

## РЕГУЛЯТОРНЫЕ CD4<sup>+</sup> Т-КЛЕТКИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ПУЛОВ НАИВНЫХ КЛЕТОК, КЛЕТОК ПАМЯТИ И ЭФФЕКТОРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ, СОХРАНЯЮТ СВОЙСТВА СВОИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ

© 2019 г. К. В. Шмагель

E-mail: [shmagel@iegm.ru](mailto:shmagel@iegm.ru)

«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ, Пермь, Россия

Поступила: 13.03.2019. Принята: 26.03.2019

В группе здоровых добровольцев методом проточной цитометрии определяли субпопуляционный состав CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов: наивные клетки, клетки центральной и эффекторной памяти, терминально дифференцированные эффекторы. Внутри каждой субпопуляции по маркерам CD25, CD127, FoxP3 идентифицировали регуляторные Т-лимфоциты (Tregs). Экспрессию CD71, CD39, GARP, LAP, транскрипционного коактиватора PGC-1 $\alpha$ , регулирующего энергетический метаболизм, а также массу и заряд митохондрий оценивали, как в общем пуле клеток каждой субпопуляции, так и в пуле Tregs, выделенных внутри этих субпопуляций. Проведенный корреляционный анализ показал, что активационный фенотип Tregs отражает таковой в общем пуле клеток родственной им субпопуляции. Также были установлены сильные связи показателей энергетики Tregs с энергетическими параметрами соответствующих субпопуляций.

**Ключевые слова:** CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты, регуляторные Т-клетки, субпопуляции, активация, митохондрии, энергетика

DOI: 10.31857/S102872210006495-9

**Адрес:** 614081 г. Пермь, ул. Голева, д. 13, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ, лаборатория экологической иммунологии. Шмагель Константин Владимирович. Тел.: 8 (342) 280 83 34.

**E-mail:** [shmagel@iegm.ru](mailto:shmagel@iegm.ru)

**Авторы:**

**Шмагель К. В.**, д.м.н., заведующий лабораторией экологической иммунологии «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ, Пермь, Россия.

Регуляторные Т-лимфоциты (Tregs) играют важную роль в работе иммунной системы. Они контролируют активацию и пролиферацию иммунокомпетентных клеток, препятствуя, таким образом, развитию аутоиммунных и иммунопатологических процессов. Изначально человеческие Tregs характеризовались как CD4<sup>+</sup> Т-клетки с высоким уровнем экспрессии рецептора к IL-2 (CD25) и низким содержанием рецептора к IL-7 (CD127). Однако к настоящему времени стало ясно, что популяция регуляторных клеток

высоко гетерогенна [1]. Элементы, способные подавлять активность других клеток присутствуют не только среди CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, но и среди CD8<sup>+</sup> Т-клеток,  $\gamma\delta$ Т-клеток, В-лимфоцитов. В то же время, CD4<sup>+</sup> Tregs занимают лидирующее положение в подавлении аутоиммунных, аллергических и воспалительных реакций. Эксперименты с тимэктомией, проведенной в неонатальном периоде, показали, что тимус является важным источником CD4<sup>+</sup> Tregs [2]. Кроме того, было установлено, что регуляторные Т-лимфоциты могут генерироваться вне тимуса. В результате CD4<sup>+</sup> Tregs были разделены на тимические (tTregs) и периферические (pTregs) [3]. Эти субпопуляции отличаются между собой по фенотипическим маркерам, регуляции и выполняемым функциям. Первые несут маркер CD45RA, вторые – CD45R0. Тимические Tregs направлены преимущественно на блокирование негативных аутоиммунных и воспалительных реакций. Они распознают аутоантигены pTregs обеспечивают толерантность во

взаимоотношениях «мать-плод», контролируют реакции против вирусов, бактерий, паразитов и пересаженных чужеродных тканей. Их рецепторы реагируют на чужеродные пептиды.

Вместе с тем, основная масса Т-лимфоцитов после выхода из тимуса проходит несколько стадий развития: наивные клетки, клетки центральной и эффекторной памяти, терминально дифференцированный эффекторы. Все эти субпопуляции содержат в своем составе Tregs.

