

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ  
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-ЛИМФОЦИТОВ CD4<sup>+</sup>  
ГАЛЕКТИНОМ-3 *IN VITRO*

© 2013 г. О. А. Васильева\*, В. Д. Якушина, Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий,  
Л. А. Таширева, Е. Г. Старикова, А. П. Зима, Т. С. Прохоренко,  
Т. Ю. Краснова, И. С. Небесная

Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Томск, 634050

Поступила в редакцию 25.06.2013 г.

Принята к печати 15.07.2013 г.

В настоящее время выявлен и достаточно хорошо изучен целый ряд Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup>, получивших название Th1, Th2, Treg и Th17. Особую актуальность в современной медицине приобретают методы коррекции иммуноопосредованных заболеваний, основанные на целенаправленном регулировании процесса дифференцировки Т-лимфоцитов, осуществляющих поляризацию иммунного ответа. В качестве регулятора Т-клеточного гомеостаза нами исследован эндогенный β-галактозид-связывающий белок семейства лектинов – галектин-3, активно продуцирующийся опухолевыми клетками при злокачественной трансформации и способный влиять на процессы трансдукции сигналов, межклеточную кооперацию и реализацию запрограммированной гибели. Поскольку в основе дифференцировки клеток лежат процессы, связанные с регуляцией экспрессии генов, нами исследовано влияние рекомбинантного галектина-3 на уровень экспрессии мРНК генов транскрипционных факторов, определяющих направление дифференцировки CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов. Материалом исследования служили мононуклеарные лейкоциты периферической крови здоровых людей. Оценку экспрессии генов осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени. В эксперименте *in vitro* впервые установлено, что под действием рекомбинантного галектина-3 (0.5 мкг/мл) происходит активация экспрессии мРНК транскрипционных факторов Gata-3 и Rorc и угнетение экспрессии факторов транскрипции T-bet и FoxP3. До концентрации 1 мкг/мл рекомбинантный галектин-3 дозозависимо стимулирует Th-лимфоциты, при более высоких концентрациях стимулирующий эффект ослабевает, и начинает преобладать ингибирующее действие. Полученные результаты свидетельствуют о том, что галектин-3, регулируя дифференцировку лимфоцитов, может способствовать развитию аллергических, аутоиммунных и опухолевых заболеваний, что позволяет рассматривать его как потенциальную мишень для терапии этих заболеваний.

**Ключевые слова:** галектин-3, дифференцировка лимфоцитов, транскрипционные факторы, Т-хелперы.

REGULATION OF THE GENES EXPRESSION OF CD4<sup>+</sup> T-LYMPHOCYTES DIFFERENTIATION TRANSCRIPTION FACTORS BY GALECTIN-3 *IN VITRO*, by O. A. Vasilyeva\*, V. D. Yakushina, N. V. Ryzantseva, V. V. Novitsky, L. A. Tashireva, E. G. Starikova, A. P. Zima, T. S. Prokhorenko, T. U. Krasnova, I. S. Nebesnaya (Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia; \*e-mail: Vasiljeva-24@yandex.ru). Now a number of CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes, known as Th1, Th2, Treg and Th17, is currently identified and well-studied. The methods basing on the targeted regulation of differentiation process of the Th-lymphocytes that carry out the immune response polarization attract an attention of scientists dealing with a correction of immune-mediated. In the present study, endogenous β-galactoside-binding protein of the lectin family, galectin-3, was investigated as a regulator of T-cell homeostasis. A galectin-3 is known to be actively produced by tumor cells in malignant transformation and able to influence the processes of signal transduction, cell-cell cooperation and the implementation of programmed death. As cell differentiation processes are directly connected with the regulation of gene expression, we investigated the effect of recombinant galectin-3 on expression of mRNA of transcription factors, which guide the differentiation of CD4<sup>+</sup> lymphocytes. The study was performed on peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals. The gene expression levels were evaluated by a real-time PCR. In the experiments *in vitro*, it has been first found the recombinant galectin-3 (0.5 mg/mL) up-regulating the expression of transcription factors Gata-3 and Rorc mRNAs and down-regulating the mRNA expression of

Принятые сокращения: Th – Т-лимфоцит-хелпер; Treg – Т-регуляторные лимфоциты.  
\* Эл. почта: Vasiljeva-24@yandex.ru

