

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ЭРГОТОПОАССОЦИИРОВАННЫХ МАРКЕРОВ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ В УСЛОВИЯХ ПОЛИКЛОНАЛЬНОЙ АКТИВАЦИИ IN VITRO

© *Е. А. Блинова*^{1,*} *Е. А. Папкина*¹ *А. Е. Тевс*^{2,3} *В. М. Непомнящих*²
*М. И. Леонова*² *Д. В. Демина*² *В. А. Козлов*^{1,3}

¹ *Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, 630099,*

² *Клиника иммунопатологии Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, 630047, и*

³ *Кафедра клинической иммунологии Новосибирского государственного медицинского университета, Новосибирск, 630047;*

** электронный адрес: blinovaelena-85@yandex.ru*

Антиэрготипический ответ приводит к формированию эффекторных Т-клеток, способных элиминировать активированные лимфоциты вне зависимости от их антигенной специфичности, поскольку в качестве мишеней для данных клеток выступают молекулы, появляющиеся в процессе активации клетки (эрготопы). В настоящей работе мы исследовали уровень экспрессии эрготопоассоциированных маркеров CD25, HSP60 и HLA-DR Т-лимфоцитами, выделенными из крови пациентов с atopическим дерматитом, сразу после выделения и после культивирования. В результате 10-суточного культивирования в присутствии антител анти-CD3 и IL-2 на Т-клетках изменился уровень экспрессии маркеров ранней и поздней активации: среди CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов число CD25-позитивных клеток увеличилось до 68 и 47 %, а число HLA-DR-позитивных клеток — до 26 и 33 % соответственно. Плотность молекул HLA-DR на поверхности активированных Т-клеток возросла более чем в 5 раз. Практически все Т-клетки до и после культивирования экспрессировали белок теплового шока 60 кДа, однако активированные in vitro CD4⁺-клетки содержали больше этих молекул, чем активированные CD8⁺- и CD4⁺-клетки периферической крови. Таким образом, Т-лимфоциты пациентов с atopическим дерматитом имели статус активированных клеток, экспрессируя в достаточном количестве маркеры ранней и поздней активации, и при введении в организм, возможно, способствовали бы индукции антиэрготипического ответа. Учитывая, что антиэрготипическая регуляция действует в отношении активированных Т-клеток вне зависимости от их антигенной специфичности, иммунотерапия на основе аутологичных активированных Т-лимфоцитов может представлять интерес в качестве подхода, целенаправленно воздействующего на патогенетические звенья atopического дерматита.

Ключевые слова: эрготоп, Т-лимфоциты, антиэрготипическая регуляция, активационные маркеры, HLA-DR.

Принятые сокращения: АД — atopический дерматит, МНК — моноклеарные клетки, HLA-DR -лейкоцитарный антиген человека, молекула главного комплекса гистосовместимости II класса, HSP — белок теплового шока, IL-2 — интерлейкин-2, МНС — главный комплекс гистосовместимости.

В литературе описано довольно большое количество клеток, выполняющих регуляторные функции в отношении иммунных процессов. Их дифференцируют на основании фенотипических характеристик и механизмов действия (Козлов, 2016). Особое место в реализации этих функций занимают сетевые взаимодействия, включающие в себя идиотип-антиидиотипические Т-Т-клеточные взаимодействия, в результате которых осуществляются распознавание и специфический киллинг Т-клеток определенной антигенной специфичности, а также еще один тип регуляции, направленный против детерминант активированных антигеном Т-клеток («эрготопов») — антиэрготипический ответ (Lohse et al., 1989). Первый вид ре-

гуляции (антиидиотипический ответ) связан с фагоцитозом Т-клеток, подвергшихся активационному апоптозу, антигенпрезентирующими клетками и представлением на их поверхности пептидов, входящих в структуру Т-клеточного рецептора и определяющих его специфичность (CDR и Fr), в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Реализация антиэрготипического ответа происходит без специализированных антигенпрезентирующих клеток, поскольку набор детерминант активированных Т-клеток включает в себя все необходимые молекулы — молекулы МНС, костимуляторные молекулы (CD80/86) и молекулы адгезии (Кожеников, 2009). В результате формируются эффекторные

антиэрготипические клетки, действующие в отношении активированных Т-клеток независимо от их антигенной специфичности и способные контролировать развитие аутоиммунной патологии (Lohse et al., 1989; Кожевников, 2009).

