

МНОГОЦВЕТНЫЙ ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ. ИДЕНТИФИКАЦИЯ Т-КЛЕТОК И ИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ПО ЭКСПРЕССИИ $\alpha\beta$ -TCR И $\gamma\delta$ -TCR

Хайдуков С.В.¹, Зурочка А.В.², Черешнев В.А.³

¹ Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

² ГОУ ВПО Челябинская государственная медицинская академия Росздрава, г. Челябинск

³ Институт иммунологии и физиологии УРО РАН, г. Екатеринбург

Резюме. Т-лимфоциты играют важную роль в элиминации опухолевых клеток в реакциях трансплантат против хозяина и хозяин против трансплантата, гиперчувствительности замедленного типа и других реакциях организма, направленных на поддержание гомеостаза. Помимо молекул CD3 антиген-специфический Т-клеточный рецептор является другим пан-Т-клеточным маркером. Существует два отличных типа TcR — $\alpha\beta$ -TcR и $\gamma\delta$ -TcR, которые различаются в онтогенезе и функциональных свойствах. $\gamma\delta$ -Т-клетки играют значительную роль в защите организма от различных типов инфекций, и знание об их количественном составе должно быть неотъемлемой частью анализа иммунного статуса пациентов. Для этих целей следует использовать многоцветный анализ и следующие комбинации моноклональных антител: CD3/CD4/CD8/CD45 и $\alpha\beta$ -TcR/ $\gamma\delta$ -TcR/CD3/CD45. Применение многоцветного окрашивания и многоэтапного гейтирования позволяют провести многопараметрический анализ Т-клеток периферической крови с высокой точностью и достоверностью. Данный подход значительно облегчает интерпретацию полученных результатов и позволяет судить о функционировании иммунной системы больных при разнообразных патологических состояниях.

Ключевые слова: проточная цитометрия, Т-клетки, Т-клеточный рецептор, $\alpha\beta$ -TcR, $\gamma\delta$ -TcR.

Khaidukov S.V., Zurochka A.V., Chereshnev V.A.

MULTI-COLOUR CYTOMETRIC ANALYSIS. IDENTIFICATION OF T LYMPHOCYTES AND THEIR SUBSETS

Abstract. T-lymphocytes play an important role in elimination of tumor cells, in reactions of a transplant against graft and graft versus host disease, in slow-type hypersensitivity, and other reactions directed for maintenance of homeostasis. Along with CD3, an antigen-specific T-cellular receptor (TCR) is another common marker of T-cells. There are two types of TcR — $\alpha\beta$ -TcR and $\gamma\delta$ -TcR that differ in ontogenetic and functional properties. $\gamma\delta$ -T-cells play a significant role in protection of organism against various types of infections, and determination of their amounts should be an integral part of the analysis of patients' immune status. To these purposes, a multi-colour analysis should be used, applying the following combinations of monoclonal antibodies: CD3/CD4/CD8/CD45 and $\alpha\beta$ -TcR/ $\gamma\delta$ -TcR/

CD3/CD45. Multi-colour staining and multi-step gating allow of carrying out multiparametric analysis of peripheral blood with high accuracy and reliability. The proposed approach considerably facilitates interpretation of results obtained, and it allows of judging about immune system functioning in various pathological conditions. (*Med. Immunol., 2008, vol. 10, N 2-3, pp 115-124*)

Адрес для переписки:

Хайдуков Сергей Валерьевич

Институт биоорганической химии

им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

Тел.: (495) 336-02-55.

E-mail: khsv@mail.ibch.ru

Введение

Многие микроорганизмы являются внутриклеточными паразитами и, обитая внутри клеток организма-хозяина, недоступны для действующего начала гуморального иммунитета, т.е. антител. облигатные внутриклеточные паразиты, в частности вирусы, способны размножаться только внутри клеток, используя репликационную систему клеток хозяина. Факультативные внутриклеточные микроорганизмы, такие как микобактерии и лейшмании, могут размножаться как в клетках, главным образом в макрофагах, так и вне клеток, но внутриклеточный способ существования для них более предпочтителен, поскольку обеспечивает защиту от факторов иммунной системы. Против данных микроорганизмов в организме действует особый механизм приобретенного иммунитета, а именно клеточный иммунитет. Он обеспечивается отдельной субпопуляцией лимфоцитов, получившей название Т-клетки. В отличие от В-клеток они дифференцируются в тимусе (Thymus), откуда и пошло их название. Т-лимфоциты специализируются на уничтожении клеток организма-хозяина, которые инфицированы размножающимися внутриклеточно возбудителями инфекции [1]. Т-лимфоциты играют важную роль в элиминации опухолевых клеток [43, 45], в реакциях трансплантат против хозяина [52, 60] и хозяин против трансплантата [25, 54], гиперчувствительности замедленного типа [39, 44] и других реакциях организма, направленных на поддержание гомеостаза.

