

Е.О. Остапчук¹ , **Ж.Е. Мухатаев^{1,2}** , **Ю.В. Перфильева¹** 

¹Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Казахстан, г. Алматы

²Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы,
e-mail: katyostapchuk@gmail.com

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ВИТИЛИГО

Витилиго – это кожное заболевание, характеризующееся потерей меланоцитов и формированием очагов депигментации кожи. Хотя точная этиология и патогенез витилиго до сих пор остаются до конца не изученными, известно, что в основе патогенеза витилиго лежат аутоиммунные механизмы. Как и при большинстве аутоиммунных патологий, активно обсуждается роль дисфункции иммуносупрессорных Т-регуляторных (Treg) клеток при витилиго. Предполагается, что сниженная иммуносупрессорная активность и инфильтрация Treg-клетками пораженных участков кожи играет ключевую роль в срыве иммунной толерантности, ведущей к развитию витилиго. Однако, фенотипические и функциональные характеристики Treg-клеток при витилиго остаются малоизученными. Целью данного исследования было изучение фенотипа циркулирующих Treg-клеток при витилиго. В ходе исследования было обнаружено, что по сравнению со здоровыми добровольцами в периферической крови больных прогрессирующей формой витилиго достоверно снижена доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, а также доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, экспрессирующих иммуносупрессорный маркер CD39 и маркер клеточной адгезии и миграции CD44. У людей с ремиссией витилиго также было обнаружено снижение доли Treg-клеток с фенотипом CD39⁺ и CD44⁺FoxP3⁺ по сравнению с контролем, что может говорить о роли Treg-клеток в патогенезе витилиго и о снижении функциональной активности и рекрутирования Treg-клеток в область поражения витилиго, что может приводить к отсутствию надлежащего иммунологического надзора.

Ключевые слова: Т-регуляторные клетки, витилиго, CD39, CD44.

Y.O. Ostapchuk¹, Z. Mukhatayev^{1,2}, Y.V. Perfilyeva¹

¹M.A. Aitkhozhin's Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Kazakhstan, Almaty

²Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty,
e-mail: katyostapchuk@gmail.com

Phenotypical analysis of circulating T-regulatory cells in vitiligo patients

Vitiligo is an autoimmune skin disease characterized by the loss of melanocytes and development of skin depigmentation foci. The exact etiology and pathogenesis of vitiligo are not fully understood, but autoimmune processes have been strongly implicated in the development of the disease. As with other autoimmune diseases, the role of dysfunction of immunosuppressive T-regulatory (Treg) cells in Vitiligo has been actively discussed. It is assumed that reduced immunosuppressive activity and Treg cell infiltration of vitiligo-affected skin lesions play a key role in a breakdown of immune tolerance leading to the development of the disease. However, the phenotypic and functional characteristics of Treg cells in vitiligo remain poorly understood. The aim of this study was to investigate the phenotype of circulating Treg cells in vitiligo. It was found that the proportion of CD4⁺CD25⁺ Treg cells, as well as the proportion of CD4⁺CD25⁺ Treg cells expressing the immunosuppressive marker CD39 and the cell adhesion and migration marker CD44, were significantly reduced in the peripheral blood of vitiligo patients with active stage of the disease comparing to healthy volunteers. Moreover, we found a decreased proportion of Treg cells possessing CD39⁺ and CD44⁺FoxP3⁺ phenotypes in patients with stable vitiligo. Obtained data suggest that Treg cells play an important role in vitiligo pathogenesis and may indicate a decrease in the functional activity and the recruitment of Treg cells into vitiligo lesions leading to a lack of immunological surveillance.

Key words: T regulatory cells, vitiligo, CD39, CD44.

Е.О. Остапчук¹, Ж.Е. Мухатаев^{1,2}, Ю.В. Перфильева¹

¹М.А.А йтхожин атындағы молекулярлық биология және биохимия институты, Қазақстан, Алматы қ.

²Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.,
e-mail: katyostapchuk@gmail.com

Витилиго науқастарының перифериялық қанындағы Т-реттегіш жасушаларына фенотиптік талдау

