной по интенсивности экспрессии CD25 и функциональной активности. Причем супрессорной активностью обладают преимущественно CD4 Т-клетки с высокой экспрессией CD25 – так называемые $CD4^+CD25^{high}$ клетки [7]. Поэтому на следующем этапе был проведен сравнительный анализ содержания именно этой субпопуляции клеток. В группе здоровых доноров относительное количество $CD4^+CD25^{high}$ варьировали от 0,25 до 1,38%, составляя в среднем 0,88±0,09% (n=12). У больных с анергией Т-клеток содержание данной субпопуляции колебалось от 0,43 до 5,0%, превышая в среднем в 2,5 раза аналогичный показатель у доноров (2,21±0,38%; n=13; p_U=0,0019). Интересно, что при проведении корреляционного анализа интенсивность анти-CD3-идуцированной пролиферации МНК обратно коррелировала только с субпопуляцией $CD4^+CD25^{high}$ клеток (r=-0,56; p<0,05), но не с общей субпопуляцией $CD4^+CD25^+$ Т-клеток. Таким образом, можно полагать, что угнетение пролиферативного ответа в группе «анергичных» больных ассоциируется с накоплением естественных регуляторных клеток.

Для выяснения причастности CD25-позитивных регуляторных Т-клеток к негативной регуляции ответа на анти-CD3 было исследовано влияние истощения $CD25^+$ клеток на уровень анти-CD3-индуцированной пролиферации в культурах МНК здоровых доноров и больных сепсисом (рис.1). Эффективность деплеции CD25 клеток оценивалась по относительному количеству $CD4^+CD25^+$ клеток до и после разделения МНК на колонке с магнитными бусами. Количество $CD4^+CD25^+$ клеток после удаления фракции CD25-позитивных лимфоцитов снижалось с 9,62±2,46% до 2,4±0,76% (n=4; p<0,05) в группе больных и с 3,86±0,39% до 0,99±0,43% (n=5; p<0,001) в группе здоровых доноров. Известно, что максимальный ответ при стимуляции анти-CD3 регистрируется на 3 сутки, в то время как к 6 суткам уровень пролиферации снижается, что может быть связано с активацией регуляторных Т-клеток. Поэтому анализ пролиферативного ответа проводили в 3- и 6-суточных культурах МНК. Истощение CD25-позитивных клеток у здоровых доноров сопровождалось тенденцией к увеличению пролиферативного ответа МНК на 3 сутки, однако наиболее выраженное и значимое усиление ответа по сравнению с культурами несепарированных МНК отмечалось на 6 сутки. Так, пролиферативный ответ МНК после удаления CD25-клеток возрастал в 3 раза (p=0,0006). В то же время интенсивность пролиферации в культурах, обогащенных $CD25^+$ лимфоцитами (клетки, элюированные с колонки) была практически полностью ингибирована как на 3, так и на 6 сутки.

У больных сепсисом с исходно низким пролиферативным ответом на 3 сутки истощение CD25-позитивных клеток во всех 4 экспериментах приводило к достоверному усилению анти-CD3-стимулированной пролиферации, которая в культурах CD25-истощенных клеток была в среднем в 3,5 раза выше по сравнению с пролиферативным ответом несепарированных МНК (p_U=0,049). Следовательно, можно предположить, что анти-CD3-стимулированный ответ находится под контролем регуляторных Т-клеток, ко-экспрессирующих CD25 молекулы. У здоровых доноров эти клетки принимают участие в ограничении ответа Т-клеток при стимуляции через Т-клеточный рецептор, а у больных сепсисом в силу увеличения их численности детерминируют подавление пролиферации Т-клеток.