Оценка как относительного, так и абсолютного количества Т-клеток и их основных субпопуляций получила широкое распространение в лабораторной практике. При фенотипировании лимфоцитов эти данные являются диагностически значимыми при различных патологических состояниях иммунной системы, включая первичные и вторичные иммунодефициты [2, 20, 41]. Динамика изменения субпопуляционного состава Т-клеток при некоторых патологиях представляет собой значительную ценность для контроля эффективности терапии, прогноза развития и течения заболевания.

Т-клетки и Т-клеточный рецептор

К маркерам, характеризующим линию Т-клеток, в первую очередь относится Т-клеточный рецептор (T-cell Receptor, TcR). Подобно В-лимфоцитам, Т-лимфоциты несут на своей поверхности специфический рецептор для распознавания антигена. Однако рецептор В-лимфоцитов представляет собой мембранос-

вязанный мономер Ig, а TcR является гетеродимером, состоящим из двух цепей с молекулярной массой 40-50 kDa, которые не являются продуктами генов иммуноглобулинов.

Существует два типа TcR, каждый из которых ассоциируется с разными типами Т-лимфоцитов. TcR1, состоящий из γ - и δ -цепей, появляется на ранних стадиях онтогенеза [3, 27]. TcR2 состоит из α - и β -цепей [61]. Каждая цепь образует два домена; один из них имеет относительно неизменную структуру, гомологичную характерной укладке цепи иммуноглобулинов [12], а другой обладает большей структурной изменчивостью, поскольку по своему строению напоминает вариабельные домены Ig (Fab-фрагмент).

Гены α - и β -цепей Т-клеточного рецептора организованы так же, как и гены иммуноглобулинов. Имеются также сегменты V, D и J и гены константных областей (C). Формирование иммунокомпетентных Т-клеток аналогично же сопровождается транслокацией фрагментов V, D и J с образованием непрерывной последовательности VDJ. Как и при синтезе иммуноглобулинов, образование мРНК предусматривает удаление интронов между VDJ и C.

Вариабельные области обеих цепей в эмбриональном наборе представлены 30-500 V-генами, 12-15 мини-генами D и 40-50 короткими J-сегментами. Гены константных областей представлены в виде одной копии. Случайное соединение внутри каждой группы генов любого V-гена с любым D, а затем J-сегментом приводит к возникновению около 5000 как α -, так и β -цепей. Спонтанная их ассоциация завершается образованием до 8 000 000 Т-лимфоцитов с различной специфичностью. Дополнительное разнообразие обеспечивается комбинациями V>D>J. Следует отметить, что уже выявлена специфичность отдельных вариантов V-сегмента TcR. Так, V β 17 является мишенью для суперантигена микоплазмы (MAS) и стафилококкового энтеротоксина В [21, 22], а V β 8 — для стафилококкового энтеротоксина Е [31]. Также было описано, что при инфицировании вирусом Эпштейна—Барр наблюдалась быстрая клональная пролиферация CD8⁺Т-клеток экспрессирующих TcR-V β 14 [63], хотя в норме TcR-V β 14 Т-клетки (рис. 1) составляют только 2-7% [62].

Примерно 81,4-98,4% Т-клеток представляют собой вариант $\alpha\beta$ -TcR, и обозначаются эти клетки как $\alpha\beta$ -Т-клетки. Остальные 1,6-8,9% Т-клеток несут на своей поверхности $\gamma\delta$ -TcR и обозначаются как $\gamma\delta$ -Т-клетки.

