

БИОХИМИЯ BIOCHEMISTRY

МАРКЕРЫ Th1-ПОЛЯРИЗОВАННЫХ КЛЕТОК Th17 (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

**Куклина Е.М.,
Глебездина Н.С.**

Институт экологии и генетики
микроорганизмов Уральского отделения
Российской академии наук –
филиал ФГБУН Пермского федерального
исследовательского центра УрО РАН
(614081, г. Пермь, ул. Голева, 13, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Куклина Елена Михайловна,
e-mail: ibis_07@mail.ru

РЕЗЮМЕ

T-хелперы (*Th*, *T* helpers), продуцирующие IL-17 (*Th*17), обладают высокой пластичностью и под влиянием внешних условий способны редифференцироваться в клетки с другим фенотипом, прежде всего в *Th*1-лимфоциты, формируя популяцию, сочетающую в себе характеристики как *Th*17, так и *Th*1 и обладающую высоким провоспалительным потенциалом, а также уникальной способностью преодолевать гистогематические барьеры. Именно этим клеткам в настоящее время отводится ключевая роль в патогенезе многих воспалительных заболеваний, включая и аутоиммунные: в инфильтрациях воспалённых тканей на их долю приходится до половины присутствующих там лимфоцитов. В работе обсуждаются причины повышенной пластичности клеток *Th*17 в сравнении с основными *T*-хелперными популяциями (*Th*1 и *Th*2) и подробно рассматриваются механизмы формирования IFN γ -продуцирующих *Th*17 с учётом не только редифференцировки зрелых *Th*17, но и возможных альтернативных путей, в частности редифференцировки клеток *Th*1 или непосредственной дифференцировки наивных CD4⁺*T*-лимфоцитов в клетки с промежуточным *Th*1/*Th*17-фенотипом. Также обсуждаются основные индукторы дифференцировки IFN γ -продуцирующих клеток *Th*17 и обратимость этого процесса. Особое внимание в обзоре уделено способам идентификации *Th*1-поляризованных клеток *Th*17: эта популяция неоднородна, и её размер существенно зависит от типа маркеров, используемых для характеристики данных клеток – *Th*1/*Th*17-ассоциированных транскрипционных факторов, ключевых цитокинов, а также хемокиновых рецепторов и других мембранных молекул. Как следствие, данные в работах по этой проблеме плохо сопоставимы друг с другом. Унификация подходов к выявлению популяции *Th*1-подобных *Th*17 позволит решить эту проблему и даст возможность использовать оценку размера и активности такой популяции в качестве диагностических или прогностических маркеров.

Ключевые слова: *Th*17, *Th*1, пластичность, редифференцировка, *Th*17.1, ex-*Th*17

Статья поступила: 07.12.2022

Статья принята: 29.05.2023

Статья опубликована: 11.07.2023

Для цитирования: Куклина Е.М., Глебездина Н.С. Маркеры *Th*1-поляризованных клеток *Th*17 (обзор литературы). *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(3): 55-62. doi: 10.29413/ABS.2023-8.3.5

MARKERS OF Th1 POLARIZED Th17 CELLS (LITERATURE REVIEW)

**Kuklina E.M.,
Glebezdina N.S.**

Institute of Ecology and Genetics
of Microorganisms, Ural Branch
of the Russian Academy of Sciences –
Branch of the Perm Federal Research Center
UB RAS (Goleva str. 13, Perm 614081,
Russian Federation)

Corresponding author:
Elena M. Kuklina,
e-mail: ibis_07@mail.ru

ABSTRACT

T helpers (Th) producing IL-17 (Th17) have high plasticity and under the influence of external conditions are able to redifferentiate into cells with a different phenotype, primarily in Th1-lymphocytes, forming a population that combines the characteristics of both Th17 and Th1 and has a high pro-inflammatory potential, as well as a unique ability to overcome histohematic barriers. These cells are currently assigned a key role in the pathogenesis of many inflammatory diseases, including autoimmune ones: they account for up to half of the lymphocytes present in infiltrates of inflamed tissues. The paper discusses the reasons for the increased plasticity of Th17 cells in comparison with the main T helper populations (Th1 and Th2) and considers in detail the mechanisms of formation of IFN γ producing Th17, taking into account not only the redifferentiation of mature Th17, but also possible alternative pathways, in particular, Th1 cell redifferentiation or naive CD4⁺T lymphocytes direct differentiation into cells with an intermediate Th1/Th17 phenotype. The main inducers of differentiation of IFN γ producing Th17 cells and the reversibility of this process are also discussed. Particular attention is paid to the methods for identifying Th1 polarized Th17 cells: this population is heterogeneous, and its size significantly depends on the type of markers used to characterize these cells – Th1/Th17-associated transcription factors, key cytokines, as well as chemokine receptors and other membrane molecules. As a result, the data in the works on this problem are poorly comparable with each other. The unification of approaches to identifying a population of Th1 like Th17 cells will solve this problem and make it possible to use an assessment of the size and activity of such a population as diagnostic or prognostic markers.

