

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 612.017.1.33.083

Васильева О.А.¹, Якушина В.Д.¹, Новицкий В.В.^{1,2}, Рязанцева Н.В.^{1,2}**РОЛЬ ГАЛЕКТИНА-1 В РЕГУЛЯЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-КЛЕТОК IN VITRO**¹ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 634050, г. Томск; ²Национальный исследовательский государственный университет, 634050, г. Томск

На модели *in vitro* исследовано влияние β-галактазидсвязывающего белка семейства лектинов – галектина-1 на субпопуляционный состав и иммуносупрессорную функцию регуляторных CD4⁺-лимфоцитов. Действие галектина-1 на дифференцировку CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-лимфоцитов определяется степенью зрелости клеток и условиями культивирования. Инкубация предварительно дифференцированных клеток с рекомбинантным галектином-1 сопровождалась повышением количества лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, повышением содержания и уровня экспрессии мРНК транскрипционного фактора Foxp3 и продукции цитолитического белка перфорина. Результаты исследования свидетельствуют о том, что иммунорегуляторное действие галектина-1 основано на поддержании регуляторного фенотипа уже дифференцированных CD4⁺-лимфоцитов. Разработанная модель эксперимента может быть использована для направленной регуляции процесса дифференцировки лимфоцитов в сторону Т-регуляторных лимфоцитов и получения популяции клеток, обладающих иммуносупрессорными свойствами.

Ключевые слова: галектин-1; Т-регуляторные лимфоциты; дифференцировка; транскрипционный фактор Foxp3; перфорин.

Для цитирования: Иммунология. 2014; 35 (6): 300–305.

Vasil'eva O.A.¹, Yakushina V.D.¹, Novitsky V.V.^{1,2}, Ryazantseva N.V.^{1,2}

THE ROLE OF GALECTIN-1 IN THE REGULATION OF CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-CELLS DIFFERENTIATION IN VITRO

¹Siberian state medical university, 634050, Tomsk, Russian Federation; ²National research Tomsk state university, 634050, Tomsk, Russian Federation

The effect of β-galactoside-binding protein from lectins family - galectin-1 on the subpopulation structure and immunosuppressive function of CD4⁺- regulatory lymphocytes was studied *in vitro*. The action of galectin-1 on the differentiation of CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells depends on the ratio of lymphocytes maturity and conditions of cell cultivation. The incubation of pre-differentiated cells with the recombinant galectin-1 was accompanied by the increase in the number of lymphocytes with CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ phenotype, the increase in the content and expression level of transcription factor Foxp3 mRNA and the increase in cytolytic protein – perforin production. The findings suggest that the immunoregulatory effects of galectin-1 are based on the maintaining of the regulatory phenotype of differentiated CD4⁺-lymphocytes. Experimental model that we have developed, can be used to regulate the process of lymphocyte differentiation toward regulatory T-cell and to receive the populations of cells with immunosuppressive properties.

Key words: galectin-1; T-regulatory cells; differentiation; transcription factor Foxp3; perforin.

Citation: Immunologiya. 2014; 35 (6): 300–305. (in Russian)

Введение. По современным представлениям, Т-регуляторные лимфоциты (Treg) представляют собой фенотипически и функционально гетерогенную группу клеток [1]. Благодаря данной популяции лимфоцитов обеспечивается периферическая иммунологическая толерантность к аутоантигенам, осуществляются подавление пролиферации различных клонов Т-хелперов, удаление аутореактивных лимфоцитов, контроль силы и продолжительности иммунного ответа [2, 3]. Дефицит или функциональная неполноценность Treg является основополагающим фактором патогенеза аутоиммунных заболеваний, а их избыточное количество вызывает выраженную иммуносупрессию, что способствует прогрессированию злокачественных новообразований. Поэтому особый интерес приобретают методы коррекции иммуноопос-

редованных заболеваний, основанные на модулировании процесса дифференцировки Treg-клеток как основных агентов, ответственных за супрессию иммунного ответа.

В качестве регулятора Т-клеточного гомеостаза в данной работе рассматривается эндогенный низкомолекулярный белок семейства лектинов – галектин-1. Галектин-1 в норме присутствует на поверхности клеток в разных органах: плаценте, легких, печени, костном мозге, селезенке, сердце, лимфатических узлах и предстательной железе. Он экспрессируется на фибробластах, эпителиальных, эндотелиальных, дендритных клетках, макрофагах, активированных Т- и В-лимфоцитах, костномозговых стромальных клетках, NK-клетках, а также на Foxp3⁺ Т-регуляторных клетках [4, 5]. Внутриклеточно галектин-1 локализуется на свободных цитоплазматических рибосомах, в цитозоле и ядре [6]. Избыточная экспрессия на поверхности галектина-1 характерна для опухолевых клеток различного происхождения. Галектин-1 регулирует многочисленные процессы, связанные с жизнедеятельностью клеток: инициирует клеточный апоптоз, стимулирует ангиогенез, участвует в дифференци-