В качестве эрготопа может выступать любая аутологичная молекула, удовлетворяющая трем условиям. Во-первых, уровень ее экспрессии должен увеличиваться в результате Т-клеточной активации. Во-вторых, эта молекула должна быть процессирована и представлена на поверхности активированных Т-лимфоцитов в комплексе с МНС I или II класса. В-третьих, эрготоп должен распознаваться Т-клетками, что в свою очередь должно приводить к их активации и проявлению эффекторных функций (Quitana et al., 2008; Кожевников, 2009). Показано, что CD25 и белок теплового шока HSP60 удовлетворяют этим условиям, а иммунизация пептидами или последовательностями ДНК, кодирующими эти молекулы, индуцирует антиэрготипический ответ при аутоиммунных патологиях (Lohse et al., 1989; Mimran et al., 2004; Hong et al., 2006; Huurman et al., 2007). Однако развитие антиэрготипического ответа продемонстрировано не только при вакцинации антиген-реактивными Т-клетками, но и при введении мышам спленоцитов, поликлонально активированных конканавалином А. При этом покоящиеся спленоциты не обладали подобным действием (Ильина и др., 2007). Эти данные послужили основой для клинических исследований поликлонально активированных Т-клеток для лечения иммунопатологических заболеваний, для которых выявление антигенной специфичности Т-клеток, участвующих в патогенезе, осложнено. Одним из таких заболеваний является атопический дерматит (АД).

Целью настоящей работы было исследование *in vitro* экспрессии эрготопоассоциированных маркеров (CD25, HSP60 и HLA-DR) в поликлонально активированных Т-клетках, полученных от пациентов с АД.

Материал и методика

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из периферической крови 7 пациентов с АД средней степени тяжести, преимущественно распространенной формы. Средний возраст в группе составлял 27 ± 2.7 года. Все исследования были проведены после получения информированного согласия от пациентов.

Реактивы: фиколл 400 (BioClot GmbH, Германия); урографин 76 % (Bayer Schering Pharma AG, Германия); ЭДТА (Gerbu, Германия); забуференный физиологический раствор или фосфатно-солевой буфер (Биолот, Россия); среда RPMI-1640 и сыворотка FCS (HyClone, США); очищенные антитела анти-CD3 (МедБиоСпектр, Россия); ронколейкин (рекомбинантный ИЛ-2 человека, НПК Биотех, Россия); гентамицин (Дальхимфарм, Россия); тиенам (Merck Sharp & Dohme Corp., США); моноклональные антитела: анти-CD3-PE/Cy7 (Beckman Coulter, США); анти-CD127-PerCP/Cy5.5, CD4-APC/Cy7 (Bioegend, США); анти-CD25-PE, анти-HLA-DR-FITC, анти-CD3-APC и анти-HSP60-FITC (Becton Dickinson, США); анти-CD4-PE (Сорбент, Россия); раствор для фиксации Cytofix/Cytoperm и раствор для пермеабиллизации Perm/Wash (Becton Dickinson, США).

Для выделения мононуклеарных клеток (МНК) периферическую кровь, стабилизированную гепа-

рином, центрифугировали в градиенте плотности фикоколл-верографина (1.078 г/мл) в течение 20 мин при 2.7 тыс. об/мин, после чего МНК собирали и отмывали дважды забуференным физиологическим раствором, содержащим ЭДТА (ЗФР), в течение 5 мин при 1 тыс. об/мин. Осадок ресуспендировали в среде RPMI-1640 и считали клетки в камере Горяева.

Выделенные из крови МНК культивировали в течение 10 сут в культуральных флаконах (2 млн клеток на 1 мл) в питательной среде RPMI-1640, содержащей 10 % сыворотки FCS, 50 мкг/мл гентамицина и 25 мкг/мл тиенама. В качестве активаторов использовали антитела анти-CD3 (1 мкг/мл) и рекомбинантный ИЛ-2 человека (100 ед./мл). Через 7 сут культивирования клетки реактивировали активаторами и заменяли 50 % полной среды на свежую. Часть клеток перед культивированием отбирали для оценки эрготопоассоциированных маркеров. Молекулы HLA-DR и CD25 экспрессированы на мембране клеток, поэтому для их определения использовали протокол мечения для поверхностных маркеров.