Key words: Th17, Th1, plasticity, redifferentiation, Th17.1, ex-Th17

Received: 07.12.2022
Accepted: 29.05.2023
Published: 11.07.2023

For citation: Kuklina E.M., Glebezdina N.S. Markers of Th1 polarized Th17 cells (literature review). *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(3): 55-62. doi: 10.29413/ABS.2023-8.3.5

Популяция Т-хелперов (Th, T helpers), продуцирующей интерлейкин (IL) 17 (Th17), обладает значительной гетерогенностью и пластичностью. Цитокиновое окружение способно не только корректировать программу дифференцировки наивных CD4⁺Т-лимфоцитов в Th17, но и вызывать редифференцировку зрелых Th17, и в первую очередь речь идет о приобретении этими клетками Th1-подобного фенотипа, ассоциированного с высокой продукцией интерферона (IFN) γ [1–4]. Номенклатура таких Th1-поляризованных Th17 не единообразна, хотя и отражает их трансформированное состояние: в разных работах эти клетки обозначены как Th17/Th1 [5, 6], Th1/Th17 [7, 8], Th1/17 [9], Th17/1 [10], Th17-1 [11], Th17.1 [12–14], а также как Th1* [15], «неклассические Th1» [6] или просто как «IFN γ -продуцирующие Th17». Однако дело не только в номенклатуре – анализ этих работ показывает, что популяция Th1-подобных Th17 неоднородна, и в указанных выше работах речь часто идёт о фенотипически и функционально различных субпопуляциях.

Несмотря на небольшой размер субпопуляции IFN γ -продуцирующих Th17 в периферической крови, её содержание в инфильтратах воспалённых тканей достигает 60 % [13], и именно этим клеткам в настоящее время отводится ключевая роль в патогенезе многих заболеваний, включая и аутоиммунные [5, 7, 8, 10, 13, 14]. В связи с этим унификация данных о неклассических вариантах клеток Th17 имеет высокую актуальность и является предметом настоящего обзора.

ХАРАКТЕРИСТИКА Th1-ПОДОБНЫХ КЛЕТОК Th17

Тот факт, что в популяции Th17 есть фракция лимфоцитов, продуцирующих, наряду с IL-17, Th1-ассоциированный цитокин IFN γ , был отмечен ещё в одной из первых работ по изучению клеток Th17 у человека [16]. Тогда же были определены и мембранные маркеры, позволяющие дифференцировать такую неклассическую популяцию от традиционных Th17, – хемокиновые рецепторы CCR6, CCR4 и CXCR3 [16]. В частности, было показано, что Т-клетки памяти периферической крови, экспрессирующие IL-17A в ответ на стимуляцию *ex vivo*, несут на мембране рецептор CCR6 [5, 16] и в зависимости от коэкспрессии молекул CCR4 и CXCR3 разделяются на две субпопуляции с разным цитокиновым профилем: коэкспрессия на мембране CCR6/CCR4 маркирует Т-клетки памяти, селективно продуцирующие IL-17A, но не IFN γ , тогда как CCR6⁺CXCR3⁺Т-клетки продуцируют IL-17A и IFN γ или один IFN γ [16]. И хотя впоследствии представления о клетках Th17, продуцирующих IFN γ , были скорректированы, комбинация указанных выше хемокиновых рецепторов (CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺) в сочетании с маркерами Т-клеток памяти и в настоящее время широко используется для идентификации данной Т-хелперной субпопуляции, особенно в клинических работах, не предусматривающих длительного культивирования и оценки экспрессии внутриклеточных факторов [7, 12, 13, 15].

Механизмы формирования Т-лимфоцитов, коэкспрессирующих маркеры Th17 и Th1

Традиционно дифференцировка клеток Th17 инициируется в присутствии IL-6, трансформирующего фактора роста β (TGF β , transforming growth factor β), IL-1 β и IL-23, последовательно активирующих транскрипционные факторы STAT3 и RORC (у мышей – ROR γ t) [17]. При этом первичными индукторами дифференцировки являются IL-6/TGF β или IL-6/IL-1 β , а IL-23 включается в процесс позже, когда на мембране активированных Т-лимфоцитов появляется рецептор IL-23R: сигнализация через этот рецептор стимулирует экспансию клеток и необходима для поддержания их функционирования, в частности для синтеза IL-17 [18]. Классические Th17 экспрессируют ключевой транскрипционный фактор RORC, несут на мембране специфические маркеры, такие как лектин-подобный рецептор киллерных клеток CD161 и хемокиновый рецептор CCR6, и способны продуцировать характерные для них цитокины IL-17A, IL-17F и IL-22 [17, 19].