Для корреспонденции: Васильева Ольга Александровна, Vasiljeva-24@yandex.ru

For correspondence: Vasil'eva Olga Aleksandrovna, Vasiljeva-24@yandex.ru

ровке Т-лимфоцитов, развитии В-лимфоцитов, сплайсинге мРНК, дифференцировке нервных и мышечных клеток, клеточной адгезии и межклеточной кооперации [4, 5, 7]. На моделях аутоиммунных заболеваний показано, что галектин-1 играет ключевую роль в развитии и функционировании Т-регуляторных лимфоцитов, в связи с этим представляет интерес исследование влияния галектина-1 на дифференцировку Т-регуляторных клеток и возможность получения популяции лимфоцитов, обогащенной данным подклассом клеток. В работе мы провели оценку влияния рекомбинантного галектина-1 на количество, функциональную активность Т-регуляторных клеток, уровень экспрессии мРНК и содержание транскрипционного фактора дифференцировки Treg (Foxp3⁺) в разных условиях культивирования *in vitro*.

Материалы и методы

Культивирование мононуклеарных лейкоцитов с галектином-1

В исследовании использовали периферическую кровь здоровых людей обоего пола ($n = 15$), средний возраст которых составил 26 ± 4 года. Взятие крови производили утром натощак из локтевой вены в количестве 20 мл в вакуумные пробирки с антикоагулянтом K₃-ЭДТА. Из крови методом градиентного центрифугирования [8] выделяли мононуклеарные лейкоциты. Количество выделенных клеток стандартизировали до $2,0 \cdot 10^6$ /мл, разбавляя полной питательной средой, состоящей из 90% RPMI-1640 (ЗАО «Вектор», Россия), 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «Биолот», Россия), 0,3 мг/мл L-глутамина, 50 мкг/мл гентамицина. Клетки культивировали в специализированных 48-луночных стерильных планшетах с крышкой (BD Falcon™, США) в CO₂-инкубаторе при 37°C.

Исследование проводили с использованием двух экспериментальных моделей. В модели 1 изучали влияние рекомбинантного галектина-1 (0,5 и 1 мкг/мл; RnDSystems, США;) на неактивированные клетки и добавляли его в культуральную среду вместе с анти-CD3/CD28-антителами (АТ) и цитокинами, необходимыми для поляризации в сторону Т-регуляторных лимфоцитов. Модель 2 экспериментала предусматривала внесение рекомбинантного галектина-1 через 72 ч культивирования к уже активированным и поляризованным лимфоцитам. Общая продолжительность культивирования клеток составила 6 сут.

Активацию лимфоцитов проводили анти-CD3-АТ и анти-CD28-АТ (BD Pharmingen, США) в количестве 1 и 2 мкг/мл соответственно. С целью генерации субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов в культуральную среду одновременно с активирующими АТ добавляли рекомбинантные цитокины: интерлейкин (IL)-2 (10 нг/мл) и трансформирующий фактор роста β_1 (TGF β_1) (20 нг/мл) (RnDSystems, США); замену среды осуществляли через 72 ч от начала культивирования. В качестве контроля использовали культуру мононуклеарных лейкоцитов, активированных анти-CD3/CD28-АТ.

Контроль дифференцировки клеток на 6-е сутки проводили методом иммунофенотипирования на проточном цитометре FACSCantoII (BD, США). Содержание транскрипционного фактора FoxP3 и цитолитического белка перфорина анализировали в клетках, культивированных с добавлением галектина-1 через 72 ч от начала культивирования (модель 2).

Имунофенотипирование Т-регуляторных лимфоцитов

Субпопуляцию Treg определяли по связыванию АТ к CD4, меченных флюоресцеина изотиоцианатом, к CD25-аллофикоцианином (APC) и к Foxp3 – фикоэритрином (BD Pharmingen, США). К клеткам, отмытым от культуральной среды, добавляли 5 мкл анти-CD25-АТ, 10 мкл анти-CD4-АТ и инкубировали 20 мин. С помощью набора реагентов “Human Foxp3 Buffer set” (BD Pharmingen, США) осуществляли фиксацию клеток в течение 10 мин и пермеабиллизацию 30 мин. Затем окрашивали анти-Foxp3-АТ в течение 30 мин, отмывали

и анализировали на проточном цитометре. Все процедуры инкубации проводили при комнатной температуре, клетки отмывали с использованием “Stain Buffer” (BD Pharmingen, США).

Вестерн-блоттинг

Содержание транскрипционного фактора Foxp3 и цитолитического белка перфорина при действии галектина-1 на клетки, дифференцированные в направлении регуляторных Т-лимфоцитов, определяли методом вестерн-блоттинга. Равное количество цельноклеточных лизатов подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле, содержащем 10% додецилсульфата натрия, затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану блокировали 1% желатином, трижды промывали буфером TTBS (20 ммоль/л трис-HCl, pH 7,6, 137 ммоль/л NaCl и 0,05% твин-20), после чего инкубировали с первичными АТ anti-Foxp3 (eBioscience, США), anti-perforin (RnDSystems, США) в течение 1 ч, трижды промывали буфером TTBS и добавляли вторичные АТ с пероксидазной меткой (RnDSystems, США). Для визуализации результатов использовали хемилюминесцентный субстрат «NOVEX ECL Chemiluminescent Substrate Reagent kit» (Invitrogen, США). Содержание белков определяли путем подсчета интенсивности бенда на рентгеновской пленке с помощью программы «TotalLab 2.01». В качестве стандарта и внутреннего контроля использовали белок глицеро-3-фосфатдегидрогеназу (eBioscience, США), выражая содержание исследуемого протеина как отношение сигнала определяемого белка к сигналу белка глицеро-3-фосфатдегидрогеназы в исследуемых образцах.