**transcription factors T-bet and FoxP3. Up to a concentration of 1 mg/mL recombinant galectin-3 stimulates Th-cells by dose-dependent manner, whereas at higher concentrations stimulating effect weakens, and inhibiting action starts prevailing. Thus, one can suppose that galectin-3 through regulation of lymphocytes differentiation promote development of allergic, autoimmune and neoplastic diseases that allows us to consider the galectin-3 as a potential target for therapy of these diseases.**

**Keywords:** galectin-3, lymphocyte differentiation, transcription factors, T-helpers.

**DOI:** 10.7868/S0026898413060165

Широкая распространенность заболеваний, связанных с нарушением регуляции иммунной системы, определяет высокую потребность исследований, направленных на поиск новых технологий, позволяющих избирательно модулировать активность различных популяций иммунокомпетентных клеток. Интерес к исследованию галектинов вызван тем, что эти белки вовлечены в многочисленные процессы, связанные с жизнедеятельностью клетки: регуляцию клеточного цикла, межклеточную адгезию и передачу сигналов. Кроме того, некоторые галектины представляют собой маркеры клеточной трансформации и опосредуют воспаление [1, 2]. Галектин-3 – низкомолекулярный белок массой около 30 кДа [3] – относится к семейству животных лектинов, способных распознавать  $\beta$ -галактозу. Он состоит из двух функциональных доменов: N-концевой домен выполняет регуляторную роль, в его структуре содержится множество повторяющихся пептидных последовательностей, богатых пролином, глицином и тирозином [4]. С-концевой домен галектина-3 – углевод-связывающий [5]. Галектин-3 секретируется клетками лимфоузлов, тимуса, селезенки, а также лимфоцитами, макрофагами, дендритными и опухолевыми клетками [1, 6, 7].

В настоящее время галектин-3 считают маркером опухолевой трансформации клеток. Показано его участие в регуляции всех этапов опухолевой прогрессии: способствует опухолевому перерождению клеток, стимулирует их пролиферацию, опосредует адгезию и агрегацию к экстрацеллюлярному матриксу, увеличивает миграционную способность, усиливает ангиогенез [1, 6, 8].

Исследования, посвященные изучению галектина-3, в основном направлены на оценку взаимосвязи наличия галектина-3 и степени злокачественной трансформации клетки. Однако данные литературы свидетельствуют о том, что галектин-3, как и другие представители этого семейства, может влиять на иммунный ответ и, тем самым, способствовать уходу опухолевых клеток из-под иммунологического надзора.

Изучение регуляторных механизмов влияния галектина-3 на T-лимфоциты-хелперы (Th-лимфоциты) актуально и для решения задач прикладной медицины, поскольку знания о роли этого белка в модуляции иммунного ответа станут осно-

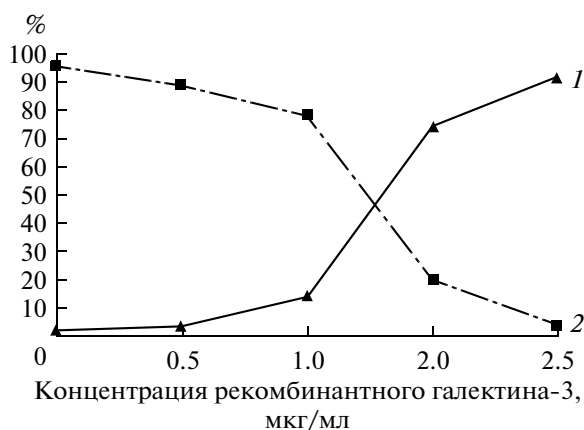
ванием для разработки фармакологических подходов к коррекции онкозаболеваний, сопровождающихся повышенным уровнем секреции галектина-3.

