

ОСНОВНЫЕ И МАЛЫЕ ПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРЕФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И ИХ НОРМАТИВНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ (МЕТОДОМ МНОГОЦВЕТНОГО ЦИТОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА)

Хайдуков С.В.¹, Зурочка А.В.², Тотолян Арег А.³,
Черешнев В.А.⁴

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

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

³ФГУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора

⁴Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург

Резюме. В настоящее время определение субпопуляционного состава и фенотипа лимфоцитов является важным диагностическим признаком для выяснения нарушений связанных с функционированием иммунной системы. Однако информация, извлекаемая в результате анализа только основных популяций лимфоцитов периферической крови, является недостаточной. Для целей диагностики более важным представляется информация о наличии малых субпопуляций лимфоцитов и активированных пулов клеток.

Проведенные исследования субпопуляционного состава клеток периферической крови условно здоровых доноров в различных регионах России позволили определить интервалы распределения содержания как основных, так и малых субпопуляций клеток иммунной системы человека. Сравнение полученных результатов с литературными данными, опубликованными в зарубежной литературе, свидетельствуют о близости референтных интервалов распределения основных субпопуляций клеток иммунной системы условно здоровых доноров вне зависимости от места проживания.

Результатом данной работы стала разработка алгоритмов цитометрических исследований и формирование комбинаций моноклональных антител, позволяющих оценить как все основные популяции лимфоцитов, так и их минорные субпопуляции, участвующие в развитии иммунного ответа. Были определены интервалы распределения таких минорных субпопуляций, как В1- и В2-лимфоцитов, В-клеток памяти, $\gamma\delta$ - и $\alpha\beta$ T-клеток, регуляторных и нативных Т-клеток, цитотоксической и секретирующей популяций NK-клеток.

Поскольку данное исследование проводили с использованием периферической крови условно здоровых доноров, результаты его могут лечь в основу нормативных показателей субпопуляционного состава клеток иммунной системы.

Ключевые слова: проточная цитометрия, иммунофенотипирование, Т-лимфоциты, В-клетки, NK-клетки.

Адрес для переписки:

Хайдуков Сергей Валерьевич,
Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии Наук
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Тел.: (985) 923-4162.
E-mail: khsergey54@mail.ru

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

MAJOR AND LYMPHOCYTE POPULATIONS
OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES
AND THEIR REFERENCE VALUES, AS ASSAYED
BY MULTI-COLOUR CYTOMETRY

Abstract. Determination of lymphocyte subpopulations and their phenotypes is an important

diagnostic feature, in order to elucidate some disturbances connected with immune system functioning. However, insufficient data are obtained when analyzing only major populations of peripheral lymphocytes. In order to perform clinical diagnostics, the data about minor lymphocytic populations and activated cellular pools seem to be more pertinent.

Studies of peripheral blood cell subpopulations of healthy donors performed in different Russian regions allowed to assess quantitative distribution intervals for both major and minor immune cell subpopulations in humans. The results obtained, as compared with data from literature, provide an evidence for similar reference intervals for main immune cell subpopulations in healthy donors, independent on their habitation area.

Present work has resulted into development of algorithms for cytometric studies and generation of certain panels of monoclonal antibodies enabling evaluation of all main lymphocyte subpopulations, as well as their minor subsets participating in emerging immune response. The distribution intervals have been estimated for such minor subpopulations, as B1- and B2-lymphocytes, memory B-cells, $\gamma\delta$ - and $\alpha\beta$ T-cells, regulatory and naïve T-cells, cytotoxic and secretory NK-cell populations.

The results of present study, while been performed with peripheral blood of healthy donors, may provide a basis of reference values when studying subpopulation profile of immune cells. (*Med. Immunol.*, Vol. 11, N 2-3, pp 227-238).

Введение

Уже в первом официальном документе (Приказ МЗ СССР № 539 от 18.04.1986 г. «Об организации лабораторий клинической иммунологии»), регламентирующем деятельность иммунологических лабораторий, в минимальный объем иммунологического обследования были включены такие показатели, как количество Т- и В-лимфоцитов. В дальнейшем этот перечень был расширен (Приказ МЗ РФ № 380 от 25 декабря 1997 г. «О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации») за счет включения Т-хелперов, Т-цитотоксических и естественных киллеров (NK-клеток).

Успехи фундаментальной иммунологии, основанные на достижениях молекулярной биологии и геной инженерии, позволили уточнить иммунопатогенез аллергических, аутоиммунных, онкологических и инфекционных заболеваний. В тоже время возросшие методические возможности метода проточной цитометрии обусловили расширение наших представлений о необходимом перечне популяций лимфоцитов, исследование которых целесообразно при оценке иммунного статуса.

Применение в течение последних 20 лет в практике иммунологических лабораторий пяти популяций лимфоцитов (Т-клетки, Т-хелперы, Т-цитотоксические, В-клетки и NK-клетки), проявило наряду с необходимостью определения этих показателей недостаточную их информативность. С другой стороны, интенсивное изучение патогенеза различных заболеваний выявило ключевую роль активированных лимфоцитов, регуляторных Т-клеток, субпопуляций В- и NK-клеток. В связи с этим для оценки

иммунного статуса при иммунофенотипировании лимфоцитов наряду с основными пятью популяциями целесообразно расширить анализ за счет малых субпопуляций лимфоцитов и пулов активированных клеток. Технические и методические возможности для этого у практических лабораторий появились только в последнее время. Так, если ранее для определения Т-цитотоксических лимфоцитов считалось достаточным использовать только один маркер — CD8, то согласно современным представлениям необходимо одновременное исследование четырех маркеров: CD8, CD4, CD3 и CD45. Реализация такого подхода возможна только при использовании многоцветного цитометрического анализа.