Количественное определение экспрессии мРНК

Влияние рекомбинантного галектина-1 на экспрессию мРНК транскрипционного фактора Foxp3 изучали, добавляя галектин-1 к мононуклеарным лейкоцитам (в дозе 1 мкг/мл) вместе с активирующими АТ, длительность воздействия составила 72 ч. Контролем служила культура клеток без добавления галектина-1. За 4 ч до окончания инкубации в культуры клеток добавляли стимуляторы – форболмиристилацетат в дозе 50 нг/мл и кальция иономицин в дозе 1 мкг/мл. После 72 ч культивирования клеток с рекомбинантным галектином-1 среду с клетками переносили из лунок планшета в пробирки типа эппендорф, центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин, супернатант удаляли, а осадок клеток использовали для выделения РНК и последующей оценки уровня экспрессии мРНК транскрипционного фактора дифференцировки Т-регуляторных лимфоцитов. Выделение РНК из мононуклеарных лейкоцитов осуществляли сорбентно-колоночным методом (RNeasy Plus Mini Kit, QIAGEN, Германия). Далее синтезировали ДНК на матрице мРНК при участии обратной транскриптазы. Для этого готовили реакционную смесь: 9 мкл (0,5–2 мкг) РНК, 1 мкл (100 нг) статистического праймера (N9; праймера, подобранного к среднестатистической последовательности ДНК), 10 мкл RT-буфера (20 mM трис-HCl, pH = 8,3, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 100 mM KCl, 0,4 mM dNTP), 200 ед. активности ДНК-зависимой РНК-полимеразы (MMuLV-RT) (Promega, США). Реакцию обратной транскрипции проводили в течение 60 мин при температуре 42°C.

Таблица 1

Праймеры, позволяющие специфично амплифицировать фрагменты кДНК

Ген	Последовательность нуклеотидов в прямом (F) и обратном (R) праймерах
Foxp3	F: CTGGCAAATGGTGTCTG R: GTGCCCTGCCCTTCTCAT
β -Actin	F: CATTTCCGAAGCGAGTGTCT R: GAGCGATTCCGGACTACCTT

Полученный фрагмент ДНК амплифицировали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием SYBR Green I (Molecular Probe, США) на амплификаторе Mini Opticon (Bio-Rad, США). Для определения относительного количества кДНК в образце использовали метод $\Delta\Delta C_t$. Результаты выражали в относительных единицах: отношение величины порогового цикла амплификации исследуемого гена к пороговому циклу амплификации гена “домашнего хозяйства” – β -актина. Праймеры, позволяющие специфично амплифицировать фрагменты кДНК транскрипционного фактора Foxp3 и β -актина, представлены в табл. 1.

Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0. Нормальность распределения полученных результатов оценивали, используя критерий Шапиро Вилка. Достоверность различий ($p < 0,05$) изучали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для зависимых выборок. Данные представлены в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей (Q_{25} – Q_{75}).

Результаты и обсуждение

Оценку влияния галектина-1 на процесс дифференцировки Т-лимфоцитов в Treg проводили *in vitro* с использованием двух экспериментальных моделей. В контрольной группе клеток, культивированных только в присутствии активирующих АТ, на 6-е сутки культивирования количество $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ -лимфоцитов составило 67,3 (57,3–74,6)%. При этом содержание клеток, имеющих повышенный уровень презентации α -цепи к IL-2 (фенотип $CD4^+CD25^+Foxp3^-$), составило 15,4 (8,4–21,7)%, а экспрессирующих транскрипционный фактор Foxp3 – 17,3 (12,9–21)% (табл. 2). Добавление в культуру клеток рекомбинантных цитокинов (IL-2 и TGF β_1) приводило к тому, что практически вся популяция $CD4^+$ -положительных лимфоцитов состояла из Treg, а именно количество $CD4^+CD25^+$ -клеток увеличилось до 59,7 (49,1–61,2)%, а $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ – до 40,2 (40–49,2)%, что достоверно выше количества клеток с соответствующими фенотипами в контрольной группе.

При добавлении галектина-1 на 1-е сутки культивирования вместе с анти-CD3/CD28-АТ и цитокинами, необходимыми для поляризации в сторону Т-регуляторных клеток

(модель 1), была характерна следующая тенденция: с увеличением дозы галектина-1 отмечали статистически значимое увеличение количества клеток с фенотипом $CD4^+CD25^+$ ($p < 0,05$) и достоверное снижение содержания клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор Foxp3 ($p < 0,05$), по сравнению с таковым клеток, поляризованных в направлении Treg (см. табл. 2). Так, при добавлении галектина-1 в дозе 0,5 мкг/мл количество $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ -клеток увеличилось в 1,3 раза, а содержание $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ -клеток снижалось в 2,3 раза по сравнению с таковым клеток, поляризованных в сторону Т-регуляторных. Схожие результаты получили при добавлении галектина-1 в дозе 1 мкг/мл, но уменьшение количества $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ -клеток было более выражено (в 3 раза), при этом повышение содержания $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ -лимфоцитов повысилось в 1,4 раза. Таким образом, в результате добавления рекомбинантного галектина-1 на 1-е сутки культивирования происходит перераспределение популяции $CD4^+$ -лимфоцитов в сторону клеток, несущих повышенное количество маркера $CD25^+$, при этом наблюдается подавление экспрессии транскрипционного фактора Foxp3.

