МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
КАФЕДРА ГЕРОНТОЛОГИИ И ГЕРИАТРИИ С КУРСОМ
АЛЛЕРГОЛОГИИ И ПРОФПАТОЛОГИИ

Л.В.МАСЛОВА А.Е. ГОНЧАРОВ

МИНОРНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК КРОВИ

Учебно-методическое пособие

Минск БелМАПО
2017

УДК 616.15- 078.083.3 (075.9)
ББК 52.54я73
М 31

Рекомендовано в качестве учебно-методического пособия
НМС Белорусской медицинской академии последипломного образования
протокол № 11 от 20.12. 2017г.

Авторы:

профессор кафедры геронтологии и гериатрии с курсом аллергологии и профпатологии БелМАПО, доктор медицинских наук *Л.В. Маслова;*
заведующий лабораторией иммунологии и клеточной биотехнологии РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, кандидат медицинских наук *А.Е. Гончаров*

Рецензенты:

заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней УО «БГМУ», доктор медицинских наук, профессор Доценко Э.А.
заведующий 1-й кафедрой внутренних болезней УО «БГМУ», кандидат медицинских наук, доцент Алексейчик С.Е.

Маслова Л.В.
М 31 Минорные субпопуляции клеток крови: учеб.-метод. пособие. /Л.В. Маслова, А.Е. Гончаров. – Минск: БелМАПО, 2017. – 30с.
ISBN 978-985-584-216-4

В учебно-методическом пособии изложены основные методы иммунологических исследований, выполняемых с использованием проточного цитофлуориметра: определение поверхностных и внутриклеточных молекул на различных клетках, стадий клеточного цикла и пролиферации, жизнеспособности и апоптоза, продукции биологически активных веществ (активные формы кислорода, азота), фагоцитоза и нетоза, мембранного потенциала клеток и др.

Предназначено для врачей лабораторной диагностики, врачей-иммунологов и врачей-аллергологов учреждений здравоохранения, для научных сотрудников республиканских научно-практических центров.

УДК 616.15- 078.083.3 (075.9)
ББК 52.54я73

ISBN 978-985-584-216-4

© Маслова Л.В., Гончаров А.Е., 2017
© Оформление БелМАПО, 2017

Содержание

Перечень сокращений	4
Введение	6
1. Лимфоидные клетки	6
1.1. Субпопуляции Т-клеток	6
1.2 Гамма-дельта Т-клетки	8
1.3 Т-регуляторные клетки	9
1.4 Истощенные Т-клетки	13
1.5 Субпопуляции В-клеток	15
1.6 Врожденные лимфоидные клетки	16
2. Клетки миелоидного происхождения	17
2.1. Субпопуляции моноцитов и макрофагов	17
2.2 Дендритные клетки крови	20
2.3 Миелоидные супрессорные клетки	32
Литература	36

Перечень сокращений

АПК – антигенпрезентирующая клетка

ВЛК – врожденные лимфоидные клетки

ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа

ДК – дендритные клетки

ЕК – естественные киллеры

ИЛ - интерлейкин

ИНФ - интерферон

МЛСК - миелоидные супрессорные клетки

ПРР – паттерн-распознающие рецепторы

ТЕМ - эффекторные Т-клетки памяти

ТРФ - β – трансформирующий ростовой фактор- β

ФНО – фактор некроза опухоли

CCR - C-C chemokine receptor

CD – кластеры дифференцировки

$CXCR3^{+-}$ - хемокиновый рецептор

DP – Double Positive

GATA-3 - Trans-acting T-cell-specific transcription factor

IRC - inflammation-related cells

iT-regs – inducible T-regs

MAVS - митохондриальный противовирусный сигнальный белок

MHC - Major Histocompatibility Complex

PD-1 - programmed cell death 1

pT-regs - peripheral-derived

PU.1 - фактор транскрипции гемопоэза

ROR - related orphan receptor

SP – Single Positive

STAT - signal transducers and activators of transcription

T-bet - член семейства транскрипционных факторов T-box, который регулирует дифференцировку Th1

TCM - центральные Т-клетки памяти

TCR – Т-клеточный рецептор

TEMRA - терминально-дифференцированные Т-клетки

TLRs - toll-like-рецепторы

Th – Т хелперы

T-regs cells – Т-регуляторные клетки

tT-regs - thymic-derived T-regs

FoxP3 - forkhead box P3

Введение.

