

РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ: ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ФУНКЦИИ

Фрейдлин И.С.

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. За последние 10 лет предупреждение аутоиммунных заболеваний стали связывать с популяцией так называемых регуляторных Т-клеток (T_{reg} клеток). В данном обзоре обсуждаются молекулярные механизмы развития и функций T_{reg} клеток, включая идентификацию уникального молекулярного маркера T_{reg} клеток – фактора транскрипции – Foxp3. Обсуждаются также механизмы супрессии, к которым относятся прямые контакты через связывание поверхностных молекул CTLA-4 на T_{reg} клетках с CD80/CD86 молекулами на эффекторных Т-клетках и местную секрецию цитокинов (IL-10, TGF β). Недостаточность или дисфункция этих клеток могут вести к развитию аутоиммунных заболеваний. Эти клетки могут служить удобной мишенью при разработке новых путей индукции или отмены иммунологической толерантности к «своим» и «не своим» антигенам.

Ключевые слова: регуляторные Т-клетки, иммуносупрессия

Freidlin I.S.

REGULATORY T-CELLS: ORIGIN AND FUNCTION

Abstract. Over the past decade a population of so-called “regulatory T cells” (T_{reg} cells) has been linked to the prevention of autoimmunity. In this review we discuss the molecular mechanisms of T_{reg} cells development and function including the identification of the unique molecular marker of T_{reg} cells – the transcription factor Foxp3. We discuss also the mechanisms of suppression, which include the direct cell contact through binding of cell surface molecules CTLA-4 on T_{reg} cells to CD80/CD86 molecules of effector T cells and the local secretion of cytokines (IL-10, TGF β). Deficiency in or dysfunction of these cells can be a cause of autoimmune disease. These cells are a good target for designing ways to induce or abrogate immunological tolerance to self and non-self antigens. (*Med. Immunol., 2005, vol.7, № 4, pp 347-354*)

Обнаружение на периферии аутореактивных клонов Т-лимфоцитов, потенциально способных вызывать аутоиммунные заболевания, заставляет подозревать, что там же на периферии должны существовать механизмы, обеспечивающие поддержание ауто толерантности.

Концепция супрессорных Т-клеток возникла, когда было показано, что стимуляция иммунной системы тимусзависимым антигеном может вызвать продукцию Т-клеток, которые подавляют дифференцировку Т-хелперов или антигенспецифических эффекторов. Существовавшие долгие годы представления о Т-супрессорах с фенотипом CD8⁺ к 1988 г. были дискредитированы. В последующие годы в свя-

зи с развитием концепции дихотомии Th1/Th2 наиболее привлекательной казалась гипотеза взаимной регуляции этих двух субпопуляций, продуцирующих цитокины с альтернативной биологической активностью: IL-4 ингибирует некоторые типы Th1-опосредованного иммунного ответа, IFN γ ингибирует Th2-опосредованный ответ.

Начиная с 1995 г. появились описания вновь идентифицированных Т-регуляторных клеток (T_{reg} -клеток) среди CD4⁺ Т-клеток, конститутивно экспрессирующих молекулу CD25, которые отличались по продукции цитокинов от Th1 и Th2, были способны супрессировать функции и Th1, и Th2, блокировать аутоиммунную патологию, обеспечивая доминантную иммунологическую толерантность к собственным антигенам. Было показано, что периферическую ауто толерантность поддерживают CD25⁺CD4⁺ T_{reg} -клетки, которые активно супрессируют активацию и экспансию потенциально патогенных аутореактивных Т-клеток, присутствующих в норме в иммунной системе. Среди поверхностных молекул, найденных

Адрес для переписки:

Фрейдлин Ирина Соломоновна
197376, Санкт-Петербург, ул.Акад.Павлова, д.12
Отдел иммунологии
Тел. (812)234-29-29
E-mail: irinaf@sptmu.rssi.ru

на CD4⁺ регуляторных клетках (CD5, CD45RB, CD25, CD62L, CD38), экспрессия CD25 оказалась наиболее постоянной и наиболее характерной для протективной роли этих клеток при аутоиммунных заболеваниях [1].

У не иммунизированных людей и мышей экспрессия CD25 может служить маркером субпопуляции T_{reg}-клеток. Но при иммунном ответе на инфекцию или при аутоиммунном заболевании на активированных не регуляторных Т-клетках усиливается экспрессия CD25, CTLA-4 и других молекул, характерных для поверхностного фенотипа T_{reg}-клеток. Поэтому роль CD25 как маркера T_{reg}-клеток становится сомнительной. В связи с этим возникла необходимость поиска особого молекулярного маркера T_{reg}-клеток, который бы позволил проводить надежную идентификацию этих клеток. С поисками такого маркера тесно связан вопрос, являются ли T_{reg}-клетки отдельной субпопуляцией или образуются в результате изменения фенотипа Т-лимфоцитов под влиянием факторов микроокружения. Проведенный "агау"- анализ экспрессии генов T_{reg}-клеток показал большое разнообразие маркеров, но ни один из них не является уникальным только для этих клеток.

Фохр3 в качестве маркера T_{reg}-клеток.

Ответ был получен при изучении дефекта (мутации) гена, кодирующего Фохр3, как причины фатального аутоиммунного заболевания – Х-ассоциированной иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии, энтеропатии (IPEX). В возрасте 3-4 недель у таких больных наблюдается массивная лимфопролиферация, IDM, тиреоидит, экзема, энтеропатия, пищевая аллергия, гемолитическая анемия, тромбоцитопения, тяжелые инфекции. Вышеназванная мутация была воспроизведена у мышей с последующим развитием сходной клинической картины. При этом была обнаружена поликлональная активация CD4⁺Т-клеток и в меньшей степени – CD8⁺Т-клеток, усиление продукции провоспалительных цитокинов. У трансгенных по этому гену мышей снижалось количество Т-клеток, а оставшиеся не отвечали на связывание Т-клеточного рецептора (TCR). Возникло предположение, что Фохр3 опосредует общий механизм негативной регуляции Т-клеток.