Фенотипирование Т-регуляторных клеток осуществляли по поверхностным маркерам, выделяя их как популяцию CD4⁺25⁺127⁻-лимфоцитов. Лимфоциты периферической крови, свежeweделенные или после культивирования отмывали ЗФР-ЭДТА, после чего проводили мечение моноклональными антителами, конъюгированными с флуорохромами (анти-CD3-PE/Cy7, анти-CD4-APC/Cy7, анти-CD25-PE, анти-CD127-PerCP/Cy5.5 и анти-HLA-DR-FITC), в количестве, рекомендуемом производителем. После этого клетки отмывали ЗФР и оценивали долю клеток, несущих на себе исследуемые маркеры, используя метод проточной цитофлуориметрии.

Определение содержания внутриклеточного HSP60. Свежeweделенные или культивированные лимфоциты отмывали ЗФР и окрашивали сначала антителами к поверхностным маркерам (анти-CD3-APC и анти-CD4-PE), как описано выше. Затем клетки фиксировали раствором Cytofix/Cytoperm в течение 20 мин при 4 °С, после чего дважды отмывали раствором Perm/Wash и окрашивали моноклональными антителами к HSP60, меченными FITC. После двух отмывок раствором Perm/Wash клетки ресуспендировали в 250 мкл этого же раствора. Для учета неспецифического связывания моноклональных антител к HSP60 использовали изотипический контроль. Цитометрический анализ данных проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США) с помощью программного обеспечения Diva 6.1 (Becton Dickinson, США).

Статистический анализ данных проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. Поскольку не все показатели имели нормальное распределение по критерию Шапиро—Уилка, применяли методы непараметрической статистики. Для сравнения связанных переменных использовали парный критерий Вилкоксона, а для оценки несвязанных переменных — критерий Манна—Уитни. Выявленные отличия считали достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Активированные клетки в отличие от покоящихся способны быть антигенпрезентирующими клетками за счет экспрессии молекул МНС, молекул адгезии, костиче-

Экспрессия маркеров активации на Т-клетках до и после культивирования с анти-CD3 и ИЛ-2 *in vitro* при атопическом дерматите

Субпопуляция Т-клеток	Экспрессия маркера, %	
	до культивирования	после культивирования
CD4 ⁺	42.9 (40.4—48.7)	33 (23.4—35.6) ^a
CD8 ⁺	20.9 (18—25.5)	56.2 (51.7—58.9) ^a
CD4 ⁺ 25 ⁺	9.7 (7.2—13.7)	74.6 (46.2—85.4) ^a
CD4 ⁺ DR ⁺	5.2 (3.7—6.5)	19.1 (18.3—32.2) ^a
CD8 ⁺ 25 ⁺	1.2 (0.7—1.4)	57.6 (33.1—65.1) ^a
CD8 ⁺ DR ⁺	6.4 (1.9—8.2)	27.9 (19.4—37.5) ^a
Трег (CD4 ⁺ 25 ⁺ 127 ⁻)	5.5 (5.0—7.1)	6.5 (2.6—6.7)
CD4 ⁺ HSP60 ⁺	99.7 (98.1—99.9)	99.7 (99.6—99.9)
CD8 ⁺ HSP60 ⁺	99.7 (93.8—99.9)	99.8 (99.3—99.9)

Примечание. Данные приведены в виде медианы (МЕ) с указанием в скобках интерквартильного размаха (25—75 перцентили). ^a Достоверность различий между группами до и после культивирования (по парному критерию Вилкоксона) при $P < 0.05$. Трег — регуляторные Т-клетки. За 100 % в случае лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺ приняты все события из лимфоцитарного гейта, для остальных субпопуляций — число клеток в популяции CD4⁺ или CD8⁺ соответственно.

муляторных молекул и молекул активации (Кожевников, 2009). Кроме того, они способны участвовать в различных видах иммунорегуляторных реакций. По этой причине активированные Т-лимфоциты предпочтительнее используются в качестве клеточных препаратов для иммунотерапии. В процессе культивирования CD4⁺ и CD8⁺-лимфоциты пациентов с АД приобрели статус полноценно активированных клеток: значительно увеличилась экспрессия поверхностных маркеров ранней и поздней активации CD25 и HLA-DR (см. таблицу). Изменился субпопуляционный состав культуры: доля CD8⁺-Т-клеток стала составлять 56.2 %. При этом число Т-регуляторных клеток сохранилось на том же уровне, что и до культивирования. Таким образом, выбранный нами протокол приводит к накоплению активированных Т-клеток, которые при введении в организм человека предположительно смогут индуцировать антиэрготипический ответ.