В последние годы важную роль в модуляции иммунного ответа отводят минорным субпопуляциям лейкоцитов крови, а их роль в патогенезе инфекционных, аутоиммунных, аллергических и онкологических заболеваний активно дискутируется.

К минорным субпопуляциям относят субпопуляции моноцитов, дендритных клеток (ДК), миелоидных супрессорных клеток (МЛСК), истощенных и анергичных Т-лимфоцитов, регуляторных CD4+ клеток и TCRγδ+ Т-клеток и др. Несмотря на невысокое их содержание в крови, составляющее от нескольких процентов до сотых долей процента от числа всех иммунокомпетентных клеток, выполняемые ими регуляторные функции крайне важны для поддержания иммунного гомеостаза.

Подсчет их относительного и абсолютного содержания в рамках лабораторных исследований иммунокомпетентных клеток (иммунограмма) находит применение в диагностике заболеваний и состояний и имеет прогностическое значение. В этой связи, важным для специалистов в области иммунологии и аллергологии является получение ясного представления о фундаментальных свойствах минорных субпопуляций клеток крови и выполняемых ими функциях.

1. Лимфоидные клетки

1.1. Субпопуляции Т-клеток

Как известно, CD3+ Т-лимфоциты по типу клеточного рецептора разделяют на TCRαβ+ и TCRγδ+ Т-клетки. При этом, двойные негативные и двойные позитивные клетки по типу клеточного рецептора отсутствуют. Т-лимфоциты с типом Т-клеточного рецептора αβ представляют большую часть Т-клеток периферической крови. Среди TCRαβ+ Т-клеток выделяют CD8+ цитотоксические Т-клетки и CD4+ Т-хелперы.

Наиболее изученными в настоящее время являются субпопуляции Т-хелперов. По экспрессии транскрипционных факторов, спектру продуцируемых цитокинов и, соответственно, выполняемой функции, в настоящее время

выделяют до 10 субпопуляций $CD4^+$ клеток. Среди них как «классические» Th1- и Th2-клетки, а также $FoxP3^+$ Т-регуляторные клетки, так и относительно недавно описанные Th9-, Th17- и Th22-субпопуляции Т-хелперов. Отдельной важной субпопуляцией являются фолликулярные Т-клетки, которые локализованы в В-клеточных фолликулах вторичных лимфоидных органов и стимулируют продукцию антител В-клетками.

Основные субпопуляции $CD4^+$ клеток периферической крови представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Субпопуляции $CD4^+$ Т-лимфоцитов

Суб-популяция	Транскр. факторы	Продуц. цитокины	Функция	Ассоциированная патология	Иммуно-фенотип
Th1	T-bet	ИНФ-γ ИЛ-2	Активация АПК, стимуляция В-клеток. Защита от внутриклеточных патогенов (вирусы, бактерии)	Аутоиммунитет, ГЗТ	$CCR7^-$ $CCR5^+$ $CXCR3^+$
Th2	GATA-3	ИЛ-4 ИЛ-5 ИЛ-13	Стимуляция В-лимфоцитов. Защита от внеклеточных патогенов (паразиты, бактерии)	Аллергические заболевания	$CCR7^-$ $CCR4^+$ $CRTH2^+$
Th9	PU.1	ИЛ-9 ИЛ-10 ИЛ-21	Активация тучных клеток, Т-регуляторных клеток	Аллергические заболевания, аутоиммунитет	
Th17	RORγt	ИЛ-17 ИЛ-21 ИЛ-26	Активация нейтрофилов, фибробластов, клеток эпителия. Защита от внеклеточных патогенов (грибы, бактерии)	Аутоиммунитет	$CD161^+$ $CCR7^-$ $CCR6^+$ $ИЛ\text{-}23R^+$
Th22	AHR BNC-2	ИЛ-22 ФНО-α	Участие в регенерации тканей	Псориаз	
tT-regs	FoxP3+ Helios+	ИЛ-10 ТРФ-β ИЛ-35	Супрессия функции ДК, Т-клеток. Поддержание толерантности к аутоантигенам	Онкозаболевания, иммунодефициты	$CD25^{hi}$, $CD127^-$ $CCR7^+$
pT-regs / iT-regs	$FoxP3^{+/--}$	ТРФ-β ИЛ-10			CD25+/– CD73+/–
Tr1 T-reg cells	$FoxP3^-$	ИЛ-10 ИЛ-15			CD49b Lag-3
Tfh	Bcl-6 STAT-3	ИЛ-21	Стимуляция продукции антител	Неизвестна	$CXCR5^+$ $CCR7^-$