Поскольку в основе дифференцировки клеток, в том числе субпопуляций T-хелперов, лежат процессы, связанные с регуляцией экспрессии генов, целью нашей работы стало исследование влияния рекомбинантного галектина-3 на уровень экспрессии мРНК генов транскрипционных факторов, определяющих направление дифференцировки CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы и методы.** В исследовании использована периферическая кровь здоровых людей обоего пола ( $n = 15$ ), средний возраст которых составил  $26 \pm 4$  года. Взятие крови производили утром натощак из локтевой вены в количестве 20 мл в вакуумные пробирки с антикоагулянтом K<sub>3</sub>-ЭДТА. Из крови методом градиентного центрифугирования [9] выделяли мононуклеарные лейкоциты. Количество выделенных клеток стандартизировали до  $2.0 \times 10^6$ /мл, разбавляя полной питательной средой, состоящей из 90% RPMI-1640 (ЗАО “Вектор”, Россия), 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ООО “Биолот”, Россия), 0.3 мг/мл L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина. Культивирование клеток проводили в специализированных 48-луночных стерильных планшетах с крышкой (“BD Falcon<sup>TM</sup>”, США).

**Определение эффективной дозы галектина-3.** Способность рекомбинантного галектина-3 (“RnDSystems”, США) вызывать апоптоз лимфоцитов оценивали в диапазоне концентраций от 0.1 до 5.0 мкг/мл. Галектин-3 вводили в культуральную среду для мононуклеарных лейкоцитов, и клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 18 ч. Число апоптотических лимфоцитов определяли с помощью набора Annexin V Apoptosis Detection Kit I (“BD Pharmingen<sup>TM</sup>”, США) на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II. Регистрировали число лимфоцитов, связавших двойную метку (Annexin<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>), и число жизнеспособных клеток (Annexin<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>) (рис. 1). Для дальнейших экспериментов выбра-



**Рис. 1.** Количество апоптотически измененных (1 — Annexin<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>) и жизнеспособных лимфоцитов (2 — Annexin<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>) в зависимости от концентрации рекомбинантного галектина-3 в культуральной среде.

ны две концентрации рекомбинантного галектина-3: 0.5 и 1.0 мкг/мл.

**Культивирование мононуклеарных лейкоцитов с галектином-3.** Выделенные клетки культивировали в течение 72 ч с рекомбинантным галектином-3 (0.5 и 1.0 мкг/мл) вместе с активирующими моноклональными антителами: анти-CD3 и анти-CD28 (“BD Pharmingen<sup>TM</sup>”, США) в концентрации 1 и 2 мкг/мл соответственно. За 4 ч до окончания инкубации в культуры клеток добавляли стимуляторы форболмиристилацетат (50 нг/мл) и иономицин кальция (1 мкг/мл), после чего среду с клетками переносили в пробирки, центрифугировали 10 мин при 1500 об./мин, супернатант удаляли, а осадок клеток использовали для выделения РНК. В качестве контроля использовали мононуклеарные лейкоциты, которые культивировали

**Таблица 1.** Последовательность нуклеотидов в праймерах, используемых для оценки экспрессии генов транскрипционных факторов дифференцировки Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup>

Ген	Последовательность нуклеотидов прямого (F) и обратного (R) праймеров
<i>tbx21</i>	F: 5'-ССААСАСГСАТАТСТТТАСТТТСС-3' R: 5'-АСТСАААГТТСТСССГГААТС-3'
<i>gata-3</i>	F: 5'-GCGGGCTCTATCACAАААТG-3' R: 5'-TССССАТТGGСАТТССТС-3'
<i>rorc</i>	F: 5'-TGГТGCTGGTTAGGATGTG-3' R: 5'-GGAGTGGGAGAAGTCAAAGATG-3'
<i>foxp3</i>	F: 5'-СТGGCAAATGGTGTCTG-3' R: 5'-GTGCCCTGCCСТТСТСАТ-3'
<i>β-actin</i>	F: 5'-САТТССGAAGCGAGTGTCT-3' R: 5'-GAGCGАТТССGGACTACСТТ-3'