Поскольку МНК больных являются источником повышенного содержания $CD4^+CD25^+$ клеток, в следующей серии экспериментов была также исследована супрессорная активность МНК «анергичных» больных в сравнении с таковой у здоровых доноров. Для этого оценивали влияние нестимулированных и активированных анти-CD3 в течение 48 ч МНК больных на интенсивность анти-CD3-стимулированной пролиферации МНК здоровых доноров. Нестимулированные и активированные анти-CD3 МНК больных перед внесением в культуры МНК доноров обрабатывали митомицином С. Как следует из данных рис.2, нестимулированные МНК доноров практически не обладали супрессорной активностью, в то время как МНК больных подавляли интенсивность пролиферации МНК доноров в среднем на 42%. Индивидуальный анализ данных показал, что супрессорная активность более 20% выявлялась у 8 из 9 (89%) больных, тогда как в группе доноров (n=8) не встречалась ни у одного индивидуума. После активации анти-CD3-антителами супрессорная активность МНК больных возрастала с 42% до 54%, (n=7, p=0,04) и была достоверно выше, чем у здоровых доноров (p_U=0,015). Характерно, что

супрессорная активность анти-CD3-стимулированных МНК, проанализированная в группе 15 больных сепсисом (в том числе 8 «ареактивных» и 7 «реактивных» пациентов), коррелировала с относительным содержанием $CD4^+CD25^+$ клеток (r=0,55; p=0,03).

Известно, что супрессорная активность, опосредованная Trn клетками, может нивелироваться при добавлении экзогенного IL-2. Поэтому следующим этапом нашей работы стало исследование влияния IL-2 на супрессорную активность МНК анергичных больных. Как следует из данных рис. 3, добавление в тест культуры IL-2 уменьшало супрессорную активность нестимулированных и анти-CD3-активированных МНК в среднем на 14-36% и 25-45%, соответственно. Подавление супрессорной активности МНК наблюдалось уже при добавлении IL-2 в концентрации 10 МЕ/мл, и было максимальным при использовании IL-2 в дозе 50 МЕ/мл. Следовательно, добавление экзогенного IL-2 частично уменьшает супрессорную активность МНК, но не отменяет ее полностью. Полученные результаты о повышенном содержании $CD4^+CD25^+$ Т-клеток, наличии супрессорной активности МНК у этих пациентов и ее снижение в присутствии экзогенного IL-2 свидетельствуют о возможной роли Trn в угнетении пролиферативной активности Т-клеток у больных хирургическим сепсисом с Т-клеточной анергией.

Tr1 клетки у больных сепсисом

Наряду с Trn супрессорной активностью среди анергичных CD4 Т-клеток могут обладать индуцибельные регуляторные Т-клетки - Tr1. Супрессорная активность указанных клеток реализуется через продукцию растворимых факторов, в частности IL-10. Поэтому далее мы исследовали, может ли супрессорная активность МНК «анергичных» больных реализоваться через продукцию растворимых факторов, для чего проанализировали влияние супернатантов (30%, v/v) МНК больных на анти-CD3-индуцированную пролиферацию Т-клеток здоровых доноров. Оказалось, что в преобладающем большинстве случаев (у 8 из 9 пациентов) супрессорной активностью обладали не только сами клетки больных, но и полученные от них 48-часовые супернатанты. При этом выраженность супрессорной активности растворимых факторов, продуцируемых нестимулированными и анти-CD3-активированными МНК больных, варьировала от 35 до 58%, что более чем в 2 раза превышало аналогичные показатели у здоровых доноров (16 – 22%, p_U<0,01).