Витилиго – бұл меланоциттердің жоғалуымен және терінің депигментациясы ошақтарының пайда болуымен сипатталатын тері ауруы. Витилигоның нақты этиологиясы мен патогенезі әлі де толық ашылмағанымен, витилиго патогенезінің негізі аутоиммунды механизм арқылы екендігі белгілі. Көптеген аутоиммундық патологиялардағыдай, иммуносупрессивті Т-реттегіш (Treg) жасушаларының дисфункциясының витилигодағы рөлі қазіргі таңда белсенді талқыланады. Иммуносупрессиялық белсенділіктің төмендеуі және зардап шеккен тері аймақтарындағы Treg жасушаларының санының аздығы витилигоның дамуына әкелетін иммундық төзімділікті бұзуда маңызды рөл атқарады деп болжанады. Алайда, витилиго құрамындағы Treg жасушаларының фенотиптік және функционалдық сипаттамалары нашар түсініледі. Бұл зерттеудің мақсаты витилиго құрамындағы Treg жасушаларының фенотипін зерттеу болды. Зерттеу көрсеткендей, үдемелі витилиго формасы бар пациенттердің перифериялық қанында сау еріктілермен салыстырғанда, CD4⁺ CD25⁺ Treg жасушаларының үлесі, сонымен қатар CD39 иммуносупрессивті маркерін білдіретін CD4⁺CD25⁺ Treg жасушаларының үлесі және CD44 жасушаларының адгезиясы мен миграциялық маркері айтарлықтай төмен. Витилиго ремиссиясымен ауыратын адамдарда Treg жасушаларының CD39⁺ және CD44⁺ FoxP3⁺ фенотиптері бақылауға қарағанда төмен екені және бұл витилиго патогенезіндегі Treg жасушаларының рөлін және функционалды белсенділіктің төмендеуін және Treg жасушаларын витилиго зақымдану аймағына жалдауды көрсетіп тиісті иммунологиялық қадағалаудың болмауына әкелуі мүмкін.

Түйін сөздер: Т реттегіш жасушалар, витилиго, CD39, CD44.

Введение

Витилиго представляет собой кожное заболевание, которое относят к гипомеланозам. Заболевание развивается в среднем у 1-2% населения, у лиц обоих полов, любой расы и примерно в половине случаев проявляется в возрасте до 20 лет. Хотя витилиго можно считать заболеванием, наносящим незначительный вред здоровью, люди с витилиго часто страдают серьезными эмоциональными и психологическими расстройствами, связанными с чувством стресса, смущения, низкой самооценки, особенно в профессиональной и общественной сферах. Кроме этого, депигментация может способствовать получению пациентами солнечных ожогов и развитию рака кожи, а также потери слуха и развитию воспалений радужной оболочки глаз [1].

Витилиго было идентифицировано как аутоиммунное заболевание, опосредованное аутореактивными CD8⁺ Т-клетками, реагирующими на меланосомный антиген – тирозиназу, антиген меланомы MART-1, меланосомный трансмембранный протеин (MelanA), gp100 и другие белки, экспрессируемые меланоцитами, что приводит к цитотоксическому ответу и депигментации кожи [2, 3]. Ранее было показано, что у пациентов, страдающих витилиго, доля циркулирующих меланоцит-специфичных CD8⁺ Т-клеток

значительно повышена по сравнению со здоровыми людьми и коррелирует с площадью очагов поражения кожи. Т-клетки при витилиго в большей степени экспрессируют молекулы, обеспечивающие хоуминг клеток в дерму, включая экспрессию кожного лимфоцитарного антигена (CLA) и кожного Т-клеточного хемоаттрактанта (STACK) [4]. Также, у пациентов с активными формами витилиго наблюдается повышенная инфильтрация Т-клеток на периферии очагов депигментации кожи [5], а также повышение уровня продукции цитокинов Th1-типа на периферии и непосредственно в очагах депигментации [6]. При этом, в экспериментах с использованием мышинной модели витилиго было показано, что удаление CD8⁺ Т-клеток предотвращает массовую гибель меланоцитов, тогда как повышение доли этих клеток усиливает депигментацию [2]. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в исследовании патофизиологии витилиго за последнее десятилетие, точные механизмы, лежащие в основе активации, расширения пула аутореактивных CD8⁺ Т-клеток и потери толерантности к аутоантигенам меланоцитов при витилиго, до сих пор не ясны [7].

Как и в случае других аутоиммунных патологий, в качестве одной из основных причин срыва иммунной толерантности при витилиго рассматривают отклонения в функционирова-

нии Т-регуляторных клеток (Treg), играющих ключевую роль в регуляции иммунного ответа и контролирующей иммунный ответ на собственные и чужеродные антигены, тем самым предотвращая развитие аутоиммунных нарушений [8]. Treg-клетки созревают в тимусе из незрелых CD4⁺CD8⁺ тимоцитов в ходе нормального биогенеза Т-лимфоцитов и, после выхода на периферию, участвуют в обеспечении периферической иммунологической толерантности. [9]. Treg-клетки находят в периферической крови и вторичных лимфоидных органах по их конститутивной экспрессии маркеров CD4 и CD25 [10]. В качестве дополнительного маркера Treg-клеток, определяют внутриклеточный транскрипционный фактор FoxP3, являющийся ДНК-связывающим белком, который необходим для дифференцировки и функционирования Treg-клеток [11].