С другой стороны, при появлении новых лабораторных показателей одним из основных требований является стандартизация протокола определения показателя и установление значений нормы. Не является исключением и проточная цитометрия. Таким образом, целью данного исследования было оценить наличие и интервалы распределения основных и малых субпопуляций лимфоцитов в периферической крови практически здоровых лиц при помощи многоцветного цитометрического анализа.

Материалы и методы

Группы обследованных лиц. Для анализа клеток иммунной системы использовали периферическую кровь 356 практически здоровых лиц в возрасте от 20 до 45 лет из различных регионов России.

Проточная цитофлюориметрия. Панель моноклональных антител (МА), использованная для окрашивания лимфоцитов, приведена в таблице 1. Моноклональные антитела фирмы Beckman

ТАБЛИЦА 1. ПАНЕЛЬ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ДЛЯ АНАЛИЗА ОСНОВНЫХ И МАЛЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

| Исследуемые популяции и субпопуляции | Флуорохромы и меченые ими моноклональные антитела | | | |
|--|---|-------------------|--------|------|
| | FITC | PE | ECD | PC5 |
| В1-, В2- и В-клетки памяти | CD19 | CD5 | CD45 | CD27 |
| Т-клетки, Т-хелперы и Т-цитотоксические | CD8 | CD4 | CD3 | CD45 |
| NK-клетки, NK-цитолитические, NK-цитокин-продуцирующие | CD16 | CD56 | CD3 | CD45 |
| Т-хелперы нативные, Т-хелперы активированные / памяти | CD45RA | CD4 | CD45R0 | CD45 |
| Регуляторные Т-клетки | CD4 | CD127 | CD25 | CD45 |
| $\alpha\beta$ Т-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки | $\gamma\delta$ TCR | $\alpha\beta$ TCR | CD3 | CD45 |
| Т-клетки активированные | CD3 | CD25 | HLA-DR | CD45 |

Coulter (США) были мечены FITC (изоцианат флуоресцеина), PE (фикоэритрин), PC5 (комплекс PE с цианином-5) и ECD (комплекс PE с техасским красным). Для удаления эритроцитов пробоподготовку проводили по безотмывочной технологии с использованием следующих лизирующих растворов: OptiLyse C и ImmunoPrep (Beckman Coulter, США).

Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США).

Подготовку клеток периферической крови человека (ПКЧ) для многоцветного анализа проводили в соответствии с описанными ранее протоколами [2]. Для корректного исключения из зоны анализа всех частиц, которые не соответствовали по размерам и гранулярности живым лимфоцитам, вводили необходимые логические ограничения в гистограммы распределения частиц по малоугловому, боковому светорассеянию и CD45. В каждой пробе анализировали не менее 104 лимфоцитов. Абсолютное количество

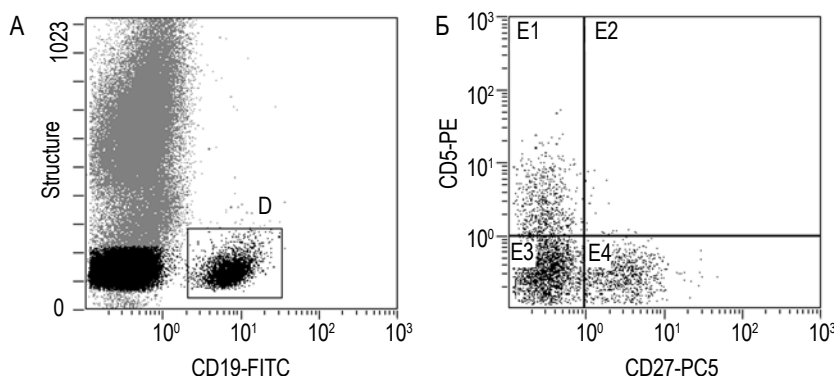


Рисунок 1. Гистограммы распределения CD45, CD19, CD5 и CD27 на лимфоцитах периферической крови

Примечания. А – анализ распределения клеток по структуре и CD19. В зоне D локализованы CD19 позитивные клетки. Б – распределение CD19 позитивных клеток, находящихся в зоне D. Квадрант E1 – В1-клетки (CD19⁺CD5⁺), квадрант E4 – В-клетки памяти (CD19⁺CD27⁺).

ТАБЛИЦА 2. ИНТЕРВАЛЫ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ОСНОВНЫХ И МАЛЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