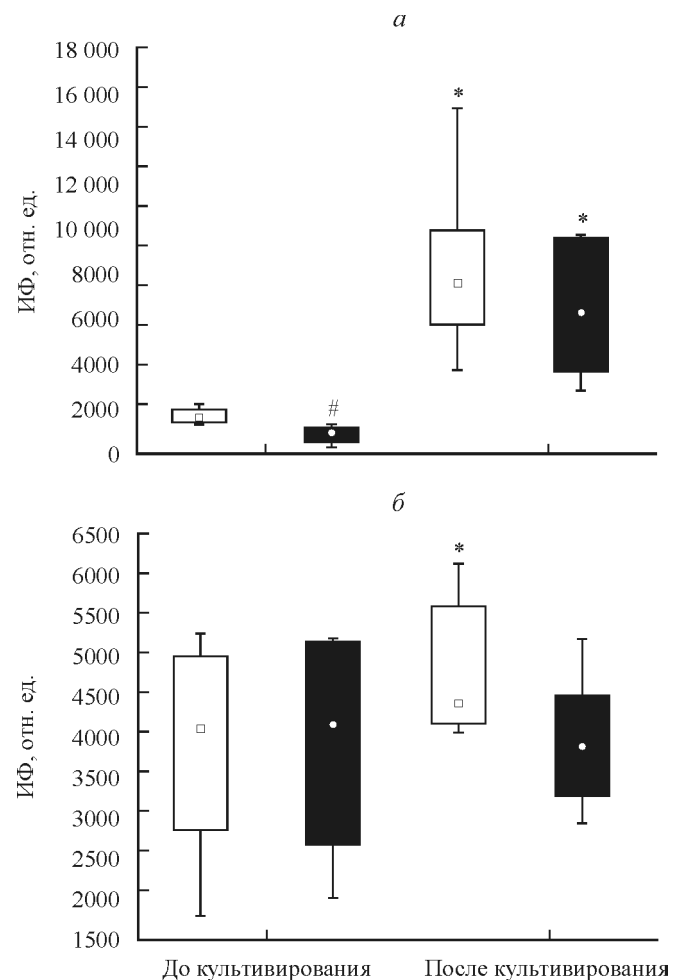
Плотность молекул HLA-DR на поверхности активированных Т-клеток, определенная по интенсивности флуоресценции антител, увеличилась более чем в 5 раз (см. рисунок, а), что также подтверждает статус активирования клеток. Кроме того, мы обнаружили различные уровни экспрессии HLA-DR на CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитах у пациентов с АД до культивирования.

Внутриклеточная экспрессия белка HSP60 детектировалась практически во всех клетках как сразу после выделения из периферической крови, так и после культивирования с активаторами (см. таблицу). По интенсивности флуоресценции показано увеличение маркера HSP60 в субпопуляции CD4⁺-лимфоцитов после культивирования, тогда как в субпопуляции CD8⁺-лимфоцитов этот показатель оставался практически на том же уровне (см. рисунок, б). Кроме того, наблюдали различия по уровню HSP60 между CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетками в культуре, однако эти изменения имели лишь характер тенденции ($P = 0.09$).

Молекула CD25 представляет собой α -цепь рецептора к ИЛ-2, она увеличивает родство гетеромерного низ-

коаффинного рецептора к ИЛ-2 на несколько порядков, что играет ключевую роль в запуске пролиферативного ответа Т-лимфоцитов на антиген и в процессе дифференцировки (Литвинова и др., 2014). Также эта молекула служит одним из ранних маркеров активации лимфоцитов (Graca, Cobbold, 2002). В норме число CD25-позитивных клеток в популяции CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов периферической крови составляет около 12 и 1.1 % соответственно (Wenzel et al., 2005). В периферической крови пациентов с АД мы получили похожие результаты: 10 и 2.6 % для CD4⁺25⁺- и CD8⁺25⁺-клеток соответственно.

В клеточной культуре происходило значительное нарастание CD4⁺25⁺-лимфоцитов. Доля CD25-позитивных цитотоксических лимфоцитов увеличилась до 57.6 %. Мы предполагаем, что в основном популяция CD8⁺CD25⁺-лимфоцитов представлена клетками памяти, так как в литературе есть данные о том, что популяция CD8⁺CD25⁺-клеток периферической крови проявляет свойства клеток па-



Плотность экспрессии рецепторов HLA-DR (а) и HSP60 (б) на Т-лимфоцитах при атопическом дерматите сразу после выделения и через 10 сут после культивирования.