Основными клетками-мишенями иммуносупрессорного действия Treg-клеток являются CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, отвечающие на аутоантиген. Treg-клетки подавляют активацию, пролиферацию и продукцию цитокинов аутоантиген-специфичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами через подавление ко-стимуляции дендритными клетками, абсорбции IL-2, а также при непосредственном межклеточном взаимодействии и посредством продукции супрессорных цитокинов и цитотоксических белков. При межклеточном контакте Treg-клетки могут убивать Т-клетки с помощью гранзим-зависимого или перфорин-зависимого механизмов или подавлять их пролиферацию и продукцию IL-2 через индукцию внутриклеточного циклического АМР, катализируемого CD39 (эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролазой) и CD73 (экто-5'-нуклеотидазой), экспрессируемых Treg-клетками [12], а также через иммуносупрессорные молекулы, экспрессированные на мембране Treg-клеток, индуцируемый глюкокортикоидами TNF-подобный рецептор (glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor, GITR), пептид латентности (latency-associated peptide, LAP) и антиген-4 цитолитических Т-лимфоцитов (cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, CTLA-4) [13]. К иммуносупрессорным цитокинам, продуцируемым Treg-клетками и подавляющим активность Т-лимфоцитов, относят трансформирующий фактор роста-β (transforming growth factor-beta, TGF-β), IL-35 и IL-10 [14].

Недавно проведенные исследования показали роль Treg-клеток в развитии витилиго, однако малочисленные данные до сих пор не позволяют сделать заключение относительно того, в чем

именно заключается дисфункция Treg-клеток, в изменении количества образующихся Treg-клеток, аномалий в их функциональной активности или их способности адгезии и хоуминга в кожные покровы. Так, было показано, что Treg-клетки способны регулировать активность меланоцит-специфичных CD8⁺ Т-клеток посредством CTLA-4 *in vitro*, при этом меланоцит-специфичные CD8⁺ Т-клетки у пациентов с витилиго обладают фенотипом, характерным для Т-клеток не подвергшихся иммуносупрессии Treg-клетками [15]. Репигментация кожи у мышей наблюдается при повышении инфильтрации Treg-клеток спонтанных эпидермальных очагов депигментации [16]. Также, супрессорный эффект Treg-клеток больных витилиго снижен в отношении антиген-специфичной пролиферации CD8⁺ Т-клеток [17, 18], что указывает на их важную роль в предотвращении продолжающегося иммунного ответа против меланоцитов. Однако, в настоящее время, результаты исследований доли циркулирующих или инфильтрирующих очаги депигментации Treg-клеток и их функциональной активности у пациентов с витилиго носят спорный характер. Результаты некоторых исследований показали значительное снижение доли Treg-клеток и экспрессии ими FoxP3, тогда как другие исследователи не обнаружили изменений в количестве циркулирующих CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg-клеток. При этом, доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, инфильтрирующих периферические участки и непосредственно очаги депигментации витилиго значительно снижена [19]. Однако, достоверных изменений в экспрессии рецепторов хоуминга CCR4, CCR5, CCR8 и CLA Treg-клетками периферической крови больных витилиго не было обнаружено. Treg-клетки, выделенные из периферической крови больных витилиго, были в равной степени способны мигрировать в направлении дермальных лигандов CCR4 и хемокина CCL22, что и Treg-клетки здоровых доноров [20].

В связи с этим, мы исследовали долю Treg-клеток и экспрессию ими функциональных маркеров и рецептора хоуминга трансмембранного гликопротеина I типа CD44 периферической крови больных витилиго.

Материалы и методы

В ходе исследования использовали венозную кровь здоровых доноров (ср. возраст 34,5±9,6 лет (26-51), n=8; женщины: ср. возраст 42,3±12,5 лет, n=3; мужчины: ср. возраст

29,8±3,0 лет, n=5), не имеющих аутоиммунных заболеваний или явных признаков других заболеваний, и людей с активными и неактивными формами витилиго (средний возраст – 23,7±7,4 лет (18-31), n=7; женщины: ср. возраст 21,0±1,4 лет, n=2; мужчины: ср. возраст 25,4±4,7 лет, n=5), характеристики больных витилиго доно-

ров представлены в таблице 1. Исследование было одобрено локальной этической комиссией Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина. Все доноры дали информированное согласие, исследование проводилось согласно этическим принципам Хельсинской Декларации.