Фохр3 принадлежит к большому семейству функционально различных факторов транскрипции и имеет ДНК-связывающую область (fork-head box – Fox). Эти белки классифицируются в субсемейства, обозначенные цифрами. Их структура свидетельствует о высокой консервативности функций.

Связываясь с ДНК, Фохр3 действует как репрессор транскрипции, выступая антагонистом функций NFAT за счет конкуренции за места связывания с ДНК. В результате Фохр3 ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов.

Была показана высокая экспрессия Фохр3 у CD25⁺CD4⁺ T_{reg}-клеток и низкая – у других Т-клеток. Развитие T_{reg}-клеток критически зависит от эк-

спрессии Фохр3. Менее 10% CD25⁺CD4⁺ Т-клеток экспрессируют Фохр3 и отвечают на стимуляцию через TCR экспрессией CD25 и Фохр3^{hi}, приобретая активность T_{reg}-клеток. Но их происхождение и связь с CD25⁺ T_{reg}-клетками не изучены.

Таким образом, был открыт специальный генетический механизм доминантной толерантности, опосредованной белком Фохр3 и защищающей организм от аутоиммунных заболеваний и хронических инфекций. Доказано, что T_{reg}-клетки это особая линия (субпопуляция) Т-клеток, выполняющая жизненно важные функции медиаторов иммунологической толерантности, а фактор транскрипции Фохр3 является наиболее характерным и единственным надежным маркером T_{reg}-клеток [7].

Фохр3 является ключевым контрольным геном в развитии и функциях T_{reg}-клеток. Субпопуляция Фохр3⁺CD25⁺CD4⁺ T_{reg}-клеток активно участвует в негативном контроле разных форм иммунного ответа. Естественные периферические T_{reg}-клетки CD25⁺CD4⁺ конститутивно экспрессируют Фохр3 в отличие от других Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, NK и NKT. Этот механизм доминантной ауто толерантности является физиологической функцией организма.

Главная новизна современных представлений об иммуносупрессии состоит в том, что нормальная иммунная система эндогенно продуцирует в качестве нормальной субпопуляции CD4⁺ Т-клетки, высоко специализированные на супрессорных функциях. Большая часть эндогенных T_{reg}-клеток продуцируются в нормальном тимусе как функционально отличные, зрелые Т-клетки (естественные T_{reg}-клетки), а меньшая часть T_{reg}-клеток индуцируются из наивных Т-клеток после их встречи с антигеном на периферии (адаптивные T_{reg}-клетки) [14].

Ответ T_{reg}-клеток на связывание TCR с антигеном.

TCR-репертуар T_{reg}-клеток не менее широк, чем у CD4⁺CD25⁺ Т-клеток. Имея достаточно обширный репертуар специфичностей TCR, T_{reg}-клетки характеризуются преимущественным распознаванием собственных пептидов. Они способны распознавать аутоантигены при аутоиммунных заболеваниях, туморассоциированные антигены и аллогенные трансплантационные антигены [14].

Регуляторные CD4⁺CD25⁺ клетки при связывании TCR с соответствующим антигеном, как правило, не пролиферируют и не продуцируют IL-2, но приобретают способность ингибировать пролиферацию и продукцию цитокинов Т-клетками эффекторами [7].

T_{reg}-клетки приобретают супрессивную активность после связывания TCR с соответствующим антигеном. После связывания TCR с антигеном при участии костимулирующей молекулы CD28 и только в присутствии очень высоких концентраций IL-2 T_{reg}-клетки проявляют способность к самовоспроизведению, что позволяет предполагать возможность их клональной экспансии в условиях *in vivo*.

Описаны несколько вариантов поверхностных фенотипов T_{reg} -клеток: $CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD25^+CD62L$, $CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$. Т-клетки с фенотипом $CD4^+CD25^+$, $CD45RB^{low}$ присутствуют в нормальной иммунной системе и активно супрессируют аутореактивность. Среди $CD4^+CD25^+$ Т-клеток супрессивность ассоциирована с экспрессией $CD25^{high}$ и коррелирует с экспрессией ингибирующего рецептора CTLA-4 и TNFR.

К семейству поверхностных молекул CD28 кроме CTLA-4 принадлежит еще один ингибирующий рецептор – PD-1. Среди других поверхностных маркеров T_{reg} -клеток отмечены разные мембранные представители семейства TNF: OX40, 4-1BB, GITR (глюкокортикоид-индуцированный TNFR). Сравнительно недавно был описан маркер из семейства интегринов – α_{IEL} .

При низкой пролиферативной активности T_{reg} -клетки экспрессируют нормальные уровни Т-клеточных маркеров активации CD25, CD40L, CD69, HLA-DR, CTLA-4. После активации через TCR T_{reg} -клетки экспрессируют хемокиновый рецептор CCR7.

Основные особенности T_{reg} -клеток: сниженная способность отвечать на сигналы пролиферации и способность ингибировать функции других клеток иммунной системы при непосредственном контакте или опосредованно через секрецию противовоспалительных цитокинов: IL-10, IL-4, TGF β .