$\alpha\beta$ -Т-клетки подразделяются на две различные неперекрывающиеся субпопуляции. Клетки одной из них несут маркер CD4 и в основном

«помогают» в осуществлении иммунного ответа или «индуцируют» его. Данная субпопуляция получила название Т-хелперы. Т-клетки другой субпопуляции несут маркер CD8 и обладают преимущественно цитотоксической активностью.

Небольшая часть $\alpha\beta$ -Т-клеток не экспрессируют ни CD4, ни CD8. С другой стороны, большинство $\gamma\delta$ -Т-клеток, циркулирующих в периферической крови, также «дважды отрицательны». Однако некоторые из них все же экспрессируют молекулы CD8. Напротив, большая часть $\gamma\delta$ -Т-клеток в тканях экспрессируют CD8. Кроме молекулы CD8 $\gamma\delta$ -Т-клетки на своей поверхности могут экспрессировать CD56 [17, 26], CD94 [5], CD161 [5]. Также было продемонстрировано, что цитостатическую активность $\gamma\delta$ -Т-клеток возможно стимулировать через CD122 (β -цепь рецептора IL-2) [17].

$\gamma\delta$ -Т-клетки были изучены относительно недавно. Одной из особенностей $\gamma\delta$ -Т-клеток в отличие от $\alpha\beta$ -Т-клеток является то, что они распознают непептидные антигены, полученные из микробных патогенов, независимо от МНС [48, 49, 50, 51]. Данная субпопуляция клеток выполняет целый ряд важных функций, так они могут усиливать иммунный ответ, производя большие количества интерферона- γ (IFN γ), фактора некроза опухолей- α (TNF α) и хемокины [10, 38, 47]. Кроме этого, $\gamma\delta$ -Т-клетки имеют эффекторную (цитотоксическую) активность [14].

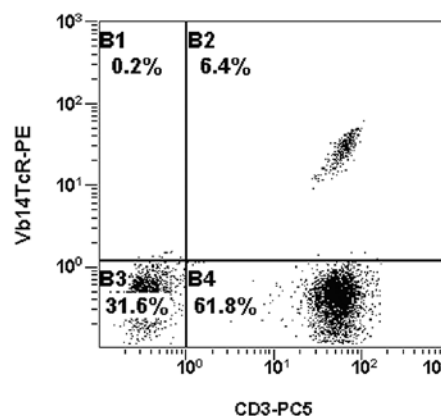


Рисунок 1. Двухпараметрические гистограммы распределения Т-клеток, экспрессирующих TcR-Vβ14. Квадрант B2 содержит клетки с фенотипом CD3⁺, TcR-Vβ14⁺

С эволюционной точки зрения, $\gamma\delta$ -Т-клетки занимают уникальное место между высокоспецифичными $\alpha\beta$ -Т-клетками и врожденной иммунной системой для выполнения защиты организма от патогенов. Экспериментальные данные показали, что роль $\gamma\delta$ -Т-клеток была весьма существенна в устойчивости организма против целого ряда микроорганизмов. Так, функциональную значимость $\gamma\delta$ -Т-клеток (табл. 1) отмечали в устойчивости к *Mycobacterium*, *Borellia*, *Francisella tularensis*, *Salmonella* [10, 30, 46, 47]

ТАБЛИЦА 1. ИЗМЕНЕНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНОГО КОЛИЧЕСТВА $\gamma\delta$ -Т-КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ И ПАТОЛОГИЯХ

Изменение относительного количества $\gamma\delta$ -Т-клеток	Заболевание
Повышение относительного уровня $\gamma\delta$ -Т-клеток	Вирусные инфекции:
	ВИЧ
	Цитомегаловирус
	Вирус Эпштейна–Барр
	Бактериальные инфекции:
	Туберкулез легких (<i>Mycobacterium</i>)
	Легионеллез (<i>Legionella</i>)
	Туляремия (<i>Francisella tularensis</i>)
	Сальмонеллез (<i>Salmonella</i>)
	Боррелиоз (болезнь Лайма) (<i>Borellia</i>)
	Атопический дерматит (у детей)
	Болезнь Корна
	Болезнь Бехчета
	Первичные иммунодефициты
Понижение относительного уровня $\gamma\delta$ -Т-клеток	Атопический дерматит (у взрослых)
	Возрастное снижение относительного уровня $\gamma\delta$ -Т-клеток