Таблица 1 – Характеристики больных витилиго, участвующих в исследовании

№ п./п.	Пол	Возраст	Продолжительность заболевания	Течение заболевания	Клиническая форма
1	Муж.	26	17 лет	Ремиссия (8 лет)	Локализованная форма (поражение 4% кожного покрова)
2	Муж.	26	9 лет	Ремиссия (5 лет)	Локализованная форма (поражение 5% кожного покрова)
3	Жен.	22	15 лет	Прогрессирующее	Генерализованная форма (поражение 30-40% кожного покрова)
4	Муж.	31	1,5 мес.	Прогрессирующее	Локализованная форма (поражение 1% кожного покрова)
5	Жен.	20	6 лет	Прогрессирующее	Локализованная форма (поражение 2% кожного покрова)
6	Муж.	26	9 лет	Ремиссия (5 лет)	Локализованная форма (поражение 5% кожного покрова)
7	Муж.	18	11 лет	Прогрессирующее	Локализованная форма (поражение 10% кожного покрова)

Из цельной крови выделяли мононуклеарные клетки центрифугированием на Histopaque-1,077 (Sigma-Aldrich, США) 20 мин при 3000g, 20°C и отмывали средой RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США). Далее фенотип и экспрессию супрессорных молекул оценивали методом проточной цитофлуориметрии, анализируя Treg-клетки в гейте CD4⁺CD25⁺ (рис. 1). Для этого клетки метили флуоресцентно-мечеными антителами к CD4-PE, CD39-APC, CTLA4-APC, IL10-FITC, GITR-APC, CD73-APC, LAP(TGFβ1)-APC, TGFβ1-PE, FoxP3-APC (Miltenyi Biotec, США), CD4-FITC, CD25-PerCP-Cy5.5, FoxP3-PE, CD44-FITC (BD Biosciences, США), IL35-APC (R&D Systems, США). Сначала проводили мечение поверхностных маркеров, согласно инструкциям фирм-производителей, затем клетки фиксировали, пермеабелизовали и отмывали с использованием набора FOXP3 Staining Buffer Set (Miltenyi Biotec, США), далее производили внутриклеточное окрашивание и анализировали с использованием цитофлуориметра FACSCalibur и программного обеспечения BD CellQuest Pro Software (BD Biosciences, США).

Полученные данные обрабатывали методами математической статистики. Графики содержат информацию в виде средних арифметических величин ± стандартного отклонения. Достоверность различия *p* рассчитывали по критерию Стьюдента (Ттест). Различие двух сравниваемых выборок считали достоверным при уровне значимости *p*<0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

На сегодняшний день в литературе имеются разногласия относительно изменения доли CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg-клеток периферической крови при витилиго [19]. Мы изучили данные популяции в группе здоровых доноров и больных витилиго. В ходе исследования нами было обнаружено, что в группе больных витилиго значительно снижена доля циркулирующих CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток по сравнению с группой здоровых доноров, при этом достоверных различий в доли CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg-клеток периферической крови между данными группами доноров обнаружено не было (рис. 1).

При сравнении доли CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток периферической крови между контрольной группой и группой больных витилиго с прогрессирующей формой заболевания, мы также обнаружили достоверное снижение количества данных клеток в при прогрессирующем витилиго (9,0±1,6 (n=8), 6,4±0,04 (n=4), p=0,003, соответственно). Доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток периферической крови не отличалась между группами здоровых доноров и больных витилиго с неактивной формой заболевания и между группами больных с прогрессирующей и неактивной формами витилиго (9,0±1,6 (n=8), 8,2±1,3 (n=3), p=0,4; 6,4±0,04 (n=4), 8,2±1,3 (n=3), p=0,1, соответственно) (данные не показаны). Уровень экспрессии FoxP3 Treg-клетками не отличался до-

стоверно между всеми исследуемыми группами (данные не показаны).

Полученные нами результаты противоречат ранее опубликованным данным, согласно которым доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, экспрессирующих FoxP3, снижена в периферической крови больных с прогрессирующим витилиго по сравнению со здоровыми людьми и больными с неактивной формой заболевания [21]. Однако полученные нами данные свидетельствуют о том, что количество циркулирующих CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток коррелирует с прогрессированием витилиго и подтверждают роль недостаточности данных клеток в срыве иммунологической толерантности и патогенезе витилиго.