T_{reg} -клетки с фенотипом $CD4^+CD25^+$ были описаны среди наивных Т-клеток. В отличие от мышинных $CD4^+CD25^+$ Т-клеток человеческие T_{reg} -клетки активно продуцировали IL-10. Непосредственно из человеческой крови были выделены $CD4^+CD25^+$ Т-клетки с регуляторными свойствами. Они не пролиферировали и супрессировали активацию обычных $CD4^+CD25^-$ Т-клеток. Анергичный статус T_{reg} -клеток удавалось частично преодолеть при добавлении IL-2 или IL-4, но не анти-CD3 или анти-CD28 антител. Такие T_{reg} -клетки составляли от 5 до 10% периферических Т-клеток. Человеческие T_{reg} -клетки не отвечали пролиферацией на контакт с дендритной клеткой, экспрессирующей костимулирующие молекулы и продуцирующей IL-12, IL-15, IL-18. Человеческие T_{reg} -клетки с фенотипом $CD4^+CD25^+$ экспрессировали mPNC для IL-10 и TGF β , но не IL-4.

Из человеческой крови были выделены $CD4^+CD25^{high}$ Т-клетки, которые при активации через TCR не отвечали пролиферацией, а вместо этого тотально ингибировали контактным путем пролиферацию и секрецию цитокинов активированными $CD4^+CD25^-$ Т-клетками. Такие T_{reg} -клетки $CD4^+CD25^{high}$ экспрессировали высокие уровни CD45RO, но не CD45RA. Перекрестное связывание CD28 или добавление IL-2 при максимальной анти-CD3 – стимуляции вело к слабой индукции пролиферации и к утрате супрессирующего действия на $CD4^+CD25^-$ Т-клетки.

Механизмы супрессорного действия $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -клеток включают:

- прямой контакт через связывание молекулы CTLA-4 на T_{reg} -клетках с CD80/CD86 молекулами на активированных клетках-эффекторах или на антигенпрезентирующих клетках (АПК),

- секрецию ингибирующих цитокинов (TGF β , IL-10).

- дополнительный механизм супрессии – цитолитическая активность.

$CD4^+CD25^+$ T_{reg} -клетки могут селективно супрессировать разные свойства Т-эффекторов: секрецию цитокинов, экспрессию хемокиновых рецепторов, цитолитическое действие, т.е. они обратимо интерферируют с TCR- сигналами проксимально в отношении разных факторов транскрипции, индуцирующих разные функции [16].

Предполагается существование двух субпопуляций $CD4^+$ T_{reg} -клеток: естественных и адаптивных.

Субпопуляция естественных T_{reg} -клеток.

Субпопуляция естественных T_{reg} -клеток формируется в тимусе. Продукция T_{reg} -клеток была названа третьей функцией тимуса. Предшественники T_{reg} -клеток были выявлены в тимусе среди $CD4^+CD25^+$ клеток. Для развития T_{reg} -клеток в тимусе решающими являются сигналы от TCR. В естественных условиях взаимодействие незрелых Т-клеток с антигеном, презентированным тимическим эпителием, ведет к развитию $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -клеток. T_{reg} -клетки усиленно экспрессируют факторы выживаемости CD5, PD-1, CTLA-4, OX40, GITR, что согласуется с повышенной аффинностью их TCR к комплексам собственных пептидов с МНС. Формирование естественной субпопуляции T_{reg} -клеток индуцируется ответом аутореактивных TCR с высокой авидностью на комплексы собственных пептидов с МНС примерно в тех же условиях, при которых происходит позитивная и негативная селекция. Принадлежность T_{reg} -клеток к $CD4^+$ Т-клеткам объясняется тем, что именно $CD4^+$ Т-клетки индуцируются сигналами от TCR повышенной силы и продолжительности. T_{reg} -клетки более резистентны к TCR-индуцированному апоптозу и их количество может увеличиваться за счет избирательной элиминации не регуляторных $CD4^+$ Т-клеток. Возможно, в дальнейшем эпителиальные клетки тимуса поддерживают дифференцировку T_{reg} -клеток.

Формирование естественной субпопуляции T_{reg} -клеток зависит не только от TCR, но и от костимулирующих молекул CD28, взаимодействующих с CD80/CD86. От них зависит величина пула T_{reg} -клеток. Сигнал через CD28 критичен для генерации в тимусе $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -клеток. Дефекты CD28 и B7 ведут к недостаточности T_{reg} -клеток и к развитию аутоиммунных заболеваний.

Цитокиновые сигналы безусловно влияют на развитие T_{reg} -клеток в тимусе. Высокие концентрации TGF β индуцируют приобретение регулирующих функций TCR-стимулированными Т-клетками *in vitro*, а *in vivo* он влияет на количество и функциональную активность T_{reg} -клеток. Сигналы IL-2 –

IL2R способствуют развитию и экспансии T_{reg} -клеток. Источником IL-2 служат другие Т-клетки, в том числе, аутореактивные. Таким образом IL-2 обеспечивает контроль с обратной связью между Т-эффекторами и T_{reg} -клетками, которые, в свою очередь, ингибируют продукцию этого цитокина [14].

На мышах было показано, что CD25 экспрессируют 5-10% $CD4^+$ Т-клеток и 5% $CD4^+CD8^-$ тимоцитов у нормальных наивных мышей. Молекула CD25 играет большую роль в процессах генерации, выживания и функциях T_{reg} -клеток. Дефицит IL-2 или CD25 приводит к фатальной лимфолипролиферации с аутоиммунными компонентами на фоне селективного снижения количества $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -клеток в тимусе и на периферии при сохранении нормального состава других $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток. У мышей без CD25 усиливается иммунный ответ на аутоантигены и аллотрансплантацию. Нейтрализация IL-2 ингибирует физиологическую пролиферацию T_{reg} -клеток в ответ на нормальные аутоантигены. IL-2 необходим для активации T_{reg} -клеток и поддержания экспрессии CD25. Мыши, дефектные по IL-2 или IL-2R, страдают не от иммунодефицита, а от тяжелых аутоиммунных заболеваний, которые излечиваются при введении $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -клеток, т.е. эти мыши дефектны и по T_{reg} -клеткам, которые не развиваются без IL-2. После искусственного уменьшения числа $CD25^+$ Т-клеток с помощью антисыворотки наблюдали усиление иммунного ответа на вирусы или опухолевые антигены [16].