**Целью** настоящего исследования была оценка свойств CD4<sup>+</sup> Tregs, выделенных из различных субпопуляций периферических CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов человека.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Мононуклеарные клетки периферической крови были получены от 23 здоровых добровольцев (15 женщин и 8 мужчин) в возрасте 32 лет (медиана; интерквартильный размах: 28–39 лет). Жизнеспособные клетки делили пополам и окрашивали двумя наборами антител. В первом варианте использовали митохондриальные красители MitoTracker™ Green FM и MitoTracker™ Orange CM-H2TMRos (Invitrogen, США), и коктейль антител для поверхностного окрашивания, содержащий анти-CD25-BUV395, анти-CD127-BV786, анти-CD39-BV711, анти-CD71-BV421, анти-CD3-AF700, (Becton Dickinson, США), анти-CD45RA-BV650, анти-GARP-PE-Cy7, анти-LAP-APC (Biolegend, США), анти-CD4-Qdot605 и LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, США). Во втором варианте добавляли коктейль антител, содержащий анти-CD25-BUV395, анти-CD127-BV786, анти-CD39-BV711, анти-CD71-BV421, анти-CCR7-PE-Cy7, анти-CD3-AF700 (Becton Dickinson, США), анти-CD45RA-BV650 (Biolegend, США), анти-CD4-Qdot605 и LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, США). После инкубации, отмывания и фиксации/пермеабиллизации клетки окрашивали анти-PGC1α-FITC (Novus Biologicals, Великобритания) и анти-FoxP3-PE (eBioscience™, США) Измерение проводили на проточном цитофлюориметре Fortessa (Becton Dickinson, США).

В пуле мононуклеарных клеток периферической крови определяли: наивные Т-лимфоциты (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), Т-клетки центральной памяти (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>) – СМ, Т-клетки эффекторной памяти (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) – ЕМ и терминально дифферен-

цированные лимфоциты (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) – ТD.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

У здоровых лиц абсолютное содержание CD4<sup>+</sup> Т-клеток крови распределилось следующим образом: наивные – 429/мкл; СМ – 304/мкл; ЕМ – 190/мкл; ТD – 14/мкл. Численность Tregs в тех же субпопуляциях: наивные – 18/мкл; СМ – 18/мкл; ЕМ – 16/мкл; ТD – 1,4/мкл. Относительное содержание CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Tregs в популяциях оказалось следующим: наивные – 4,2%; СМ – 6,0%; ЕМ – 8,6%; ТD – 10,1%. Таким образом, абсолютная численность CD4<sup>+</sup> Tregs в трех субпопуляциях CD4<sup>+</sup> Т-клеток (наивных, СМ и ЕМ) у взрослых здоровых людей находится приблизительно на одном уровне. В пуле эффекторных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов она снижена более, чем в 10 раз. При этом относительное содержание Tregs растет в процессе антиген-зависимой дифференцировки CD4<sup>+</sup> Т-клеток.

Известно, что активность Tregs зависит от экспрессии целого ряда поверхностных и внутренних структур, определяющих супрессорный потенциал этих клеток. Среди них: трансферинный рецептор CD71, отражающий вхождение в пролиферацию; GARP/LAP комплекс, индуцирующий секрецию TGF-β; CD39 и CD73, редуцирующие внеклеточные молекулы АТФ и АДФ до АМФ (CD39) и АМФ до аденозина (CD73). Последнее ведет к подавлению продукции провоспалительных цитокинов эффекторными клетками и стабилизации функции самих Tregs.

Мы установили, что комплекс GARP/LAP экспрессируется как на CD4<sup>+</sup> Tregs, так и на других CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах. Относительное содержание GARP/LAP-позитивных элементов среди CD4<sup>+</sup> Tregs составило 3,7%, среди всего пула CD4<sup>+</sup> Т-клеток – 2,3%. Меньше всего клеток, экспрессирующих GARP/LAP было среди наивных лимфоцитов: 2,3% и 1,5% соответственно. Из всех CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти GARP/LAP определялся у 3,7%, а из всех CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> Tregs – у 5,9%. Таким образом, у CD4<sup>+</sup> Tregs экспрессия комплекса, индуцирующего секрецию TGF-β, соответствует уровню его экспрессии в той субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-клеток, из которой Tregs были выделены. Подтверждением этому стали результаты корреляционного анализа. Связь между уровнем GARP/LAP-позитивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и GARP/LAP-позитивных CD4<sup>+</sup> Tregs была сильной и статистически вы-

соко значимой. Эта зависимость была установлена для общей популяции CD4<sup>+</sup> Т-клеток, для наивной субпопуляции и субпопуляции клеток памяти. Во всех случаях коэффициент корреляции (R) был выше 0,850;  $p < 0,001$ .