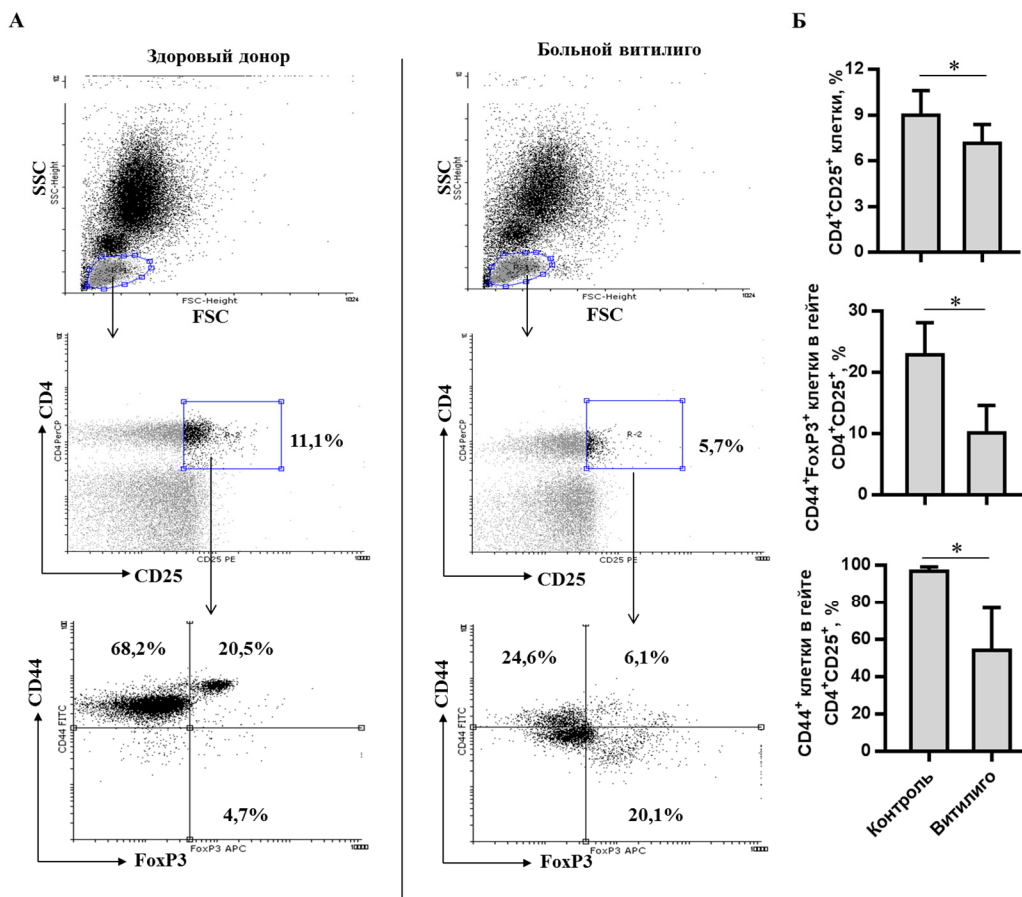


Рисунок 1 – Доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, экспрессирующих CD44⁺FoxP3⁺ и CD44⁺, периферической крови здоровых доноров (Контроль) и больных витилиго (Витилиго).

Представлены репрезентативные (А) и обобщенные данные в виде M±SD (Б), достоверность различий между группами представлена как *p<0,05 (по критерию Стьюдента)

Известно, что доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, инфильтрирующих очаги депигментации витилиго, значительно снижена, что считается основ-

ной причиной отсутствия регуляции аутоиммунного отмета против меланоцитов [22, 23]. Тем не менее, в ранее проведенных исследованиях

попытки выявить причины снижения тропности Treg-клеток в пораженные участки дермы, не увенчались успехом. В частности, не было обнаружено отклонений в экспрессии рецепторов адгезии и хоуминга CCR4, CCR5, CCR8 и CLA Treg-клетками периферической крови при витилиго [20]. Однако, экспрессия одного из центральных рецепторов привлечения Treg-клеток из кровяного русла в места воспаления – CD44 [24] при витилиго ранее не изучалась. Таким образом, следующим этапом нашего исследования было изучение экспрессии CD44 CD4⁺CD25⁺ Treg-клетками периферической крови больных прогрессирующей и неактивной формами витилиго.

