Харламова А. Н.
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск
Петракова О. В.
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск
Гурманчук И. Е.
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИМФОЦИТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ БИОПТАТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Являясь самым крупным органом иммунной системы, кожа и связанные с ней элементы представляют собой высокоорганизованный её компонент. В норме в ней присутствуют две популяции лимфоцитов: резидентные клетки, несущие на своей поверхности в основном γδ тип Т-клеточного рецептора и транзиторные клетки, вовлеченные в процесс хоминга. Механизм функционирования γδ-Т-лимфоцитов основан на своевременной продукции специфических цитокинов, хемокинов, ростовых факторов и глюкозаминогликанов, которые направленно влияют на соседние эпителиальные клетки. Несмотря на множество исследований в этом направлении, в связи со сложностью извлечения чистой популяции лимфоцитов кожи ряд аспектов, касающихся спектра иммунных функций этих клеток, а также межклеточных взаимодействий в процессе развития иммунного ответа в физиологических условиях и при патологических состояниях, остаются не ясными. Изучение фенотипических и функциональных особенностей лимфоцитов кожи позволит более детально узнать о роли данной популяции лимфоцитов в механизмах функционирования лимфоидной ткани, ассоциированной с кожей в норме и при различных патологических состояниях.

Материалы и методы. Исследования проводили на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Белорусского государственного медицинского университета. Материалом для исследования послужили полученные с помощью дерматома участки аутодермотрансплантата весом около 1 г и толщиной приблизительно 1 мм.

Для получения суспензии лимфоцитов кожи использовали метод комбинирования ферментативной диссоциации (коллагеназа, гиалуронидаза, ДНКаза I) и хелатирующих агентов. На заключительном этапе полученную суспензию клеток центрифугировали на градиенте Ficoll-Paque, клетки отмывали, оценивали их количество, состав и жизнеспособность (с помощью 0,2 % трипанового синего). Из суспензии готовили мазки и проводили их окраску по Романовскому–Гимзе.

Функциональные характеристики клеток оценивали по их пролиферативной активности. В качестве стимулятора использовали фитогемагглютинин (ФГА). Оценку фенотипических характеристик лимфоцитов, выделенных из биоптатов кожи человека, проводили методом проточной цитофлюорометрии. Использовали

Репозиторий БГМУ

моноклональные антитела к CD3+, CD4+, CD8+, CD45+, меченные флюорохромами.

Результаты и обсуждение. Жизнеспособность клеток после выделения во всех случаях составила около 99 %. Морфологически полученные клетки были весьма неоднородны. Наибольшее количество составили крупные клетки с неравномерным очертанием, хорошо контурированным большим азурофильным ядром и бледной цитоплазмой. Вторую по численности популяцию представляли слегка вытянутые клетки с бобовидным, неоднородным по структуре, занимающим практически весь объем клетки ядром и слабобазофильной цитоплазмой. Небольшие клетки с округлым, очень темным ядром, и небольшой полоской базофильной цитоплазмы занимали по численности третью место, среди всех выделенных клеток. Также обратили на себя внимание крупные, плохо очерченные, вытянутой формы клетки с большим продолговатым, неоднородным азурофильным ядром.

Пролиферативная активность клеток в функциональных тестах зависит в основном от трех параметров: концентрации клеток, концентрации используемых митогенов и продолжительности культивирования. В связи с этим, ранее нами была определена оптимальная для использования концентрация Т-клеточ-ного митогена (ФГА). Всего использовали четыре концентрации ФГА — 2,5 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 15 мкг/мл. Однако оптимальными концентрациями ФГА для определения функциональной активности лимфоцитов, выделенных из биоптатов кожи, оказались 2,5 мкг/мл и 15 мкг/мл (табл.).

Результаты исследования пролиферативной активности лимфоцитов биоптатов кожи в ответ на ФГА

Количество исследований	ФГА 2,5 мкг/мл	ФГА 5 мкг/мл	ФГА 10 мкг/мл	ФГА 15 мкг/мл
10	1,21 ± 0,06	0,97 ± 0,02	0,99 ± 0,07	1,30 ± 0,12

Таким образом, максимальный пролиферативный ответ на Т-клеточный митоген наблюдался при концентрации ФГА 15 мкг/мл и составлял 1,30 ± 0,12, а при концентрации ФГА 5 мкг/мл ответ на митоген минимален и составляет лишь 0,99 ± 0,07.

Такие низкие значения индекса пролиферации можно объяснить небольшой концентрацией клеток (лимфоцитов), которые удается получить из биоптата кожи с помощью фрагментационного метода. Минимальное же количество клеток, которое можно использовать в тесте с МТТ для оценки пролиферации клеток, составляет 10^4 кл /мл.

Поскольку достоверно определить принадлежность выделенных клеток к популяции лимфоцитов морфологически оказалось невозможным, нами было проведено исследование экспрессии на выделенных клетках основных поверхностных маркеров лимфоцитов. Анализ показал, что среди выделенных из биоптатов кожи клеток только около 5 % были лимфоцитами (CD45+), из них 90 % приходилось на долю CD3+ лимфоцитов. Среди последних клетки с фенотипом

Репозиторий БГМУ

CD3+CD4+CD8– составили около 1 %, а клетки с фенотипом CD3+CD4-CD8+ — 38 %. Оставшиеся клетки приходились на долю дважды негативных лимфоцитов (CD3+CD4–CD8–) и составляли около 65 %.

Заключение. Несмотря на ограниченное количество выделяемых клеток (10*5 клеток на 1 г биоптата кожи), в ходе исследования были определены методические возможности для исследования их функциональных и фенотипических характеристик.

Дальнейшее изучение функциональных и других параметров популяции резидентных лимфоцитов кожи позволит раскрыть новые механизмы функционирования лимфоидной ткани, ассоциированной с кожей в норме и при различных патологических состояниях.

ЛИТЕРАТУРА

1. *The vast* majority of CLA+ T cells are resident in normal skin / R. A. Clark [et al.] // J. Immunol. 2006. Vol. 176. P. 4431–4439.

2. *Hayday, A.* Immunoregulation in the tissues by γδ T cells / A. Hayday, R. Tigelaar // Nat. Rev. Immunol. 2003. Vol. 3. P. 233–242.

3. *A role* for epithelial γδ T cells in tissue repair / D. A. Witherden [et al.] // Springer Semin. Immunopathol. 2000. Vol. 22. P. 265–281.

4. *A role* for skin γδ T cells in wound repair / J. Jameson [et al.] // Science. 2002. Vol. 296. P. 747–749.

Репозиторий БГМУ