Однако популяция Th17 нестабильна – дифференцированные лимфоциты Th17 способны трансформироваться в клетки другого фенотипа в условиях локального цитокинового окружения при рестимуляции, и легче всего реализуется сдвиг Th17 в направлении Th1. Эффективным индуктором такого сдвига ожидается IL-12, главный цитокин в дифференцировке Th1. Повышенный уровень IL-12 индуцирует развитие субпопуляции Th1-подобных клеток Th17, в которых инициируется экспрессия Th1-ассоциированных транскрипционных факторов T-bet/STAT4 и хемокинового рецептора CXCR3, а также синтез ключевого Th1-цитокина IFN γ [3, 10]. Как следствие, новообразованная субпопуляция имеет фенотипические черты, общие для линий Th17 и Th1 (CD4⁺CD161⁺CCR6⁺CXCR3⁺IL-17⁺IFN γ ⁺Т-клетки) [6, 10]. Она по-разному идентифицируется и обозначается в современной литературе – в данной работе мы будем использовать наиболее распространённое название Th17.1 [12–14]. Часть клеток Th17.1 (IL-17⁺IFN γ ⁺Th17-клетки) может полностью утрачивать продукцию IL-17 и дифференцироваться в так называемые «бывшие» Th17 (ex-Th17), которые продуцируют только IFN γ , но сохраняют при этом экспрессию Th17-ассоциированного транскрипционного фактора RORC, мембранных молекул CD161 и CCR6 (CD4⁺CD161⁺CCR6⁺CXCR3⁺IL-17[–]IFN γ ⁺Т-клетки) [5, 10, 20, 21], а также способность эффективно отвечать на IL-23 [10]. Помимо этого, некоторыми авторами фиксируются дополнительные переходные формы, например, с разными вариантами экспрессии мембранных молекул CD161 и CCR6: CD4⁺CD161⁺CCR6[–]CXCR3⁺IL-17[–]IFN γ ⁺Т-лимфоциты или CD4⁺CD161[–]CCR6⁺CXCR3⁺IL-17[–]IFN γ ⁺Т-клетки [22]. В норме содержание Th1-подобных Th17 в периферической крови здоровых доноров крайне мало, однако именно на эти клетки приходится основная часть CD4⁺IL-17⁺Т-лимфоцитов в сайте воспаления, в том числе аутоиммунного [10], поэтому ещё одно их неформальное название – «патогенные Th17», в противоположность классическим Th17, которые не явля-

ются патогенными в различных моделях аутоиммунитета и продуцируют существенные количества противовоспалительного цитокина IL-10 [23].

Следует отметить, что IL-12 – не единственный индуктор редифференцировки Th17 в Th1: показано, что классический для Th17-линии цитокин IL-23 при рестимуляции также способен индуцировать появление клеток с Th1-подобным фенотипом [23–25], в связи с чем ему в настоящее время приписывают участие не только в экспансии Th17, но и в их патогенности [3, 23]. Более того, высокий уровень экспрессии IL-23R Т-клетками памяти ограничен неклассическими Th17, коэкспрессирующими IFN γ и CXCR3 [12].

Важным фактором, регулирующим переход Th17–Th1, является TGF β – цитокин, который в сочетании с IL-6 считается классическим стимулятором первичной дифференцировки наивных CD4⁺Т-лимфоцитов в Th17. И хотя в настоящее время показано, что для первичной стимуляции TGF β необязателен, он играет важную роль в дальнейшей судьбе Th17 – за счёт ингибирования экспрессии Th1-ассоциированного транскрипционного фактора T-bet [10, 23]. Это стабилизирует фенотип классических Th17 и препятствует формированию патогенных Th1-подобных вариантов данной популяции [10].

Ещё один важный момент связан с происхождением Т-лимфоцитов, коэкспрессирующих маркеры Th17 и Th1, – все приведённые выше рассуждения исходят из того, что эти клетки формируются из зрелых дифференцированных Th17, и это действительно продемонстрировано во многих работах [3, 10, 26], хотя теоретически возможны ещё как минимум два механизма их возникновения: во-первых, они могут развиваться непосредственно из наивных CD4⁺Т-лимфоцитов в ходе первичной дифференцировки; во-вторых – трансформироваться из классических Th1. По первому варианту данных пока нет, но вероятность его мала, так как для одного из основных индукторов развития Th1-подобных Th17 – IL-23 – на наивных Т-лимфоцитах нет рецептора [24], а второй индуктор – IL-12 – в этом случае будет инициировать развитие классических Th1. Что касается происхождения IFN γ -продуцирующих Th17 из Th1, то этот вариант оценивался во многих исследованиях и на сегодняшний день не подтверждён. Напротив, показано, что фракционированные Th1 не способны трансформироваться в Th17 или Th17.1 в ответ на Th17-поляризующие цитокины IL-1 β , IL-23, IL-6 и IL-21 *in vitro* [10], и клональная структура Т-клеточных рецепторов (TCR, T cell receptor) у популяции Th17.1 ближе к таковой у Th17, чем у Th1 [10]. Поэтому поляризованные клетки Th17 рассматриваются как основной источник IFN γ -продуцирующих Th17. Вопрос об обратимости редифференцировки Th17 в Th1 является спорным: одни авторы сообщают о невозможности возвращения «неклассических Th1» (ex-Th17) в Th17, обусловленной эпигенетическими механизмами [27], тогда как другими показана трансдифференцировка *ex vivo* «неклассических Th1» в Th17 и Th1/Th17 при Th17-поляризующих условиях [22].