Чтобы выяснить, связана ли супрессорная активность супернатантов с IL-10, на следующем этапе исследовали уровень спонтанной и анти-CD3-стимулированной продукции IL-10 в группе «анергичных» больных и здоровых доноров. Анализ полученных данных (табл. 1) показал, что спонтанная продукция IL-10 у здоровых доноров практически соответствовала пороговым значениям метода. У больных концентрация IL-10 в нестимулированных культурах МНК была выше, однако не достоверно. Стимуляции анти-CD3 сопровождалась усилением продукции IL-10. При этом уровень стимулированной продукции IL-10 у больных был в 2 раза выше, чем у доноров. Важно отметить, что увеличение уровня IL-10 у больных сепсисом не было связано с Th1→Th2 переключением. Так, исследование относительного количества CD4 Т-клеток с внутриклеточной экспрессией IFNγ и IL-4 показало, что по сравнению с донорами у больных сепсисом регистрировалось одновременное снижение CD4 клеток с внутриклеточной экспрессией IFNγ (14,8±4,1 *vs* 23,4±1,9% у доноров, p<0,05) и IL-4 (0,93±0,3 *vs* 3,2±0,35% у доноров; p<0,05). Следовательно, увеличение продукции IL-10 у анергичных больных могло быть обусловлено увеличением доли Tr1 клеток. Чтобы оценить возможную роль IL-10 в реализации супрессорной активности, в следующей серии экспериментов исследовали влияние нейтрализующих анти-IL-10 антител на супрессорную активность супернатантов, полученных от нестимулированных МНК больных. Добавление анти-IL-10 антител в концентрации 20 мкг/мл снижало супрессорную активность анализируемых супернатантов в среднем с 55±6 до 44±6% (n=7; p<0,05). Следовательно, IL-10 играет, по-видимому, существенную роль в опосредовании супрессорной активности МНК больных, хотя является не единственным медиатором супрессии.

Чтобы убедиться, что супрессорная активность, опосредованная IL-10, связана именно с субпопуляцией Tr1 клеток, далее мы исследовали относительное количество CD4 Т-клеток с внутриклеточной экспрессией IL-10. У здоровых доноров относительное содержание $CD4^+IL\text{-}10^+$ клеток составляло в среднем 0,61±0,09% (n=15). Доля указанной субпопуляции у больных варьировала от 0,21 до 5,66%, и в среднем в 3 раза превышала аналогичный показатель доноров (2,11±0,23%; n=13, p_U=0,0005). Следовательно, можно полагать, что Tr1 клетки принимают участие в IL-10-опосредованной супрессии у больных сепсисом с Т-клеточной анергией. Следует отметить, что до настоящего времени не определены специфические фенотипические маркеры, позволяющие идентифицировать регуляторные Т-клетки, в том числе дифференцировать Trn и Tr1 клетки. Молекула CD25 не является специфичной молекулой для Trn клеток и служит одновременно маркером клеточной активации. В этой связи до сих пор не ясно, являются ли Tr1 CD25-позитивными клетками или они не несут указанный антиген [17]. Исследование IL-10 продуцирующих клеток в субпопуляциях $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^-$ показало,