Естественные T_{reg} -клетки предупреждают иммунный ответ против аутоантигенов, это физиологический конститутивный механизм доминантной толерантности к собственным антигенам. Возможно, что генетически детерминированная повышенная чувствительность к аутоиммунным заболеваниям ассоциирована с дефектностью естественных T_{reg} -клеток, которые в норме поддерживают ауто толерантность. Так, при диабете I типа или рассеянном склерозе избирательно снижено количество естественных T_{reg} -клеток [4].

Естественные T_{reg} -клетки могут дифференцироваться в адаптивные под влиянием IL-10, но и Т-хелперы могут дифференцироваться в T_{reg} -клетки под влиянием TGF β или IL-10.

Контакты с собственными аутоантигенными пептидами в тимусе способствуют формированию репертуара $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -клеток. Для развития естественных T_{reg} -клеток в тимусе требуется участие костимулирующей молекулы CD40. Многие считают CD25 их критическим поверхностным маркером. Другие маркеры, например, CD38, CD62L (L-селектин), CD103 также встречаются достаточно часто. Субпопуляция $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -клеток, которая характеризуется конститутивной экспрессией CD25, супрессирует иммунный ответ через механизмы, не связанные с цитокинами.

In vitro супрессия зависит от межклеточного контакта. Связывание B7 с CTLA-4 на T_{reg} -клетках рассматривается как один из важных механизмов суп-

рессии. Кроме того, активированные T_{reg} -клетки могут убивать активированные $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоциты перфорин – грензимным путем. Возможно использование T_{reg} -клетками разных механизмов иммуносупрессии.

Для взаимодействия необходима колокализация T_{reg} -клеток с Т-эффекторами в разных тканях. Миграция и хоминг T_{reg} -клеток должны совпадать с миграцией и хомингом Т-эффекторов. $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -клетки, коммитированные к супрессии после контакта с антигеном в тимусе или вне тимуса, могут выживать длительно без деления клеток вне контакта со специфическим антигеном. Такие клетки экспрессируют L-селектин (CD62L) и циркулируют как наивные Т-клетки. Они могут оседать в лимфоузлах и при контакте со своим антигеном могут начать пролиферировать. При этом T_{reg} -клетки эффективно супрессируют иммунный ответ и препятствуют выходу Т-эффекторов в очаг воспаления, снижая экспрессию их хемокиновых рецепторов CXCR3. В результате продолжения антигенной активации T_{reg} -клетки, как и Т-эффекторы, могут изменять свой поверхностный фенотип для выхода в очаг воспаления, где они супрессируют местное воспаление, подавляя эффекторные свойства Т-клеток [16].

Естественные T_{reg} -клетки рассматриваются как антиген-специфические Т-супрессоры, которые после распознавания антигена могут действовать через CTLA-4 – ингибирующие рецепторы, супрессируя Т-клеточную активность. От экспрессии молекул CD28 и CTLA-4 зависит соотношение функций супрессоров и контрсупрессоров в данной популяции [1].

На поверхности наивных Т-клеток CD28 экспрессируется конститутивно, а CTLA-4 транскрибируется только после стимуляции, т.е. через 1-2 дня после активации TCR. Особенностью $CD25^+CD4^+$ T_{reg} -клеток является конститутивная экспрессия высокого уровня CTLA-4.

В качестве профессионального ингибиторного рецептора CTLA-4 подавляет Т-клеточный ответ, конкурируя за связывание одних и тех же лигандов (CD80/CD86) с позитивным костимулирующим рецептором CD28. Движение и поверхностная экспрессия CTLA-4 динамически регулируются. CTLA-4 накапливается в лизосомах и секретируется к месту контакта Т-клетки с АПК после стимуляции TCR. CTLA-4 опосредует негативную регуляцию с обратной связью при активации Т-клеток.

CTLA-4 имеет в 10-20 раз более высокую аффинность по сравнению с CD28 для связывания CD80/CD86. При этом CD80 имеет большее сродство к CTLA-4, а CD86 к CD28 [13].

Возможны различные варианты вклада CTLA-4 в осуществление T_{reg} -клетками негативной регуляции. CTLA-4 на T_{reg} -клетках может трансдуцировать костимулирующий сигнал, т.е. CTLA-4 вместе с TCR активируют T_{reg} -клетки для оказания супрессорного действия. Другая функция CTLA-4 – опосредование супрессии при взаимодействии с CD80/CD86 на

дендритных клетках через индукцию синтеза последними фермента индоламина 2,3-диоксигеназы, который катализирует превращение триптофана в кинуренин и др. метаболиты, оказывающие супрессирующее действие в их микроокружении. CTLA-4 на T_{reg} -клетках может, связывая CD80/CD86 на Т-эффекторах, прямо трансдуцировать негативный сигнал [14]. Связывание молекул CD80/CD86 с CD28 индуцирует костимулирующий позитивный сигнал, способствующий активации Т-клеток после связывания TCR. Связывание молекул CD80/CD86 с CTLA-4 индуцирует негативный сигнал, ингибирующий пролиферацию, функциональную активность Т-клеток и продукцию ими IL-2. В качестве ингибиторного рецептора CTLA-4 служит антагонистом костимулирующих сигналов, в частности, ингибирует повышенный метаболизм глюкозы, индуцированный костимулирующей молекулой CD28 [8].