Причины пластичности клеток Th17 в направлении Th1

Говоря о пластичности популяции Th17, важно отметить, что независимо от направления редифференцировки она в целом менее стабильна, чем основные Т-хелперные популяции, Th1 и Th2: в отличие от последних, у клеток Th17 в процессе дифференцировки не формируется петля положительной обратной связи, так называемой аутоактивации, при которой продуцируемый цитокин (IFN γ для Th1 или IL-4 для Th2), действуя как ауто- или паракринный фактор, связывается с рецепторами на мембране клетки и усиливает собственную продукцию, что стабилизирует соответствующий фенотип. Кроме того, у клеток Th17 не работает и вторая важная составляющая процесса стабилизации фенотипа – подавление дифференцировки альтернативных Т-хелперных линий, тогда как у Th1 и Th2 этот механизм чётко отлажен, в том числе и в отношении Th17. Так, Th1-ассоциированный регулятор T-bet связывается с транскрипционным фактором RUNX1 и блокирует его взаимодействие с ROR γ t, подавляя в итоге дифференцировку Th17 [28]. Ингибирующим действием в отношении ROR γ t обладают также главный индуктор Th2-ответа GATA3 [29], цитокины IL-2 (через STAT5) [30], IFN γ (через STAT1) и IL-12 (через STAT4). К тому же, в отличие от ключевых регуляторов Th1/Th2-линий, T-bet и GATA3, ROR γ t регулирует транскрипцию существенно меньшего количества локусов в клетках Th17 [31], что при отсутствии надёжных механизмов стабилизации его экспрессии не позволяет считать данный фактор полноценным «мастер-регулятором», способным обеспечить эффективную программу дифференцировки Th17, что и определяет высокую нестабильность популяции.

Что касается преимущественной пластичности Th17 в направлении Th1, здесь выделяют несколько причин. Одна из них заключается в том, что ключевой цитокин в дифференцировке клеток Th17, IL-23, имеет общую субъединицу с IL-12, основным индуктором Th1, и рецептор IL-23R также делит одну из двух субъединиц с IL-12R [32]. Как следствие, сигналы, инициируемые в Th17 при связывании IL-23 с соответствующим рецептором, активируют не только STAT3 (ключевой транскрипционный фактор в дифференцировке Th17), но и STAT4 (дифференцировочный фактор для Th1), хотя и в существенно меньшей степени [33]. То есть стабилизирующий для Th17-линии IL-23-зависимый сигнал, реализуемый через STAT3, одновременно за счёт активации STAT4 промотирует коэкспрессию IFN γ и сдвиг в направлении Th1-фенотипа [34]. На молекулярном уровне пластичность Th17–Th1 связывают с пермиссивными эпигенетическими модификациями в Th1-ассоциированных локусах клеток Th17 [35], в частности в локусе *IFNG*: в то время как в клетках Th2 локус *IFNG* не имеет заметных следов ремоделирования, в клетках Th17 структура хроматина в этом локусе имеет высокое сходство с таковой в клетках Th1 [20]. В работе А. Mazzoni и соавт. трансформация генерированных *in vitro* Th17 в «неклассические» Th1 (ex-Th17) сопровождалась деметилированием ДНК в локусах *TBX21* (кодирует T-bet) и *IFNG* с одно-

временным метилированием ДНК в *IL-17A/RORC2* [36], хотя в более ранней работе с использованием клонов Th17-клеток памяти в аналогичных условиях эпигенетических модификаций в *IFNG*-локусе не было выявлено [37]. Вопрос о том, связано ли эпигенетическое примирование Th1-ассоциированных локусов клеток Th17 с описанной выше перекрёстной активацией транскрипционного фактора STAT4 в ответ на IL-23/IL23R-зависимый сигнал, пока остаётся открытым.

МАРКЕРЫ Th1-ПОДОБНЫХ КЛЕТОК Th17

На сегодняшний день в популяции Th1-поляризованных клеток Th17 выделяют два основных варианта. Первый – лимфоциты Th17, продуцирующие наряду с классическим IL-17 главный Th1-цитокин IFN γ , а также коэкспрессирующие транскрипционный фактор T-bet, хемокиновый рецептор CXCR3 и ряд других Th1-ассоциированных молекул [3, 10]. Такая субпопуляция сочетает фенотипические и функциональные характеристики обеих линий, Th17 и Th1 и в наиболее общей форме представлена в литературе как CD4⁺CD161⁺CCR6⁺CXCR3⁺IL-17⁺IFN γ ⁺Т-клетки [6, 10]. В ряде случаев, когда эти клетки идентифицируют только с помощью мембранных молекул, без оценки синтеза цитокинов, в линейку маркеров добавляются ещё два хемокиновых рецептора – CCR4 и CCR10, – чтобы разделить популяции классических Th17 и Th22, которые при идентификации с помощью указанных мембранных маркеров имеют одинаковый фенотип (CCR6⁺CXCR3^{low}), но могут быть дифференцированы по комбинации CCR4/CCR10: CCR4 представлен в обеих популяциях, тогда как CCR10 высоко экспрессирован на клетках Th22, но отсутствует у Th17 [12]. В результате интересующая нас субпопуляция клеток Th17, копродуцирующих IL-17/IFN γ , будет иметь фенотип CD4⁺CD161⁺CCR6⁺CCR4^{low}CCR10⁺CXCR3⁺, в отличие от классических Th17 с фенотипом CD4⁺CD161⁺CCR6⁺CCR4⁺CCR10⁺CXCR3⁺ [12]. Кроме того, в исследованиях *ex vivo* клетки Th17.1 и ex-Th17, как правило, выделяются из предварительно фракционированных Т-клеток памяти – центральных (CCR7⁺CD45RA⁺) или эффекторных (CCR7⁺CD45RA⁺/CD45RO⁺). Разумеется, это ещё не предел детализации: есть исследования, в которых наряду с мембранными оценивается широкий спектр внутриклеточных молекул – как на уровне мРНК, так и на уровне белка, однако в большинстве работ, особенно клинических, данную субпопуляцию идентифицируют по ключевым цитокинам (IL-17/IFN γ), хемокиновым рецепторам (CCR6/CXCR3) или их комбинации. Эти клетки не имеют единого названия, в литературе у них множество обозначений (будут рассмотрены ниже), мы в данной работе используем наиболее распространённое – Th17.1 [12–14].