| Популяции и субпопуляции | Содержание | |
|---|-----------------------------|--|
| | Относительно лимфоцитов (%) | Абсолютное количество (x 10 ⁹ /л) |
| В-клетки (CD3 ⁺ CD19 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺) | 7,0-17,0 | 0,111-0,376 |
| В1-клетки (CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁺ CD45 ⁺) | 0,5-2,1 | 0,022-0,115 |
| В2-клетки (CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁺ CD45 ⁺) | 6,5-14,9 | 0,081-0,323 |
| В-клетки памяти (CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁺ CD45 ⁺) | 1,8-6,8 | 0,012-0,040 |
| НК-клетки (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺) | 8,0-18,0 | 0,123-0,369 |
| НК-клетки цитолитические (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ^{dim} CD45 ⁺) | 0,2-1,0 | 0,003-0,022 |
| НК-клетки цитокин-продуцирующие (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ^{bright} CD45 ⁺) | 7,8-17,0 | 0,120-0,347 |
| Т-НК-клетки (CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁺ CD45 ⁺) | 0,5-6,0 | 0,007-0,165 |
| Т-клетки (CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD45 ⁺) | 61,0-85,0 | 0,946-2,079 |
| Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺) | 35,0-55,0 | 0,576-1,336 |
| Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺) | 19,0-35,0 | 0,372-0,974 |
| Т-хелперы активированные / памяти (CD4 ⁺ CD45R0 ⁺ CD45RA ⁺ CD45 ⁺) | 5,0-25,0 | 0,068-0,702 |
| Т-хелперы нативные (CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45R0 ⁺ CD45 ⁺) | 20,0-40,0 | 0,272-1,123 |
| αβТ-клетки (CD3 ⁺ αβTcR ⁺ γδTcR ⁻ CD45 ⁺) | 70,5-9,7 | 0,924-1,964 |
| γδТ-клетки (CD3 ⁺ γδTcR ⁺ αβTcR ⁻ CD45 ⁺) | 4,6-2,8 | 0,022-0,115 |
| Т-клетки актив. (CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ CD25 ⁺ CD45 ⁺) | 0,5-6,0 | 0,007-0,165 |
| Регуляторные Т-клетки (CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ⁻ CD45 ⁺) | 1,6-5,8 | 0,009-0,078 |
| Индекс соотношения (Т-хелперы / Т-цитотоксические) | 1,5-2,6 | |

клеток определяли как в одноплатформенной (с помощью реагента Flow Count (Beckman Coulter, США)), так и в двухплатформенной (с использованием результатов гематологического анализатора LH500 (Beckman Coulter, США)) системах.

Математическую обработку цитометрических данных проводили при помощи программ EXPO 32 и СХР v. 2.2 (Beckman Coulter, США). Результаты анализа представлены в виде процентов с достоверностью 0,05.

ТАБЛИЦА 3. ИНТЕРВАЛЫ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ МАЛЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ВЗРОСЛЫХ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ ОТНОСИТЕЛЬНО ОСНОВНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ

| Субпопуляции | | Содержание клеток (%) |
|--|------------------------------|-----------------------|
| В1-клетки | относительно общих В-клеток | 4,1-17,5 |
| В2-клетки | | 82,1-96,3 |
| В-клетки памяти | | 22,8-39,7 |
| $\gamma\delta$ Т-клетки | относительно общих Т-клеток | 1,7-12,6 |
| $\alpha\beta$ Т-клетки | | 87,2-98,4 |
| Регуляторные Т-клетки | относительно Т-хелперов | 1,65-5,75 |
| CD16 ^{+(or high)} CD56 ^{dim} НК-клетки цитолитические | относительно общих НК-клеток | 2,5-6,3 |
| CD16 ^{-(or low)} CD56 ^{bright} НК-клетки цитокин-продуцирующие | | 93,8-97,5 |

Результаты

Результатом данной работы стало формирование комбинаций моноклональных антител, позволяющих оценить как все основные популяции лимфоцитов, так и их малые субпопуляции, участвующие в развитии иммунного ответа. Поскольку данное исследование проводилось с использованием периферической крови практически здоровых лиц, ее результаты могут лечь в основу нормативных показателей субпопуляционного состава клеток иммунной системы.

Наиболее полную характеристику количества В-клеток и их субпопуляционного состава

можно получить при следующей комбинации МА: CD19/CD5/CD27/CD45 (рис. 1). Анализ В1-, В2- клеток и В-клеток памяти в ПКЧ с использованием этой комбинации МА позволил определить интервалы распределения как относительного, так и абсолютного количества этих субпопуляций у практически здоровых лиц, результаты представлены в таблице 2. Использование дополнительного логического ограничения по CD19⁺ клеткам позволило получить дополнительную информацию по интервалам распределения В1, В2-клеток и В-клеток памяти вну-

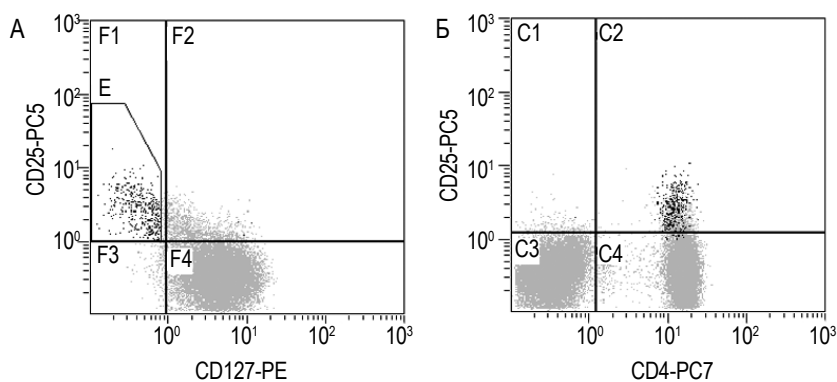


Рисунок 2. Многоэтапное логическое ограничение при анализе Т-рег клеток в периферической крови

Примечания. А – гистограмма распределения CD127 и CD25 после логического ограничения по CD4 и CD45. В зоне Е находятся регуляторные клетки. Б – гистограмма распределения CD4 и CD25 после логического ограничения только по CD45. Черные точки – Т-рег клетки.

три популяции В-клеток практически здоровых лиц (табл. 3).

Для наиболее полной фенотипической характеристики Т-клеток проводили анализ не только линейно-специфичного маркера Т-клеток CD3, но и определяли субпопуляционный состав Т-клеток по экспрессии Т-клеточного рецептора, а именно $\gamma\delta$ и $\alpha\beta$ TCR. Для этих целей были использованы следующие комбинации МА: CD3/CD4/CD8/CD45 и $\alpha\beta$ TCR/ $\gamma\delta$ TCR/CD3/CD45, а результат представлен в таблице 2. В случае анализа $\alpha\beta$ Т-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток использование дополнительного логического ограничения по CD3⁺ клеткам позволило получить дополнительную информацию по интервалам распределения этих клеток в основной популяции Т-клеток (табл. 3).