Субпопуляции лимфоцитов: CD4⁺ (белые столбцы) и CD8⁺ (черные столбцы). Проточная цитометрия с использованием соответствующих флуоресцентномеченных антител. ИФ — интенсивность флуоресценции. Данные приведены в виде медианы и интерквартильного размаха (25—75 перцентили). Звездочкой показана достоверность различий между группами до и после культивирования (парный критерий Вилкоксона), решеткой — между субпопуляциями (критерий Манна—Уитни) при $P < 0.05$.

мяти, сохраняя разнообразный репертуар Т-клеточных рецепторов для ответа на антиген и способность пролиферировать в ответ на стимуляцию IL-2 (Herndler-Brandstetter et al., 2005). Среди CD8⁺-клеток, позитивных по CD25, выделяют также регуляторные клетки, которые способны подавлять пролиферативную активность аутологичных Т-лимфоцитов и экспрессировать маркер Foxp3, присущий классическим Т-регуляторным клеткам (Chaput et al., 2009).

Поликлональная стимуляция антителами анти-CD3 с добавлением IL-2 приводит к накоплению в культуре CD4⁺CD25^{high} и CD4⁺Foxp3⁺ Т-регуляторных клеток (Курганова и др., 2008; Trzonkowski et al., 2009). Поскольку для генерации активированных Т-клеток были использованы те же активаторы, мы оценили число регуляторных Т-клеток CD4⁺25⁺127⁻ до и после культивирования *in vitro*. Достоверных изменений не выявили.

HLA-DR принадлежит к молекулам МНС II класса, ответственным за презентацию антигена. Ее экспрессия служит маркером поздних этапов активации клеток. Известно, что активированные Т-клетки длительное время сохраняют экспрессию этого маркера и циркулируют в периферической крови (Литвинова и др., 2014). Повышенное количество HLA-DR-позитивных Т-клеток детектируется при инфекционных, аллергических и некоторых аутоиммунных процессах (Antúnez et al., 2006; Литвинова и др., 2014). Для ВИЧ-инфекции тоже характерно накопление CD8⁺HLA-DR⁺-клеток (Imamichi et al., 2012).

В наше исследование были включены пациенты, находящиеся в стадии ремиссии, поэтому число HLA-DR-позитивных клеток было в пределах нормативных показателей. Ранее было показано, что активация *in vitro* МНК доноров антителами анти-CD3 вместе с IL-2 приводила к появлению гораздо большего количества лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR: среди клеток CD4⁺ их доля составляла 57, а среди CD8⁺ — 76 % (Королюкова и др., 2009). В наших экспериментах при АД после 10-суточной поликлональной стимуляции *in vitro* примерно 1/3 CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов стали экспрессировать маркер поздней активации, а кроме того, увеличилась его плотность на поверхности мембраны. Это говорит о том, что данные клетки в организме будут способны презентировать антигены и, возможно, они будут презентировать в том числе эрготопы и осуществлять запуск антиэрготипического ответа.

В работах, опубликованных ранее, продемонстрировано, что пролиферацию выделенных из организма антиэрготипических клеток индуцируют только активированные Т-лимфоциты, причем к отмене ответа приводят как разделение стимулирующих и отвечающих клеток мембраной, так и добавление антител, блокирующих молекулы МНС (Mimran et al., 2005; Quitana et al., 2008). Кроме того, клетки пациентов с рассеянным склерозом, которые получали облученные аутологичные Т-клетки, специфичные к основному белку миелина, демонстрировали способность отвечать не только на активированные миелином Т-клетки, но и Т-клетки, активированные антителами к антигенам CD3 и CD28 (Hong et al., 2006). Подобный эффект отсутствовал при добавлении неактивированных лимфоцитов. Показано, что антиэрготипические Т-клетки распознавали пептид, состоящий из 61—73 аминокислотных остатков α-цепи рецептора к IL-2 (Hong et al., 2006).