Второй вариант Th1-поляризованных клеток Th17 – это фактически результат дальнейшей редифференцировки Th17.1 в направлении Th1, при которой клет-

ки утрачивают синтез IL-17, продуцируя только IFN γ , но сохраняют при этом остальные «атрибуты» исходной популяции – экспрессию Th17-ассоциированного транскрипционного фактора RORC и мембранных молекул CD161/CCR6 (CD4⁺CD161⁺CCR6⁺CXCR3⁺IL-17⁺IFN γ ⁺Т-клетки) [2, 5, 10, 20]. Это так называемые «бывшие» Th17 (ex-Th17), они же «неклассические Th1» [6] или Th1* [15]. Следует отметить, что субпопуляцию ex-Th17 нельзя идентифицировать только по цитокиновой продукции или только по экспрессии мембранных маркеров: в первом случае она перекрывается с классическими Th1, а во втором – с клетками Th17.1. Именно поэтому их часто ошибочно «недооценивают» или «переоценивают».

Однако проблемы с идентификацией относятся не только к клеткам ex-Th17, но и в целом к популяции Th1-поляризованных Th17. Как отмечалось выше, номенклатура таких клеток не единообразна; в разных работах эти клетки обозначены как Th17/Th1, Th1/Th17, Th1/17, Th17/1, Th17-1, Th17.1 и так далее. И хотя из названия ясно, что это продукты трансформации Th17 в Th1, внимательный анализ таких работ показывает, что речь в них часто идёт о разных субпопуляциях.

Рассмотрим несколько примеров. Работа R. Ramesh и соавт. [12] – одна из немногих, в которой максимально точно на сегодняшний день идентифицирована субпопуляция лимфоцитов Th17, копродуцирующих IL-17/IFN γ : в ней из клеток периферической крови человека последовательно выделялись Т-клетки памяти – центральные (CD4⁺CCR7⁺CD45RO⁺) и эффекторные (CD4⁺CCR7⁺CD45RO⁺), которые далее фракционировались на основе экспрессии хемокиновых рецепторов CCR6/CCR4/CXCR3 и внутриклеточных цитокинов IL-17/IFN γ (CD4⁺CCR6⁺CCR4^{lo}CXCR3^{hi}IL-17⁺IFN γ ⁺Т-лимфоциты). Субпопуляция была впервые обозначена в работе как Th17.1 – это наиболее распространённый на сегодняшний день вариант её названия.

Однако в других работах, использующих такое же обозначение, Th17.1 [13, 14], речь идёт не о той же популяции – вернее, не о ней одной. Так, в исследовании J. Ramstein и соавт. [13] клетки Th17.1 идентифицировали в периферической крови и бронхоальвеолярном лаваже больных саркоидозом по коэкспрессии CCR6/CXCR3 (CD4⁺CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺Т-лимфоциты). Аналогичным образом, по коэкспрессии CCR6/CXCR3, определялась субпопуляция Th17.1 в клетках памяти крови здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (CD4⁺CD45RO⁺CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺Т-лимфоциты) в работе W. Dankers и соавт. [14]. Очевидно, что при использовании в качестве маркеров только хемокиновых рецепторов CCR6/CXCR3 идентифицируется общая популяция Th1-подобных Th17, включающая Th17.1 и ex-Th17. Субпопуляция, обозначаемая в литературе как Th1/Th17 [7, 8], также идентифицировалась по коэкспрессии хемокиновых рецепторов CCR6/CXCR3 – в циркулирующих CD70⁺Т-лимфоцитах больных рассеянным склерозом (CD4⁺CD70⁺CCR6⁺CXCR3⁺Т-лимфоциты) [8] и в центральных клетках памяти из периферической крови таких пациентов CCR6/CXCR3 (CD4⁺CCR7⁺CD45RA⁺CCR6⁺CXCR3⁺Т-