Для выявления регуляторных Т-клеток (Т-рег) был использован многоцветный цитометрический анализ с многоэтапным введением логических ограничений и следующая комбинация МА: CD45-FITC, CD4-PC7, CD25-PC5 и CD127-PE (рис. 2). Результаты анализа Т-рег клеток взрослых практически здоровых лиц представлены в таблице 2. Подход с использованием множественных логических ограничений выявил интервалы распределения Т-рег клеток в основной популяции Т-клеток практически здоровых лиц (табл. 3).

В процессе исследования количество наивных Т-клеток было проанализировано при помощи следующей комбинации МА: CD4/CD45RA/CD45R0/CD45. Результаты анализа наивных Т-клеток взрослых практически здоровых лиц представлены в таблице 2.

Применение многоцветного анализа и комбинации моноклональных антител CD3/CD16/CD56/CD45 позволили локализовать не только популяции NK-клеток и Т-NK-клеток, но и отдельные малые субпопуляции NK-клеток, имеющие фенотип CD16^{+(or high)}CD56^{dim} и CD16^(or low)CD56^{bright}. Результаты анализа общих NK-клеток, малых субпопуляций NK-клеток и Т-NK-клеток взрослых практически здоровых лиц представлены в таблицах 2 и 3.

Обсуждение

Анализ В-клеток. Оценка как относительного, так и абсолютного количества В-клеток является одним из важных диагностических признаков. При воспалительных заболеваниях наблюдается значительное снижение количества В-клеток. Особенно это ярко выражено при остром панкреатите, хроническом пародонтите и тонзиллите, гнойном осложнении травм. Противоположный эффект наблюдался при острых и хронических формах гепатитов В и С.

Для выявления В-клеток используют так называемые линейноспецифические маркеры. В-клетки экспрессируют целый ряд мембранных молекул, которые необходимы для формирования В-клеточного рецептора (В-cell Receptor, BCR) и являются маркерами линейной принадлежности В-клеток. К таким маркерам прежде всего относится CD19. В связи с этим данный антиген рекомендуется для количественной оценки общей популяции В-клеток.

Некоторые исследователи для локализации В-клеток используют CD20, но данная молеку-

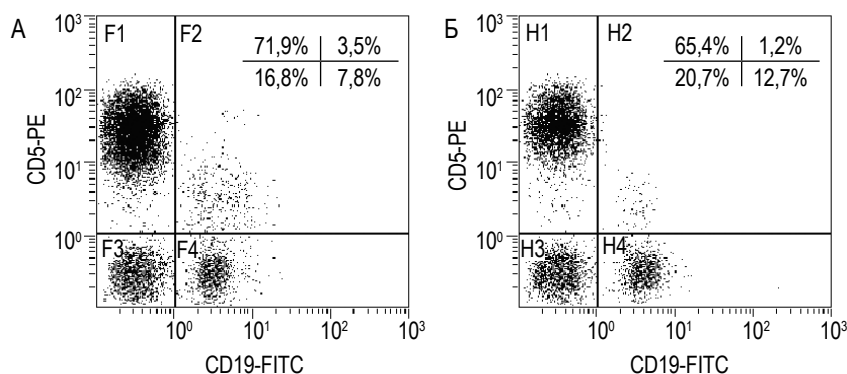


Рисунок 3. Гистограмма распределения CD5 и CD19 на лимфоцитах периферической крови

Примечания. Субпопуляции В1-лимфоцитов у пациента X с аутоиммунным тиреодитом: пациент А – до терапии; пациент Б – в процессе терапии.

ла может экспрессироваться в низкой плотности на других популяциях лимфоцитов. Хотя CD20 первоначально был описан как В-клеточный линейный маркер, оказалось, что небольшая субпопуляция Т-клеток человека экспрессирует CD20 в низкой плотности [13]. Причем, В-клетки экспрессировали CD20 в высокой плотности (CD20^{bright}), а Т-клетки в низкой (CD20^{dim}) и составляли $2,4 \pm 1,5\%$ от лимфоцитов периферической крови.

Хотя оценка экспрессии CD20 бывает полезна при характеристике В-клеток, необходимо достаточно осторожно подходить к интерпретации получаемых результатов, например при фенотипировании лимфоцитов периферической крови пациентов с ревматоидным артритом.

В настоящее время среди В-клеток выделяют три основные субпопуляции, а именно: В1, В2 и, так называемые В-клетки памяти. Достаточно важная роль при данном делении отводится молекуле CD5, которая была расценена как возможный маркер В-клеток, позволяющий различать их субпопуляции: CD5⁺ В-клетки (также называемые В1) и обычные CD5⁻ В-клетки (или В2) [18].

Хотя точная функциональная роль CD5 все еще до конца не изучена, для этих молекул была показана физическая ассоциация с антиген-специфическим рецепторным комплексом как на Т-, так и на В-лимфоцитах. Однако в последние годы выяснилось, что CD5 может быть посредником при негативной регуляции передачи сигналов для В-клеточного рецептора [28].