В ходе исследования нами было обнаружено, что доля циркулирующих CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, экспрессирующих CD44, достоверно снижена в группе больных витилиго по сравнению со здоровыми добровольцами. Более того, процент CD44⁺FoxP3⁺-клеток в гейте CD4⁺CD25⁺ также был значительно снижен в группе больных, по отношению к контрольной группе (рис. 1). Аналогичные данные были получены в отношении доли CD44⁺ и CD44⁺FoxP3⁺ Treg-клеток при сравнении контрольной группы с группой больных прогрессирующей формой витилиго (96,9±2,3 (n=8), 46,3±26,3 (n=4), $p=0,03$; 22,9±5,2 (n=8), 7,8±4,6 (n=4), $p=0,001$, соответственно). Доля CD44⁺FoxP3⁺ CD4⁺CD25⁺-клеток также была значительно выше в периферической крови здоровых доноров по сравнению с донорами с неактивной формой витилиго (96,9±2,3 (n=8), 13,3±2,5 (n=3), $p=0,003$, соответственно). Достоверных отличий в уровне экспрессии CD44 CD4⁺CD25⁺-клетками между группой здоровых доноров и больных неактивной формой витилиго, а также экспрессии CD44 CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg-клетками между группами больных прогрессирующей и неактивной формами витилиго обнаружено не было (данные не показаны).

Таким образом, экспрессия рецептора хоуминга CD44 Treg-клетками периферической крови при витилиго снижается. Мы можем предположить, что данная дисфункция Treg-клеток может приводить к снижению тропности Treg-клеток в дерму очагов витилиго. Более того, ранее в исследованиях на мышах было показано, что экспрессия CD44 положительно коррелирует с экспрессией Foxp3, продукцией IL-10, повышенной пролиферацией и супрессорной активностью Treg-клеток в отношении пролиферации T-клеток [25]. Способность связывать

компонент межклеточного матрикса – гиалуронан, активными изоформами CD44 дискриминирует Treg-клетки с повышенным супрессорным потенциалом и степенью активации [26]. Также ранее было показано, что Treg-клетки мышей с отсутствием гена, кодирующего CD44, обладают сниженной способностью подавления T-клеточного иммунитета [27]. Мы можем предположить, что снижение доли Treg-клеток, экспрессирующих CD44, при развитии витилиго свидетельствует об уменьшении пула Treg-клеток способных эффективно подавлять активность меланоцит-специфичных CD8⁺ T-клеток у пациентов.

Далее мы сравнили уровень экспрессии функциональных маркеров Treg-клетками периферической крови больных витилиго и здоровых доноров. Нами не было выявлено значимых различий в доли CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg-клеток, экспрессирующих маркеры CTLA-4, IL-10, GITR, CD73, LAP, TGFβ и IL-35, между исследуемыми группами (данные не показаны). Однако мы обнаружили достоверное понижение уровня экспрессии CD39 CD4⁺CD25⁺ Treg-клетками периферической крови больных витилиго по отношению к здоровым донорам (рис. 2). Кроме того, доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, экспрессирующих CD39, была достоверно выше в группе здоровых доноров при сравнении с группой больных, страдающих прогрессирующей и неактивной формой витилиго (81,8±22,2 (n=8), 35,6±16,3 (n=4), $p=0,01$; 42,6±21,4 (n=3), $p=0,04$, соответственно). Отличий в экспрессии CD39 CD4⁺CD25⁺ Treg-клетками между группами больных прогрессирующей и неактивной формой витилиго обнаружено не было (данные не показаны).

Как было отмечено выше, экспрессия CD39 ассоциирована с супрессорной активностью Treg-клеток и каталитическая инактивация поверхностного АТФ молекулой CD39 является одним из ключевых иммуносупрессорных механизмов Treg-клеток [28]. CD39 гидролизует как аденозинтрифосфат, так и аденозиндифосфат до монофосфата [29]. Связывание аденозина с его A2A-рецептором, который представлен на мембране эффекторных T-клетках и дендритных клеток, приводит к увеличению внутриклеточного циклического аденозинмонофосфата и подавлению функции этих клеток. Существуют экспериментальные данные о том, что супрессия пролиферации T-клеток мышей, нокаутных по A2A гену, намного ниже, чем у диких мышей. Трансдукция гена *foxp3* в мышинные CD25⁺

Т-клетки индуцирует экспрессию ими CD39, а предварительная инкубация Treg-клеток в АТФ-содержащей среде снижает АТФ-зависимое созревание DC при дальнейшей их ко-инкубации. Помимо прямого супрессорного эффекта, уда-

ление АТФ с цитоплазматической мембраны клеток молекулой CD39 позволяет Treg-клеткам проникать в области воспаления и подавлять АТФ-индуцированные воспалительные реакции [30].