лимфоциты) [7]. Цитокины здесь не определялись, так что речь идёт об общей популяции Th1-подобных Th17, включающей и Th17.1, и ex-Th17. Это относится и к субпопуляции циркулирующих клеток Th1* в работе H. Nishihara и соавт. (CD4⁺CD45RO⁺CXCR3⁺CCR4⁺CCR6⁺T-лимфоциты) [15] или к клеткам Th1/17 из крови здоровых доноров в исследовании T. Duhen и соавт. (CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺CD127⁺CCR6⁺CXCR3⁺T-лимфоциты) [9]. Интересно отметить, что в ряде описанных выше работ последующая оценка цитокинов в T-лимфоцитах, коэкспрессирующих CCR6/CXCR3, показала, что лишь небольшая доля этих клеток копродуцирует IL-17/IFN γ , тогда как основная часть (в бронхоальвеолярном лаваже – до 60 %) – один IFN γ [9, 13].

С другой стороны, в литературе есть немало работ, в которых Th1-подобные клетки Th17 определяются по коэкспрессии цитокинов IL-17/IFN γ , – это субпопуляция Th17-1, идентифицированная в крови здоровых доноров (CD4⁺IL-17⁺IFN γ ⁺T-лимфоциты) [11], клетки Th17/Th1 из крови и слизистой кишечника пациентов с болезнью Крона (CD4⁺IL-17⁺IFN γ ⁺T-лимфоциты) [5], а также Th17/1, определявшиеся в крови и синовиальной жидкости пациентов с ювенильным идиопатическим артритом (CD4⁺IL-17⁺IFN γ ⁺T-лимфоциты) [10]. Во всех этих работах речь, очевидно, идёт о субпопуляции, которая в нашем обзоре названа Th17.1. В исследовании L. Maggi и соавт. [6] для идентификации в крови клеток, обозначенных как Th17/Th1, в качестве маркеров наряду с цитокинами IL-17/IFN γ была использована Th17-специфичная мембранная молекула CD161: её использование позволило выявить не только субпопуляцию IL-17/IFN γ -копродуцирующих Th17, то есть Th17.1 (CD4⁺CD161⁺IL-17⁺IFN γ ⁺T-лимфоциты), но и вторую основную субпопуляцию Th1-подобных Th17 – ex-Th17, или «неклассических» Th1 (CD4⁺CD161⁺IL-17⁺IFN γ ⁺T-клетки), дифференцировавших её с помощью CD161 от классических Th1 (CD4⁺CD161⁺IL-17⁺IFN γ ⁺T-клетки) [6].

Подведём итоги: использование мембранных маркеров CCR6/CXCR3 позволяет идентифицировать обе основные субпопуляции Th1-подобных Th17, Th17.1 и ex-Th17, но не позволяет дифференцировать их друг от друга. Оценка коэкспрессии цитокинов IL-17/IFN γ позволяет выявить только Th17.1, но не ex-Th17. Только комбинированный подход с использованием в качестве маркеров наряду с цитокинами мембранных молекул даёт возможность разделить эти субпопуляции.

Отдельного внимания заслуживают транскрипционные факторы как потенциальные маркеры в подобных исследованиях: хотя оценка экспрессии T-bet и RORC является стандартом в определении классических популяций Th1 и Th17, их использование для идентификации субпопуляций Th17.1 и ex-Th17, по-видимому, малоэффективно: немногочисленные работы показывают, что если экспрессия RORC в субпопуляциях Th17.1 и ex-Th17 одинакова и сопоставима с таковой в классических Th17, T-bet имеет низкую экспрессию в Th17.1, хотя его уровень в ex-Th17 сопоставим с классическими Th1 [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что Th1-поляризованные Th17 выявляют и у здоровых доноров, интерес к этой популяции обусловлен в первую очередь присутствием (и существенным превалированием) этих клеток в очагах воспаления при рассеянном склерозе [7, 8, 24], саркоидозе [13], ревматоидном артрите [10, 14], воспалительном заболевании кишечника [5, 38], причём доказан их вклад в развитие данных заболеваний. Более того, процесс редифференцировки Th17 в Th1 рассматривается в настоящее время как перспективная мишень для терапии. В связи с этим вопрос об унификации методов выделения этих клеток очень актуален, особенно учитывая, что популяция Th1-подобных клеток Th17 неоднородна и включает как минимум два варианта – Th17.1 и ex-Th17, – отражающие, по-видимому, разные стадии трансформации Th17. Роль каждой из субпопуляций в патогенезе и их уникальные свойства пока изучены недостаточно: есть лишь несколько работ, в которых клетки Th17.1 и ex-Th17 выделялись и оценивались индивидуально. Большинство же исследователей используют один из двух методов идентификации Th1-подобных клеток Th17 – по коэкспрессии клетками хемокиновых рецепторов CCR6/CXCR3 или цитокинов IL-17/IFN γ , – и получают результаты, не всегда сопоставимые друг с другом. Причина таких противоречий состоит, по-видимому, в том, что субпопуляция ex-Th17, упускаемая из виду при определении IL-17/IFN γ -копродуцирующих клеток, сильно варьирует в зависимости от локализации и окружения: если в периферической крови её размер невелик (~5 %), как и в краткосрочной культуре при трансформации Th17 в Th1 *in vitro*, то в сайтах воспаления доля ex-Th17 достигает 60 % [9, 13]. В связи с этим использование хемокиновых рецепторов CCR6/CXCR3 в качестве маркеров позволяет получить более точные представления о размере популяции Th1-подобных Th17, чем при оценке синтеза цитокинов, однако предпочтительной стратегией идентификации этих клеток является, по-видимому, одновременная оценка экспрессии клетками цитокинов IL-17/IFN γ и Th17-ассоциированных мембранных маркеров (CCR6 и/или CD161): она позволяет не только идентифицировать обе субпопуляции, Th17.1 и ex-Th17, но и разделить их, а также дифференцировать ex-Th17 от классической популяции Th1.