При оценке влияния изучаемого лектина на уже дифференцированные Т-регуляторные клетки (модель 2) отметили следующие эффекты. Добавление в культуральную среду галектина-1 в дозе 0,5 мкг/мл не оказывало значимого влияния на дифференцировку Т-регуляторных клеток ($p > 0,05$); количество клеток с фенотипами $CD4^+CD25^+/CD4^+CD25^+Foxp3^+$ было значимо выше, чем в контрольной группе, но сопоставимо с таковым в группе дифференцированных клеток без добавления галектина-1 (табл. 3). Статистически значимое увеличение процентного содержания Foxp3 положительных регуляторных клеток регистрировали при действии галектина-1 в дозе 1 мкг/мл ($p < 0,05$) в сравнении с таковым количества лимфоцитов с таким же фенотипом в культуре клеток, поляризованных в направлении Treg, и при действии галектина-1 в меньшей концентрации (0,5 мкг/мл). Результат анализа популяционного состава Т-регуляторных лимфоцитов при действии галектина-1 в дозе 1 мкг/мл позволяют заключить, что галектин-1 в данной концентрации способствует экспрессии транскрипционного фактора Foxp3 и под его влиянием происходит перераспределение субпопуляций Т-регуляторных лимфоцитов: в структуре популяций пре-

Таблица 2

Содержание (в %) субпопуляций $CD4^+$ -лимфоцитов при добавлении в культуру клеток рекомбинантного галектина-1 одновременно с активирующими АТ, $Me (Q_{25}$ – $Q_{75})$

Субпопуляция $CD4^+$ -лимфоцитов на 6-е сутки культивирования	Условия культивирования			
	анти-CD3/CD28-АТ (контроль), ($n = 15$)	IL-2, TGF β_1 , анти-CD3/CD28-АТ ($n = 15$)	IL-2, TGF- β_1 , анти-CD3/CD28-АТ, галектин-1 0,5 мкг/мл ($n = 15$)	IL-2, TGF- β_1 , анти-CD3/CD28-АТ, галектин-1 1 мкг/мл ($n = 15$)
$CD4^+CD25^-Foxp3^-$	67,30 (57,3–74,6)	0,30 (0,1–1,7) $p_1 < 0,05$	4,70 (4,5–4,9) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	3,6 (3,4–3,6) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 \geq 0,05$
$CD4^+CD25^+Foxp3^-$	15,40 (8,40–21,7)	59,70 (49,10–61,2) $p_1 < 0,05$	77,90 (73,20–82,60) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	83,45 (80,8–87,9) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
$CD4^+CD25^+Foxp3^+$	17,30 (12,90–21)	40,20 (40–49,2) $p_1 < 0,05$	17,35 (12,40–22,3) $p_1 \geq 0,05$ $p_2 < 0,05$	13,35 (8,5–15,6) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Примечание. Здесь и в табл. 3: p_1 – по сравнению с показателями в контрольной группе; p_2 – по сравнению с показателями в группе с добавлением рекомбинантных цитокинов в отсутствие галектина-1; p_3 – по сравнению с показателями в группе с добавлением рекомбинантных цитокинов и галектина-1 в дозе 0,5 мкг/мл.

Таблица 3

Содержание (в %) субпопуляций CD4⁺-лимфоцитов при добавлении в культуру клеток рекомбинантного галектина-1 через 72 ч от начала культивирования, *Me (Q₂₅–Q₇₅)*

Субпопуляция CD4 ⁺ -лимфоцитов на 6-е сутки культивирования	Условия культивирования			
	анти-CD3/CD28-АТ (контроль), (n = 15)	IL-2, TGFβ ₁ , анти-CD3/CD28-АТ, (n = 15)	IL-2, TGFβ ₁ , анти-CD3/CD28-АТ, галектин-1 0,5 мкг/мл (n = 15)	IL-2, TGFβ ₁ , анти-CD3/CD28-АТ, галектин-1 1 мкг/мл (n = 15)
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	67,3 (57,3–74,6)	0,3 (0,1–1,7) $p_1 < 0,05$	0,2 (0,1–1,8) $p_1 < 0,05$ $p_2 \geq 0,05$	0,3 (0,2–1,9) $p_1 < 0,05$ $p_2 \geq 0,05$ $p_3 \geq 0,05$
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	15,4 (8,4–21,7)	59,7 (49,1–61,2) $p_1 < 0,05$	54,6 (44,2–62,2) $p_1 < 0,05$ $p_2 \geq 0,05$	40,6 (33,9–54,6) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	17,3 (12,9–21)	40,2 (40–49,2) $p_1 < 0,05$	45,3 (37,7–54) $p_1 < 0,05$ $p_2 \geq 0,05$	59,1 (45,3–64,2) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Примечание. Здесь и в табл. 3: p_1 – по сравнению с показателями в контрольной группе; p_2 – по сравнению с показателями в группе с добавлением рекомбинантных цитокинов в отсутствие галектина-1; p_3 – по сравнению с показателями в группе с добавлением рекомбинантных цитокинов и галектина-1 в дозе 0,5 мкг/мл.