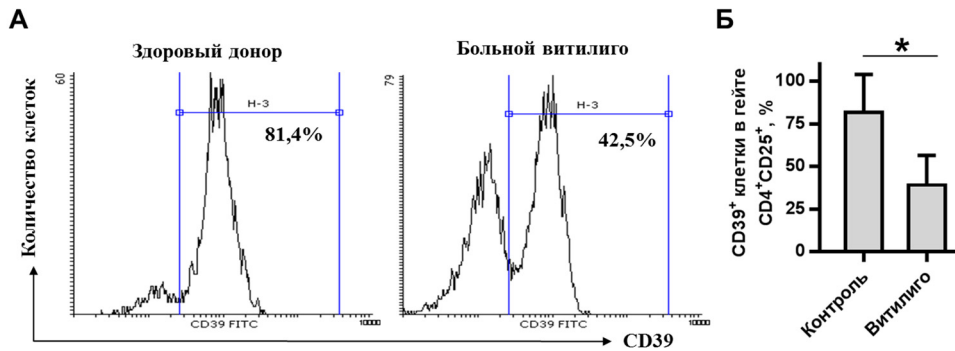


Рисунок 2 – Доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, экспрессирующих CD39, в периферической крови здоровых доноров (Контроль) и больных витилиго (Витилиго). Представлены репрезентативные (А) и обобщенные данные в виде M±SD (Б), достоверность различий между группами представлена как * p<0,05 (по критерию Стьюдента)

Поскольку полученные нами данные свидетельствуют о снижении экспрессии супрессорной молекулы CD39 Treg-клетками при прогрессирующем витилиго и при ремиссии заболевания, мы можем предположить вклад дисфункции Treg-клеток в патогенез витилиго. Снижение тропности и экспрессии CD39 Treg-клетками может приводить к неконтролируемому повышению количества и активации меланоцит-специфичных Т-клеток и их аутоиммунному цитотоксическому действию в очагах витилиго.

Заключение

В результате проведенного исследования мы установили, что доля общей популяции CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, а также доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, экспрессирующих иммуносупрессорную молекулу CD39 и рецептор клеточной адгезии и миграции CD44, снижены в периферической крови у больных витилиго, страдающих прогрессирующей формой заболевания. Также было установлено, что у больных вити-

лиго, находящихся на стадии ремиссии, также снижена доля Treg-клеток с фенотипом CD39⁺ и CD44⁺FoxP3⁺ по сравнению с контролем. Полученные данные указывают на дисфункцию Treg-клеток при витилиго и могут свидетельствовать о снижении их иммуносупрессорных свойств и способности эффективно мигрировать в очаги депигментации, что может приводить к неконтролируемой активности меланоцит-специфичных Т-клеток и прогрессии заболевания.

Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов нарушения иммунной регуляции при витилиго и могут послужить основой для разработки новых подходов к лечению витилиго на основе повышения супрессорной активности Treg-клеток и их рекрутирования в пораженные витилиго участки кожи.

Работа выполнена в рамках гранта AP05131691 "Молекулярные механизмы влияния Т-регуляторных клеток на активность опухолевых клеток" Комитета Науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Литература