Белки теплового шока (HSP) — высококонсервативные молекулы, которые выполняют целый ряд функций, в том числе внутриклеточную сборку, фолдинг и транс-

локацию олигомерных белков, препятствуют агрегации белков. Кроме этого, HSP являются важными элементами иммунного ответа на патогенные микроорганизмы (Kaufmann, 1990). Учитывая филогенетическое сходство между микробным белком и белком млекопитающих (50—60 % идентичных аминокислотных остатков в случае семейства HSP60), высказывается предположение о том, что HSP могут выступать в качестве аутоантигена и приводить к развитию некоторых аутоиммунных заболеваний (Kaufmann, 1990; De Graeff-Meeder et al., 1991; Ghio et al., 2013).

В норме HSP60 локализуется внутри митохондрий, но его можно обнаружить и в цитозоле клеток, межклеточном пространстве и периферической крови. В ответ на стрессовое воздействие этот белок может aberrантно экспрессироваться на поверхности клеток (Soltys, Gupta, 1997), высвобождаться из внутреннего пространства клетки во время некроза, что может вносить вклад в инициацию и поддержание Th1-опосредованного воспаления (Chen et al., 1999). С другой стороны, HSP60 в растворимой форме способен связываться с толл-подобным рецептором TLR-2 и вследствие этого снижать миграционную способность Т-клеток (Zanin-Zhorov et al., 2003) и продукцию ими провоспалительных цитокинов ФНО-α и ИФН-γ (Zanin-Zhorov et al., 2005).

При АД почти во всех Т-клетках сразу после выделения из периферической крови и после культивирования мы наблюдали внутриклеточную экспрессию HSP60. Однако стимуляция антителами анти-CD3 вместе с IL-2 приводила к более высокому содержанию белка, определенному по интенсивности флуоресценции, в CD4⁺-клетках по сравнению как с CD8⁺-, так и с CD4⁺-лимфоцитами до культивирования. В литературе встречаются данные, подтверждающие, что HSP60 участвует в антиэрготипической регуляции и выступает в качестве эрготопы (De Kleer et al., 2003; Huurman et al., 2007; Almanzar et al., 2012). Показано наличие HSP60-специфических Т-клеток и антител к HSP60 в периферической крови здоровых доноров (Quitana et al., 2008).

Исследование экспрессии эрготопоассоциированных маркеров Т-клеток после стимуляции *in vitro* отражает степень их активации и возможность выступать в качестве клеток-индукторов антиэрготипического ответа при введении в организм. Учитывая, что при АД установить определенный антиген не всегда возможно, иммунотерапия, направленная на индукцию антиэрготипической регуляции, позволит уменьшить аллергическое воспаление и ослабить симптомы заболевания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-34-60167_мол_а).

Список литературы

- Ильина Н. А., Кожевников В. С., Гойман Е. В., Кудяева О. Т., Колесникова О. П. 2007. Развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа в ответ на введение аутологичных активированных клеток. Омский научный вестник. 3 (61) : 188—190. (Ilyina N. A., Kozhevnikov V. S., Goiman E. V., Kudaeva O. T., Kolesnikova O. P. 2007. The development of a delayed-type hypersensitivity reaction in response to administration of autologous activated cells. Omsk Sci. Bull. 3 (61) : 188—190.)
- Кожевников В. С. 2009. Антиэрготипический ответ: теоретические аспекты и клиническое значение. В кн.: Клеточные