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда и Пермского края в рамках научного проекта № 22-25-20121.

Конфликт интересов

Конфликт интересов в финансовой или какой-либо иной сфере отсутствует.

Соблюдение этических стандартов

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ahern PP, Schiering C, Buonocore S, McGeachy MJ, Cua DJ, Maloy KJ, et al. Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. *Immunity*. 2010; 33(2): 279-288. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.010
- Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol*. 2011; 12: 255-263. doi: 10.1038/ni.1993
- Lee YK, Turner H, Maynard CL, Oliver JR, Chen D, Elson CO, et al. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity*. 2009; 30(1): 92-107. doi: 10.1016/j.immuni.2008.11.005
- Lexberg MH, Taubner A, Albrecht I, Lepenies I, Richter A, Kamradt T, et al. IFN- γ and IL-12 synergize to convert *in vivo* generated Th17 into Th1/Th17 cells. *Eur J Immunol*. 2010; 40(11): 3017-3027. doi: 10.1002/eji.201040539
- Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2007; 204(8): 1849-1861. doi: 10.1084/jem.20070663
- Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Rossi MC, Querci V, Mazzoni A, et al. Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells. *Eur J Immunol*. 2012; 42(12): 3180-3188. doi: 10.1002/eji.201242648
- Quirant-Sanchez B, Presas-Rodriguez S, Mansilla MJ, Teniente-Serra A, Hervas-Garcia JV, Brieva L, et al. Th1Th17_{CM} lymphocyte subpopulation as a predictive biomarker of disease activity in multiple sclerosis patients under dimethyl fumarate or fingolimod treatment. *Mediators Inflamm*. 2019; 2019: 8147803. doi: 10.1155/2019/8147803
- Dhaeze T, Tremblay L, Lachance C, Peelen E, Zandee S, Grasmuck C, et al. CD70 defines a subset of proinflammatory and CNS-pathogenic TH1/TH17 lymphocytes and is overexpressed in multiple sclerosis. *Cell Mol Immunol*. 2019; 16(7): 652-665. doi: 10.1038/s41423-018-0198-5
- Duhen T, Campbell DJ. IL-1 β promotes the differentiation of polyfunctional human CCR6⁺CXCR3⁺ Th1/17 cells that are specific for pathogenic and commensal microbes. *J Immunol*. 2014; 193(1): 120-129. doi: 10.4049/jimmunol.1302734
- Nistala K, Adams S, Cambrook H, Ursu S, Olivito B, de Jager W, et al. Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107(33): 14751-14756. doi: 10.1073/pnas.1003852107
- Dhodapkar KM, Barbutto S, Matthews P, Kukreja A, Mazumder A, Vesole D, et al. Dendritic cells mediate the induction of polyfunctional human IL17-producing cells (Th17-1 cells) enriched in the bone marrow of patients with myeloma. *Blood*. 2008; 112(7): 2878-2885. doi: 10.1182/blood-2008-03-143222
- Ramesh R, Kozhaya L, McKevitt K, Djuretic IM, Carlson TJ, Quintero MA, et al. Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J Exp Med*. 2014; 211(1): 89-104. doi: 10.1084/jem.20130301
- Ramstein J, Broos CE, Simpson LJ, Ansel KM, Sun SA, Ho ME, et al. IFN- γ -producing T-helper 17.1 cells are increased in sarcoidosis and are more prevalent than T-helper type 1 cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016; 193(11): 1281-1291. doi: 10.1164/rccm.201507-1499OC
- Dankers W, den Braanker H, Paulissen SMJ, van Hamburg JP, Davelaar N, Colin EM, et al. The heterogeneous human memory CCR6⁺ T helper-17 populations differ in T-bet and cytokine expression but all activate synovial fibroblasts in an IFN γ -independent manner. *Arthritis Res Ther*. 2021; 23(1): 157. doi: 10.1186/s13075-021-02532-9
- Nishihara H, Soldati S, Mossu A, Rosito M, Rudolph H, Muller WA, et al. Human CD4⁺ T cell subsets differ in their abilities to cross endothelial and epithelial brain barriers *in vitro*. *Fluids Barriers CNS*. 2020; 17(1): 3. doi: 10.1186/s12987-019-0165-2
- Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*. 2007; 8(6): 639-646. doi: 10.1038/ni1467
- Belpaire A, van Geel N, Speeckaert R. From IL-17 to IFN- γ in inflammatory skin disorders: Is transdifferentiation a potential treatment target? *Front Immunol*. 2022; 13: 932265. doi: 10.3389/fimmu.2022.932265
- McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells *in vivo*. *Nat Immunol*. 2009; 10(3): 314-324. doi: 10.1038/ni.1698
- Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*. 2010; 140(6): 845-858. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.021
- Mukasa R, Balasubramani A, Lee YK, Whitley SK, Weaver BT, Shibata Y, et al. Epigenetic instability of cytokine and transcription factor gene loci underlies plasticity of the T helper 17 cell lineage. *Immunity*. 2010; 32(5): 616-627. doi: 10.1016/j.immuni.2010.04.016
- Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, et al. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med*. 2007; 204(12): 2803-2812. doi: 10.1084/jem.20071397
- Leipe J, Pirronello F, Schoolze-Koops H, Skapenko A. Increased plasticity of non-classic Th1 cells toward the Th17 phenotype. *Mod Rheumatol*. 2020; 30(5): 930-936. doi: 10.1080/14397595.2019.1667473
- Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Joanne Konkel J, et al. Generation of pathogenic Th17 cells in the absence of TGF- β signaling. *Nature*. 2010; 467(7318): 967-971. doi: 10.1038/nature09447
- Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2009; 66(3): 390-402. doi: 10.1002/ana.21748
- Duhen R, Glatigny S, Arbelaes CA, Blair TC, Oukka M, Bettelli E. Cutting edge: The pathogenicity of IFN- γ -producing Th17 cells is independent of T-bet. *J Immunol*. 2013; 190(9): 4478-4482. doi: 10.4049/jimmunol.1203172
- Okada S, Markle JG, Deenick EK, Mele F, Averbuch D, Lagos M, et al. Immunodeficiencies. Impairment of immunity to Candida and Mycobacterium in humans with bi-allelic RORC mutations. *Science*. 2015; 349(6248): 606-613. doi: 10.1126/science.aaa4282
- Mazzoni A, Maggi L, Siracusa F, Ramazzotti M, Rossi MC, Santarlasci V, et al. Eomes controls the development of Th17-derived (non-classic) Th1 cells during chronic inflammation. *Eur J Immunol*. 2019; 49(1): 79-95. doi: 10.1002/eji.201847677