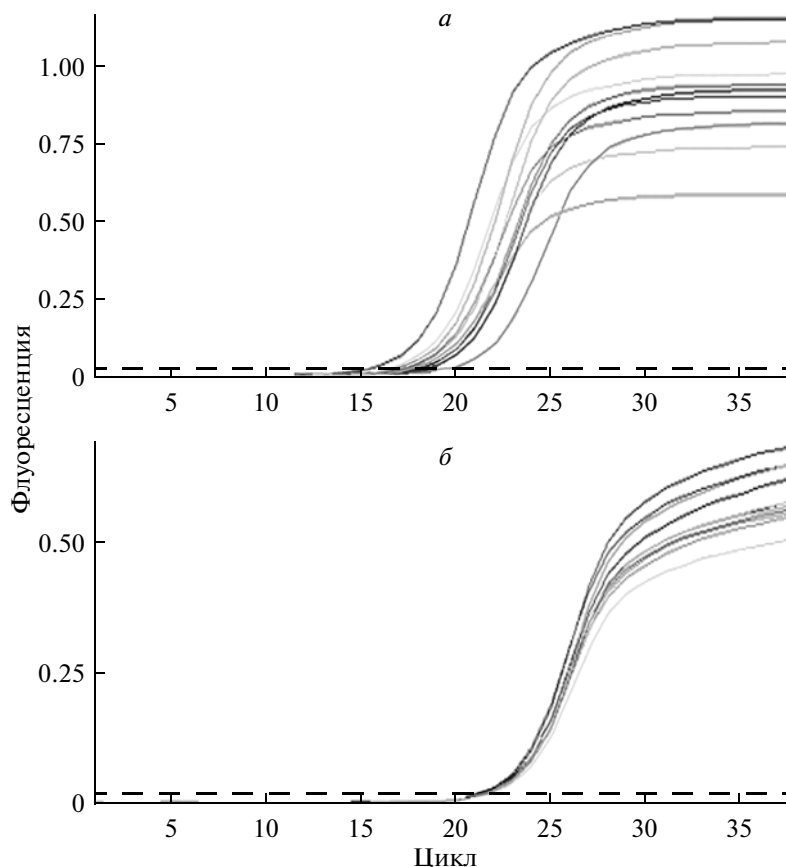
в аналогичных условиях, но без добавления галектина-3 в питательную среду.

**Количественное определение экспрессии мРНК.** Выделение РНК из мононуклеарных лейкоцитов осуществляли сорбентно-колоночным методом согласно инструкции производителя (RNeasy Plus Mini Kit, “QIAGEN”, Германия). Используя обратную транскриптазу MMuLV-RT (“Promega”, США), проводили синтез кДНК на соответствующей мРНК. Полученный фрагмент кДНК амплифицировали методом ПЦР в режиме реального времени с использованием интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green I (“Медиген”, Россия) на амплификаторе Mini Opticon (“Bio-Rad”, США). Праймеры, позволяющие специфично амплифицировать фрагменты кДНК генов, представлены в табл. 1. Амплификацию каждой серии образцов сопровождали постановкой внутреннего контроля — смесь кДНК, выделенной из клеток 20 здоровых доноров (пять двукратных разведений в двойных повторях). Качество реакции амплификации считалось приемлемым при выполнении следующих условий:

- разница между значениями  $C_t$  (номер цикла в точке пересечения кинетической кривой порогового уровня) превышает 0.5 цикла;
- индекс корреляции между расчетными значениями количества кДНК в пяти точках (пять последовательных 2-кратных разведений) и экспериментальными значениями больше 0.95;
- эффективность реакции амплификации более 90%;
- специфичность реакции амплификации (отсутствие дополнительных пиков на кривой плавления).

Температуру плавления праймеров выявляли эмпирически при проведении ПЦР в режиме, позволяющем задавать градиент температур в пределах блока амплификатора. Температуру плавления продукта амплификации вычисляли при анализе кривой плавления. Для определения относительного количества кДНК в образце использовали метод  $\Delta\Delta C_t$ . Результаты выражали в относительных единицах: отношение величины порогового цикла амплификации исследуемого гена к пороговому циклу амплификации гена “домашнего хозяйства” —  $\beta$ -актина.

Оценку нормальности распределения полученных результатов проводили с использованием критерия Шапиро Вилка. Достоверность различий ( $P < 0.05$ ) оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для зависимых выборок. Данные представлены в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей ( $Q_{25}$ — $Q_{75}$ ).



**Рис. 2.** Кривые накопления продуктов амплификации генов. *а* – Нормировочный ген  $\beta$ -актина; *б* – ген *rorc* транскрипционного фактора.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

К настоящему времени установлено, что развитие Th1-клеток определяется транскрипционным фактором T-bet [10]; Th2-клеток – фактором Gata-3 [11]; Th17-клеток – фактором Rorc [12]; T-регуляторных клеток (Treg) – фактором FoxP3 [13, 14]. Кодировать эти факторы гены *tbx21*, *gata-3*, *rorc* и *foxP3*, которые экспрессируются практически исключительно в клетках соответствующих субпопуляций T-лимфоцитов. Так, ген *tbx21* специфичен для Th1-лимфоцитов, *foxP3* – для Treg. Гены *gata-3* и *rorc* могут экспрессироваться в разных клетках организма, однако они контролируют развитие соответственно только Th2 и T17-лимфоцитов крови. Это позволяет оценивать экспрессию факторов данной группы в цельной фракции мононуклеарных лейкоцитов крови без ее дополнительного фракционирования [13, 14]. На рис. 2 приведен пример использования ПЦР для оценки экспрессии мРНК транскрипционных факторов.