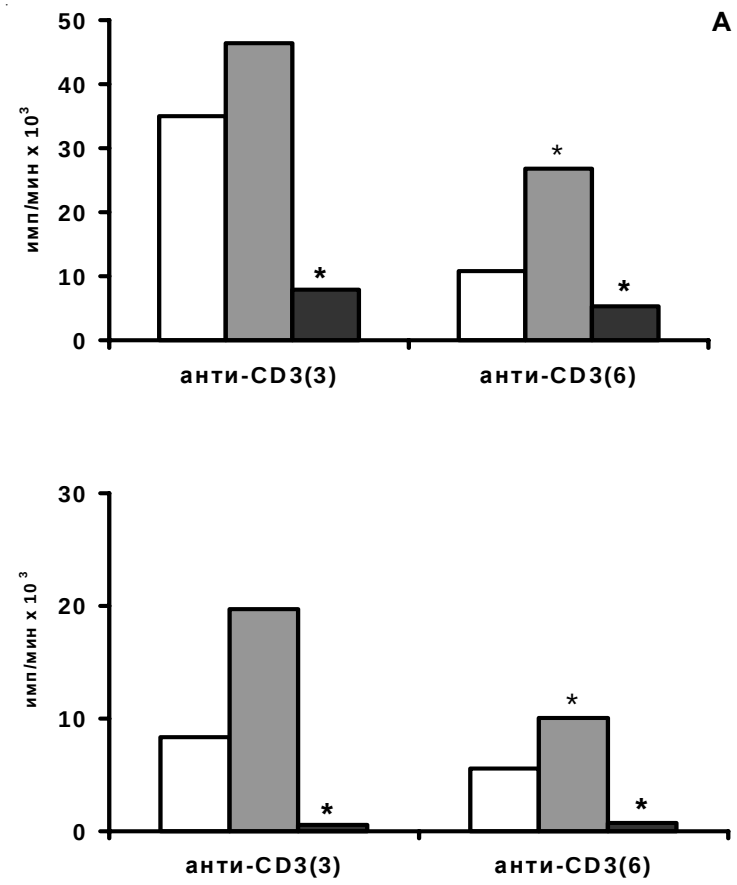

Рис. 1. Влияние истощения/обогащения CD25⁺ лимфоцитов из популяции МНК здоровых доноров и анергичных больных сепсисом на уровень анти-CD3-стимулированного пролиферативного ответа. Несепарированные (белые), истощенные по CD25⁺ (серые) и обогащенные CD25⁺ (черные столбики) популяции МНК здоровых доноров и больных стимулировали анти-CD3 антителами (1мкг/мл). Интенсивность пролиферации оценивали на третьи (3) и шестые (6) сутки по включению ^{3}H-тимидина. Результаты представлены в виде средних значений, полученных от пяти доноров (А) и четырех больных (Б) в отдельных экспериментах.

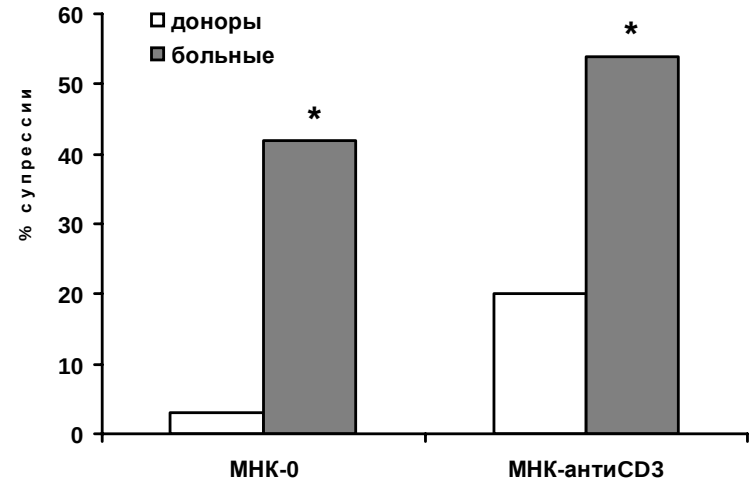

Рис. 2. Супрессорная активность нестимулированных (МНК-0) и анти-CD3-активированных МНК (МНК-антиCD3) доноров и больных сепсисом. МНК больных и доноров культивировали в течение 48 ч в отсутствии и в присутствии анти-CD3 (1мкг/мл), отмывали RPMI, обрабатывали митомицином С (40мкг/мл) и добавляли в соотношении 1:1 в культуры МНК здоровых доноров, стимулированных анти-CD3-антителами. Интенсивность пролиферации оценивали на 3 сутки. Данные представлены в виде процента супрессии.