обладают клетки, экспрессирующие Foxp3 (59,1%), над клетками с фенотипом CD4⁺CD25⁺ (40,6%). Таким образом, добавление рекомбинантного галектина-1 в дозе 1 мкг/мл через 72 ч от начала культивирования клеток с рекомбинантными цитокинами и активирующими АТ приводит к наибольшему количеству Foxp3-положительных Т-регуляторных лимфоцитов, следовательно, условия культивирования, соответствующие модели 2 эксперимента, являются оптимальными для дифференцировки лимфоцитов в Treg. Поэтому дальнейшее изучение влияния галектина-1 на содержание транскрипционного фактора Foxp3 и эффекторного цитолитического белка перфорина проводили, используя модель 2 эксперимента, и тестировали его действие в дозе 1 мкг/мл.

Содержание транскрипционного фактора Foxp3 в лизатах клеток, культивированных в течение 6 сут в среде с добавлением только анти-CD3/CD28-АТ (контрольная группа), составило 0,19 (0,16–0,23) отн. ед. (табл. 4).

При анализе внутриклеточного содержания транскрипционного фактора Foxp3 в лизатах клеток, поляризованных в направлении Т-регуляторных, отметили его увеличение в 1,6 раза по сравнению с таковым в контрольной группе. Добавление галектина-1 в дозе 1 мкг/мл через 72 ч в культуру предварительно дифференцированных клеток приводило к значимому увеличению ($p < 0,05$) количества Foxp3 по сравнению с таковым в контрольной группе и клетками, культивированными в условиях направленной дифференцировки. Значения данного показателя при добавлении галектина-1 оказались в 2 раза выше, чем в дифференцированных клетках, составив 0,68(0,62–0,92) отн. ед. Результат анализа экспрессии мРНК гена транскрипционного фактора Foxp3 подтвердили стимулирующее действие рекомбинантного галектина-1. А именно под влиянием галектина-1 в дозе 1 мкг/мл уровень экспрессии мРНК Foxp3 составил 0,98 (0,82–1,06) отн. ед., что в 3 раза превышает этот показатель в клетках, культивированных в условиях активации с помощью АТ без добавления галектина-1, где уровень экспрессии был 0,32 (0,27–0,38) отн. ед.

В результате исследования методом вестерн-блоттинга внутриклеточного со-

держания перфорина на 6-е сутки культивирования установили, что добавление рекомбинантных цитокинов приводит к статистически значимому повышению ($p < 0,05$) значений данного показателя (см. табл. 4). Количество перфорина в клетках, культивированных в условиях направленной дифференцировки, составило 3,13 (2,21–4,67) отн. ед., в то время как в контрольной группе – 2,38 (1,94–3,30) отн. ед. При действии галектина-1, добавляемого к дифференцированным клеткам через 72 ч, внутриклеточное содержание перфорина статистически значимо повышалось ($p < 0,05$) до 4,98 (3,24–7,28) отн. ед. Полученное количество перфорина оказалось в 2 раза выше, чем в клетках, культивируемых в условиях направленной дифференцировки без добавления галектина-1.

Таким образом, действие галектина-1 на клетки, предварительно активированные и дифференцированные в направлении регуляторных Т-лимфоцитов, приводит к повышению внутриклеточного содержания эффекторного белка регуляторных Т-лимфоцитов перфорина.

В результате проведенных исследований с использованием двух схем эксперимента установили, что действие галектина-1 на Treg зависит от стадии активации клеток. Так, при добавлении галектина-1 вместе с активирующими АТ и цитокинами (модель 1) характерно увеличение популяции Treg с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, а при действии галектина-1 на уже частично дифференцированные клетки in vitro (модель 2) отмечали экспансию клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, при этом повышалось внутриклеточное

Таблица 4

Внутриклеточное содержание (в отн. ед.) транскрипционного фактора Foxp3 и белка перфорина в лизатах мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, при действии in vitro рекомбинантного галектина-1 через 72 ч от начала культивирования, *Me (Q₂₅–Q₇₅)*

Показатели	Условия культивирования		
	анти-CD3/CD28-АТ (контроль), (n = 6)	IL-2, TGFβ ₁ , анти-CD3/CD28-АТ, (n = 6)	IL-2, TGFβ ₁ , анти-CD3/CD28-АТ, галектин-1 1 мкг/мл, (n = 6)
Foxp3	0,19 (0,16–0,23)	0,32 (0,24–0,4)	0,68 (0,62–0,75)**
Перфорин	2,38 (1,94–3,3)	3,13 (2,21–4,67)*	4,98 (3,24–7,28)*, **

Примечание. $p < 0,05$: * – по сравнению с показателями в контрольной группе; ** – по сравнению с количеством клеток, культивированных с добавлением IL-2, TGFβ₁ в отсутствие галектина-1.