Следует отметить особенности ингибирующих рецепторов Т-клеток по сравнению с ингибирующими рецепторами других клеток. NK имеют несколько ингибирующих рецепторов, несущих ITIMs – последовательности на цитоплазматических концах молекул, их лигандами служат молекулы MHC I. В лимфоцитах имеют $Fc\gamma RIIb$ в качестве ингибирующего $Fc\gamma R$, который также связан с ITIMs – последовательностями в цитоплазматическом фрагменте. А у Т-клеток ингибирующий рецептор CTLA-4 служит антагонистом костимулирующих сигналов [13].

Дополнительный цитотоксический механизм иммуносупрессирующего действия T_{reg} -клеток проявляется значительно реже. Человеческие $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T_{reg} -клетки могут быть активированы сочетанием CD3 и CD46 – антител к экспрессии грензима А и убивают активированные $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки перфорин-зависимым механизмом без участия Fas – FasL связывания. Но аналогичного действия антигена не показано. Цитотоксическое действие T_{reg} -клеток и апоптоз Т-эффекторов *in vivo* мало вероятны. При отделении от T_{reg} -клеток у Т-эффекторов восстанавливается пролиферация и продукция IL-2, IFN γ . То есть супрессирующее действие T_{reg} -клеток обратимо. Но вместе с тем, T_{reg} -клетки могут создавать среду, в которой Т-эффекторы превращаются в T_{reg} -клетки, начиная продуцировать TGF β или IL-10 [16].

Разные костимулирующие молекулы и цитокины контролируют тимическое развитие, выживание на периферии и активацию естественных T_{reg} -клеток, меняя интенсивность опосредованной T_{reg} -клетками супрессии и поддерживая аутоотолерантность на стабильном уровне.

Субпопуляция адаптивных T_{reg} -клеток.

Адаптивные T_{reg} -клетки могут дифференцироваться на периферии из предшественников общих с Т-эффекторами при условии субоптимальной презентации антигена и недостаточной костимуляции. На периферии наивные Т-клетки могут трансформироваться в $CD4^+CD25^+$ при неполноценной пре-

зентации аутоантигенов, связанной с недостатком костимуляции. Для T_{reg} -клеток характерна экспрессия поверхностных молекул CD4, CD25, CTLA-4, GITR, CD28. Для развития T_{reg} -клеток нужны костимулирующие молекулы CD80/CD86, CD28 или CD40/CD40L. Субоптимальная стимуляция Т-клеток в случае презентации антигена в отсутствие костимулирующих факторов ведет к индукции T_{reg} -клеток. Так например, блокада CD40/CD40L-костимуляции на экспериментальной модели диабета ведет к индукции T_{reg} -клеток.

Другой способ генерации T_{reg} -клеток – презентация антигена незрелыми дендритными клетками. Так например, человеческие T_{reg} -клетки получали после повторной стимуляции $CD4^+$ Т-клеток из пуповинной крови незрелыми дендритными клетками моноцитарного происхождения. Дифференцировка T_{reg} -клеток контролируется особыми дендритными клетками, которые способствуют продукции IL-10 и могут экспрессировать толерогенные костимулирующие молекулы [10]. Зрелые наивные Т-клетки на периферии, получившие «неполную стимуляцию» от незрелых дендритных клеток, дифференцируются в T_{reg} -клетки [12]. Описана особая субпопуляция T_{reg} -клеток $CD4^+$, экспрессирующих высокий уровень CD25, присутствие которых в человеческой крови, может вести к изменениям в соотношениях субпопуляций Т-клеток и к индукции аутоиммунных заболеваний. Такие $CD4^+CD25^{high}$ Т-клетки не секретируют IFN γ , IL-13, IL-10 ни при какой стимуляции, но скорее способны ингибировать секрецию IFN γ , IL-13 в кокультурах с активированными $CD4^+$ Т-клетками. Их супрессорный механизм не зависит от цитокинов (IL-10, TGF β). Эти клетки экспрессируют HLA-DR, что делает возможной Т-Т – презентацию с последующим развитием анергии [3].

Адаптивные $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -клетки были получены при культивировании $CD4^+$ Т-клеток с АПК, презентующими антиген в присутствии IL-10. Уровень экспрессии CD25 у них варьировал. Их супрессирующее действие является цитокин-зависимым.

Некоторые пути введения антигена (например, оральный или интраназальный) селективно индуцируют появление T_{reg} -клеток. Эти T_{reg} -клетки функционируют только после дополнительной экспозиции антигена. Они могут быть не зависимы от CD28-посредничества. При попадании аутоантигена через рот в грудном возрасте (например, попадание инсулина и других компонентов грудного молока) может индуцироваться дифференцировка T_{reg} -клеток. Другой причиной может быть молекулярная мимикрия аутоантигена с чужеродным антигеном микробного происхождения. Возможно, что антигенная мимикрия может активировать не только Т-эффекторы, но и T_{reg} -клетки, которые сформировались в тимусе при распознавании аутоантигенов. Индукция T_{reg} -клеток, как правило, происходит в областях, разграничивающих внутреннюю среду («свое») от внешней среды («не свое»), куда относятся кожные и слизис-

тые покровы. В МАЛТ дендритные клетки преимущественно индуцируют T_{reg} -клетки благодаря продукции IL-10, IL-4, TGF β . Возможно, что CD8 $^{+}$ $\gamma\delta$ IELs оказывают влияние на дендритные клетки слизистой, которые становятся толерогенными, что ведет к генерации CD4 $^{+}$ T_{reg} -клеток, которые могут конкурировать с аутоагрессивными Т-эффекторами за связывание антигена [17].