В процессе жизненного цикла Т-клетки проходят путь от наивных Т-клеток к терминально-дифференцированным клеткам памяти. Данный процесс ассоциирован со сменой ряда маркеров дифференцировки на поверхности клеток: наивные Т-клетки ($CCR7^+$/CD62L+ $CD45RA^+CD45R0^-$) –> центральные Т-клетки памяти TCM ($CCR7^+$/$CD62L^+$ $CD45RA^-CD45R0^+$) –> эффекторные Т-клетки памяти – TEM (претерминально-дифференцированные: $CCR7^-$/$CD62L^-$ $CD45RA^-CD45R0^+$) –> терминально-дифференцированные Т-клетки – TEMRA ($CCR7^-$/$CD62L^-$ $CD45RA^+CD45R0^-$).

В то же время известны субпопуляции Т-клеток с нетипичным фенотипом маркеров дифференцировки, ассоциированные с рядом заболеваний. Так, Т-клетки, ассоциированные с воспалением (IRC – inflammation-related cells), имеющие фенотип $CD4^+CD45RB^+CD45RA^+CD62L^-$, выявляют при разнообразной аутоиммунной патологии, включая ревматоидный артрит. Имеется публикация, в которой показано, что у пациентов с остеоартритом также увеличено содержание данных клеток в периферической крови.

Среди $CD3^+CD8^+$ клеток периферической крови также выделяют различные минорные субпопуляции. Одна из наиболее важных субпопуляций – $CD8^+CD161^+$ Т-клетки. Такие лимфоциты экспрессируют хемокиновый рецептор CCR6, продуцируют провоспалительные цитокины ИЛ-17, ФНО-α и ИНФ-γ. Известно, что содержание клеток этой субпопуляции увеличено у пациентов с аутоиммунными заболеваниями (рассеянный склероз, ревматоидный артрит и др.).

1.2 Гамма-дельта Т-клетки

Субпопуляция $TCR\gamma\delta^+$ Т-лимфоцитов преимущественно локализована в слизистых оболочках и играет важную роль в защите слизистых от патогенов. $TCR\gamma\delta^+$ клетки существенно отличаются от Т-клеток с αβ-типом клеточного рецептора способностью связывать непептидные антигены без обязательной презентации вместе с молекулами МНС на поверхности АПК. Это позволяет TCRγδ-клеткам быстро реагировать на поступление патогенного микроорганизма. Помимо этого, γδТ-клетки слизистых экспрессируют

молекулу CD8 и обладают выраженной цитотоксической активностью. TCRγδ-клетки составляют в среднем 3–7% Т-клеток периферической крови. В отличие от TCRγδ клеток слизистых, γδТ-клетки крови характеризуются слабой экспрессией антигена CD8.

Интересно, что аналогично $CD8^+$ Т-регуляторным клеткам, предположительно идентифицирована субпопуляция $CD27^+CD25^{hi}$ $TCR\gamma\delta^+$ клеток, обладающая толерогенными свойствами.

Увеличение числа γδТ-клеток в периферической позволяет предположить наличие воспалительного процесса слизистых, в то же время их снижение показано при ряде хронических инфекций, в том числе при вирусных гепатитах В и С. В ряде работ показано увеличение числа циркулирующих γδТ-клеток в острую фазу инфекционного мононуклеоза. Установлено, что такие TCRγδ-клетки экспрессировали молекулы HLA-DR и CD38, но были негативны по маркерам TCS1, CD4 и CD8.

1.3 Т-регуляторные клетки – основные клетки периферической крови, выполняющие регуляторную функцию и опосредующие периферическую иммунологическую толерантность. Эти клетки способны подавлять аутоиммунные и аллергические реакции, отторжение трансплантата, но, вместе с тем, существенно уменьшают резервы противоопухолевого и противоинфекционного иммунитета.

Впервые Treg были описаны S. Sakaguchi с соавторами, как специализирующиеся на подавлении излишней активности иммунной системы $CD4^+CD25^+$ Т-клетки при исследовании аутоиммунных заболеваний у мышей. В 2001 году супрессорные свойства CD4+CD25+ Т-клеток были обнаружены и у человека, а в 2003 г. был описан ген, локализованный в хромосоме X – FOXP3 (forkhead box P3), который кодирует транскрипционный репрессор — белок скарфин, контролирует развитие и функционирование Treg клеток.