В результате проведенного исследования показано, что уровень экспрессии мРНК транскрипционного фактора T-bet, ответственного за дифференцировку Th1-лимфоцитов, в контрольной группе составил 5.34 отн. ед. При действии галектина-3

в концентрации 0.5 мкг/мл и 1 мкг/мл уровень мРНК T-bet снижался соответственно в 4.8 и в 2.5 раза (1.11 и 2.09 отн. ед.), что статистически значимо отличалось от значений показателя в контрольной группе ( $P < 0.05$ ) (табл. 2).

Добавление галектина-3 в концентрации 0.5 мкг/мл в культуральную среду приводило к 2.5-кратному увеличению ( $P = 0.011$ ) уровня экспрессии мРНК транскрипционного фактора Gata-3 в лимфоцитах относительно группы контроля. При увеличении концентрации галектина-3 до 1 мкг/мл стимулирующее действие ослабевало, и уровень экспрессии мРНК значимо не отличался от контрольного уровня (табл. 2).

Анализ данных показал, что уровень экспрессии мРНК транскрипционного фактора Rorc, свойственного Th17-лимфоцитам, при действии галектина-3 в дозе 0.5 мкг/мл составил 0.43 отн. ед., что достоверно ( $P = 0.026$ ) выше такового в контрольной группе (0.24 отн. ед.). При добавлении галектина-3 в дозе 1 мкг/мл уровень экспрессии мРНК Rorc составил 0.15 отн. ед., что ниже контрольного значения, но статистически недостоверно ( $P = 0.325$ ; табл. 2).

Влияние исследуемого лектина на дифференцировку Т-регуляторных лимфоцитов оценивали по экспрессии мРНК транскрипционного фактора FoxP3. В контроле уровень мРНК FoxP3 соответствовал 0.32 отн. ед., а галектин-3 в концентрации 0.5 мкг/мл и 1 мкг/мл индуцировал снижение экспрессии соответственно в 1.8 и в 1.6 раза (0.17 и 0.23 отн. ед.) ( $P < 0.05$ ; табл. 2).

Таким образом, *in vitro* рекомбинантный галектин-3 в дозе 0.5 мкг/мл индуцирует активацию экспрессии генов транскрипционных факторов Rorc и Gata-3 и угнетение экспрессии генов репрессирующих факторов транскрипции FoxP3 и T-bet. Следует отметить, что с увеличением концентрации рекомбинантного галектина-3 до 1 мкг/мл стимулирующий эффект ослабевает, и начинает преобладать ингибирующее действие.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

К заболеваниям, которые сопровождаются повышением уровня эндогенного галектина-3 в организме, преимущественно относятся злокачественные новообразования [8]. При этом галектин-3 играет роль не только в процессе метастазирования [6, 8], но, возможно, оказывает и модулирующее действие на дифференцировку Th-лимфоцитов, тем самым благоприятствуя ускользанию опухолетрансформированных клеток от иммунного надзора.

Как следует из анализа полученных результатов, под влиянием галектина-3 происходит активация одной из популяций Th-лимфоцитов и подавляется дифференцировка функционально противоположной группы клеток. Так, повышение уровня экспрессии мРНК транскрипционного фактора Gata-3 под действием галектина-3 сопровождается снижением экспрессии мРНК транскрипционного фактора T-bet. Известно, что Gata-3 в значительной степени обуславливает конкуренцию Th2-клеток с другими субпопуляциями Т-хелперов. Он активно ингибирует экспрессию гена *tbx21*, определяющего развитие Th1-лимфоцитов, и гена *ifng*, кодирующего его