Аналогичные результаты были получены по экспрессии CD71. CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти содержали в своем составе больше лимфоцитов с маркером CD71, чем наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки. При этом Tregs, выделенные из любой субпопуляции (наивных, CM, EM и TD) содержали больше CD71-позитивных элементов, чем другие клетки. Для каждой из этих субпопуляций вновь были установлены статистически значимые позитивные связи между содержанием CD71-экспрессирующих элементов среди всех CD4<sup>+</sup> Т-клеток и среди CD4<sup>+</sup> Tregs. Во всех случаях  $R > 0,699$ ;  $P < 0,001$ . При исследовании экспрессии CD39 обнаружилось, что этот маркер, в отличие от CD71, шире представлен на наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках по сравнению с CD4<sup>+</sup> Т-клетками памяти. Однако вновь самая большая доля CD39-позитивных лимфоцитов во всех субпопуляциях наблюдалась среди Tregs. При этом прямые зависимости между экспрессией CD39 в общем пуле клеток и в пуле Tregs были характерны для всех четырех субпопуляций (от  $R > 0,629$  ( $P < 0,01$ ) до  $R > 0,860$  ( $P < 0,001$ )).

Концентрация PGC-1 $\alpha$  была относительно низкой в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, а наиболее высокой в CD4<sup>+</sup> Т-клетках эффекторной памяти. Внутриклеточное содержание этого транскрипционного коактиватора оказалось единственным параметром, уровень которого в общем пуле CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов был выше, чем пуле CD4<sup>+</sup> Tregs. Это различие отмечено всех четырех субпопуляций. Вместе с тем, выраженность экспрессии PGC-1 $\alpha$  в общем пуле CD4<sup>+</sup> Т-клеток

и в пуле CD4<sup>+</sup> Tregs была сопряжена, а R в каждой из субпопуляций превышал 0,730 ( $P < 0,001$ ). Известно, что PGC-1 $\alpha$  активирует работу митохондрий, а также запускает их регенерацию [4]. Исходя из этого, можно было бы ожидать меньшую активность этих органелл у Tregs в сравнении с таковой в общем пуле CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Однако обнаружилось, что и масса, и заряд митохондрий у CD4<sup>+</sup> Tregs были выше, чем у CD4<sup>+</sup> Т-клеток общего пула. Это характерно и для наивных элементов, и для клеток памяти. Более того, мы установили, что параметры митохондрий Tregs жестко коррелировали с параметрами митохондрий CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов общего пула.

Таким образом, нами впервые представлены данные о том, что у здоровых людей CD4<sup>+</sup> Tregs, выделенные из разных субпопуляций CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов не только функционально связаны с состоянием этих субпопуляций, но и превосходят CD4<sup>+</sup> Т-клетки «материнского» пула по активационным и энергетическим параметрам.

Работа выполнена в рамках государственного задания; номер госрегистрации темы: 01201353249.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Lu L., Barbi J., Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat. Rev. Immunol.* 2017, 17(11), 703–717.
2. Nishizuka Y. & Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science.* 1969, 166, 753–755.
3. Plitas G. & Rudensky A. Y. Regulatory T cells: differentiation and function. *Cancer Immunol. Res.* 2016, 4(9), 721–725.
4. Wenz T. PGC-1 $\alpha$  activation as a therapeutic approach in mitochondrial disease. *IUBMB Life.* 2009, 61(11), 1051–1062.

**REGULATORY CD4<sup>+</sup> T CELLS ISOLATED FROM NAIVE, MEMORY  
AND EFFECTOR LYMPHOCYTE SUBSETS KEEP THE PROPERTIES  
OF APPROPRIATE SUBPOPULATIONS**

© 2019 K. V. Shmagel

*E-mail: shmagel@iegm.ru*

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch  
of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia*

**Received:** 13.03.2019. **Accepted:** 26.03.2019

In the blood of healthy volunteers, CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte subsets (naïve cells, central and effector memory cells, terminally differentiated effectors) were determined by flow cytometry. Using CD25, CD127, and FoxP3 molecules, regulatory T-lymphocytes (Tregs) were identified within each subset. Mitochondrial mass and charge, as well as the expression of CD71, CD39, GARP, LAP, and transcriptional co-activator PGC-1 $\alpha$  regulating energy metabolism were assessed within each subset's total cell pool and Tregs isolated from the appropriate subset. Correlation analysis showed that the Treg activation phenotype reflects the one of the parent subset. Furthermore, strong links between the energy indices of Tregs and the appropriate T-cell subset were established.

*Key words:* CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes, regulatory T-cells, subsets, activation, mitochondria, energy

**Author:**

**Shmagel K. V.**, PhD, Head of the Laboratory of Ecological Immunology at the Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia.