

УДК 616-089.819.843-085.37:577.27

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-199–210

Для цитирования: Сенников С.В., Хантакова Ю.Н., Кнауэр Н.Ю. Клеточная Т-регуляторная терапия в трансплантологии: от получения до клинического применения. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (1): 199–210.

## Клеточная Т-регуляторная терапия в трансплантологии: от получения до клинического применения

Сенников С.В., Хантакова Ю.Н., Кнауэр Н.Ю.

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)  
Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

### РЕЗЮМЕ

Интенсивное изучение клеточных подходов для коррекции различных нарушений, включая иммунологические и онкологические процессы, а также изучение иммуносупрессорной роли регуляторных Т-клеток (Трег-клеток) стали основными предпосылками для разработки методик клеточной коррекции различных иммуноопосредованных состояний, таких как аутоиммунная патология или трансплантация. В связи с малочисленностью Трег-клеток в периферической крови, а также отсутствием строго-специфичных маркеров изолированное использование методов сортировки цельной крови затрудняет получение достаточного количества клеток, что делает актуальным поиск оптимальных условий генерации и экспансии Трег-клеток с использованием стимуляторов пролиферации и направленной дифференцировки чистой популяции Трег без пролиферации эффекторных клеток.

Насегодняшний день в различных экспериментальных и клинических испытаниях показаны многообещающие результаты применения Трег-клеточной иммунотерапии для индукции аллоспецифической толерантности у реципиентов с пересаженными органами и тканями. Ключевые проблемы данной терапии заключаются как в недостаточной изученности механизма действия и специфического фенотипа Трег-клеток, которые в наибольшей степени способствуют индукции толерантности, так и в трудностях получения стабильной популяции функционально-активных Трег-клеток. Кроме того, остается открытым вопрос получения и механизма действия антиген-специфической популяции Трег-клеток. В обзоре проводится анализ имеющихся различных протоколов генерации регуляторных Т-клеток, а также анализ данных о клиническом применении Трег-клеток для индукции аллоспецифической толерантности в условиях трансплантации.

**Ключевые слова:** Т-регуляторные клетки, клеточная иммунотерапия, трансплантация, РТПХ, рапамицин, АТРА, витамин Д.

### ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на большое число исследований, посвященных разработке новых лекарственных препаратов, вакцин и способов лечения, некоторые заболевания до сих пор могут приводить к ситуациям, когда трансплантация становится единственным вариантом лечения. На сегодняшний

день, благодаря использованию новейших технологий и иммуносупрессивной терапии, показатели приживления пересаженных органов достигают 90% [1]. Однако длительное применение иммуносупрессивных препаратов не способно предотвратить хронические реакции отторжения. Кроме того, данная терапия сопровождается побочными эффектами, такими как сердечно-сосудистые заболевания, оппортунистические инфекции, нефротоксичность, онкологические заболева-

✉ Сенников Сергей Витальевич, e-mail: SennikovSV@gmail.com.

ния, гипертензия, метаболический синдром, что суммарно приводит к дисфункции пересаженного органа [1]. В связи с такими неудовлетворительными данными клеточная иммунотерапия с использованием Тreg-клеток, а особенно антиген-специфических Тreg-клеток, является перспективным подходом к индукции иммунологической толерантности, которая основывается на введении реципиенту клеток, которые будут стимулировать селективную толерантность к пересаженным органам и тканям.

Современная парадигма иммунологии и трансплантологии утверждает, что иммунная толерантность при трансплантации достигается при балансе Т-регуляторных и Т-эффекторных клеток. В связи с этим терапевтический потенциал Тreg-клеток, индуцированных непосредственно *in vivo*, или при внесении аутологичных Тreg-клеток, полученных *ex vivo*, представляет собой эффективный подход для индукции и поддержания трансплантационной толерантности. Так, на мышиных моделях было показано, что присутствие Тreg-лимфоцитов у реципиента во время трансплантации кожи или сердца является значимо важным для индукции и поддержания толерантности [2]. Кроме того, при пересадке костного мозга показано, что одновременное введение изолированных Тreg-клеток и аллотрансплантата значительно уменьшает реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и улучшает приживление [3]. Очевидным преимуществом использования клеточной аллоспецифичной терапии является то, что иммуномодулирующая активность данных регуляторных Т-клеток будет сосредоточена в области аллоантигена и иммунной активации [4], а не по всему организму, как в случае использования медикаментозной терапии. В связи с этим ученые склоняются к тому, что Т-клеточная терапия не будет сопровождаться повышенным риском инфекционных и онкологических осложнений как в случае системной иммуносупрессии. В данном обзоре обобщаются литературные данные о современных возможностях получения регуляторных Т-клеток для клинического применения, а также имеющиеся данные о первых испытаниях Т-клеточной терапии для модуляции иммунологической толерантности.

## СУБПОПУЛЯЦИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Открытие С. Сакагучи с соавт. особой популяции Т-клеток, обладающих регуляторными свойствами, определение основных маркеров и

механизмов реализации своих функций привели к интенсивному изучению роли Т-регуляторных клеток как в норме, так и при различных патологических состояниях, включая онкологию, аутоиммунные заболевания и трансплантологию [5, 6]. Тreg-клетки дифференцируются из наивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в тимусе, аналогично нормальным функционально зрелым CD4<sup>+</sup> Т-клеткам, и составляют около 5–10% от всей популяции CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов периферической крови. Согласно современной номенклатуре, принято разделять Тreg-клетки на естественные, образующиеся в тимусе (nTreg), и индуцированные, образованные на периферии при иммунологическом ответе (iTreg) [7]. Кроме того, индуцированные Тreg-клетки в зависимости от поверхностных маркеров и преимущественного механизма действия могут быть разделены на ряд субпопуляций: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> IL-10-зависимые Tr1, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> TGF-β-зависимые Th3, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> IL-35-зависимые iTreg35 [5].

В связи с гетерогенностью субпопуляционного состава iTreg-клеток на сегодняшний день нет единой точки зрения по поводу маркеров Тreg-клеток, которые позволили бы строго дифференцировать данные популяции клеток. Основными маркерами, характерными для Тreg-клеток, являются поверхностная молекула CD25 – α-цепь рецептора интерлейкина (IL) 2, а также ядерный фактор FoxP3, необходимый для реализации супрессорной функции Тreg-клетками. С одной стороны, считается, что при экспрессии FoxP3 происходит стабилизация регуляторного фенотипа клеток в условиях воспаления за счет индукции Тreg-ассоциированных генов при подавлении экспрессии Th1-, Th2- и Th17-ассоциированных генов [5]. С другой стороны, такие клетки, как Tr1, не экспрессируют FoxP3, однако продуцируют в большом количестве IL-10 и TGF-β и оказывают ярко выраженные супрессорные свойства, тем самым указывая на неоднозначность имеющихся данных и необходимость поиска новых знаковых маркеров, которые позволили бы проводить четкую дифференциацию эффекторных и регуляторных клеток.