основной продукт – интерферон- $\gamma$  [15]. Супрессорное влияние галектина-3 на Th1-тип иммунного ответа показано Бернардесом (E.S. Bernardes) и др. [16] в опытах на мышах, дефицитных по гену галектина-3 (*Igals3<sup>-/-</sup>*). Оказалось, что дендритные клетки нокаутированных животных продуцируют значительно более высокое количество IL-12 по сравнению с клетками дикого типа, что свидетельствует о негативном влиянии галектина-3 на продукцию этого цитокина [16]. Так как IL-12 необходим для стимуляции Th1-ответа, эти результаты означают, что галектин-3 может подавлять Th1-путь иммунного ответа путем нарушения цитокиновой регуляции между дендритными клетками и Т-лимфоцитами, что позволяет опухолевым клеткам оставаться незамеченными клетками иммунной системы.

Дисбаланс Th1- и Th2-опосредованных иммунных реакций в сторону преобладания Th2-пути иммунного ответа считается ключевым фактором формирования предрасположенности к развитию реакций гиперчувствительности немедленного типа. Ослабление экспрессии гена *tbx21* сопряжено с гиперреактивностью бронхов и сопровождается развитием бронхиальной астмы, что связано с гиперпродукцией Th2-цитокинов [17]. Участие галектина-3 в Th2-поляризации иммунного ответа продемонстрировано в экспериментах *in vivo* на нокаутированных по галектину-3 мышах (*Igals3<sup>-/-</sup>*) с atopическим дерматитом. У животных регистрировали значимо сниженный уровень IgE по сравнению с особями дикого типа (*Igals3<sup>+/+</sup>*), а иммунный ответ развивался по Th1-пути. Авторы предположили, что галектин-3 играет важную роль в развитии Th2-ответа при atopическом дерматите [18].

Таким образом, данные о влиянии галектина-3 на Th1/Th2-поляризацию иммунного ответа, полученные с использованием нокаутированных животных, согласуются с полученными нами результатами оценки экспрессии транскрипционных факторов T-bet и Gata-3 под действием галектина-3 *in vitro*.

**Таблица 2.** Уровень экспрессии мРНК транскрипционных факторов дифференцировки Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> под действием рекомбинантного галектина-3

Ген	Уровень экспрессии мРНК, Me(Q <sub>25</sub> –Q <sub>75</sub> )*		
	контроль	галектин-3 в дозе 0.5 мкг/мл	галектин-3 в дозе 1.0 мкг/мл
<i>tbx21</i>	5.35(2.89–6.88)	1.11(0.74–1.85) $P = 0.011$	2.09(0.56–2.98) $P = 0.011$
<i>gata-3</i>	1.61(0.29–10.06)	4.11(1.57–14.21) $P = 0.011$	2.61(0.41–6.04) $P = 0.325$
<i>rorc</i>	0.24(0.09–0.35)	0.43(0.14–0.74) $P = 0.026$	0.15(0.05–0.25) $P = 0.325$
<i>foxP3</i>	0.32(0.17–0.99)	0.17(0.06–0.23) $P = 0.011$	0.23(0.11–0.33) $P = 0.011$

\* Результаты представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q<sub>25</sub>–Q<sub>75</sub>);  $P$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с контролем.

Известно, что Treg-клетки могут препятствовать развитию аллергических заболеваний на различных патогенетических этапах, включая сенсибилизацию, прогрессию, ремоделирование и гиперреактивность дыхательных путей, персистенцию аллергического воспаления. Полученные данные свидетельствуют о супрессорном действии галектина-3 на популяцию Treg, что выражается в подавлении экспрессии мРНК гена *foxp3*. FoxP3 — транскрипционный фактор, который не только контролирует экспрессию определенных генов, но и стабилизирует паттерны экспрессированных и доступных для индукции генов, т.е. вызывает дифференцировку Treg-клеток [19]. По современным представлениям, факторы Treg обеспечивают периферическую иммунологическую толерантность к аутоантигенам, предотвращая развитие аутоиммунных заболеваний; подавляют пролиферацию различных клонов Т-хелперов, контролируя чрезмерную реакцию иммунных клеток на антиген; удаляют аутореактивные лимфоциты, контролируют силу и продолжительность иммунного ответа через регуляцию функций Т-эффекторных клеток, а также подавляют противоопухолевый иммунный ответ, способствуя опухолевой прогрессии [20, 21]. Согласно полученным результатам, отрицательное влияние галектина-3 на Treg-клетки может способствовать развитию аутоиммунных заболеваний. Джанг (H.R. Jiang) и др. [22] на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита показали, что у нокаутированных мышей (*Igals3<sup>-/-</sup>*) развивается менее тяжелая форма болезни по сравнению с мышами дикого типа, при этом степень инфильтрации нервной ткани макрофагами и дендритными клетками снижена по сравнению с контролем. Кроме того, у нокаутированных животных отмечалась низкая продукция провоспалительных цитокинов как изолированными Т-клетками, так и нервной тканью; а в селезенке и нервной ткани этих мышей обнаружено высокое содержание FoxP3<sup>+</sup>-Treg. Исследователи предположили, что иммуносупрессорное действие Treg-клеток обуславливает легкую форму аутоиммунного процесса у мышей *Igals3<sup>-/-</sup>*, а галектин-3 принимает участие в развитии Treg-лимфоцитов и оказывает провоспалительный эффект при аутоиммунном энцефаломиелите.