Как правило, адаптивные T_{reg} -клетки продуцируют IL-10, IL-4, TGF β и низкий уровень IFN γ . Ингибирующая активность CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ клеток антиген-специфична и опосредована блокадой транскрипции гена IL-2 у CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ клеток. Ингибция нивелируется при добавлении IL-2.

Зависимость супрессивного действия большинства адаптивных T_{reg} -клеток от влияния цитокинов не вызывает сомнений. Цитокины могут подавлять иммунный ответ, особенно, аутоиммунный ответ и в меньшей степени – аллоиммунный ответ. TGF β и IL-10 ингибируют Th1 и Th2 – опосредованный ответ *in vivo*. Более широким спектром супрессирующего действия обладает TGF β , судя по результатам, полученным на экспериментальных моделях [2].

Точкой приложения супрессирующего действия может служить транскрипционный контроль продукции IL-2 эффекторными клетками, или T_{reg} -клетки конкурентно связывают IL-2, т.к. экспрессируют большее количество IL-2R. Конкуренция за IL-2 может вести к супрессии пролиферации эффекторных клеток [1].

Человеческие CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Т-клетки слабо пролиферируют и слабо синтезируют IL-2 в ответ на стимуляцию ФГА или антиCD3 антителами. Их удается вывести из анергии при добавлении IL-2 или IL-15. Эти клетки способны супрессировать пролиферацию и продукцию IL-2 Т-клетками CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ контактным путем. Они же продуцируют IL-10 и TGF β , но не продуцируют IFN γ и IL-4. Те же клетки могут супрессировать CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ Т-клетки с участием секреции IL-10 или TGF β [6].

Ингибирующее действие адаптивных T_{reg} -клеток часто связано с продукцией IL-10 и TGF β . Однако супрессирующий эффект опосредован не только через продукцию IL-10. CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Т-клетки угнетают созревание и антигенпрезентирующие функции дендритных клеток, что проявляется снижением экспрессии костимулирующих молекул при одновременном усилении секреции IL-10 и TGF β [11].

При хронической антигенной стимуляции CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ Т-клетки приобретают способность секретировать IL-10 и этим супрессировать иммунный ответ. Такие клетки были обозначены T_R1 . Но не исключено, что, что CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T_{reg} -клетки тоже секретируют IL-10. То есть T_{reg} -клетки могут использовать разные механизмы супрессии при разных локализациях и разных процессах.

IL-10 и TGF β влияют на дифференцировку цитокин-продуцирующих CD4 $^{+}$ T_{reg} -клеток. От экспрессии IL-10R зависит ответ клеток на IL-10. Так, на ак-

тивированных Т-клетках экспрессия IL-10R снижена и они резистентны к ингибирующим эффектам IL-10. А на активированных моноцитах экспрессия IL-10R повышена. Например, дендритные клетки у больных ревматоидным артритом резистентны к ингибирующим эффектам IL-10 из-за недостаточной экспрессии рецепторов. IL-10 и TGF β создают условия для дифференцировки T_{reg} -клеток, продуцирующих те же цитокины.

IL-10 предупреждает чрезмерный, опасный воспалительный ответ на патогенные микроорганизмы: он подавляет продукцию всех провоспалительных цитокинов и хемокинов и усиливает экспрессию натуральных агонистов, ингибирует экспрессию костимулирующих молекул CD80/CD86, МНСII, т. е. подавляет функции АПК.

TGF β реализует ингибирующий эффект через активацию SMAD – семейства транскрипционных факторов. TGF β оказывает антипролиферативное действие на CD4 $^{+}$ Т-лимфоциты благодаря способности ингибировать продукцию IL-2 и усиливать продукцию ингибиторов клеточного цикла. TGF β блокирует дифференцировку Th1 и Th2 через ингибцию факторов транскрипции, необходимых для экспрессии IFN γ (t-bet) и IL-4 (GATA-3). На уровне АПК TGF β ингибирует активацию макрофагов и их способность продуцировать провоспалительные цитокины. Он препятствует созреванию дендритных клеток и, как и IL-10, ингибирует усиление экспрессии МНСII. Эти два цитокина являются синергистами, продукция и эффекты этих цитокинов тесно взаимосвязаны. IL-10 не только повышает продукцию TGF β , но и контролирует способность клеток отвечать на TGF β . Анергический статус Т-клеток, вызванный IL-10, не компенсируется при добавлении IL-2 (или IL-15), т.е. это состояние отличается от блокады костимуляторов. Анергизированные под влиянием IL-10 Т-клетки приобретают регуляторную активность и супрессирующее действие на пролиферацию Т-клеток. Такие клетки не продуцируют цитокинов, но в ответ на анти-CD3-стимуляцию дифференцируются в T_{reg} -клетки, продуцирующие IL-10 и TGF β . Возможно участие TGF β в этих эффектах IL-10.

TGF β способствует генерации и пролиферации CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T_{reg} -клеток. TGF β и IL-10 могут быть вовлечены в опосредованную T_{reg} -клетками регуляцию, либо усиливая пролиферацию и дифференцировку T_{reg} -клеток, либо делая другие клетки более чувствительными к супрессии.

Связанный с мембраной TGF β в комбинации с CTLA-4 вносит свой вклад в супрессивную активность CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Т-клеток. Супрессирующее действие T_{reg} -клеток на CD8 $^{+}$ Т-клетки зависит от сохранности TGF β -RII на CD8 $^{+}$ Т-клетках. Только в этом случае супрессируется цитолитическая функция CD8 $^{+}$ Т-клеток.

Все субпопуляции T_{reg} -клеток и продуцируемые ими цитокины активно регулируют периферическую толерантность [10].