содержание транскрипционного фактора Foxp3 и эффекторного белка перфорины.

В нескольких исследованиях замечено, что чувствительность Т-лимфоцитов к галектину-1 меняется в зависимости от стадии созревания и активации: на ранних этапах связывания с Т-клеточным рецептором галектин-1 не влияет на активацию клеток, что исследователи связывают с изменением профиля гликозилирования по мере активации лимфоцитов [9, 10].

Согласно представлениям о функциональной активности Т-регуляторных клеток, экспрессия транскрипционного фактора Foxp3 необходима для осуществления супрессорного эффекта Treg при прогрессии иммунного ответа [11, 12]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что галектин-1 в дозе 1 мкг/мл способствует экспрессии Foxp3, повышая функциональную активность регуляторных Т-клеток. В многочисленных исследованиях при моделировании патологий у животных показано, что дефекты в CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-регуляторных клетках или дисбаланс в их количестве приводят к развитию аутоиммунных заболеваний, в том числе рассеянному склерозу, ревматоидному артриту, псориазу и системной красной волчанке [13]. Следует отметить, что, согласно данным литературы, количество Treg с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ у здоровых людей не превышает 5,75% содержания всех Т-хелперов [14], и полученный нами *in vitro* результат практически в 12 раз превышает данное количество клеток. Генерация *in vitro* регуляторных Т-клеток представляет большой интерес в плане разработки новых технологий лечения аутоиммунных/аллергических заболеваний и контроля трансплантационных реакций. Следовательно, данный способ получения аутологичной популяции клеток, обогащенной Treg, может быть использован для лечения заболеваний, характеризующихся выраженным снижением количества и/или функциональной активности регуляторных Т-клеток.

Среди механизмов иммуносупрессорного действия регуляторных Т-лимфоцитов выделяют цитотоксический, осуществляемый путем синтеза и секреции перфорины и гранзима [11]. В нашей работе обнаружено, что галектин-1 вызывает 2-кратное повышение содержания перфорины в Т-регуляторных лимфоцитах.

Известно, что гранзимперфориновый цитоллиз клеток-мишеней свойствен НК-клеткам (естественные киллеры) и цитотоксическим CD8⁺-лимфоцитам. Однако группа ученых показала, что данный способ супрессии также характерен для Т-регуляторных клеток. Х. Сао и соавт. обнаружили, что Foxp3⁺-Т-регуляторные клетки синтезируют перфорин и гранзим В, при этом у CD4⁺CD25⁺-лимфоцитов синтез цитолитических молекул снижается на 5–30% [15].

Противоречивые данные получены в работе N. Sugimoto и соавт., согласно которым, экспрессия Foxp3 при активации Т-регуляторных клеток не влияет на продукцию галектина-1 и гранзима [16]. Напротив, в нашем эксперименте при действии рекомбинантного галектина-1 на клетки наблюдали параллельное повышение внутриклеточного содержания транскрипционного фактора Foxp3 и уровня цитолитического белка перфорины. Данный результат может быть обусловлен как за счет непосредственного влияния галектина-1 на запуск программы биосинтеза эффекторных молекул в клетках, так и опосредованно, через индукцию регулятора дифференцировки Foxp3.

Один из возможных механизмов супрессорного действия Treg цитокинзависимый, который осуществляется посредством продукции IL-10, IL-35 и TGFβ [17]. В исследованиях С. Bergmann и соавт. показано, что в опухолевом микроокружении преобладают Т-регуляторные клетки, экспрессирующие Foxp3 и продуцирующие IL-10, а также являющиеся главным механизмом супрессии иммунокомпетентных клеток [18]. Предполагается, что одним из путей ускользания опухолевых клеток из-под иммунного надзора является продукция ими (или стромальными клетками опухолевого микроокружения) галектина-1, что индуцирует апоптоз Т-клеток, находящихся в зоне контакта [19]. Повышенная экспрессия данного лектина обнаружена в клетках различ-

ных опухолей, включая астроцитому, меланому, рак простаты, толстой кишки, мочевого пузыря, яичников и гепатоцеллюлярную карциному. В большинстве случаев повышенная экспрессия галектина-1 коррелировала с более агрессивным фенотипом опухолей и способностью к метастазированию [20, 21]. На сегодняшний день накоплено много данных, указывающих на связь опухолевой прогрессии с повышенным уровнем Т-регуляторных клеток в опухолевых тканях. В частности, такая зависимость установлена для таких заболеваний, как рак яичников, рак легких, рак молочной железы и рак печени [22]. Согласно данным литературы и результатам собственного исследования, можно предположить, что опухолевые клетки, продуцируя галектин-1, способствуют дифференцировке Т-регуляторных клеток, и тем самым оказывают супрессорное действие на эффекторные механизмы иммунной защиты. Таким образом, один из перспективных способов преодоления иммуносупрессии при опухолевых заболеваниях может быть основан на использовании химических ингибиторов или моноклональных АТ к галектину-1.