28. Li P, Spolski R, Liao W, Leonard WJ. Complex interactions of transcription factors in mediating cytokine biology in T cells. *Immunol Rev.* 2014; 261(1): 141-156. doi: 10.1111/imr.12199
29. Wohlfert EA, Grainger JR, Bouladoux N, Konkel JE, Oldenhove G, Ribeiro CH, et al. GATA3 controls Foxp3(+) regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J Clin Invest.* 2011; 121(11): 4503-4515. doi: 10.1172/JCI57456
30. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity.* 2007; 26(3): 371-381. doi: 10.1016/j.immuni.2007.02.009
31. Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell.* 2012; 151(2): 289-303. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.016
32. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 2000; 13(5): 715-725. doi: 10.1016/s1074-7613(00)00070-4
33. Tait Wojno ED, Hunter CA, Stumhofer JS. The immunobiology of the interleukin-12 family: Room for discovery. *Immunity.* 2019; 50(4): 851-870. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.011
34. Wu C, Yosef N, Thalhamer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, et al. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature.* 2013; 496(7446): 513-517. doi: 10.1038/nature11984
35. Yang BH, Floess S, Hagemann S, Deyneko IV, Groebe L, Pezoldt J, et al. Development of a unique epigenetic signature during in vivo Th17 differentiation. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(3): 1537-1548. doi: 10.1093/nar/gkv014
36. Mazzoni A, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Rossi MC, Querci V, et al. Demethylation of the RORC2 and IL17A in human CD4⁺ T lymphocytes defines Th17 origin of nonclassical Th1 cells. *J Immunol.* 2015; 194(7): 3116-3126. doi: 10.4049/jimmunol.1401303
37. Cohen CJ, Crome SQ, MacDonald KG, Dai EL, Mager DL, Levings MK. Human Th1 and Th17 cells exhibit epigenetic stability at signature cytokine and transcription factor loci. *J Immunol.* 2011; 187(11): 5615-5626. doi: 10.4049/jimmunol.1101058
38. Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP, et al. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med.* 2009; 206(3): 525-534. doi: 10.1084/jem.20081712

Сведения об авторах

Куклина Елена Михайловна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, e-mail: ibis_07@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2173-2724>

Глебездина Наталья Сергеевна – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, e-mail: glebezdina_n@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9891-0509>

Information about the authors

Elena M. Kuklina – Dr. Sc. (Biol.), Leading Research Officer at the Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – Branch of the Perm Federal Research Center UB RAS, e-mail: ibis_07@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2173-2724>

Natalya S. Glebezdina – Cand. Sc. (Biol.), Junior Research Officer at the Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – Branch of the Perm Federal Research Center UB RAS, e-mail: glebezdina_n@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9891-0509>