В1-клетки вызывают значительный интерес за счет того, что их ассоциируют с продукцией аутоантител [19] и, как следствие, с аутоиммунными заболеваниями [4]. Значительная роль В1-клеток была отмечена при ревматоидном артрите, системной красной волчанке и синдроме Шегрена [10]. Увеличение количества CD5⁺ В-клеток наблюдали у пациентов, страдающих миастенией, инсулинзависимым диабетом и тиреоидите Хашимото [15]. На рисунке 1 представлены гистограммы распределения В1- (CD19⁺CD5⁺) и В2- (CD19⁺CD5⁻) лимфоцитов при аутоиммунном тиреоидите. Как видно из рисунка 3, у пациента А доля CD5⁺ В-клеток составляла практически треть от всех В-клеток, тогда как у пациента Б в процессе терапии их количество значительно снизилось и составило приблизительно десятую часть от всех В-клеток.

Другой субпопуляцией В-клеток, вызывающей не менее значительный интерес у исследователей, являются так называемые В-клетки памяти. Идентификация CD27 как маркера памяти

В-клеток [29] позволила надежно и эффективно идентифицировать в периферической крови наивные В-клетки (IgM⁺/CD27⁻) и В-клетки памяти (CD27⁺).

Взаимодействие CD27 с его лигандом (CD70) на Т-клетках является одним из условий дифференцировки В-клеток в плазматические клетки. В свою очередь отсутствие IgD-CD27⁺ В-клеток памяти в значительной степени объясняет нарушение продукции иммуноглобулинов у пациентов с X-связанным гипер-IgM синдромом [3].

Анализ Т-клеток. К маркерам, характеризующим линию Т-клеток, в первую очередь относится Т-клеточный рецептор (T-cell Receptor, TcR). Существуют два типа TcR, каждый из которых ассоциируется с разными типами Т-лимфоцитов. TcR1, состоящий из γ - и δ -цепей, появляется на ранних стадиях онтогенеза. TcR2 состоит из α - и β -цепей.

$\gamma\delta$ Т-клетки были изучены относительно недавно. В отличие от $\alpha\beta$ Т-клеток, $\gamma\delta$ Т-клетки распознают непептидные антигены, полученные из микробных патогенов, независимо от МНС [24]. Данная субпопуляция 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 хемокинов [7]. Кроме этого, $\gamma\delta$ Т-клетки имеют эффекторную (цитотоксическую) активность [9]. С эволюционной точки зрения $\gamma\delta$ Т-клетки занимают уникальное место между высоко специфичными $\alpha\beta$ Т-клетками и врожденной иммунной системой для выполнения защиты организма от патогенов. Роль $\gamma\delta$ Т-клеток весьма существенна в устойчивости организма против целого ряда бактериальных [7] и вирусных [21] инфекций, включая вирус ВИЧ [17]. Кроме того, $\gamma\delta$ Т-клетки играют существенную роль и в противоопухолевом ответе [12]. Однако $\gamma\delta$ Т-клетки могут играть не последнюю роль при некоторых иммунопатологических состояниях, таких как диабет [20], аутоиммунные расстройства [14], болезнь Бехчета [31].

Содержание $\gamma\delta$ Т-клеток в периферической крови может варьироваться, в частности, существуют половые и возрастные различия. Их количество увеличивается с момента рождения до половозрелости и в дальнейшем постепенно снижается. У женщин количество $\gamma\delta$ Т-клеток несколько выше, и этот уровень сохраняется значительно дольше, чем у мужчин [6].

Обнаружение увеличенной циркулирующей субпопуляции $\gamma\delta$ Т-клеток позволяет предположить наличие недавней или продолжающейся

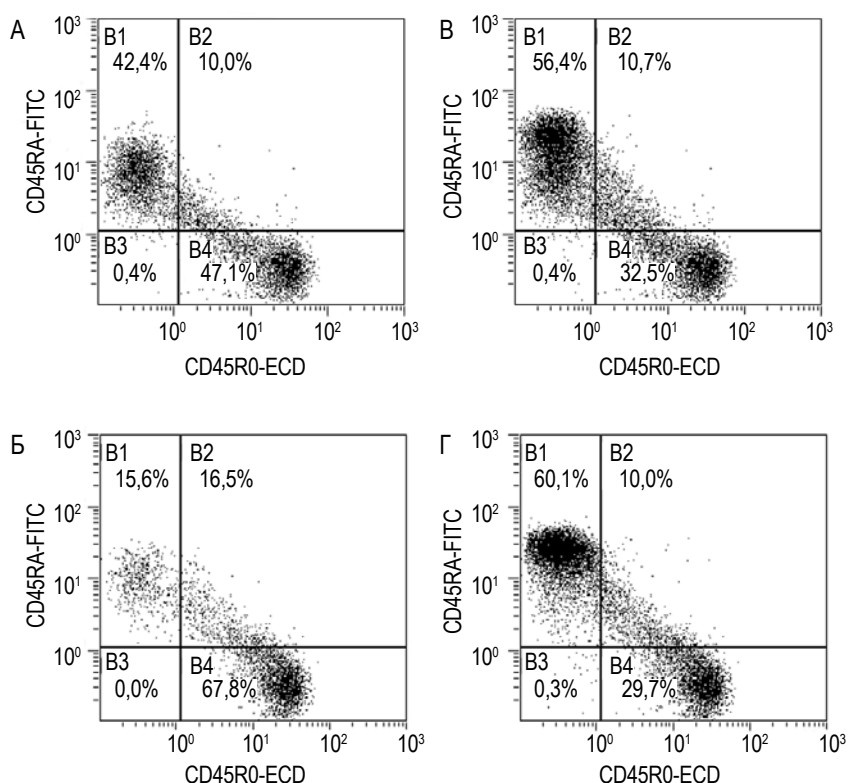


Рисунок 4. Распределение лимфоцитов практически здорового донора (А и В) и пациента в послеоперационный период (Б и Г)

Примечания. На гистограммах А и Б анализировали только CD45- и CD4- клетки, локализованные при помощи многоэтапного логического ограничения по этим маркерам. На гистограммах В и Г представлен результат анализа общей популяции CD45 позитивных лимфоцитов.