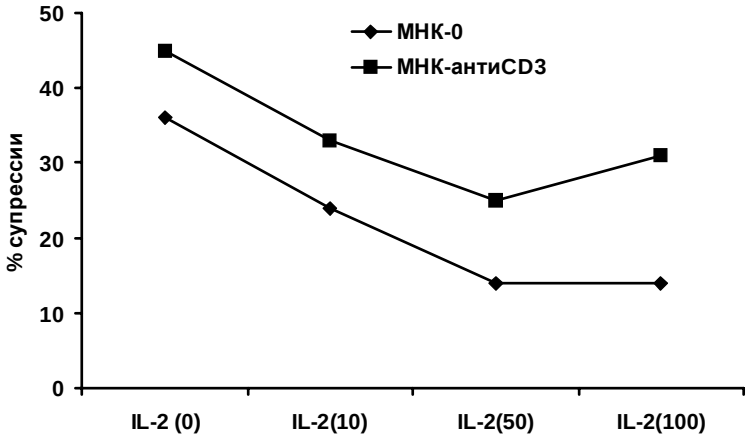

Рис. 3. Влияние IL-2 на супрессорную активность нестимулированных МНК (МНК-0) и активированных анти-CD3 МНК (МНК-антиCD3) анергичных больных сепсисом. При совместном культивировании нестимулированных (или активированных) МНК больных с МНК доноров (в соотношении 1:1) добавляли IL-2 в разных концентрациях (10, 50 и 100 МЕ/мл) и оценивали пролиферативный ответ на стимуляцию анти-CD3 антителами.

что IL-10$^+$-клетки выявлялись в равной степени как среди CD4$^+$CD25$^+$, так и среди CD4$^+$CD25$^-$ клеток. Однако количество их у больных сепсисом было достоверно выше, чем у доноров. Так, относительное количество IL-10$^+$ клеток во фракции CD4$^+$CD25$^+$ составило соответственно 0,95±0,26% (n=13) *vs* 0,19±0,07% (n=7, p_U=0,007), а во фракции CD4$^+$CD25$^-$ клеток 1,0 ± 0,23% (n=13) *vs* 0,16 ± 0,06% (n=6, p_U=0,01). Следовательно, CD4$^+$ IL-10 продуцирующие клетки, увеличение которых регистрируется при сепсисе, могут быть представлены как CD25$^+$, так и CD25$^-$ Т-клетками.

Обсуждение

Полученные в целом данные впервые демонстрируют, что угнетение пролиферативной активности Т-клеток при сепсисе ассоциировано с накоплением регуляторных Т-клеток с супрессорной активностью. Согласно данным литературы регуляторные Т-клетки представлены гетерогенной популяцией, среди которой выделяют, по меньшей мере, естественные и индуцибельные регуляторные Т-клетки. Одним из фенотипических признаков Trn является экспрессия CD25 маркера, на основании чего данную субпопуляцию идентифицируют как CD4$^+$CD25$^+$ [15, 27]. Причем в отличие от активированных Т-клеток, которые также экспрессируют CD25, супрессорной активностью у человека обладают CD4$^+$ клетки, характеризующиеся высокой экспрессией CD25 – так называемые CD4$^+$CD25^{+high} [7]. Согласно полученным нами данным относительное количество CD4$^+$CD25$^+$ лимфоцитов, в том числе с высокой экспрессией CD25 молекул, у больных с хирургическим сепсисом в группе ареактивных пациентов значимо выше, что ассоциировано с появлением выраженной супрессорной активности МНК при их сокультивировании с клетками здоровых доноров. Кроме того, удаление CD25-позитивных лимфоцитов приводит к усилению пролиферативной активности Т-клеток, а между содержанием CD4$^+$CD25^{+high} клеток и пролиферативной активностью в культурах анти-CD3-стимулированных МНК у больных выявляется достоверная обратная корреляционная связь. Все эти факты указывают на то, что супрессорная активность МНК при сепсисе реализуется с участием Trn. Как известно, супрессорная активность CD4$^+$CD25$^+$ клеток связана с их способностью подавлять продукцию IL-2 отвечающими клетками. Поэтому в присутствии экзогенного IL-2 супрессорная активность CD4$^+$CD25$^+$ нивелируется [9]. Проведенные нами исследования показали, что добавление экзогенного IL-2 снижает супрессорный эффект МНК больных, но не отменяет его полностью, что с одной стороны указывает на вовлечение Trn, а с другой - возможное присутствие наряду с Trn других типов супрессорных клеток, например Tr1.