Показано, что мутации в гене FoxP3 приводят к гиперактивации Т-клеток и их агрессии против собственных аутоантигенов, кишечных бактерий или безвредных агентов окружающей среды, что приводит к аутоиммунным

заболеваниям, в частности, полиэндокринопатии, синдрому неспецифического воспаления кишечника, аллергии и т.д.

В настоящее время Т-регуляторные клетки классифицируют по происхождению следующим образом:

1) клетки тимического происхождения – thymic-derived T-regs – tT-regs (ранее их называли «natural» nT-regs;

2) Т-регуляторные клетки, функциональная активность которых сформирована в периферических лимфоидных органах под действием ряда факторов – peripheral-derived pT-regs.

3) Также выделяют inducible iT-regs, получаемые in vitro.

Естественные Т-регуляторные клетки дифференцируются из CD4-позитивных Т-клеток в тимусе в процессе негативной селекции, которая, как известно, необходима для предупреждения выхода на периферию Т-клеток, специфичных к аутоантигенам.

Негативная селекция является одним из механизмов центральной иммунологической толерантности и происходит как в кортикальной, так и в медуллярной зоне. В кортикальной зоне DP-тимоциты взаимодействуют с кортикальными эпителиальными клетками, несущими комплекс собственный антиген: ГКС. В медуллярной зоне CD4+ и CD8+ SP-тимоциты взаимодействуют с медуллярными эпителиальными клетками или макрофагами/дендритными клетками костно-мозгового происхождения, экспрессирующими комплекс собственный антиген: ГКС. При этом, тимоциты, чрезмерно активно взаимодействующие с собственными антигенами, подвергаются апоптозу. Слабое взаимодействие с аутоантигенами приводит к формированию традиционных Т-хелперов, а промежуточное по силе взаимодействие инициирует экспрессию FoxP3 и дифференцировку Т-клеток в Т-регуляторные.

Фенотипически Т-регуляторные клетки характеризуются наличием на мембране молекулы CD25 (α-цепь рецептора к ИЛ-2), экспрессируют транскрипционный фактор FoxP3. В 2006 году было показано, что Т-

регуляторные не экспрессируют молекулу CD127 (рецептор к ИЛ-7), что отличает Т-регуляторные клетки от активированных Т-клеток. Таким образом, фенотип Т-регуляторных клеток может быть представлен в виде $CD4^{+}CD25^{hi}CD127^{-}FoxP3^{+}$. Как можно было предполагать, Т-регуляторные клетки являются достаточно гетерогенной популяцией. В настоящее время идентифицированы многочисленные субпопуляции Т-регуляторных клеток, среди которых наибольшее значение придают субпопуляциям T-regs, относящимся к их дифференцированности: $CD197^{+}$ и $CD62L^{+}$ (маркеры хоуминга и миграции в лимоидные органы), CD45R0 (маркер клеток, прошедших антиген-зависимую дифференцировку), CD45RA (маркер клеток, не прошедших антиген-зависимую дифференцировку) Т-регуляторным клеткам. По экспрессии молекулы CD31 (PECAM-1) наивные Т-регуляторные клетки разделяют на тимически наивные CD31+ клетки и центральные наивные CD31– хелперы.

Иммуносупрессорные механизмы Т-регуляторных клеток реализуются как путем межклеточных взаимодействий, так и продукцией/секрецией ряда растворимых факторов. Среди основных, хорошо описанных в литературе молекул, экспрессированных на Т-регуляторных клетках и опосредующих иммуносупрессивную функцию, следует отметить:

1) CTLA-4 (CD152), взаимодействующие с молекулами семейства B7 на АПК и подавляющие антигенпредставление, костимуляцию и продукцию цитокинов;

2) галектины, в частности, галектин-9, который связывается с молекулой Tim-3 (CD366) на поверхности Т-клеток и инициирует апоптоз клетки-мишени;

3) молекула CD223 (Lag-3), которая при контакте с ГКС II класса приводит к снижению антигенпредставляющей функции АПК;

4) нейропилин-1 (CD304), конечный эффект взаимодейцствия также приводит к нарушению антигенпредставления.

Т-регуляторные клетки продуцируют спектр канонических иммуносупрессивных цитокинов, таких как TGF, IL-10, IL-35, которые

подавляют функцию эффекторных Т-клеток и АПК, связываясь с соответствующими рецепторами на поверхности. Показано. что Т-регуляторные клетки могут инициировать апоптоз клеток при помощи перфорин-гранзимового механизма, который является основным способом киллинга мишеней цитотоксическими Т-клетками и ЕК клетками. Важным свойством Т-регуляторных клеток является также опосредованное эктонуклеотидазами CD39/CD73 образование аденозина из АТФ, который подавляет активность эффекторных клеток, АПК, ЕК-клеток.