Если говорить про индуцированные Тreg-клетки, то показано, что их активация на периферии происходит по антиген-специфическому пути, характерному для любой Т-клетки при взаимодействии корецеторов CD28 на Тreg-клетках и B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86) на антиген-презентирующих клетках (АПК) [8]. Это предполагает, что иммуносупрессивные свойства Тreg-клеток зависят от презентации антигена АПК в ходе

иммунного ответа. Кроме того, эксперименты *in vitro* показали, что для запуска супрессивных механизмов Treg-клетки требуют TCR-опосредованной активации [9]. В различных доклинических и клинических исследованиях трансплантационной толерантности было показано, что аллоантиген-специфическая пролиферация Treg-лимфоцитов может пролонгировать функционирование аллографта [2, 10–12]. Согласно имеющимся в мировой литературе данным, регуляторные T-клетки, как естественные, так и индуцированные, подавляют пролиферацию и эффекторную активность иммунокомпетентных клеток для предотвращения развития аутоиммунного ответа и контроля над воспалительными реакциями. Для этого они используют различные механизмы, опосредованные либо через мембранные молекулы, такие как CTLA-4, PD-L1, GITR, LAG-3, а также цитолитические молекулы Fas и гранзим B, либо через продукцию таких цитокинов, как IL-10 и TGF- $\beta$ .

Кроме того, среди механизмов иммуносупрессии можно отметить истощение IL-2 в воспалительном микроокружении за счет увеличенного потребления цитокина CD4+CD25<sup>hi</sup> Treg-клетками, увеличение продукции IDO как самими клетками, так и АПК (дендритные клетки (ДК)) при контакте с регуляторными T-клетками, а также продукцию внеклеточного аденозина в виде ADP и AMP, которые через аденозиновые рецепторы A2AR способствуют супрессии эффекторных T-клеток [5].

T-регуляторные клетки – это особая популяция T-лимфоцитов, которая выступает фактором контроля развития и уровня иммунного ответа против антигенов, собственных и чужеродных. Поэтому является актуальным вопрос о возможности проведения Treg-клеточной терапии, направленной на индукцию состояния иммуносупрессии для подавления развития патологических аутоиммунных или воспалительных реакций. Для клинического применения важным является вопрос выделения чистой культуры Treg-клеток без примеси других субпопуляций T-лимфоцитов. Анализ литературы показал, что все протоколы получения Treg-клеток можно разделить на два направления: выделение регуляторных клеток из цельной крови различными методами сортировки или их генерация *in vitro* с использованием разнообразных блокирующих и стимулирующих агентов.

## ПОЛУЧЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ T-КЛЕТОК ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Для выделения регуляторных клеток из периферической крови используют несколько

подходов. Во-первых, это удаление клеток CD8<sup>+</sup> и позитивная селекция оставшихся клеток по экспрессии CD25<sup>+</sup> с использованием методов магнитной сепарации. Основным минусом данной технологии является невозможность селекции Treg-клеток по нескольким желаемым характеристикам. Кроме того, при использовании магнитной сепарации получается смесь клеток CD25<sup>hi</sup>, которая включает в себя не только регуляторные T-клетки, но и активированные эффекторные T-клетки, что уменьшает чистоту данного метода по сравнению с проточной цитометрией. В связи с этим сортировка только по CD25 позволяет различать регуляторные T-клетки с наивной популяцией T-лимфоцитов, но не с антиген-активированными T-клетками [13].

Метод проточной сортировки позволяет получать чистые популяции клеток благодаря возможности использования нескольких комбинаций маркеров. Так, для выделения Treg-клеток на первом этапе, согласно данным литературы, выделяют популяцию клеток CD4+CD25<sup>hi</sup> с дополнительной селекцией по CD45RA<sup>+</sup> для удаления дифференцированных клеток и клеток-памяти [14]. В результате чего можно получить популяцию наивных регуляторных T-клеток, которая обладает более выраженными супрессорными свойствами, чем вся популяция клеток CD25<sup>hi</sup> [15]. Следующим этапом для отделения Treg-клеток и эффекторных T-лимфоцитов предлагается использовать два маркера FoxP3 или CD127. В связи с тем, что FoxP3 является внутриклеточным маркером, при его применении для сортировки получается популяция нежизнеспособных клеток, что не позволяет их использовать в клеточных протоколах иммунотерапии. Кроме того, под воздействием таких цитокинов, как IL-6 и IL-1, может происходить дифференцировка Treg-клеток в Th17-клетки с потерей экспрессии FoxP3 и экспрессией IL-17 [16], что указывает на нестабильность экспрессии данного маркера.

Хотя для естественных Treg-клеток у человека доказан фенотип CD4+CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup>, для индуцированных Treg-клеток, которые преобладают на периферии и контролируют развитие мукозального и воспалительного иммунного ответа, экспрессия CD25 и FoxP3 не является конститутивной [5, 15, 17]. Так, для Tr1-субпопуляции индуцированных Treg-клеток не характерна экспрессия CD25 и FoxP3. Для дифференцировки этих клеток предлагают использовать совместную экспрессию таких маркеров, как CD49b и LAG-3 [18], но эти поверхностные маркеры не строго специфичны. Определение внутриклеточного со-

держания IL-10 позволяет устанавливать данную субпопуляцию Treg-клеток [19], но не допускает использования полученных клеток в клинических протоколах в связи с необходимой фиксацией клеток для проточной сортировки. Для Th3-клеток показана экспрессия CD25 и FoxP3, что препятствует их дифференцировке от естественных регуляторных Т-клеток [20]. Некоторыми авторами даже предполагается, что Th3-клетки являются активированной формой nTreg-клеток на периферии. Каких-либо других поверхностных маркеров для Th3-регуляторных клеток на сегодняшний день не установлено, для их дифференцировки от других субпопуляций предлагается использовать определение внутриклеточного содержания TGF- $\beta$  [20]. Экспрессия дополнительных маркеров, таких как CTLA-4 [5], GITR [21], CD39 [22], HLA-DR [13], CD127 [23], показана на Treg-клетках, но она неспецифична и их также недостаточно для определения Treg.

Среди потенциальных маркеров nTreg-клеток рассматривают  $\alpha$ -цепь рецептора IL-7, или CD127. Этот рецептор имеет общую  $\gamma$ -цепь (CD127) с другими членами семейства рецепторов IL-2 (IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 и IL-21), но экспрессия уникальной высокоаффинной цепи специфична только для IL-7. IL-7R $\alpha$ -цепь экспрессируется на поющих Т-лимфоцитах CD4+ у здоровых доноров. Показана обратная корреляция между уровнем экспрессии рецептора и супрессорными возможностями данной субпопуляции [23]. Treg-клетки, которые определяют как CD4+CD25+CD127<sup>low</sup>, обладают выраженными супрессорными функциями и одновременно экспрессируют большое количество FoxP3 [24]. При сравнении функциональных свойств Treg-клеток CD25<sup>hi</sup> и CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup> выявлено, что последние оказывают более выраженное подавление аллостимулированных эффекторных Т-клеток *in vitro* [24]. В связи с этим использование CD127 является более предпочтительным для выделения чистой популяции Treg-клеток.

Таким образом, в отличие от метода магнитной сепарации использование метода проточной сортировки позволяет выделять чистую популяцию регуляторных Т-клеток, что является важным критерием возможности применения таких клеток в иммунотерапии. Однако если для естественных Treg-клеток были определены поверхностные маркеры, которые позволяют проводить процедуру сортировки, то для индуцированных на периферии Treg-клеток на данный момент не приводится строгоспецифичных маркеров. Разделение iTreg-клеток по большей части происходит

по функциональному состоянию и в зависимости от внутриклеточной продукции цитокинов, что не позволяет использовать выделенные таким образом клетки в клинических испытаниях.

Кроме того, использование любого из перечисленных методов сортировки не позволяет выделять антиген-специфические клоны Treg-клеток, а все методы приводят к выделению клонов, обладающих антиген-неспецифическими супрессорными свойствами. Дополнительным затруднением при сортировке регуляторных клеток из цельной крови и последующим применением таких клеток является их малочисленность. Это означает, что для проведения клинических исследований требуется разработка клеточных протоколов генерации и экспансии достаточного количества функционально-активных регуляторных клеток *in vitro*.

## ГЕНЕРАЦИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК IN VITRO

Исследования по генерации регуляторных клеток *in vitro* можно разделить на два направления: пролиферация Treg-клеток, выделенных различными методами сортировки из периферической крови, или направленная дифференцировка наивных CD4+ Т-клеток в сторону регуляторных клеток с последующей пролиферацией необходимых клонов. Так, показано, что использование анти-CD3/CD28-покрытых частиц при добавлении IL-2 приводит к увеличению (преумножению, экспансии) Treg-лимфоцитов, выделенных из периферической крови, *in vitro* [25]. Однако в данных условиях происходит пролиферация и эффекторных клеток, что является главной проблемой культивирования Treg-клеток CD4+CD25<sup>hi</sup>, полученных после сортировки с помощью проточной цитометрии, так как они часто бывают загрязненными Т-клетками CD25+FOXP3-. В связи с этим много усилий сосредоточено на подборе таких условий культивирования, которые позволили генерировать большое количество Treg-клеток, без пролиферации других популяций Т-лимфоцитов.

Одним из веществ, которые блокируют пролиферацию эффекторных клеток, но способствуют выживанию Treg-клеток, является рапамицин. Показано, что рапамицин ингибирует mTOR, молекулу, участвующую в запуске активационного сигнала от IL-2R и CD28 через фосфотидилинозитол-3-киназу (PI3K), тем самым блокируя поступление активационного сигнала в эффекторных Т-клетках и их пролиферацию [26]. В то же время у Treg-клеток активационный сигнал с IL-2R пе-

редается не через PI3K, а через путь JAK-STAT, который не затрагивается при использовании рапамицина [27]. При трансплантации органов у пациентов, которые принимали в качестве иммуносупрессанта рапамицин, в сравнении с пациентами, принимающими ингибиторы кальциневрина, в крови содержалось большее количество Treg-клеток [28]. Таким образом, благодаря поддержанию жизнеспособности и увеличению количества регуляторных T-клеток, с одной стороны, и предотвращению роста эффекторных T-клеток, с другой стороны, рапамицин гарантирует получение чистой популяции Treg-лимфоцитов. Кроме того, при дальнейшем исследовании было показано, что Treg-клетки CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup>, обработанные рапамицином, обладают стабильным фенотипом и не дифференцируются в сторону IL-17-продуцирующих клеток *in vitro* и *in vivo* [29], что связано с эпигенетическими изменениями в активации транскрипции FoxP3 [30].

Несмотря на недавние достижения в исследовании Treg-клеток, получение большого количества клеток до сих пор остается нерешенной задачей. Основной проблемой является потеря экспрессии FoxP3 даже в чистой популяции Treg-клеток при длительном культивировании, что связано с необходимостью проведения повторных стимуляций [15]. В связи с этим внимание ученых на сегодняшний день сосредоточено на создании подходов, позволяющих получать стабильную популяцию Treg-клеток. Одним из кандидатов для использования в клеточных протоколах получения стабильных регуляторных клеток является полностью транс-ретиноевая кислота (all-trans retinoic acid, ATRA). Замечено, что естественные дериваты и метаболиты витамина А, такие как ретинол, ретиналь, ATRA и др., играют важную роль в клеточной дифференцировке, росте и апоптозе [31]. Совместное использование TGF- $\beta$  и ATRA способствует дифференцировке наивных T-клеток в сторону Treg-клеток, увеличению их количества и улучшению супрессорной активности у человека [32]. Молекулярный механизм действия ATRA на количество Treg-клеток до конца не выяснен. Однако показано, что делеция ядерного рецептора ATRA приводит к значительной потере экспрессии FoxP3 Treg, предполагая роль ATRA как стабилизатора экспрессии ядерного фактора [33]. Существенным минусом использования ATRA является то, что он предпочтительно стимулирует *ex novo* образование iTreg-клеток, которые обладают нестабильным фенотипом при воспалительных процессах *in vivo* [30]. Согласно этому, регуляторный фенотип iTreg-клеток мо-

жет быть легко изменен на провоспалительный при введении *in vivo* [34].

Еще одним кандидатом для увеличения количества Treg-клеток является витамин Д в связи с увеличением числа данных об иммуномодулирующей роли этого витамина и необходимости в индукции и поддержании Treg-клеток FoxP3<sup>+</sup> *in vivo*. Так, показано, что концентрация витамина Д в плазме прямо коррелирует с количеством Treg-клеток FoxP3<sup>+</sup> [35, 36]. Точного механизма действия витамина Д на поддержание генерации и (или) пролиферации Treg-клеток не описывается, однако известно, что эффект его зависит от концентрации. Высокие нефизиологичные концентрации витамина Д ( $10^{-6}$  М) приводят к продукции IL-10 CD4<sup>+</sup> T-клетками [36]. При физиологических концентрациях ( $10^{-7}$ М) витамин Д совместно с TGF- $\beta$  способствует увеличению количества Treg-клеток FoxP3<sup>+</sup> с высокой супрессорной активностью [37].

## ПОЛУЧЕНИЕ АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК

Одним из важных вопросов остается антигенная специфичность регуляторных T-клеток, полученных непосредственно из периферической крови методами сортировки либо культивированных *in vitro*. Так, на гуманизированных мышинных моделях было показано, что донорские антиген-специфические Treg-клетки более эффективны для индукции толерантности, чем полиспецифические Treg-клетки [2]. Хотя в первых исследованиях было показано умеренное преимущество антиген-специфичных Treg-клеток перед полиспецифичными [38].

Для получения аллоантиген-специфических регуляторных T-клеток предлагается использовать сокультивирование донорских АПК и нефракционированных МНК реципиента [2]. Исследование активационных маркеров Treg-клеток человека при стимуляции с аллогенной периферической кровью или дермальными CD11c<sup>+</sup> ДК выявило увеличение экспрессии CD69 и CD71 в течение 3–5 сут после активации. На основании этого авторы утверждали о формировании аллоантиген-специфических Treg-клеток. Кроме того, авторы продемонстрировали, что такие активированные Treg-клетки обладают более выраженным супрессорным эффектом, чем поликлональные Treg-клетки. Кроме того, в последних исследованиях была показана роль CD40L-активированных В-клеток для индукции антиген-специфических Treg-клеток *in vitro* [25]. При дополнительном

использовании анти-CD3/CD28-покрытых частиц совместно с IL-2 продемонстрировано не только увеличение количества Treg-клеток в 300–500 раз, но и аллореактивность полученных данным способом Treg-клеток против донорских антигенов. Показано, что антиген-специфическая супрессорная активность таких регуляторных Т-клеток защищает против повреждения кожи, опосредованного аллоантигенами, на гуманизированных мышинных моделях трансплантации.

Другим способом получения аллоантиген-специфических Treg-клеток является генетический перенос на них необходимых антиген-специфических TCR [39] или использование химерных антигенных рецепторов (chimeric antigen receptors, CAR) [40]. На сегодняшний день большинство исследований CAR сосредоточено на получении антиген-специфических противоопухолевых Т-клеток CD8+. Только в нескольких исследованиях показана возможность получения Treg-клеток заданной специфичности, которые предотвращают развитие экспериментального аутоиммунного энцефалита или колита [40].

Ключевым вопросом для возможности проведения иммунотерапии с применением Treg-клеток остается возможность получения достаточного количества клеток с устойчивым фенотипом, которые при введении в организм будут способствовать развитию супрессии и не будут изменять свой фенотип в условиях трансплантации органов и (или) тканей в сторону аутоиммунных и цитотоксических реакций. Выделение Treg-клеток из периферической крови требует трудоемких дорогостоящих высокотехнологических манипуляций, что не всегда можно провести при трансплантации из-за тяжести состояния пациентов. Успехи клеточной иммунотерапии онкологических заболеваний указывают на имеющиеся перспективные возможности развития новых клеточных технологий перепрограммирования иммунных реакций при трансплантации для создания условий иммуносупрессии при помощи ДК, Т-лимфоцитов и иммуносупрессорных цитокинов с последующей экспансией Treg-клеток. Использование ДК для презентации аллоантигенов Т-клеткам *in vitro* предоставляет возможность, используя небольшое количество материала, обеспечивать формирование достаточного пула стабильных аллоантиген-специфических регуляторных Т-клеток.

Таким образом, несмотря на разнообразие возможностей генерации регуляторных Т-клеток, не существует регламентированного протокола получения чистой популяции Treg-лимфоцитов. И если протоколы получения популяции

Treg-клеток для испытаний *in vitro* созданы, то одобренной технологии получения Treg-клеток для клинического применения на сегодняшний день еще не разработано. В последние несколько лет усилия исследователей сосредоточены на определении оптимальной методики для выделения и увеличения количества аллоантиген-специфических Treg-клеток из периферической или пуповинной крови. Авторами отмечается, что в перечисленных выше условиях для наиболее успешной экспансии Treg-клеток *ex vivo* необходимо проведение тщательной сортировки для выделения чистой популяции Treg-клеток. Изложенный выше материал отражает направления исследований с точки зрения создания протоколов для получения оптимального количества Treg-клеток для применения в клеточной коррекции реакций отторжения трансплантата.

## ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ TREG ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Одним из серьезных трансплантационных осложнений у гематологических пациентов является развитие реакции «трансплантат против хозяина», являющейся потенциально жизнеугрожающей. Существующие в настоящее время протоколы терапии включают в себя иммуносупрессивный компонент, подавляющий развитие РТПХ, однако данный вариант нельзя назвать оптимальным. В связи с этим большой интерес вызывает возможность использования Т-регуляторных клеток.

Первыми в контексте предотвращения РТПХ были исследованы nTreg-клетки как более стабильная субпопуляция. Было продемонстрировано, что введение естественных Treg-клеток мышам предотвращает развитие острой РТПХ, однако соотношение Т-регуляторных и Т-эффекторных клеток должно быть высоким (1 : 1) [41]. Аналогичные подходы использовались и при работе на людях. При введении Treg-клеток после инфузии Т-клеток пациентам, перенесшим HLA-гаплоидентичную трансплантацию, после химиотерапии и лучевой терапии не происходило развития РТПХ даже без иммуносупрессивной терапии, отмечалась также высокая выживаемость пациентов (12 из 28 характеризовались медианой выживаемости 12 мес после трансплантации) [42, 43]. В работах, подобной этой, также применялись методы культивирования изолированных из периферической крови в присутствии IL-2, CD4+-фидерных клеток или в условиях антиCD3/CD28-стимуляции [44, 45].

В ряде других работ было показано, что Treg-клетки пуповинной крови человека, введенные мышам в модели острой РТПХ, улучшают выживаемость особей и уменьшают выраженность симптоматики. Это действие было опосредовано как секрецией IL-10 и TGF $\beta$ , так и поляризацией Th17/Treg-баланса у реципиента в сторону Treg-клеток [46]. В одном из первых клинических испытаний на людях было показано, что введение обогащенной фракции Treg-клеток CD4+CD25+FoxP3+, выделенной из пуповинной крови, пациентам после химио- и лучевой терапии, сокращает риск развития РТПХ до 43% по сравнению с историческим контролем, где РТПХ II–IV степеней развивалась у 61% пациентов [47].

Упомянутые выше подходы были связаны с использованием естественных T-регуляторных клеток и имеют такие недостатки, как малая численность популяции при введении, а также отсутствие антиген-специфичности.

Следующим шагом стало использование индуцированных Treg-клеток, в том числе антиген-специфичных. Примечательным представляется тот факт, что, по данным разных исследователей, результаты применения iTreg-клеток являются достаточно противоречивыми. Так, например, показано, что для эффективного предотвращения развития РТПХ требуется или введение больших количеств iTreg-клеток [48], или дополнительное введение рапамицина и IL-2 [49] для поддержания стабильности фенотипа клеток. В то же время в модели острой РТПХ у мышей введение TGF $\beta$ -индуцированных антиген-специфичных iTreg-клеток предотвращало развитие клинической симптоматики антиген-специфичным образом, при этом введение данной субпопуляции производило больший эффект, нежели введение поликлональных iTreg-клеток. Следует отметить, что экспансия iTreg-клеток после инфузии происходит более активно по сравнению с nTreg-клетками, однако nTreg-клетки характеризуются более стабильной экспрессией FoxP3 [50]. Аналогичные результаты были получены и для других типов антиген-специфичных iTreg-клеток [51].

Введение реципиент-специфичных T-регуляторных клеток в модели острой РТПХ у мышей не только предотвращало развитие нежелательных реакций, потери массы тела и последующей гибели особей, но и способствовало эффективно-му восстановлению субпопуляций лимфоцитов, в том числе экспансии собственных Treg-клеток. При этом на ранних стадиях CD4-лимфоциты характеризовались сниженной способностью к секреции провоспалительных цитокинов, однако

восстанавливали ее к 30-м сут. При введении вируса коровьей оспы профиль секреции IFN $\gamma$  был близок к нормальному, однако не обнаружено секреции нейтрализующих антител, что связывается авторами с дефектами функционирования CD4+ и (или) B-лимфоцитарного компартмента [52]. Можно заключить, что, по-видимому, именно антиген-специфичность получаемых T-регуляторных клеток является показателем эффективности и специфичности терапии. Наблюдаемая же противоречивость результатов может быть объяснена использованием разных протоколов генерации клеток.

Таким образом, в настоящий момент показано, что и естественные, и индуцибельные T-регуляторные клетки, равно как и FoxP3-негативные IL-10-секретирующие Tr1-клетки, активны в предотвращении РТПХ в соответствующих моделях [45, 53]. Однако открытым остается вопрос сохранения Treg-клетками своего фенотипа и функциональной активности в условиях воспалительного микроокружения [54]. Одним из вероятных подходов может стать введение Treg-клеток в совокупности с мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), способными поддерживать стабильность Treg-клеток после трансплантации. В работе, проведенной на мышинной модели острой РТПХ, продемонстрировано, что введение такого сочетания клеток улучшает выживаемость мышей (100% особей по сравнению с 80% в группе с изолированным введением Treg-клеток) и клиническую симптоматику РТПХ. При этом отмечалось подавление Th1-иммунного ответа и экспансии Th17-клеток у мышей-реципиентов. Вклад МСК при этом был связан не только с поддержанием стабильности T-регуляторных клеток, но и с восстановлением популяции эндогенных Treg-клеток [55].

Важной проблемой при проведении терапии Treg-клетками является потенциальное подавление реакции «трансплантат против лейкоза», что в целом негативно сказывается на прогнозе у пациентов. Первые попытки решения этой проблемы были связаны с увеличением дозы вводимых Treg-клеток, однако данный вариант является относительно более дорогостоящим и технически трудоемким. В связи с этим разрабатываются и другие подходы. Так, использование ингибитора HIF-1 $\alpha$  эхиномицина у мышей с острой РТПХ приводит к экспансии Treg-клеток и подавлению аллоген-специфичного Th1- и Th17-ответа и, как следствие, подавлению РТПХ с сохранением эффекта «трансплантат против лейкоза» [56].

Еще один вариант проведения клеточной терапии предполагает совместное введение аллореак-

тивных CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-регуляторных клеток [57]. Само по себе использование CD8<sup>+</sup>- поликлональных iTreg-клеток, видимо, оказывается не столь эффективным вследствие быстрой потери экспрессии FoxP3 и меньшей выраженностью ответа на рапамицин и IL-2 [49]. При этом именно воздействие Т-регуляторных клеток CD8<sup>+</sup> при совместном введении связывают с модулированием реакции, позволяющим сохранить анти-РТПХ-ответ без потерь и способствующим эффективности противоопухолевой терапии. Примечательно, что в данном исследовании в мышинной модели супрессия РТПХ аллореактивными CD4-регуляторными клетками была антиген-специфической [57].

Таким образом, при планировании использования Т-регуляторных клеток в терапии РТПХ критическими моментами являются количественные показатели субпопуляции (в случае pTreg-клеток), стабильности фенотипа (в случае iTreg-клеток) и антиген-специфичности, влияющей как на эффективность профилактики РТПХ, так и на эффективность противоопухолевого ответа. Исходя из этих принципов, к настоящему моменту проведено несколько клинических исследований для оценки возможности использования различных протоколов введения Т-регуляторных клеток людям. Как было упомянуто выше, первые исследования показали безопасность введения Т-регуляторных клеток, а также их потенциальную активность в отношении РТПХ [42, 47]. В дальнейшем проводился эксперимент по введению изолированных донорских Treg-клеток пациентам с острым лейкозом перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. Введение конвенциональных Т-клеток в количестве 10<sup>6</sup>/кг и Treg-клеток (2 x 10<sup>6</sup>/кг) привело к увеличению выживаемости пациентов, отсутствию проявлений РТПХ, более быстрой иммунной реконституции [58]. По мнению некоторых исследователей, это может говорить об отсутствии влияния Treg-клеток на реакцию «трансплантат против лейкоза», но такое мнение требует дополнительного подтверждения [58].

Помимо этого, проведено исследование по лечению хронической РТПХ у резистентных к терапии пациентов при помощи введения Treg-клеток и низких доз IL-2. У всех пациентов наблюдалось улучшение или стабилизация состояния. При этом у трех из пяти пациентов отмечалась активация Т-клеточного звена, не имевшая, по-видимому, негативных клинических проявлений вследствие использования малых доз IL-2 [60]. В одном из исследований (ALT-TEN) использо-

вались Tr1-клетки, вводимые пациентам после кондиционирования и трансплантации гаплоидентичных гемопоэтических стволовых клеток. Следует отметить, что в ходе исследования восемь пациентов умерли, поэтому корректная дальнейшая интерпретация результатов была затруднена. Кроме того, соотношение введенных эффекторных и регуляторных клеток было слишком высоким. Таким образом, требуются дальнейшие исследования для полной оценки возможностей использования Tr1-клеток [60].

Суммируя все вышесказанное, важно подчеркнуть, что получение антиген-специфических Т-регуляторных клеток со стабильным фенотипом и функциональными способностями для терапии и профилактики РТПХ по-прежнему остается актуальной задачей, решение которой может включать как использовавшиеся ранее подходы, так и новые разработки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для нормального функционирования организма естественные Treg-клетки CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> являются незаменимой составляющей установления и поддержания иммунологической аутоотолерантности и иммунного гомеостаза. На сегодняшний день исследования ученых сосредоточены на выделении и экспансии не полиспецифичных клонов Treg-клеток, как было в начале их открытия, а на получении аллоантиген-специфичных клонов Treg, которые способны прицельному и сильному подавлению аллоантиген-специфических эффекторных клеток, ответственных за развитие реакций отторжения трансплантата. Совместно с современными успехами в получении Treg-клеток *in vitro*, а также результатами первых испытаний *in vivo* на мышах, все вышперечисленное позволит начать разработку клеточных протоколов иммунокоррекции, основанной на использовании Т-регуляторных клеток, как аллоспецифичных, так и полиспецифичных, в качестве дополнительной профилактики реакций отторжения трансплантата. Такие испытания улучшат понимание механизмов развития иммунного контроля и позволят открыть новые биомаркеры, которые будут служить предикторами успешной индукции иммунологической толерантности. Полученные в клинических испытаниях данные могут позволить уменьшить объем проводимой системной иммуносупрессорной терапии, которая сейчас применяется для снижения вероятности реакций отторжения пересаженных органов и тканей.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ**

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ**

Работа поддержана Российским научным фондом (соглашение № 16-15-00086 от 11.01.2016).

**ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES**

- Katabathina V., Menias C.O., Pickhardt P., Lubner M., Prasad S.R. Complications of Immunosuppressive Therapy in Solid Organ Transplantation. *Radiol. Clin. N. Am.* 2015; 54. (2): 303–319. DOI: 10.1016/j.rcl.2015.09.009.
- Sagoo P., Ali N., Garg G., Nestle F.O., Lechler R.I., Lombardi G. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T-cells. *Sci. Transl. Med.* 2011; 3 (83): p.83ra42. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002076.
- Hanash A.M., Levy R.B. Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2005; 105 (4): 1828–1836. DOI: 10.1182/blood-2004-08-3213.
- Dijke I.E., Weimar W., Baan C.C. Regulatory T cells after organ transplantation: where does their action take place? *Hum. Immunol.* 2008; 69 (7): 389–398. DOI: 10.1016/j.humimm.2008.05.006.
- Sakaguchi S., Vignali D.A.A., Rudensky A.Y., Niec R.E., Waldmann H. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology.* 2013; 13: 461–467. DOI: 10.1038/nri3464.
- Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Ann. Rev. Immunol.* 2004; 22: 531–562. DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122.
- Abbas A.K. et al. Regulatory T-cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nature Immunol.* 2013; 14: 307–308. DOI: 10.1038/ni.2554.
- Zeng M., Guinet E., Nouri-Shirazi M. B7-1 and B7-2 differentially control peripheral homeostasis of CD4(+)CD25(+) Foxp3(+) regulatory T cells. *Transplant. Immunology.* 2009; 20: 171–179. DOI: 10.1016/j.trim.2008.09.009.
- Takahashi T., Kuniyasu Y., Toda M., Sakaguchi N., Itoh M., Iwata M., Shimizu J., Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International Immunology.* 1998; 10: 969–1980.
- Golshayan D., Jiang S., Tsang J., Garin M.I., Mottet C., Lechler R.I. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood.* 2007; 109: 827–835. DOI: 10.1182/blood-2006-05-025460.
- Joffre O., Santolaria T., Calise D., Al Saati T., Hudrisier D., Romagnoli P., van Meerwijk J.P. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat. Med.* 2008; 14: 88–92. DOI: 10.1038/nm1688.
- Todo S., Yamashita K., Goto R., Zaitzu M., Nagatsu A., Oura T., Watanabe M., Aoyagi T., Suzuki T., Shimamura T. et al. A pilot study of operational tolerance with a regulatory T cell-based cell therapy in living donor liver transplantation. *Hepatology.* 2016; 64 (2): 632–643. DOI: 10.1002/hep.28459.
- Baecher-Allan C., Brown J.A., Freeman G.J. and Haffler D.A. CD4+CD25 high regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 2001; 167: 1245–1253. URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.3.1245>.
- Hoffmann P., Eder R., Boeld T.J., Doser K., Pisheska B., Andreesen R. et al. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood.* 2006; 108 (13): 4260–4267. DOI: 10.1182/blood-2006-06-027409.
- Hoffmann P., Boeld T.J., Eder R., Huehn J., Floess S., Wieczorek G. et al. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur. J. Immunol.* 2009; 39 (4): 1088–1097. DOI: 10.1002/eji.200838904.
- Yang X.O., Nurieva R., Martinez G.J., Kang H.S., Chung Y., Pappu B.P. et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity.* 2008; 29 (1): 44–56. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.05.007.
- Miyao T., Floess S., Setoguchi R., Luche H., Fehling H.J., Waldmann H., Huehn J., Hori S. Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity.* 2012; 36 (2): 262–275. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.12.012.
- Gagliani N.I., Magnani C.F., Huber S., Gianolini M.E., Pala M. et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat. Med.* 2013; 19 (6): 739–746. DOI: 10.1038/nm.3179.
- Fujio K., Okamura T. and Yamamoto K. The family of IL-10-secreting CD4+ T cells. *Advances in Immunology.* 2010; 105: 99–129. DOI: 10.1016/S0065-2776(10)05004-2.
- Weiner H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol. Rev.* 2001; 182: 207–214. DOI: 10.1034/j.1600-065X.2001.1820117.x.
- Shevach E.M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell mediated suppression. *Immunity.* 2009; 30 (5): 636–645. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.04.010.
- Deaglio S., Dwyer K.M., Gao W., Friedman D., Usheva A., Erat A. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 1257–1265. DOI: 10.1084/jem.20062512.
- Liu W., Putnam A.L., Xu-Yu Z., Szot G.L., Lee M.R., Zhu S. et al. CD127 expression in versely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ Treg