- 1 Pandve, H.T. "Vitiligo: is it just a dermatological disorder?" *Indian J. Dermatol.* 53, no. 1 (2008): 40-41.
- 2 van den Boorn, J.G., Konijnenberg, D., DelleMijn, T.A., et al. "Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients." *J. Invest. Dermatol.* 129, no. 9 (2009): 2220-2232.
- 3 Ogg, G.S., Rod Dunbar, P., Romero, P., Chen, J.L., Cerundolo, V. "High frequency of skin-homing melanocyte-specific cytotoxic T lymphocytes in autoimmune vitiligo." *J. Exp. Med.* 188, no. 6 (1998): 1203-1208.
- 4 Strassner, J.P., Harris, J.E. "Understanding mechanisms of autoimmunity through translational research in vitiligo." *Curr. Opin. Immunol.* 43, (2016): 81-88.
- 5 Le Poole, I.C., van den Wijngaard, R.M., Westerhof, W., Das, P.K. "Presence of T cells and macrophages in inflammatory vitiligo skin parallels melanocyte disappearance." *Am. J. Pathol.* 148, no. 4 (1996): 1219-1228.
- 6 Le Poole, I.C., Stennett, L.S., Bonish, B.K., et al. "Expansion of vitiligo lesions is associated with reduced epidermal CDw60 expression and increased expression of HLA-DR in perilesional skin." *Br. J. Dermatol.* 149, no. 4 (2003): 739-748.
- 7 Ujiie, H. "Regulatory T cells in autoimmune skin diseases." *Exp. Dermatol.* 28, no. 6 (2019): 642-646.
- 8 Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M. "Regulatory T cell and immune tolerance." *Cell.* 133, no. 5 (2008): 775-787.
- 9 Taams, L.S., Akbar, A.N. "Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 293, (2005): 115-131.
- 10 Ballke, C., Gran, E., Baekkevold, E.S., Jahnsen, F.L. "Characterization of Regulatory T-Cell Markers in CD4+ T Cells of the Upper Airway Mucosa." *PLoS One.* 11, no. 2 (2016): e0148826.
- 11 Allan, S.E., Alstad, A.N., Merindol, N., et al. "Generation of potent and stable human CD4+ T regulatory cells by activation-independent expression of FOXP3." *Mol. Ther.* 16, no. 1 (2008): 194-202.
- 12 Nishikawa, H., Sakaguchi, S. "Regulatory T cells in tumor immunity." *Int. J. Cancer.* 127, (2010): 759-767.
- 13 Galdino, N.A.L., Loures, F.V., Araújo, E.F., et al. "Depletion of regulatory T cells in ongoing paracoccidioidomycosis rescues protective Th1/Th17 immunity and prevents fatal disease outcome." *Sci. Rep.* 8, (2018): e16544.
- 14 Vignali, D.A., Collison, L.W., Workman, C.J. "How regulatory T cells work." *Nat. Rev. Immunol.* 8, (2008): 523-532.
- 15 Maeda, Y., Nishikawa, H., Sugiyama, D., et al. "Detection of self-reactive CD8+ T cells with an anergic phenotype in healthy individuals." *Science.* 346, (2014): 1536-1540.
- 16 Eby, J.M., Kang, H.K., Klarquist, J., et al. "Immune responses in a mouse model of vitiligo with spontaneous epidermal de- and repigmentation." *Pigment Cell Melanoma Res.* 27, no. 6 (2014): 1075-1085.
- 17 Lili, Y., Yi, W., Ji, Y., et al. "Global activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes correlates with an impairment in regulatory T cells in patients with generalized vitiligo." *PLoS One.* 7, (2012): e37513.
- 18 Ben Ahmed, M., Zaraq, I., Rekik, R., et al. "Functional defects of peripheral regulatory T lymphocytes in patients with progressive vitiligo." *Pigment Cell Melanoma Res.* 25, (2012): 99-109.
- 19 Dwivedi, M., Kemp, E.H., Laddha, N.C., et al. "Regulatory T cells in vitiligo: Implications for pathogenesis and therapeutics." *Autoimmun Rev.* 14, no. 1 (2015): 49-56.
- 20 Klarquist, J., Denman, C.J., Hernandez, C., et al. "Reduced skin homing by functional Treg in vitiligo." *Pigment Cell Melanoma Res.* 23, no. 2 (2010): 276-286.
- 21 Dwivedi, M., Laddha, N.C., Arora, P., Marfatia, Y.S., Begum, R. "Decreased regulatory T-cells and CD4(+)/CD8(+) ratio correlate with disease onset and progression in patients with generalized vitiligo." *Pigment Cell Melanoma Res.* 26, (2013): 586-591.
- 22 Abdallah, M., Lotfi, R., Othman, W., Galal, R. "Assessment of tissue FoxP3+, CD4+ and CD8+ T-cells in active and stable nonsegmental vitiligo." *Int. J. Dermatol.* 53, (2014): 940-946.
- 23 Ono, S., Tanizaki, H., Otsuka, A., et al. "Coexistent skin lesions of vitiligo and psoriasis vulgaris. Immunohistochemical analyses for IL-17A-producing cells and regulatory T cells." *Acta Derm. Venereol.* 94, (2014): 329-330.
- 24 DeGrendele, H.C., Estess, P., Picker, L.J., Siegelman, M.H. "CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte/endothelial cell primary adhesion pathway." *J. Exp. Med.* 183, (1996): 1119-1130.
- 25 Campbell, D.J., Koch, M.A. "Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells." *Nat. Rev. Immunol.* 11, no. 2 (2011): 119-130.
- 26 Firan, M., Dhillon, S., Estess, P., Siegelman, M.H. "Suppressor activity and potency among regulatory T cells is discriminated by functionally active CD44." *Blood.* 107, no. 2 (2006): 619-627.
- 27 Tang, Q., Henriksen, K.J., Bi, M., et al. "In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes." *J. Exp. Med.* 199, (2004): 1455-1465.
- 28 Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., et al. "Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression." *Blood.* 110, (2007): 1225-1232.
- 29 Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., et al. "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." *J. Exp. Med.* 204, (2007): 1257-1265.
- 30 Shevach, E.M. "Mechanisms of FOXP3 T regulatory cell-mediated suppression." *Immunity.* 30, (2009): 636-45.