хронической стимуляции иммунной системы, особенно на слизистых оболочках. Для клиницистов эта информация может служить дополнительным критерием, характеризующим наличие медленно прогрессирующего инфекционного заболевания.

На клеточной поверхности и $\alpha\beta$ - и $\gamma\delta$ -антигенраспознающие рецепторы Т-клеток располагаются непосредственно рядом с полипептидным комплексом, имеющим групповое название CD3. Это соседство и ассоциация с CD3 является необходимым условием для экспрессии всего рецепторного комплекса на поверхности клеток.

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. Динамика изменения субпопуляционного состава Т-клеток при некоторых патологиях представляет собой значительную ценность для контроля эффектив-

ности терапии, прогноза развития и течения заболевания.

В последние годы большой интерес у исследователей вызывает такая популяция Т-клеток, как регуляторные Т-клетки (Т-reg). Они играют важную роль в супрессии иммунных реакций (регулируют Т-клеточный гомеостаз, предотвращают аутоиммунные заболевания, аллергии, гиперчувствительность, реакцию трансплантат против хозяина, но снижают иммунитет к инфекциям). Таким образом, наличие и количественные характеристики этой популяции служат важным диагностическим признаком.

Т-reg клетки имеют следующий фенотип $CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD45R0^+CD95^+$, однако наиболее важным их маркером является фактор транскрипции скурфин (scurfin, FOXP3) и находится внутри клеток, что затрудняет работу по идентификации Т-reg [27].

Исследования последних лет показали, что экспрессия CD127 на Т-reg клетках снижена или отсутствует и их локализация возможна без выявления FOXP3 [22].

ТАБЛИЦА 4. СРАВНЕНИЕ ИНТЕРВАЛОВ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ОСНОВНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ И СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ВЗРОСЛЫХ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ ПОЛУЧЕННЫХ АВТОРАМИ С ЛИТЕРАТУРНЫМИ ДАННЫМИ [1, 8, 25, 32]

| Популяции и субпопуляции | Zidovec Lepej S., et al., (2003) (n = 50) | Pope V., et al. (1994) (n = 246) | Comans-Bitter W.M., et al. (1997) (n = 51) | Тотолян Арег А. и др. (1999) | Собственные данные (n = 356) |
|---|---|----------------------------------|--|------------------------------|------------------------------|
| Т-лимфоциты (CD3 ⁺) | 73,3 (59,0-88,2) | 72,1 (54-85) | 72 (55-83) | 70 (60-80) | 73 (61-85) |
| Т-хелперы (CD3 ⁺ , CD4 ⁺) | 43,8 (34,9-64,3) | 44,1 (32-58) | 44 (28-57) | 41,5 (33-50) | 45 (35-55) |
| Т-цитотоксические (CD3 ⁺ , CD8 ⁺) | 23,9 (11,0-37,1) | 31,2 (19-44) | 24 (10-39) | 27,5 (16-39) | 27 (19-35) |
| Т-активированные (CD3 ⁺ , HLA-DR ⁺) | 1,9 (0,5-25,9) | нет данных | 5 (2-12) | нет данных | 3 (0,5-6) |
| В-лимфоциты (CD19 ⁺) | 9,7 (4,4-26,4) | 13,3 (6-23) | 12 (6-19) | 13,5 (5-22) | 12 (7-17) |
| НК-клетки (CD3 ⁻ , CD16 ⁺ , CD56 ⁺) | 3,9 (0,4-19,3) | 12,2 (5-23) | 13 (7-31) | 11,5(3-20) | 15 (12-18) |

Не меньший интерес вызывает анализ наивных Т-клеток. Экспрессия на клеточной поверхности различных изоформ молекулы CD45 позволяет выделить среди CD4⁺ Т-лимфоцитов человека наивные Т-клетки. Принято относить субпопуляцию CD4⁺CD45RA⁻CD45R0⁺ Т-лимфоцитов к Т-клеткам памяти и соответственно CD4⁺CD45RA⁺CD45R0⁻ — к наивным Т-клеткам. Подобное разделение основано исключительно на способности CD4⁺CD45RA⁻CD45R0⁺ Т-клеток, а не наивных Т-лимфоцитов, интенсивно отвечать на повторный контакт с антигеном *in vitro*. В свою очередь, быстрый и усиленный ответ Т-клеток памяти на специфический антиген является их важнейшим функциональным отличием от наивных предшественников [23, 26]. Однако следует отметить, что CD45R0 также экспрессируют регуляторные Т-клетки и активированные Т-хелперы.

Определение количества CD4⁺CD45RA⁺CD45R0⁻ и CD4⁺CD45RA⁻CD45R0⁺ лимфоцитов может служить хорошим диагностическим признаком. Этот факт четко проявляется при развитии иммунного ответа на инфекции и в случаях хирургического вмешательства, поскольку происходит накопление доли CD4⁺CD45RA⁻CD45R0⁺ клеток и снижение CD4⁺CD45RA⁺CD45R0⁻. Как видно из рисунка 4, определение относительного количества CD45RA⁺ и CD45R0⁺ клеток по всей популяции лимфоцитов мало информативно (рис. 4Б и 4Г). Только многоцветный цитометрический анализ с логическим ограничением

по зоне CD4 позитивных клеток позволяет четко увидеть различие между CD45RA⁺ и CD45R0⁺ CD4⁺ Т-лимфоцитами в зависимости от развития иммунного ответа (рис. 4А и 4В). Результаты анализа наивных Т-клеток взрослых практически здоровых лиц представлены в таблице 2.