- технологии: теоретические и прикладные аспекты. Новосибирск: Наука. 75—86. (Kozhevnikov V. S. 2009. Anti-ergotypic response: theoretical aspects and clinical significance. In: Cell technologies: theoretical and applied aspects. Novosibirsk: Nauka. 75—86.)
- Козлов В. А. 2016. Клетки-супрессоры — основа иммунопатогенеза аутоиммунных заболеваний. Медицинская иммунология. 18 (1) : 7—15. (Kozlov V. A. 2016. Suppressor cells — the basis of immunopathogenesis autoimmune diseases. Med. Immunol. 18 (1) : 7—15.)
- Королькова О. Ю., Сениуков В. В., Кожевников В. С. 2009. Экспрессия эрготоп-ассоциированных маркеров активации Т-лимфоцитами. Мед. иммунол. 11 (2—3) : 255—260. (Korolkova O. Yu., Senukov V. V., Kozhevnikov V. S. 2009. Expression of ergotop-associated markers by activated T-lymphocytes. Med. Immunol. 11 (2—3) : 255—260.)
- Курганова Е. В., Шевела Е. Я., Тихонова М. А., Останин А. А., Черных Е. Р. 2008. Генерация в культуре *in vitro* и характеристика регуляторных Т-клеток человека. Мед. иммунол. 10 (2—3) : 173—180. (Kurganova E. V., Shevela E. Ya., Tihonova M. A., Ostanin A. A., Chernykh E. R. 2008. *In vitro* generation and characterization of human regulatory T-cells. Med. Immunol. 10 (2—3) : 173—180.)
- Литвинова Л. С., Гуцол А. А., Сохоневич Н. А., Кованова К. А., Хазиахматова О. Г., Шуплецова В. В., Кайгородова Е. В., Гончаров А. Г. 2014. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов. Мед. иммунол. 16 (1) : 7—26. (Litvinova L. S., Gutsol A. A., Sokhonevich N. A., Kofanova K. A., Khaziakhmatova O. G., Shupletsova V. V., Kaigorodova E. V., Goncharov A. G. 2014. Basic surface markers of functional activity T lymphocytes. Med. Immunol. 16 (1) : 7—26.)
- Almanzar G., Öllinger R., Leuenerberger J., Onestingel E., Rantner B., Zehm S., Cardini B., van der Zee R., Grundtman C., Wick G. 2012. Autoreactive HSP60 epitope-specific T-cells in early human atherosclerotic lesions. J. Autoimmun. 39 : 441—450.
- Antúnez C., Torres M. J., Mayorga C., Corzo J. L., Jurado A., Santamaria-Babi L. F., Vera A., Blanca M. 2006. Cytokine production, activation marker, and skin homing receptor in children with atopic dermatitis and bronchial asthma. Pediatr. Allergy Immunol. 17 : 166—174.
- Chaput N., Louafi S., Bardier A., Charlotte F., Vaillant J.C., Ménégau F., Rosenzweig M., Lemoine F., Klatzmann D., Taieb J. 2009. Identification of CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. Gut. 58 : 520—529.
- Chen W., Syldath U., Bellmann K., Kolb H. 1999. Human 60-kDa heat shock protein: a danger signal to the innate immune system. J. Immunol. 162 : 3212—3219.
- De Graeff-Meeder E. R., van der Zee R., Rijkers G. T., Schuurman H. J., Kuis W., Bijlsma J. W., Zegers B. J., van Eden W. 1991. Recognition of human 60 kD heat shock protein by mononuclear cells from patients with juvenile chronic arthritis. Lancet. 337 : 1368—1372.
- De Kleer I. M., Kamphuis S. M., Rijkers G. T., Scholtens L., Gordon G., De Jager W., Häfner R., van de Zee R., van Eden W., Kuis W., Prakken B. J. 2003. The spontaneous remission of juvenile idiopathic arthritis is characterized by CD30⁺ T cells directed to human heat-shock protein 60 capable of producing the regulatory cytokine interleukin-10. Arthritis Rheum. 48 : 2001—2010.
- Ghio M., Fabbi P., Contini P., Fedele M., Brunelli C., Indiveri F., Barsotti A. 2013. OxLDL- and HSP-60 antigen-specific CD8(+) T lymphocytes are detectable in the peripheral blood of patients suffering from coronary artery disease. Clin. Exp. Med. 13 : 251—255.
- Graca L., Cobbold S. P. 2002. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. J. Exp. Med. 195 : 1641—1646.
- Herndler-Brandstetter D., Schwaiger S., Veel E., Fehrer C., Cioca D. P., Almanzar G., Keller M., Pfister G., Parson W., Würzner R., Schönitzer D., Henson S. M., Aspinnall R., Lepperding G., Grubeck-Loebenstein B. 2005. CD25-Expressing CD8 T cells are potent memory cells in old Age. J. Immunol. 175 : 1566—1574.
- Hong J., Zang Y. C., Nie H., Zhang J. Z. 2006. CD4⁺ regulatory T cell responses induced by T cell vaccination in patients with multiple sclerosis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 103 : 5024—5029.
- Huurman V. A., Decochez K., Mathieu C., Cohen I. R., Roep B. O. 2007. Therapy with the hsp60 peptide DiaPep277 in C-peptide positive type 1 diabetes patients. Diabetes Metab. Res. Rev. 23 : 269—275.
- Imamichi H., Lempicki R. A., Adelsberger J. W., Hasley R. B., Rosenberg A., Roby G., Rehm C. A., Nelson A., Krishnan S., Pavlick M., Woods C. J., Baseler M. W., Lane H. C. 2012. The CD8⁺HLA-DR⁺ T cells expanded in HIV-1 infection are qualitatively identical to those from healthy controls. Eur. J. Immunol. 42 : 2608—2620.
- Kaufmann S. H. 1990. Heat shock proteins and the immune response. Immunol. Today. 11 : 129—136.
- Lohse A. W., Mor F., Karin N., Cohen I. R. 1989. Control of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cells responding to activated T cells. Science. 244 : 820—822.
- Mimran A., Mor F., Carmi P., Quintana F. J., Rotter V., Cohen I. R. 2004. DNA vaccination with CD25 protects rats from adjuvant arthritis and induces an anti-ergotypic response. J. Clin. Invest. 113 : 924—932.
- Mimran A., Mor F., Quintana F. J., Cohen I. R. 2005. Anti-ergotypic T cells in naive rats. J. Autoimmunity. 24 : 191—201.
- Quitana F. J., Mimran A., Carmi P., Mor F., Cohen I. R. 2008. HSP60 as a target of anti-ergotypic regulatory T cells. PLoS ONE. 3 (12) : e4026.
- Soltys B. J., Gupta R. S. 1997. Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells. Cell. Biol. Int. 21 : 315—320.
- Trzonkowski P., Szarynska M., Mysliwska J., Mysliwski A. 2009. *Ex vivo* expansion of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells for immunosuppressive therapy. Cytometry A. 75 : 175—188.
- Wenzel J., Henze S., Braehler S., Bieber T., Tuting T. 2005. The expression of human leukocyte antigen-DR and CD25 on circulating T cells in cutaneous lupus erythematosus and correlation with disease activity. Exp. Dermatol. 14 : 454—459.
- Zanin-Zhorov A., Bruck R., Tal G., Oren S., Aeed H., Hershkoviz R., Cohen I. R., Lider O. 2005. Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. J. Immunol. 174 : 3227—3236.
- Zanin-Zhorov A., Nussbaum G., Franitza S., Cohen I. R., Lider O. 2003. T cells respond to heat shock protein 60 via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. FASEB J. 17 : 1567—1569.