- cells. *J. Exp. Med.* 2006; 203: 1701–1711. DOI: 10.1084/jem.20060772.
24. Hartigan-O'Connor D.J., Poon C., Sinclair E. et al. Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J. Immunol. Methods.* 2007; 319: 41–52. DOI: 10.1016/j.jim.2006.10.008.
  25. Putnam A.L., Safinia N., Medvec A., Laszkowska M., Wray M., Mintz M.A. et al. Clinical grade manufacturing of human alloantigen-reactive regulatory T cells for use in transplantation. *Am. J. Transplant.* 2013; 13 (11): 3010–3020. DOI: 10.1111/ajt.12433.
  26. Thomson A.W., Turnquist H.R., Raimondi G. Immuno-regulatory functions of mTOR inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9 (5): 324–337. DOI: 10.1038/nri2546.
  27. Zeiser R., Leveson-Gower D.B., Zambricki E.A., Kambham N., Beilhack A., Loh J. et al. Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells. *Blood.* 2008; 111 (1): 453–462. DOI: 10.1182/blood-2007-06-094482.
  28. Segundo D.S., Ruiz J.C., Izquierdo M., Fernandez-Fresnedo G., Gomez-Alamillo C., Merino R. et al. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation.* 2006; 82 (4): 550–557. DOI: 10.1097/01.tp.0000229473.95202.50.
  29. Tresoldi E., Dell'albani I., Stabilini A., Jofra T., Valle A., Gagliani N. et al. Stability of human rapamycin-expanded CD4+CD25+ T regulatory cells. *Haematologica.* 2011; 96 (9): 1357–1365. DOI: 10.3324/haematol.2011.041483.
  30. Rossetti M., Spreafico R., Saidin S., Chua C., Moshref M., Leong J.Y. et al. Ex vivo-expanded but not in vitro-induced human regulatory T cells are candidates for cell therapy in autoimmune diseases thanks to stable demethylation of the Foxp3 regulatory T cell-specific demethylated region. *J. Immunol.* 2015; 194 (1): 113–124. DOI: 10.4049/jimmunol.1401145.
  31. Theodosiou M., Laudet V., Schubert M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol. Life Sci.* 2010; 67 (9): 1423–1445. DOI: 10.1007/s00018-010-0268-z.
  32. Lu L., Lan Q., Li Z., Zhou X., Gu J., Li Q. et al. Critical role of all-trans retinoic acid in stabilizing human natural regulatory T cells under inflammatory conditions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2014; 111 (33): 3432–3440. DOI: 10.1073/pnas.1408780111.
  33. Lu L., Ma J., Li Z., Lan Q., Chen M., Liu Y. et al. All-trans retinoic acid promotes TGF-beta-induced Tregs via histone modification but not DNA demethylation on Foxp3 gene locus. *PLoS One.* 2011; 6 (9): e24590. DOI: 10.1371/journal.pone.0024590.
  34. Basu R., Whitley S.K., Bhaumik S., Zindl C.L., Schoeb T.R., Benveniste E.N. et al. IL-1 signaling modulates activation of STAT transcription factors to antagonize retinoic acid signaling and control the TH17 cell-iTreg cell balance. *Nat. Immunol.* 2015; 16 (3): 286–295. DOI: 10.1038/ni.3099.
  35. Smolders J., Thewissen M., Peelen E., Menheere P., Tervaert J.W., Damoiseaux J. et al. Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *PLoS One.* 2009; 4 (8): e6635. DOI: 10.1371/journal.pone.0006635.
  36. Urry Z., Chambers E.S., Xystrakis E., Dimeloe S., Richards D.F., Gabrysova L. et al. The role of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and cytokines in the pro-motion of distinct Foxp3+ and IL-10+ CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 2012; 42 (10): 2697–2708. DOI: 10.1002/eji.201242370.
  37. Chambers E.S., Suwannasaen D., Mann E.H., Urry Z., Richards D.F., Lertmemongkolchai G. et al. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in combination with transforming growth factor-beta increases the frequency of Foxp3(+) regulatory T cells through preferential expansion and usage of interleukin-2. *Immunology.* 2014; 143 (1): 52–60. DOI: 10.1111/imm.12289.
  38. Trenado A., Charlotte F., Fisson S., Yagello M., Klatzmann D., Salomon B.L. et al. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J. Clin. Invest.* 2003; 112 (11): 1688–1696. DOI: 10.1172/JCI17702.
  39. Brusko T.M., Koya R.C., Zhu S., Lee M.R., Putnam A.L., McClymont S.A. et al. Human antigen-specific regulatory T cells generated by T cell receptor gene transfer. *PLoS One.* 2010; 5 (7): e11726. DOI: 10.1371/journal.pone.0011726.
  40. Jethwa H., Adami A.A., Maher J. Use of gene-modified regulatory T-cells to control autoimmune and alloimmune pathology: is now the right time? *Clin. Immunol.* 2014; 150 (1): 51–63. DOI: 10.1016/j.clim.2013.11.004.
  41. Hoffmann P., Ermann J., Edinger M., Fathman C.G., Strober S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* 2002; 196: 389–399. DOI: 10.1084/jem.20020399.
  42. Di Ianni M., Falzetti F., Carotti A., Terenzi A., Castellino F., Bonifacio E. et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood.* 2011; 117 (14): 3921–3928. DOI: 10.1182/blood-2010-10-311894.
  43. Hillard M. Lazarus. Acute leukemia in adults: novel allogeneic transplant strategies. *Hematology.* 2012; 17 (1): 47–51. DOI: 10.1179/102453312X13336169155493.
  44. Godfrey W.R., Ge Y.G., Spoden D.J., Levine B.L., June C.H. et al. In vitro-expanded human CD4(+)CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures. *Blood.* 2004; 104: 453–461. DOI: 10.1182/blood-2004-01-0151.
  45. Jessica Heinrichs, David Bastian, Anandharaman Veerapathran, Claudio Anasetti, Brain Betts, and Xue-Zhong Yu Regulatory T-Cell Therapy for Graft-versus-host Disease. *J. Immunol. Res. Ther.* 2016; 1 (1): 1–14.