Роль T_{reg} -клеток при иммунопатологических процессах.

Многие исследователи считают синонимами: супрессорные Т-клетки и $CD4^+CD25^+$. Однако были описаны подобные эффекты и у Т-клеток $CD4^+CD25^-$. На TCR-трансгенных экспериментальных моделях ЕАЕ, спонтанного диабета и др. было показано одинаково выраженное протективное действие $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^-$ Т-клеток. Следует учитывать, что в популяциях Т-клеток уровень экспрессии CD25 может изменяться, в частности под влиянием IL-2. Нокаут-мыши $CD2^{-/-}$ и $CD25^{-/-}$ имеют выраженный дефект T_{reg} -клеток. То есть высокоаффинная сигнализация IL-2 необходима для поддержания функций T_{reg} -клеток.

T_{reg} -клетки регулируют синтез антител против аутоантигенов. BCR-активированные В-клетки продуцируют CCL4 и привлекают $CD4^+CD25^+$ Т-клетки, которые лимитируют аутоиммунный ответ. Уменьшение количества или дисфункции естественных T_{reg} -клеток ведут к аутоиммунным заболеваниям из-за срыва аутоотолерантности.

При атопии T_{reg} -клетки ингибируют развитие Т-клеток в направлении Th2, секретирующих IL-4. При поступлении аллергена через слизистые дендритные клетки, секретирующие IL-10, могут индуцировать $CD4^+$ T_{reg} -клетки. IL-4 может переключать синтез Ig не только на IgE, но и на IgG4. У аллергиков, прошедших курс иммунотерапии пчелиным ядом, наблюдали IL-10-зависимую анергию, т.е. индукцию T_{reg} -клеток [12].

При туберкулезе отсутствие ГЗТ на антигены микобактерий рассматривается как анергия и сопровождается плохим клиническим прогнозом. Среди 200 больных с легочным туберкулезом были выявлены анергики с отрицательной реакцией на PPD. In vitro стимуляция клеток PPD индуцировала продукцию IL-10, IFN γ и пролиферацию у PPD $^+$ больных, а у анергиков – продукцию IL-10, но не IFN γ при отсутствии пролиферации. У анергиков конститутивно присутствовали IL-10-продуцирующие клетки. В присутствии IL-10 в условиях хронической инфекции могут дифференцироваться T_{reg} -клетки, продуцирующие IL-10. Повышенный уровень IL-10 способствует персистенции возбудителей. Возможно, и другие персистирующие возбудители вызывают анергию подобным образом [5].

Один из механизмов вирус-индуцированной иммуносупрессии – генерация экспансии $CD4^+$ регуляторных Т-клеток. В норме такие клетки активно супрессируют ответ на аутоантигены и могут защищать от развития аутоиммунного заболевания. Но неограниченное их накопление ведет к иммуносупрессии. В частности, $CD4^+$ регуляторные Т-клетки ингибируют активность $CD8^+$ CTL. Характерным для T_{reg} -клеток считается фенотип $CD4^+CD69^+$. К механизмам иммуносупрессии относят секрецию TGF β при сигнализации через CD152 (CTLA-4). Вовлечение IL-10 не столь характерно. В качестве маркеров T_{reg} -клеток описаны CD25 и CD38, кото-

рые являются и маркерами активации. В частности у больных HIV-инфекцией было выявлено существенное повышение $CD4^+$ Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD38 [9].

$CD4^+CD25^+$ T_{reg} -клетки контролируют роль CTL в противоопухолевом иммунитете. Супрессирующий эффект опосредован через секрецию TGF β . TGF β индуцирует $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -клетки, которые препятствуют пролиферации $CD8^+$ Т-клеток в ответ на аллоантигены и препятствуют дифференцировке в CTL. Многие опухолевые клетки сами способны продуцировать TGF β [15]. Эффективность противоопухолевой вакцинации возрастает в случае одновременного угнетения T_{reg} -клеток, например, введением моноклональных антител против CTLA-4 или GITR.

Естественные T_{reg} -клетки спонтанно отвечают аллоантиген-специфической экспансией in vivo при пересадке трансплантата. Это позволяет индуцировать органо-специфическую иммунологическую толерантность

Т-эффекторы могут приобретать устойчивость к супрессии T_{reg} -клетками в присутствии активированных АПК или их продуктов (IL-6). Кроме того, у естественных $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -клеток выявлена повышенная экспрессия TNF-R (GITR), которые у других клеток появляются лишь в ответ на активацию. В сочетании с TCR-сигналами они ослабляют супрессирующее действие при связывании со своим лигандом, который экспрессируют незрелые дендритные клетки, макрофаги, В-клетки. Этот TNF-R присутствует и на Т-эффекторах, что снижает их чувствительность к супрессии.

Другими рецепторами, снижающими эффективность супрессии, являются Toll-подобные рецепторы (TLR), которые активируют ответ Т-эффекторов путем блокады супрессии. IL-6, секретируемый TLR-активированными дендритными клетками, делает наивные Т-клетки устойчивыми к супрессии, заставляя их отвечать на инфекцию. $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -клетки селективно экспрессируют TLR4, через который высокие концентрации ЛПС могут непосредственно активировать их пролиферацию и функции.

Кроме $CD4^+CD25^+$ Т-клеток в качестве кандидатов на роль T_{reg} -клеток рассматривались: NK-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки. Регуляторные клетки с фенотипом $CD8^+CD28^-$ супрессируют аллореактивность Т-клеток, а $CD8^-CD28^+$ клетки супрессируют $CD8^+CD28^+$ CTL при отторжении трансплантата. NK-клетки являются продуцентами ряда цитокинов, выполняющих иммунорегуляторные функции.