THE EXPRESSION OF ERGOTOP-ASSOCIATED MARKERS ON T-CELLS
UNDER THE POLYCLONAL ACTIVATION *IN VITRO* IN PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS

E. A. Blinova,^{1,*} E. A. Pashkina,¹ A. E. Tevs,^{2,3} V. M. Nepomnyaschikh,²
M. I. Leonova,² D. V. Demina,² V. A. Kozlov^{1,3}

¹ Research Institute of Fundamental and Clinical immunology, Novosibirsk, 630099,

² Clinic of Immunopathology of Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, 630047, and

³ Department of Clinical Immunology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, 630047;

* e-mail: blinovaelena-85@yandex.ru

During anti-ergotypic response the effector T-cells was formed that are able to eliminate activated lymphocytes regardless their antigen specificity; as the target molecules for this cells are molecules which appear in the process of cell activation (ergotopes). In this study we investigated the level of ergotop-associated markers CD25, HSP60 and HLA-DR in T-cells from patients with atopic dermatitis before and after culturing *in vitro*. After 10 days of culturing with anti-CD3 antibodies and IL-2 the expression of early and late activation markers changed: among CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes the number of CD25-positive cells increased up to 74.6 and to 57.6 %, and the number of HLA-DR-positive cells — up to 19.1 and 27.9 %, respectively. The density of HLA-DR molecules on the surface of activated T-cells became higher more than 5 times. Almost all of T-lymphocytes expressed 60-kDa heat shock protein before and after culturing, however, activated CD4⁺ cells contained a greater amount of HSP60 than activated CD8⁺ cells and CD4⁺ cells from peripheral blood. Thus, obtained T-lymphocytes of patients with atopic dermatitis had the status of activated cells, expressed sufficient amount of early and late activation markers, and these cells will be able to induce anti-ergotypic response under injection into the organism. Considering that the anti-ergotypic regulation acts against activated T-cells bearing T-cell receptors with different antigen specificity, the immunotherapy with autologous activated T lymphocytes is of interest as an approach, that purposefully affect on the pathogenic links of atopic dermatitis.

Key words: ergotop, T-cells, anti-ergotypic regulation, activation markers, HLA-DR.