Большое значение в развитии аутоиммунных заболеваний играет соотношение между числом клеток Th17 и Treg. Показано, что спонтанное развитие диабета типа I у крыс линии DP-BB (Diabetes-prone BioBreeding rats) обусловлено нарушением баланса между субпопуляциями клеток Th17 и Treg [23]. Treg- и Th17-лимфоциты взаиморегулируются несколькими положительными и отрицательными регуляторными сетями. Равновесие между экспрессией транскрипционных факторов Rorc и FoxP3 — ключевой фактор, определяю-

щий дифференцировку наивных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов в Treg или в Th17. Согласно полученным результатам, *in vitro* галектин-3 снижал экспрессию мРНК транскрипционного фактора FoxP3 и индуцировал экспрессию мРНК транскрипционного фактора Rorc в лимфоцитах. Накапливается все больше данных о роли Th17-лимфоцитов при различных патологических состояниях. Установлена патогенетическая роль Th17-клеток и продуцируемых ими цитокинов в развитии аутоиммунного колита, болезни Крона, рассеянного склероза (на мышшиной модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита), ревматоидного артрита и псориаза. Экспрессия гена *rorc* повышена при различных проявлениях аллергии, в частности, при аллергической форме астмы у человека, причем усиление экспрессии *rorc* коррелирует с тяжестью заболевания [14]. На мышшиной модели аутоиммунного гепатита показано, что галектин-3 усиливает продукцию IL-17A и снижает концентрацию IL-10, а так же способствует активации Т-лимфоцитов, НК и дендритных клеток и индуцирует апоптоз мононуклеарных лейкоцитов, что сопровождается более тяжелым течением болезни [24].

Заслуживает внимания вопрос об участии Th17-лимфоцитов в развитии опухолевых заболеваний. Внимание к изучению Th17 в опухолевом процессе основывается не только на их способности выделять цитокины с выраженными провоспалительными и повреждающими свойствами, но и на способности IL-17 участвовать в неоваскуляризации [25]. Согласно полученным результатам, *in vitro* галектин-3 активирует экспрессию транскрипционного фактора Rorc, ответственного за дифференцировку Th17-лимфоцитов, и тем самым может способствовать развитию заболеваний, в патогенезе которых важную роль играет эта субпопуляция клеток.

Результаты проведенных исследований расширяют современные представления о молекулярных механизмах модулирующего влияния галектина-3 на функционирование Т-лимфоцитов. Установление природы факторов, которые осуществляют контроль функциональной активности Т-клеток, причастных к патогенезу аутоиммунных, аллергических и опухолевых заболеваний, существенно расширяет спектр мишеней для их фармакологической коррекции.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы (ГК № 16.740.11.0636; соглашение № 8302), а также при финансовой поддержке Совета по грантам при Президенте РФ