Анализ НК-клеток. Иммунофенотипирование с использованием многоцветного анализа особенно важно для характеристики высоко специализированных субпопуляций лимфоцитов, таких как НК-клетки.

НК-клетки являются носителями двух основных функций. Во-первых, это лизис опухолей и инфицированных вирусами клеток [11], а во-вторых, регуляция врожденного и адаптивного иммунных ответов [5, 16].

Для локализации НК-клеток среди других лимфоцитов используют уникальную комбинацию из нескольких маркеров, таких как CD16 и CD56. Однако Т-клетки также могут экспрессировать на своей поверхности CD56 и CD16 (так называемая популяция Т-НК-клетки). Для разделения этих отличающихся от Т-клеток популяций используют молекулу CD3, так как НК-клетки никогда ее не экспрессируют.

Популяция НК-клеток по своему составу обладает достаточной гетерогенностью. Среди популяции циркулирующих НК-клеток выделяют две основные субпопуляции. Первая экспрессирует CD16 и низкий уровень CD56 (CD16^{+(or high)}CD56^{dim}). Вторая экспрессирует CD56, однако CD16 на них представлен в низ-

кой плотности или полностью отсутствует (CD16^{-(or low)}CD56^{bright}). Последняя субпопуляция составляет около 10-20% от общего количества NK-клеток. Они секретируют IFN γ и другие цитокины, и имеют меньшую цитолитическую активность. В свою очередь субпопуляция CD16^{high}CD56^{dim} составляет около 80-90% от NK-клеток периферической крови, они слабо секретируют цитокины, но обладают высокой цитолитической активностью [30].

При двухцветном окрашивании лимфоцитов с использованием комбинации антител CD3, CD56⁺CD16 возможно локализовать NK-клетки и оценить их абсолютное и относительное количество. Однако в этом случае отсутствует возможность определить их субтипы. Данную задачу позволяет решить применение многоцветного анализа и следующей комбинации моноклональных антител CD16/CD56/ CD3/CD45.

Таким образом, проведенные исследования субпопуляционного состава клеток периферической крови практически здоровых лиц в различных регионах России позволили определить интервалы распределения содержания как основных, так и малых субпопуляций клеток иммунной системы человека. Сравнение полученных результатов с литературными данными (табл. 4), опубликованными в зарубежной и отечественной литературе, свидетельствуют о близости референтных интервалов распределения основных субпопуляций клеток иммунной системы практически здоровых лиц вне зависимости от места проживания [1, 8, 25, 32]. Однако остается открытым вопрос о российских нормах, связанных с региональными особенностями отдельных областей и этническими группами населения Российской Федерации. Все это требует объединения усилий различных лабораторных коллективов в проведении исследований в данном направлении.

Заключение

Развитие проточной цитометрии в нашей стране привело к широкомасштабному применению оценки основных субпопуляций лейкоцитов и их активационных маркеров в клинической практике, причем не только с целью выявления количественных дефектов этих клеток, но и для диагностических целей (диагностика аутоиммунных процессов, септических состояний и др.). В тоже время во многом остается неясным вопрос о референтных интервалах нормативных показателей различных клеточ-

ных субпопуляций как для страны в целом, так и их особенностей характерных для различных регионов и этносов. Учитывая насущную необходимость в формировании таких норм, нами была предпринята попытка по регламентации нормативных показателей наличия популяций и субпопуляций лимфоцитов по их фенотипу. Подобранный оптимальная комбинация моноклональных антител и использование многоцветного цитометрического анализа с многоэтапным гейтированием позволили адекватно и точно определить их в периферической крови. Предложенные алгоритмы и полученные данные могут служить надежной основой для исследователей и врачей-иммунологов (лаборантов и клиницистов) при трактовке полученных результатов у пациентов с той или иной иммунопатологией. Авторы надеются на широкое обсуждение полученных результатов и внедрение полученных нормативных данных в клиническую практику лабораторий Российской Федерации.

Список литературы

1. Тотолян Арег А., Балдуева И.А., Бубнова Л.Н., Закревская А.В., Зуева Е.Е., Калинина Н.М., Лисицина З.Н. Стандартизация методов иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга человека // Медицинская иммунология. – 1999. – Т. 1, № 5. – С. 21-43.
2. Хайдуков С.В. Подходы к стандартизации метода проточной цитометрии для иммунофенотипирования. Настройка цитометров и подготовка протоколов для анализа // Медицинская иммунология. – 2007. – Т. 9, № 6. – С. 569-574.
3. Agematsu K., Nagumo H., Shinozaki K., Hokibara S., Yasui K., et al. Absence of IgD-CD27(+) memory B cell population in X-linked hyper-IgM syndrome // J. Clin. Invest. – 1998. – Vol. 102, N 4. – P. 853-860.
4. Becker H., Weber C., Storch S., Federlin K. Relationship between CD5⁺ B lymphocytes and the activity of systemic autoimmunity // Clin. Immunol. Immunopathol. – 1990. – Vol. 56, N 2. – P. 219-225.
5. Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C., Cousens L.P., Salazar-Mather T.P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines // Annu. Rev. Immunol. – 1999. – Vol. 17. – P. 189-220.
6. Caccamo N., Dieli F., Wesch D., Jomaa H., Eberl M. Sex-specific phenotypical and functional differences in peripheral human Vgamma9/Vdelta2