В то же время, помимо Т-клеток с провоспалительными и цитолитическими свойствами, идентифицированы $CD8^+$ Т-регуляторные клетки. Как полагают, их фенотип можно представить следующим образом: $CD3^+CD8^+CD161^-CD56^+$. Большая часть этих клеток экспрессирует молекулы CD45RA и CD62L и отличается отсутствием или слабой экспрессией таких маркеров, как CD45R0, CD25, CD27, CD28 и, вероятно, CCR7.

Также описаны двойные негативные регуляторные Т-клетки (DN Treg клетки), которые при наличии CD3 на поверхности, не экспрессируют молекулы CD4 и CD8. Иммунофенотип клеток включает такие маркеры, как CD25, LFA-1, CD69, CD30, CD62L и CTLA-4. Такие клетки продуцируют ИНФ-гамма, в то же время продукция ИЛ-4, ИЛ-10 довольно низка. DN Treg клетки подавляют иммунные реакции в условиях in vitro и in vivo, а экспериментальная терапия с использованием антигенспецифических DN Treg клеток предотвращает реакцию трансплантат против хозяина и диабет 1 типа у мышей.

Таким образом, можно подытожить, что Treg играют весьма важную роль в иммунном гомеостазе, а уменьшение содержания или недостаточность функции этих клеток может приводить к развитию аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз и другие демиелинизирующее заболевания ЦНС, сахарный диабет 1-го типа, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, псориаз.

В то же время, следует отметить, что нарушение функции Т-регуляторных может иметь место в патогенезе хронических инфекций и онкозаболеваний,

поскольку избыточное количество иммуносупрессивных факторов приводит к снижению результативности иммунного ответа и развитию заболевания.

Т-регуляторные клетки служат удобной мишенью при разработке новых путей индукции или отмены иммунологической толерантности к антигенам, а клетки, генерированные in vitro – в качестве терапевтического средства для лечения аутоиммунных заболеваний.

1.4 Истощенные Т-клетки

Истощенные Т-клетки развиваются в условиях постоянного воздействия антигена – опухолевых клеток или микроорганизма. Известно, что длительная стимуляция TCR-антигенами меняет профиль экспрессии генов в сторону клеток с утраченной функциональной активностью. Спектр поверхностных антигенов и профиль генов истощенных Т-клеток существенно отличается от наивных клеток, клеток памяти и активированных Т-лимфоцитов.

Явление истощения $CD8^+$ Т-клеток, впервые описанное в 1998 г. Awen Gallimore на мышиной модели хронической инфекции, вызванной вирусом лимфоцитарного хориоменингита, в настоящее время рассматривается как важнейшая характеристика хронических вирусных инфекций, включая ВИЧ, гепатит С и В. Истощенные Т-клетки экспрессируют различные коингибиторные рецепторы. Название «коингибиторные» получены потому, что их активация при получении Т-клеткой антигенного сигнала, приводит к подавлению пролиферации клеток, их функциональной активности, в том числе, продукции эффекторных цитокинов и снижению устойчивости к апоптозу.

К коингибиторным молекулам, экспрессия которых показана на истощенных Т-клетках, относят маркеры CD223 (LAG-3), Tim-3, CD279 (PD-1), CD244, CD160.

Доказано, что $CD4^+$ и $CD8^+$ истощенные Т-клетки экспрессируют различный спектр коингибиторных рецепторов. Так, экспрессия молекул CD244 и CD160 показана на истощенных $CD8^+$ Т-клетках, но отсутствовала на $CD4^+$ Т-лимфоцитах.

Среди всех коингибирующих молекул, важнейшая роль принадлежит белку PD-1 (programmed cell death 1). Это протеин был изначально обнаружен на линиях Т-клеток тимуса, в которых выявлено усиление экспрессии этого белка в ответ на стимуляцию проапоптотическими факторами. PD-1 (CD279) принадлежит к CD28-семейству иммунорецепторов и экспрессируется преимущественно активированными Т и В-клетками.

При взаимодействии PD-1 со своими лигандами – коингибиторными молекулами PD-L1 (CD274, B7-H1) или PD-L2 (CD273, B7-DC) происходит ингибирование ответа Т- и В-клеток на антигенную стимуляцию, преимущественно за счет активации тирозин фосфатазы SHP-2.

В эксперименте на мышах показано, что усиление экспрессии молекулы PD-1 является как раз тем самым механизмом, посредством которого нарушается функция $CD8^+$ клеток при хронических инфекциях. Также показано, что блокирование PD-1 способствует выздоровлению от хронических инфекций.

Ряд авторов выделяет отдельную популяцию клеток, функционально сходных с истощенными – так называемые, анергичные Т-клетки с фенотипом $CD3^+$ BTLA $(CD272)^+$. Такие клетки формируются при стимуляции TCR в отсутствие костимулирующих сигналов. Клетки функционально неактивны, не отвечают на дальнейшую стимуляцию, не продуцируют цитокины, в частности ИЛ-2.

В таблице 2 представлены основные костимулирующие и коингибирующие молекулы Т-клеток и АПК.

Многочисленными исследования установлена роль истощенных Т-клеток в иммунопатогенезе ВЭБ-инфекции (инфекционный мононуклеоз, синдром хронической усталости).

Таблица 2 – Костимуляторные и коингибирующие молекулы на АПК и Т-клетках

АПК	Т-клетка
Костимуляторные	
B7.1 (CD80), B7.2 (CD86)	CD28
CD40	CD40L
ICOS-L	ICOS
OX40L	OX40
4-1BBL	4-1BB
CD70	CD27
CD30	CD30L
GITRL	GITR
LIGHT	HVEM (TNFRSF14)
Tim-4	Tim-1
ICAM1 (CD54)	LFA1
LFA3	CD2
Коигибиторные	
B7	CTLA-4
PD-L1 (B7-H1)	PD-1
PD-L2 (B7-DC)	PD-1
B7-H2 (CD275), B7-H3 (CD276)	ICOS
B7-H6	NKp30
B7-H7	CD28H (CD337)
HVEM	CD272 (BTLA)
HVEM	CD160
CD85k (ILT3)	MHC class I
CD85d (ILT4)	MHC class I
CD48	CD244 (2B4)
MHC class II	LAG-3
галектин-9	TIM-3

Коингибиторные молекулы являются мишенью для разработки новых методов лечения онкозаболеваний, широко распространены терапевтические моноклональные антитела против молекулы PD-1, которые используют в лечении онкозаболеваний самой разной локализации.

1.5 Субпопуляции В-клеток

В-лимфоциты относят к АПК крови. При помощи В-клеточного рецептора распознают антигены, которые затем представляют Т-клеткам в составе с молекулой MHC II класса. Основные маркеры В-клеток: CD19, CD20, CD79a/b, IgM, IgD. Зрелые В-лимфоциты в равной степени экспрессируют молекулы CD19 и CD20.

По степени зрелости выделяют незрелые В-клетки ($CD10^{+}CD19^{+}CD20^{+}CD27^{-}CD38^{+}$), наивные ($CD10^{-}CD19^{+}CD20^{+}CD27^{-}CD38^{-}CD5^{+/-}IgD^{+}$), изотип-

непереключенные В-клетки памяти ($IgD^{+}CD27^{+}CD38^{low}CD5^{-}$), изотип-переключенные В-клетки памяти ($IgM^{-}IgD^{-}CD27^{+}CD38^{low}CD5^{-}$) и плазмобласты ($CD19^{+}CD20^{-}$ $CD27^{+}CD38^{high}$).

Одной из важнейших субпопуляций В-клеток являются $CD5^{+}$ В1-клетки. Основным свойство этих клеток является продукция (в том числе спонтанная) «естественных» низкоаффинных антител класса IgM. В1-клетки отвечают на Т-независимые антигены и могут презентировать антигены Т-клеткам. Увеличение количества В1-клеток в периферической крови выявляют при аутоиммунных заболеваниях (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, синдром Шегрена, аутоиммунный тиреоидит, сахарный диабет 1-го типа, неспецифический язвенный колит).

Также выделена отдельная субпопуляция В-клеток – так называемые Age-associated B-cells (ABC). Эти клетки экспрессируют интегрин CD11c, типичный для миелоидных клеток, причем количество ABC увеличивается с возрастом. Доказана ассоциация ABC с аутоиммунными заболеваниями.

Идентифицирована субпопуляция В-клеток, обладающая регуляторными свойствами – B10-клетки или B-regs. Эти клетки продуцируют ИЛ-10, характеризуются высокой экспрессией молекул CD1d и CD5.