Табл.1. УРОВЕНЬ ПРОДУКЦИИ IL-10 В КУЛЬТУРАХ НЕСТИМУЛИРОВАННЫХ И АНТИ-CD3-АКТИВИРОВАННЫХ МНК БОЛЬНЫХ СЕПСИСОМ И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Группы	Концентрация IL-10 (пг/мл)	
	0	Анти-CD3-антитела
Доноры (n=8)	1,9 ± 0,95	32 ± 7,9
Больные (n=7)	11,6 ± 6,8	61,4 ± 10,9*

Примечание: * -Pu<0,05 – достоверность различий по сравнению с донорами, U – критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

Как известно, значительную роль в генерации и реализации супрессорной активности Tr1 играет IL-10 [20]. Поэтому добавление анти-IL-10 антител в культуру блокирует генерацию Tr1 клеток и отменяет их супрессорный эффект. При этом подобно Trn-клеткам Tr1 характеризуются состоянием анергии, т.е. не отвечают пролиферацией в ответ на стимуляцию через Т-клеточный рецептор [21, 25]. В настоящей работе показано, что супрессорной активностью у больных сепсисом со сниженной пролиферативной активностью Т-клеток обладают не только сами МНК, но и полученные от них супернатанты. Причем добавление нейтрализующих антител к IL-10 снижает супрессорную активность, опосредуемую растворимыми факторами. Эти факты указывают на возможное участие Tr1 в реализации иммуносупрессии при сепсисе. Подтверждением данного предположения являются полученные нами данные о повышенном уровне продукции IL-10 и увеличением доли CD4 Т-клеток с внутриклеточной экспрессией IL-10. Усиление продукции IL-10 Т-клетками может быть результатом Th1/Th2 переключения. Однако проведенные в работе исследования количественного содержания CD4 Т-клеток с внутриклеточной экспрессией IL-4 и IFNγ показали, что анергии в группе ареактивных больных сепсисом подвержены как Th1, так и Th2 клетки. В этом случае CD4 Т-лимфоциты с внутриклеточным содержанием IL-10 можно расценивать как Tr1 клетки.

Одновременное увеличение естественных и индуцибельных регуляторных Т-клеток представляется вполне вероятным, поскольку указанные субпопуляции Т-клеток находятся в тесных взаимоотношениях [18]. Так, известно, что Trn способствуют развитию анергии в популяции $CD4^+CD25^-$ клеток [11] и индуцируют генерацию регуляторных Т-клеток, опосредующих свою активность через продукцию IL-10 (Tr1) и TGF-β (Tr2) [10, 11, 16]. Какой из типов регуляторных Т-клеток будет генерироваться, в определенной степени зависит от экспрессии интегринов на $CD4^+CD25^+$ регуляторных клетках [17, 19]. Тот факт, что индуцированная супрессорная активность может опосредоваться через TGF-β, заслуживает на наш взгляд особого внимания [16]. Возможно именно этим обстоятельством объясняется неполное подавление супрессорной активности Т-клеток больных сепсисом в присутствие нейтрализующих антител к IL-10.

Одной из серьезных проблем являются трудности в дифференцировании естественных и индуцированных регуляторных клеток. Обе субпопуляции представлены CD4 Т-клетками, находящимися в состоянии анергии. В отношении экспрессии CD25 Tr1 клетками данные противоречивы. Некоторые авторы полагают, что CD25 экспрессируется на естественных регуляторных Т-клетках и не экспрессируется на Tr1 [27], тогда как другие полагают, что CD25 молекулы могут присутствовать на Tr1 клетках [17]. Согласно полученным нами данным CD4 Т-клетки с внутриклеточной экспрессией IL-10 обнаруживаются как среди $CD4^+CD25^+$, так и $CD4^+CD25^-$ клеток. Таким образом, маркер CD25 не может использоваться для идентификации этих субпопуляций. Одним из характерных признаков Trn является экспрессия фактора транскрипции FoxP3 [29]. Однако проведенные впоследствии исследования показали, что FoxP3 также выявляется и в субпопуляции индуцибельных регуляторных Т-клеток и, следовательно, не может быть использован для разграничения указанных субпопуляций регуляторных клеток. Таким образом, прямых маркеров, позволяющих точно разграничить количественное соотношение естественных и индуцибельных регуляторных Т-клеток на сегодняшний день не существует. Наиболее приемлемым подходом к идентификации Trn, исходя из результатов наших исследований, может быть подсчет CD4 Т-клеток с высокой экспрессией CD25 в случае, если имеются прямые или косвенные подтверждения их супрессорной активности. В свою очередь Tr1 можно идентифицировать по количеству CD4 Т-клеток с внутриклеточной экспрессией IL-10, если при этом Т-клетки характеризуются выраженным угнетением пролиферативной активности при стимуляции через Т-клеточный рецептор, и их супрессорная активность реализуется через растворимые факторы. Однако и эти подходы, по-видимому, не позволяют однозначно судить о количестве Trn и Tr1.