46. Jie Yang, Huahua Fan, Jun Hao, Yana Ren, Liang Chen, Guiping Li, Rufeng Xie, Yiming Yang, Kaicheng Qian, and Mingyao Liu. Amelioration of acute graft-versus-host disease by adoptive transfer of ex vivo expanded human cord blood CD4+CD25+ forkhead box protein 3+ regulatory T cells is associated with the polarization of Treg/Th17 balance in a mouse model. *Transfusion*. 2012; 52 (6): 1333–1347. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2011.03448.x.
47. Brunstein C.G., Miller J.S., Cao Q., McKenna D.H., Hippen K.L., Curtsinger J. et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*. 2011; 117 (3): 1061–1070. DOI: 10.1182/blood-2010-07-293795.
48. Beres A., Komorowski R., Mihara M., Drobyski W.R. Instability of Foxp3 expression limits the ability of induced regulatory T cells to mitigate graft versus host disease. *Clin. Cancer Res*. 2011; 17: 3969–3983. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3347.
49. Zhang P., Tey S.K., Koyama M., Kuns R.D., Olver S.D. et al. Induced regulatory T cells promote tolerance when stabilized by rapamycin and IL-2 *in vivo*. *J. Immunol*. 2013; 191: 5291–5303. DOI: 10.4049/jimmunol.1301181.
50. Kenrick Semple, Yu Yu, Dapeng Wang, Claudio Anasetti, and Xue-Zhong Yu. Efficient and selective prevention of GVHD by antigen-specific induced Tregs via linked-suppression in mice. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2011; 17 (3): 309–318. DOI: 10.1016/j.bbmt.2010.12.710.
51. Hippen K.L., Merkel S.C., Schirm D.K., Nelson C., Tennis N.C., Riley J.L., June C.H., Miller J.S., Wagner J.E. and Blazar B.R. Generation and large-scale expansion of human inducible regulatory T cells that suppress graft-versus-host disease. *Am. J. Transplant*. 2011; 11 (6): 1148–1157. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03558.x.
52. Aline Gaidot, Dan Avi Landau, Gae lle Her le'ne Martin, Olivia Bonduelle, Yenkel Grinberg-Bleyer, Diana Matheoud, Sylvie Gregoire, Claude Baillou, Berhazine Combadiere, Eliane Piaggio et al. Immune reconstitution is preserved in hematopoietic stem cell transplantation coadministered with regulatory T cells for GVHD prevention. *Blood*. 2011; 117 (10): 2975–2983. DOI: 10.1182/blood-2010-08-299974.
53. Keli L. Hippen, James L. Riley, Carl H. June, and Bruce R. Blazar Clinical perspectives for regulatory T cells in transplantation tolerance. *Semin. Immunol*. 2011; 23 (6): 462–468. DOI: 10.1016/j.smim.2011.07.008.
54. Amy J. Beres, William R. Drobyski. The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease. *Front. Immunol*. 2013; 4: 163. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00163.
55. Eun-Sol Lee, Jung-Yeon Lim, Keon-Il Im, Nayoun Kim, Young-Sun Nam, Young-Woo Jeon, Seok-Goo Cho. Adoptive transfer of Treg cells combined with mesenchymal stem cells facilitates repopulation of endogenous Treg cells in a murine acute GVHD model. *PLoS One*. 2015; 10 (9): e0138846. DOI: 10.1371/journal.pone.0138846.
56. Yushi Yao, Lei Wang, Jihao Zhou and Xinyou Zhang Yao et al. HIF-1 $\alpha$  inhibitor echinomycin reduces acute graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia effect. *J. Transpl. Med*. 2017; 15 (1): 28. DOI: 10.1186/s12967-017-1132-9.
57. Jessica Heinrichs, Jun Li, Hung Nguyen, Yongxia Wu, David Bastian, Anusara Daethanasanmak, M-Hanief Sofi, Steven Schutt, Chen Liu, Junfei Jin et al. CD8 Tregs promote GVHD prevention and overcome the impaired GVL effect mediated by CD4 Tregs in mice. *Oncoimmunology*. 2016; 5 (6): e1146842. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1146842.
58. Marco Romano, Sim Lai Tung, Lesley Ann Smyth, Giovanna Lombardi. Treg therapy in transplantation: a general overview. *Transpl. Int*. 2016. DOI: 10.1111/tri.12909.
59. Theil A., Tuve S., Oelschlägel U. et al. Adoptive transfer of allogeneic regulatory T cells into patients with chronic graft-versus-host disease. *Cytotherapy*. 2015; 17: 473–486. DOI: 10.1111/cei.12887.
60. Bacchetta R., Lucarelli B., Sartirana C. et al. Immunological outcome in haploidentical-HSC transplanted patients treated with IL-10-anergized donor T cells. *Front. Immunol*. 2014; 5: 1–14. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00016.

Поступила в редакцию 28.06.2017

Утверждена к печати 06.02.2018

Сенников Сергей Витальевич, д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией молекулярной иммунологии НИИФКИ, г. Новосибирск.

Хантакова Юлия Николаевна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория молекулярной иммунологии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Кнауэр Надежда Юрьевна, лаборант-исследователь, лаборатория клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

(✉) Сенников Сергей Витальевич, e-mail: SennikovSV@gmail.com.

УДК 616-089.819.843-085.37:577.27

DOI: 10.20538/1682-0363-2018-1-199–210

For citation: Sennikov S.V., Khantakova J.N., Knauer N.Y. T-regulatory cells in transplantology: from preparation to clinical applications. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (1): 199–210.

## T-regulatory cells in transplantology: from preparation to clinical applications

**Sennikov S.V., Khantakova J.N., Knauer N.Y.**<sup>1</sup> *Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI)  
14, Yudrincevskay Str., 630099, Novosibirsk, Russian Federation*

### ABSTRACT

The intensive study of the cellular approaches for the correction of different pathologies, including immunopathological processes and oncology, as well as the investigation of the immunosuppressive role of the regulatory T-cells (Tregs) made conditions for the development of techniques of the cell-based correction of immune-mediated states, such as autoimmune pathology or transplantation. Since there are few Tregs in periphery and no specific Treg marker is known, the sorting of the whole blood yields insufficient number of cells. That is why it is emerging to search for optimal conditions of Treg generation and expansion using proliferation stimulators and targeted differentiation of the “pure” Treg population that does not involve the proliferation of effector cells. To date, promising results of the Treg immunotherapy to induce allospecific tolerance in recipients having transplanted organs or tissues were obtained in laboratory experiments and clinical trials. The key problems of this therapy are the lack of knowledge about the mechanism of action and the specific phenotype of the most efficient tolerance-inducing Tregs, and the difficulties to obtain stable populations of functional Tregs. Moreover, it is still unknown how to obtain antigen-specific Treg populations and what the mechanism of their action is. In this review the protocols of Treg generation are summarized and the clinical data on the Treg use for the induction of allo-specific tolerance in transplantation are analyzed.

**Key words:** T-regulatory cells, cell immunotherapy, transplantation, HVGD, rapamycin, ATRA, vitamin D.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

### SOURCE OF FINANCING

The work is supported by the Russian Science Foundation (agreement No. 16-15-00086 of 11.01.2016).

Received 28.06.2017

Accepted 06.02.2018-

Sennikov Sergey V., DM, Professor, Head of Molecular Immunology Department, RIFCI Novosibirsk, Russian Federation.

Khantakova Julia N., PhD, Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, RIFCI Novosibirsk, Russian Federation.

Knauer N.Y., Laboratory Assistant Researcher, Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) Sennikov Sergey V., e-mail: SennikovSV@gmail.com.