- T cells. // *J. Leukoc. Biol.* – 2006. – Vol. 79, N 4. – P. 663-666.
7. Chen Z.W., Letvin N.L. Adaptive immune response of $\gamma\delta$ T cells: a new paradigm. // *Trends Immunol.* – 2003. – Vol. 24. – P. 213-219.
 8. Comans-Bitter W.M., de Groot R., van den Beemd R., Neijens H.J., et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. // *J. Pediatr.* – 1997. – Vol. 130, N 3. – P. 388-393.
 9. Dieli F., Troye-Blomberg M., Ivanyi J., et al. Granulysin-independent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by $\gamma\delta$ T lymphocytes. // *J. Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 184. – P. 1082-1085.
 10. Ebo D., DeClerck L.S., Bridts C.H., Stevens W.J. Expression of CD5 and CD23 on B cells of patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. Relationship with disease activity and treatment // *In Vivo.* 1994. – Vol. 8, N 4. – P. 577-580.
 11. French A.R., Yokoyama W.M. Natural killer cells and viral infections. // *Curr. Opin. Immunol.* – 2003. – Vol. 15, – P. 45-51.
 12. Girardi M., Oppenheim D.E., Steele C.R., et al. Regulation of cutaneous malignancy by $\gamma\delta$ T cells // *Science.* – 2001. – Vol. 294. – P. 605-609.
 13. Hultin L.E., Hausner M.A., Hultin P.M., Giorgi J.V. CD20 (pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes // *Cytometry.* – 1993. – Vol. 14, N 2, – P. 196-204.
 14. Ichkawa Y., Shimizu H., Yoshida M., Takaya M., Arimori S. T cells bearing $\gamma\delta$ T cell receptor and their expression of activation antigen in peripheral blood from patients with Sjogren's syndrome // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 1991. – Vol. 9. – P. 603-609.
 15. Iciek L.A., Waldschmidt T.J., Griffiths M.M., Brooks K.H. B-1 cells in systemic autoimmune responses: IgM⁺, Fc epsilon R⁺ B cells are lost during chronic graft-versus-host disease but not in murine AIDS or collagen-induced arthritis // *Immunol. Invest.* – 1994. – Vol. 23, N 4-5. – P. 293-311.
 16. Inngjerdingen M., Damaj B., Maghazachi A.A. Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells // *Blood.* – 2001. – Vol. 97. – P. 367-375.
 17. Kabelitz D., Wesch D. Role of $\gamma\delta$ T-lymphocytes in HIV infection // *Eur. J. Med. Res.* – 2001. Vol. 6, – P. 169-174.
 18. Kantor A.B. The development and repertoire of B-1 cells (CD5 B cells) // *Immunol. Today.* – 1991. – Vol. 12, N 11. – P. 389-391.
 19. Kazbay K., Osterland C.K. The frequency of Leu 1⁺ B cells in autoantibody positive and negative autoimmune diseases and in neonatal cord blood // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 1990. – Vol. 8, N 3. – P. 231-235.
 20. Kretowski A., Mysliwiec J., Szelachowska M., et al. $\gamma\delta$ T-cells alterations in the peripheral blood of high risk diabetes type 1 subjects with subclinical pancreatic B-cells impairment. // *Immunol. Lett.* – 1999. – Vol. 68. – P. 289-293.
 21. Lafarge X., Merville P., Cazin M.C., et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating $\gamma\delta$ T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role // *J. Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 184. – P. 533-541.
 22. Liu W., Putnam A.L., Xu-Yu Z., Szot G.L., et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203, N 7. – P. 1701-1711.
 23. Michie C.A., McLean A., Alcock C., Beverley P.C. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms // *Nature.* – 1992. – Vol. 6401, N 360. – P. 264-265.
 24. Morita C.T., Beckman E.M., Bukowski J.F., et al. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human $\gamma\delta$ -T cells. // *Immunity.* – 1995. – Vol. 3. – P. 495-507.
 25. Pope V., Larsen S.A., Rice R.J., Goforth S.N., et al. Flow Cytometric Analysis of Peripheral Blood Lymphocyte Immunophenotypes in Persons Infected with *Treponema pallidum*. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 1994. – Vol. 1, N 1. – P. 121-124.
 26. Sanders M.E., Makgoba M.W., Shaw S. Human naive and memory T cells: reinterpretation of helper-inducer and suppressor-inducer subsets. // *Immunol. Today.* – 1988. – Vol. 9, N 7-8. – P. 195-199.
 27. Schubert L.A., Jeffery E., Zhang Y., Ramsdell F., Ziegler S.F. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, N 40. – P. 37672-37679.
 28. Sen G., Bikah G., Venkataraman C., Bondada S. Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells. // *Eur. J. Immunol.* – 1999. – Vol. 29, N 10. – P. 3319-3328.
 29. Tangye S.G., Liu Y.J., Aversa G., Phillips J.H., de Vries J.E. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and

CD27 // J. Exp. Med. – 1998. – Vol. 188, N 9. – P. 1691-1703.

30. Warren H.S., Skipsey L.J. Phenotypic analysis of a resting subpopulation of human peripheral blood NK cells: the FcR gamma III (CD16) molecule and NK cell differentiation // Immunology. – 1991. – Vol.72, N 1. – P. 150-157.

31. Yamashita N., Kaneoka H., Kaneko S., Takeno M., et al. Role of gammadelta T lymphocytes in the development of Behçet's disease // Clin. Exp. Immunol. – 1997. – Vol. 107, N 2. – P. 241-247.

32. Zidovec Lepej S., Vince A., Rakušić S., et al. Center for disease control (CDC) flow cytometry panel for human immunodeficiency virus infection allows recognition of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus or Cytomegalovirus // Croat. Med. J. – 2003. – Vol. 44. – P. 702-706.

*поступила в редакцию 15.02.2009
отправлена на доработку 01.03.2009
принята к печати 06.04.2009*