1.6 Врожденные лимфоидные клетки

Врождённые лимфоидные клетки (ВЛК) - это лимфоциты, которые вовлечены в быстрое цитокин-зависимое реагирование организма во время воспалительного процесса. Они играют важную роль в иммунном ответе организма на внешние раздражители, а также регулируют процессы развития клеток приобретённого иммунитета. В отличии от "обычных" лимфоцитов у ВЛК отсутствуют антиген-специфичные рецепторы, они могут реагировать на широкий спектр воспалительных стимулов. Как и Т-хелперы, ВЛК имеют общего предшественника, охарактеризованного как клетка, экспрессирующая транскрипционный фактор - inhibitor of DNA binding 2 (ID2). Выделяют три группы ВЛК в зависимости от их функции и экспрессии воспалительных медиаторов. 1-ая группа ВЛК делит множество_характеристик

с естественными киллерами (ЕК), (Natural killer, NK cells). Также как и ЕК, 1-тип ВЛК экспрессирует интерферон-γ и нуждается в транскрипционном факторе T-bet для своего развития, но в отличие от ЕК, он не экспрессирует перфорин, гранзим B (granzyme B) и рецептор киллерных клеток (Killer-cell Ig-like receptor) и также активируется больше ИЛ-**7**, чем ИЛ-15. Высокое содержание 1-го типа ВЛК было обнаружено в кишечнике пациентов, страдающих болезнью Крона. 2-ая группа ВЛК имеет способность продуцировать ИЛ-13, ИЛ-5 и ИЛ -9. Впервые эта популяция клеток была описана в контексте антигельминтной реакции организма. Исследователи показали, что 2-ой тип ВЛК стимулирует эозинофилию и гиперплазию бокаловидных клеток, два важных процесса в антигельминтном ответе организма. Также, 2-ой тип ВЛК был обнаружен в лёгких и отмечают его роль в патофизиологии астмы. Для дифференциации во 2-ой тип ВЛК необходима активация таких транскрипторных факторов, как retinoic acid receptor–related orphan receptor (ROR) α и GATA3. 3-я группа ВЛК для своего развития также нуждается в GATA3 и ROR-γt. Эта группа делится на 3 подгруппы: 1) клетки, индуцирующие лимфоидную ткань (Lymphoid tissue inducer, LTi) , они необходимы для лимфоидного органогенеза и продуцируют ИЛ -17 и -22; 2) ИЛ-22 продуцирующие ВЛК (natural cytotoxicity receptor, NCR позитивные) учавствуют в защите организма от внешних патогенов; 3) ИЛ-17 продуцирующие ВЛК (NCR негативные) были обнаружены у пациентов, страдающих язвенным колитом, также существуют исследования, показывающие вовлечение этой группы клеток в патогенез астмы.

2. Клетки миелоидного происхождения

2.1. Субпопуляции моноцитов и макрофагов

Система мононуклеарных фагоцитов исторически подразделяется на моноциты, макрофаги и дендритные клетки. Несмотря на различия в антигенном профиле этих клеточных популяций, клетки, в целом, экспрессируют общий набор молекул, включая молекулы гистосовместимости,

костимуляторные и коингибиторные молекулы, паттерн-ассоциированные рецепторы, молекулы адгезии.

Моноциты периферической крови представляют собой транзиторную популяцию, восполняющую и замещающую тканевые макрофаги и дендритные клетки.

Моноциты не однородны, различаются по степени дифференцированности и могут быть разделены по характеру экспрессии молекул CD14 и CD16 на основные 3 субпопуляции: $CD14^{++}CD16^{-}$ классические, $CD14^{++}CD16^{+}$ промежуточные и $CD14^{dim}CD16^{++}$ неклассические (таблица 3).

«Классические» моноциты характеризуются высокой фагоцитарной активностью, высокой экспрессией рецепторов лектинового типа, выполняют антиапоптотическую функцию. «Неклассические» моноциты, в отличие от «классических», выполняют проапоптотическую и регуляторную функции. «Промежуточные» моноциты отличаются высокой продукцией ROS, способностью стимулировать пролиферацию Т-клеток, ангиогенез (Tie-2+).