Заключение

Действие *in vitro* галектина-1 в дозе 1 мкг/мл на дифференцированные регуляторные Т-лимфоциты приводит к экспансии клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, а также к повышению внутриклеточного содержания фактора Foxp3 и цитолитического белка перфорины, определяющих иммуносупрессорные свойства данной субпопуляции клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что иммунорегуляторное действие галектина-1 включает поддержание регуляторного фенотипа уже дифференцированных CD4⁺-лимфоцитов. Разработанная модель эксперимента может быть использована для направленной регуляции процесса дифференцировки лимфоцитов в сторону Т-регуляторных и получения популяции клеток, обладающих иммуносупрессорными свойствами.

Благодарности

Финансовая поддержка исследования обеспечена Советом по грантам при Президенте РФ (договор № 14.120.14.4184-НШ, проект № СП-208.2012.4 от 21.11.2012) и Российским фондом фундаментальных исследований (договор № 12-04-31224 мол_а).

ЛИТЕРАТУРА

- Caridade M., Graca L., Ribeiro R.M. Mechanisms underlying CD4CTreg immune regulation in the adult: from experiments to models. *Front. Immunol.* 2013; 4: 378; doi: 10.3389/fimmu.2013.00378.
- Jang E., Cho M. L., Oh H., Youn J. Deficiency of Foxp3⁺ regulatory T cells exacerbates autoimmune arthritis by altering the synovial proportions of CD4⁺ T cells and dendritic cells. *Immune Network.* 2011; 5: 299–306.
- Faustino L., Mucida D., Keller A.C., Demengeot J., Bortolucci K., Sardinha L.R. et al. Regulatory T cells accumulate in the lung allergic inflammation and efficiently suppress T-cell proliferation but not Th2 cytokine production. *Clin. Dev. Immunol.* 2012. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2012/721817/>.
- Cedeno-Laurent F., Dimitroff C. J. Galectin-1 research in T cell immunity: Past, present and future. *Clin. Immunol.* 2012; 2: 107–116.
- Якушина В.Д., Васильева О.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Савельева О.Е., Прохоренко Т.С. и др. Галектин-1: роль в формировании особенностей врожденного и приобретенного иммунитета. *Медицинская иммунология.* 2012; 14: 21–32.
- Dias-Baruffi M., Stowell S.R., Song S.C., Arthur C.M., Cho M., Rodrigues L.C. et al. Differential expression of immunomodulatory galectin-1 in peripheral leukocytes and adult tissues and its cytosolic organization in striated muscle. *Glycobiology.* 2010; 5: 507–20.
- Ito K., Scott S.A., Cutler S., Dong L.F., Neuzil J., Blanchard H. et al. Thiodigalactoside inhibits murine cancers by concurrently blocking effects of galectin-1 on immune dysregulation, angio-