(договор № 16.120.11.614-НШ, № 16.120.11.1233-МД) и РФФИ (договор № 12-04-31224 мол\_а).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильева О.А., Якушина В. Д., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. 2011. Возможности использования галектина-3 в лабораторной диагностике (миниобзор). *Клинико-лабораторный консилиум*. **38**, 12–16.
2. Якушина В.Д., Васильева О.А., Рязанцева Н.В., и др. 2012. Галектин-1: роль в формировании особенностей врожденного и приобретенного иммунитета. *Мед. иммунология*. **14**, 21–32.
3. Dunic J., Dabelic S., Flögel M. 2006. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim. Biophys. Acta*. **1760**, 616–635.
4. Maldonado C.A., Sundblad V., Salatino M., Elia J., Garcia L.N., Leimgruber C., Croci D.O., Rabinovich G.A. 2011. Cell-type specific regulation of galectin-3 expression by glucocorticoids in lung Clara cells and macrophages. *Histol. Histopathol.* **26**, 747–759.
5. Krzeslak A., Lipinska A. 2004. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **9**, 305–328.
6. Рапопорт Е.М., Курмышкина О.В., Бовин Н.В. 2008. Галектины млекопитающих: структура, углеводная специфичность и функции. *Биохимия*. **73**, 483–497.
7. Lippert E., Gunckel M., Brenmoehl J., Bataille F., Falk W., Scholmerich J., Obermeier F., Rogler G. 2008. Regulation of galectin-3 function in mucosal fibroblasts: potential role in mucosal inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* **152**, 285–297.
8. Liu F.T., Rabinovich G.A. 2005. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat. Rev. Cancer*. **5**, 29–41.
9. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. 1992. *Методы культуры тканей в гематологии*. Томск: Издательство ТГУ.
10. Szabo S.J., Kim S.T., Costa G.L., Zhang X., Fathman C.G., Glimcher L.H. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. **100**, 655–669.
11. Ko L.J., Engel J.D. 1993. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4011–4022.
12. Manel N., Unutmaz D., Littman D.R. 2008. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat. Immunol.* **9**, 641–649.
13. Донецкова А.Д., Никонова М.Ф., Ярилин А.А. 2011. Экспрессия генов транскрипционных факторов, контролирующих дифференцировку адаптивных субпопуляций CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, в покоящихся и активированных лимфоцитах у здоровых людей. *Иммунология*. **4**, 184–188.
14. Ярилин А.А. 2010. Транскрипционные регуляторы дифференцировки Т-хелперов. *Иммунология*. **3**, 153–168.
15. McMillan R.E., Sikes M.L. 2009. Promoter activity 5' of Dbeta2 is coordinated by E47, Runx1, and GATA-3. *Mol. Immunol.* **46**, 3009–3017.
16. Bernardes E.S., Silva N.M., Ruas L.P., et al. 2006. Toxoplasma gondii infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. *J. Pathol.* **168**, 1910–1920.
17. Suzuki K., Kaminuma O., Hiroi T., et al. 2008. Down-regulation of IL-13 gene transcription by T-bet in human T cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1**, 33–35.
18. Saegusa J., Daniel K., Chen H.Y., Yu L., Fermin A., Fung M.A., Liu F.T. 2009. Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis. *Am. J. Pathol.* **174**, 922–931.
19. Roncador G., Brown P.J., Maestre L., et al. 2005. Analysis of FoxP3 protein expression in human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells at the signal-cell level. *Eur. J. Immunol.* **35**, 1681–1691.
20. Jang E., Cho M.L., Oh H.J., Youn J. 2011. Deficiency of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells exacerbates autoimmune arthritis by altering the synovial proportions of CD4<sup>+</sup> T cells and dendritic cells. *Immune Netw.* **5**, 299–306.
21. Faustino L., Mucida D., Keller A.C. et al. 2012. Regulatory T cells accumulate in the lung allergic inflammation and efficiently suppress T-cell proliferation but not Th2 cytokine production. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, doi: 10.1155/2012/721817.
22. Jiang H.R., Al Rasebi Z., Mensah-Brown E., et al. 2009. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **182**, 1167–1173.
23. Van den Brandt J., Fischer H.J., Walter L., Hünig T., Klötting I., Reichardt H.M. 2010. Type 1 diabetes in BioBreeding rats is critically linked to an imbalance between Th17 and regulatory T cells and an altered TCR repertoire. *J. Immunol.* **185**, 2285–2294.
24. Radosavljevic G., Volarevic V., Jovanovic I., Milovanovic M., Pejnovic N., Arsenijevic N., Hsu D.K., Lukic M.L. 2012. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunol. Res.* **52**, 100–110.
25. Бережная Н.М. 2009. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. Клетки и цитокины – участники воспаления. *Онкология*. **11**, 6–17.