Вместе с тем можно с уверенностью утверждать, что при сепсисе угнетение пролиферативного ответа Т-клеток при стимуляции анти-CD3 антителами сопряжено с накоплением регуляторных Т-клеток, обладающих свойствами как Trn, так и Tr1 клеток.

Список литературы

1. Норкин М.Н., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тюрин И.Н., Останин А.А., Черных Е.Р. Роль апоптоза и анергии Т-клеток в патогенезе гнойно-септических заболеваний // Медицинская иммунология.- 2000.- Т. 2, № 1.- С. 35-42.

2. Черных Е.Р., Норкин М.Н., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Хонина Н.А., Останин А.А. Апоптоз и анергия периферических Т-лимфоцитов при гнойно-септической патологии. // Медицинская иммунология.- 1999.- Т. 1, № 5.- С. 45-51.

3. Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Курганова Е.В., Стрельцова Е.И., Останин А.А., Козлов В.А. Феномен Т-клеточной анергии при хирургическом сепсисе. // Медицинская иммунология.- 2003.- Т.- 5, № 6.- С. 529-538.

4. Astiz M., Saha D., Lustbader D., Lin R., Rackow E. Monocyte response to bacterial toxins, expression

of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis. // J. Lab. Clin. Med.- 1996.- Vol. 128, № 6.- P. 594-600.

5. Ayala A., Deol Z.K., Lehman D.L., Herdon C.D., Chaudry I.H. Polymicrobial sepsis but not low-dose endotoxin infusion causes decreased splenocyte IL-2/IFN-γ release while increasing IL-4/IL-10 production../ / J. Surg. Res.- 1994.- Vol. 56.- P. 579–585.

6. Baecher-Allan C., Brown J.A., Freeman G.J., Hafler D.A. $CD4^+CD25^{high}$ regulatory cells in human peripheral blood. // J. Immunology.- 2001.- Vol. 167.- P. 1245-1253.

7. Baecher-Allan C., Hafler D.A. Suppressor T cells in human diseases. // J. Exp. Med.- 2004.- Vol. 200, № 3.- P. 273-276.

8. Chernykh H.R., Norkin M.N., Leplina O.Yu., Khonina N.A., Tihonova M.A., Ostanin A.A. Peripheral T cell apoptosis and its role in generalized bacterial infection (mini-review) // Russian J. Immunology.- 2001.- Vol. 6, № 2.- P. 131-146.

9. Dieckmann D., Ploettner H., Berchtold S., Berger T., Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of $CD4^+CD25^+$ T cells with regulatory properties from human blood. // J. Exp. Med.- 2001.- Vol. 193, № 11.- P. 1303-1310.

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, № 2.- P. 247-253.

11. Ermann J., Szanya V., Ford G.S., Paragas V., Fathman C.G., Lejon K. $CD4^+CD25^+$ T cells facilitate the induction of T cell anergy. // J. Immunology.- 2001.- Vol. 167, № 8. – P. 4271 - 4275.