Заключение

Естественно возникающие T_{reg} -клетки активно поддерживают иммунологическую аутоотолерантность. Дефицит или дисфункция этих клеток могут стать причинами аутоиммунных заболеваний, однако благоприятствуют выработке противоопухолевого иммунитета и могут препятствовать установлению трансплантационной толерантности.

Тимическая селекция Т-клеток ответственна за продукцию естественных T_{reg} -клеток, которые на периферии контролируют аутореактивность тех Т-клеток, которые избежали тимической негативной селекции. Одна и та же популяция T_{reg} -клеток ответственна за аутоотолерантность, за гипореактивность к опухолевым антигенам и за индукцию толерантности к трансплантату.

$CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T_{reg} -клетки естественно присутствуют в нормальной иммунной системе как фенотипически и функционально отличная субпопуляция Т-клеток. Высокая зависимость от IL-2 вместе с экспрессией Foxp3 являются особенностями естественных T_{reg} -клеток, которые отличают их от IL-10 и TGF β -зависимых адаптивных T_{reg} -клеток [14].

Естественные T_{reg} -клетки более эффективно супрессируют аутореактивные Т-клетки при местных реакциях. При инфекциях и трансплантации или системных воспалительных аутоиммунных заболеваниях более эффективны адаптивные T_{reg} -клетки

Адаптивные T_{reg} -клетки действуют опосредованно через секрецию TGF β или IL-10 в отличие от естественных, действующих при прямых контактах: CD80/CD86 с CTLA-4 на T_{reg} -клетки. Адаптивные T_{reg} -клетки характеризуются способностью продуцировать высокие уровни IL-10 и TGF β и эти цитокины опосредуют их способность супрессировать патологический иммунный ответ в связи с трансплантацией, аллергией и аутоиммунными болезнями.

T_{reg} -клетки могут служить мишенями при разработке путей индукции или угнетения иммунологической толерантности к своим и не своим антигенам, при разработке методов лечения и профилактики иммунопатологии и для контроля физиологического и патологического иммунного ответа.

В дальнейшем необходимо продолжить поиски специфических молекулярных маркеров T_{reg} -клеток. Целесообразно также более детальное изучение молекулярных механизмов опосредованной T_{reg} -клетками иммуносупрессии. Роль T_{reg} -клеток при различных вариантах иммунопатологии нуждается в уточнении и конкретизации.

Работа поддержана грантами РФФИ 03-04-48118 и НШ-540.2003.4.

Список литературы

1. Athanassakis I., Vassiliadis S. T-regulatory cells: are we re-discovering T suppressor? // Immunology Letters. – 2002. – Vol.84. – P.179-183.
2. Bach J. Regulatory T cells under scrutiny // Nature Rev., Immunol. – 2003. – Vol.3. – P.189-198.
3. Baecher-Allan C., Brown J., Freeman G., Hafler D. $CD4^+CD25^{high}$ regulatory cells in human peripheral blood // J. Immunol. – 2001. – Vol.167. – P.1245-1253.
4. Bluestone J., Abbas A. Natural versus adaptive reg-

ulatory T cells // Natur. Rev., Immunol. – 2003. – Vol.3. – P.253-257.

5. Boussiotis V., Tsai E., Yunis E., Thim S., Delgado J., Dascher Ch., Berezovskaya A., Rousser D., Reynes J., Goldfeld A. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients // J. Clinical Invest. – 2000. – Vol.105. – P.1317-1324.

6. de Lafaille M., Lafaille J. $CD4^+$ regulatory T cells in autoimmunity and allergy // Current Opin. Immunol. – 2002. – Vol.14. – P.771-778.

7. Fontenot J., Rudensky A. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3 // Nature Immunol. – 2005. – Vol.6. – P.331-337.

8. Frauwirth K., Thompson C. Regulation of T lymphocyte metabolism // J. Immunol. – 2004. – Vol.172. – P.4661-4665.

9. Iwashiro M., Messer R., Peterson K., Strommes I., Sugie T., Hasenkrug K. Immunosuppression by $CD4^+$ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection // PNAS. – 2001. – Vol.98. – P.9226-9230.

10. Levings M., Bacchetta R., Schulz U., Roncarolo M. The role of IL-10 and TGF β in the differentiation and effector function of regulatory cells // Int. Arch. Allergy Immunol. – 2002. – Vol.129. – P. 263-276.

11. Misra N., Bayry J., Lacroix-Desmazes S., Katchhine M., Kaveri S. Human $CD4^+CD25^+$ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells // J. Immunol. – 2004. – Vol.172. – P.4676-4680.

12. Morel P., Feili-Hariri M., Coates P., Thomson A. Dendritic cells, T cell tolerance and therapy of adverse immune reactions // Clin. Exp. Immunol. – 2003. – Vol.133. – P.1-10.

13. Saito T., Yamasaki Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors // Immunol. Rev. – 2003. – Vol.192. – P.143-160.

14. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing $CD25^+CD4^+$ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self // Nature Immunology. – 2005. – Vol.6. – P.345-352.

15. Somasundaram R., Jacob L., Swoboda R., Caputo L., Song H., Basak S., Monos D., Peritt D., Marincola F., Cai D., Birebent B., Bloome E., Kim J., Berencsi K., Mastrangelo M., Herlyn D. Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous $CD4^+/CD25^+$ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor- β // Cancer Research. – 2002. – Vol.62. – P.5267-5272.

16. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells // Nature Immunol. – 2005. – Vol.6. – P.338-344.

17. von Herrath M., Harrison L. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity // Nature Reviews/Immunol. – 2003. – Vol.3. – P.223-232.

поступила в редакцию 22.01.2005

принята к печати 06.06.2005