- genesis and protection against oxidative stress. *Angiogenesis*. 2011; 3: 293–307.
8. Гольдберг Е. Д., ред. *Методы культуры тканей в гематологии*. Томск: Издательство ТГУ; 1992.
 9. Liu S.D., Tomassian T., Bruhn K.W., Miller J.F., Poirier F., Miceli M.C. Galectin-1 tunes TCR binding and signal transduction to regulate CD8 burst size. *J. Immunol.* 2009; 182: 5283–95.
 10. Chung C.D., Patel V.P., Moran M., Lewis L.A., Miceli M.C. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J. Immunol.* 2000; 165: 3722–9.
 11. Акинфиева О. В., Бубнова Л. Н. Роль субпопуляции естественных регуляторных CD4⁺CD25⁺T-клеток в норме и при патологии. *Медицинский академический журнал*. 2010; 10: 5–16.
 12. Митин А.Н., Литвина М.М., Шарова Н.И., Селиваненко В.Т., Мартаков М.А., Латышев С.В. и др. Экспрессия фактора Foxp3 и соотношение его изоформ в Т-клетках на разных стадиях дифференцировки. *Иммунология*. 2012; 4: 172–76.
 13. Buckner J.H. Mechanisms of impaired regulation by CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 12: 849–59.
 14. Хайдуков С. В., Зурочка А. В., Тотолян А. А., Черешнев В. А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа). *Медицинская иммунология*. 2009; 11: 227–38.
 15. Cao X., Cai S.F., Fehniger T.A., Song J., Collins L.I., Piwnica-Worms D.R. et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 2007; 27(4): 635–46.
 16. Sugimoto N., Oida T., Hirota K., Nakamura K., Nomura T., Uchiyama T. et al. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25⁺CD4⁺natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int. Immunol.* 2006; 18(8): 1197–209.
 17. Vignali D., Collison L.W., Workman C. J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 7: 523–32.
 18. Bergmann C., Strauss L., Zeidler R., Lang S., Whiteside T.L. Expansion and characteristics of human T regulatory type 1 cells in co-cultures simulating tumor microenvironment. *Cancer Immunol. Immunother.* 2007; 9: 1429–42.
 19. Du C., Wang Yu. The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2011; 1: 30–40.
 20. Rabinovich G.A., Ibarregui J.M. Conveying glycan information into T-cell homeostatic programs: a challenging role for galectin-1 in inflammatory and tumor microenvironments. *Immunol. Rev.* 2009; 230: 144–59.
 21. Astorgues-Xerri L., Riveiro M.E., Tijeras-Raballand A., Serova M., Neuzillet C., Albert S. et al. Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. *Cancer Treat. Rev.* 2014; 40(2): 307–19.
 22. Peng D.J., Liu R., Zou W. Regulatory T cells in human ovarian. *J. Oncol.* 2012. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jo/2012/345164/>.
 - immunity: Past, present and future. *Clin. Immunol.* 2012; 2: 107–16.
 5. Yakushina V.D., Vasil'eva O.A., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V., Saveleva O.E., Prokhorenko T.S. et al. Galectin-1 and its role in development of innate and adaptive immunity. *Meditsinskaya immunologiya*. 2012; 14: 21–32. (in Russian)
 6. Dias-Baruffi M., Stowell S.R., Song S.C., Arthur C.M., Cho M., Rodrigues L.C. et al. Differential expression of immunomodulatory galectin-1 in peripheral leukocytes and adult tissues and its cytosolic organization in striated muscle. *Glycobiology*. 2010; 5: 507–20.
 7. Ito K., Scott S.A., Cutler S., Dong L.F., Neuzil J., Blanchard H. et al. Thiodigalactoside inhibits murine cancers by concurrently blocking effects of galectin-1 on immune dysregulation, angiogenesis and protection against oxidative stress. *Angiogenesis*. 2011; 3: 293–307.
 8. Gol'dberg E.D., ed. *Tissue Culture Methods in Hematology. [Metody kul'tury tkani v gematologii]*. Tomsk: Izdatel'stvo TGU; 1992. (in Russian)
 9. Liu S.D., Tomassian T., Bruhn K.W., Miller J.F., Poirier F., Miceli M.C. Galectin-1 tunes TCR binding and signal transduction to regulate CD8 burst size. *J. Immunol.* 2009; 182: 5283–95.
 10. Chung C.D., Patel V.P., Moran M., Lewis L.A., Miceli M.C. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J. Immunol.* 2000; 165: 3722–9.
 11. Akinfiev O.V., Bubnova L.N. The role of naturally occurring regulatory CD4⁺CD25⁺ T-cell subpopulation in the normal state and in various diseases. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal*. 2010; 10: 5–16. (in Russian)
 12. Mitin A.N., Litvina M.M., Sharova N.I., Selivanenko V.T., Martakov M.A., Latyshev S.L. et al. The expression of the factor Foxp3 and ratio of its isoforms in T-cells at different stages of differentiation. *Immunologiya*. 2012; 4: 172–6. (in Russian)
 13. Buckner J.H. Mechanisms of impaired regulation by CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nature Reviews. Immunology*. 2010; 12: 849–59.
 14. Khaidukov S.V., Zurochka A.V., Totolyan A.A., Chereshev V.A. Major and lymphocyte population of human peripheral blood lymphocytes and their reference values, as assayed by multi-colour cytometry. *Meditsinskaya immunologiya*. 2009; 11: 227–38 (in Russian).
 15. Cao X., Cai S.F., Fehniger T.A., Song J., Collins L.I., Piwnica-Worms D.R. et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 2007; 27(4): 635–46.
 16. Sugimoto N., Oida T., Hirota K., Nakamura K., Nomura T., Uchiyama T. et al. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25⁺CD4⁺natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int. Immunol.* 2006; 18(8): 1197–209.
 17. Vignali D., Collison L.W., Workman C. J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 7: 523–32.
 18. Bergmann C., Strauss L., Zeidler R., Lang S., Whiteside T.L. Expansion and characteristics of human T regulatory type 1 cells in co-cultures simulating tumor microenvironment. *Cancer Immunol. Immunother.* 2007; 9: 1429–42.
 19. Du C., Wang Yu. The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2011; 1: 30–40.
 20. Rabinovich G.A., Ibarregui J.M. Conveying glycan information into T-cell homeostatic programs: a challenging role for galectin-1 in inflammatory and tumor microenvironments. *Immunol. Rev.* 2009; 230: 144–59.
 21. Astorgues-Xerri L., Riveiro M.E., Tijeras-Raballand A., Serova M., Neuzillet C., Albert S. et al. Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer. *Cancer Treat. Rev.* 2014; 40(2): 307–19.
 22. Peng D.J., Liu R., Zou W. Regulatory T cells in human ovarian. *J. Oncol.* 2012. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jo/2012/345164/>.

Поступила 12.04.14

REFERENCES

1. Caridade M., Graca L., Ribeiro R.M. Mechanisms underlying CD4CTreg immune regulation in the adult: from experiments to models. *Front. Immunol.* 2013; 4: 378: doi: 10.3389/fimmu.2013.00378.
2. Jang E., Cho M. L., Oh H., Youn J. Deficiency of Foxp3⁺ regulatory T cells exacerbates autoimmune arthritis by altering the synovial proportions of CD4⁺ T cells and dendritic cells. *Immune Network*. 2011; 5: 299–306.
3. Faustino L., Mucida D., Keller A.C., Demengeot J., Bortoluci K., Sardinha L.R. et al. Regulatory T cells accumulate in the lung allergic inflammation and efficiently suppress T-cell proliferation but not Th2 cytokine production. *Clin. Dev. Immunol.* 2012. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2012/721817/>.
4. Cedeno-Laurent F., Dimitroff C. J. Galectin-1 research in T cell

Received 12.08.14