12. Fehervari Z., Sakaguchi S. $CD4^+$ Tregs and immune control. // J. Clin. Invest.- 2004.- Vol. 114, № 9.- P. 1209-1216.

13. Heidecke C.D., Hensler T., Weighardt H., Zantl N., Wagner H., Siewert J.R., Holzmann B. Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection. // Am. J. Surg.- 1999.- Vol. 178.-P. 288-292.

14. Jonuleit H., Schmitt E., Schuler G., Knop J., Enk A.H. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating $CD4^+$ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. // J. Exp. Med.- 2000.- Vol. 192.- P. 1213-1222.

15. Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M., Tuerrenberg 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, № 11.- P. 1285-1294.

16. Jonuleit H., Schmitt E., Kakirman H., Stassen M., Knop J., Enk A.H. Infectious tolerance: human $CD25^+$ regulatory T cells convey suppressor activity to conventional $CD4^+$ T helper cells. // J. Exp. Med.- 2002.- Vol. 196, №2.- P. 255-260.

17. Jonuleit H., Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. // J. Immunology.- 2003.- Vol. 164.- P. 6323-6327.

18. Karim M., Kingsley C.I., Bushell A.R., Sawitzki B.S., Wood K.J. Alloantigen-induced $CD25^+CD4^+$ regulatory T cells can develop in vivo from $CD25^-CD4^+$ precursors in a thymus-independent process. // J. Immunology.- 2004.- Vol. 172.- P. 923-928.

19. Lehmann J., Huehn J., de la Rossa M., Maszyna F., Kretschemer U., Krenn V., Brunner M., Scheffold A., Hamann A. Expression of the integrin $\alpha_E\beta_7$ identifies unique subsets of $CD25^+$ as well as $CD25^-$ regulatory T cells. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 2002.- Vol. 99.- P. 13031-13036.

20. 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.

21. 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, № 10.- P. 1335–1346.

22. Maloy K.J., Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. // Nature.- 2001.- Vol. 2, № 9.- P. 816-822.

23. Mittrьcker H.-W., Kaufmann S.H.E. Regulatory T cells and infection: suppression revisited. // Eur. J. Immunology.- 2004.- Vol. 34.- P. 306-312.

24. Rouse B.T., Suvas S. Regulatory cells and infectious agents: dйtentes cordiale and contraire. // J. Immunology.- 2004.- Vol. 173.- P. 2211-2215.

25. Schwartz R.H. T cell anergy. // Annu. Rev. Immunol.- 2003.- Vol. 21.- P. 305-334.

26. Shevach E.M. Certified professionals: $CD4^+$ $CD25^+$ suppressor T cells. // J. Exp. Med.- 2001.- Vol. 193, N 11.- P. 41–45.

27. Shevach E.M. $CD4^+CD25^+$ suppressor T cells: more questions than answers. // Nature Reviews Immunology.- 2002.- Vol. 2, № 6.- P. 389-400.

28. Thornton A.M., Shevach E.M. Suppressor effector function of $CD4^+CD25^+$ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. // J. Immunology.- 1999.- Vol. 164.- P. 183-190.

29. Yagi H., Nomura T., Nakamura K., Yamazaki S., Kitawaki T., Hori S., Maeda M., Onodera M., Uchiyama T., Fujii S., Sakagushi S. Crucial role of FOXP3in the development and function of human $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells. // International Immunology.- 2004.- Vol. 16.- P. 1643-1656.

30. Wolf A.M., Wolf D., Steurer M., Gastl G., Gunsilius E., Grubeck-Loebenstein B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. // Clin. Canser Research.- 2003.- Vol. 9.- P. 606-612.

31. Zou L., Barnett B., Safah H., LaRussa V.F., Evdomon-Hogan M., Mottram P., Wei S., David O., Curiel T.J., Zou W. Bone marrow is a reservoir for $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. // J. Canser Research.- 2004.- Vol. 64.- P. 8451-8455.

поступила в редакцию 25.10.2005
принята к печати 18.11.2005