Таблица 3 – Характеристика основных субпопуляций моноцитов

	Субпопуляция		
	«Классические» (classical)	«Промежуточные» (intermediate)	«Неклассические» (non-classical)
Основные маркеры	$CD14^{++}CD16^{--}$	$CD14^{++}CD16^{+}$	$CD14^{+}CD16^{++}$
Дополнит. маркеры (наличие экспрессии)	CD62L,CCR2, CLEC4D, CLEC5A, ИЛ–13Ra1, CXCR1, CXCR2	CD74, CD202B, CD105	CD43, SLAN, Siglec 10
Дополнит. маркеры (отсутствие экспрессии)	CX3CR1,P2RX1	CD62L, CXCR1, CXCR2, CLEC4D, ИЛ–13R1a	CCR5,CD62L,CXCR1, CXCR2, CD163, CLEC4D, ИЛ-13a1
Ответ на ЛПС	ИЛ-10, Г-КСФ, ИЛ-8, ИЛ-6, CCL2, RANTES	ИЛ-6, ИЛ-8	ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-α
Функциональные особенности	Высокая фагоцитарная активность, высокая экспрессия рецепторов лектинового типа, анти-апоптотическая фукция	Высокая продукция ROS, стимуляция пролиферации Т-клеток, ангиогенез ($Tie\text{-}2^{+}$), презентация антигенов	Проапоптотическая и регуляторная функция

В процессе жизненного цикла, классические моноциты, по всей видимости, дифференцируются в промежуточные и неклассические моноциты. $CD16^{+}$ моноциты в процессе воспалительного ответа рекрутируются в участки

воспаления и дифференцируются в дендритные клетки и макрофагоподобные клетки с эффекторными функциями процессинга и презентации антигенов.

После выхода в ткани моноциты в зависимости от химических сигналов локального микроокружения способны поляризоваться в макрофаги нескольких субпопуляций, различающихся по функциям. Среди макрофагов различают два основные типа: M1-провоспалительные (классические) и M2-противовоспалительные макрофаги (альтернативно активированные). M1-клетки характеризуются высоким уровнем продукции провоспалительных цитокинов, активных форм кислорода и азота, способны запускать Th1-иммунный ответ, вовлечены в противобактериальный и противоопухолевый иммунный ответ. В противоположность, M2-макрофаги обеспечивают контроль за паразитарными инвазиями, выполняют регулирующую функцию при естественном перестроении тканей (ремоделировании), стимулируют ангиогенез, репарацию тканей, способствуют формированию и росту опухолей.

Фенотипически M1- и M2-поляризованные макрофаги существенно отличаются. Так типичные маркеры M1-макрофагов: костимуляторные молекулы CD80 и CD40, хемокиновый рецептор CCR7, молекула LAMP-семейства CD68, HLA-DR, toll-like-рецепторы CD282 и CD284, Fcγ-рецептор CD64. M2-макрофаги экспрессируют молекулы MMR (CD206), DC-SIGN (CD209), CD200R, CD163, CD36, CD11b, B7-H4, B7-DC (CD273). Рецепторы CD16 и CD32 чаще описывают как маркеры M1-макрофагов, хотя могут экспрессироваться клетками, поляризованными и в M2-направлении в зависимости от использованных стимулов (ИЛ-4, ИЛ-10 или другие). Схожая ситуация с молекулами CD86 и CD274, которые также описываются как маркеры M1- и M2-клеток. Усиление экспрессии популяционного для макрофагов маркера CD14 описано как для M1, так и для M2-макрофагов.

В то же время, на наш взгляд, невозможно ожидать от макрофагов, степени дифференцировки, сходной с действием иммунотропных веществ в высокой, совершенно нефизиологической концентрации. Типичные M1- и M2-макрофаги, описанные в литературе, это, скорее, крайние варианты

функциональной активности клеток, достижимые только в условиях *ex vivo*. В реальности же, в разных органах и тканях под действием факторов микроокружения формируются своего рода промежуточные варианты, отличающиеся между собой экспрессией генов и, в конечном счете, поверхностных и внутриклеточных рецепторов и спектром продуцируемых цитокинов/ хемокинов.

В настоящее время дискутируется роль промежуточных и неклассических моноцитов при различных патологических состояниях. Так, увеличение доли неклассических и промежуточных моноцитов установлено у пациентов с сепсисом, ревматоидным артритом, тяжелым течением бронхиальной астмы.

2.2 Дендритные клетки крови

Дендритные клетки (ДК) крови – основные «профессиональные» антигенпредставляющие клетки, обеспечивающие инициацию и направленность адаптивного иммунного ответа. ДК широко представлены в тканях всех органов, но наибольшее их присутствие отмечается в коже и слизистых оболочках – органах, являющихся барьером между внешней и внутренней средами.

Выделяют две основные субпопуляции ДК человека, которые различаются происхождением, локализацией в органах и тканях, морфологией, фенотипом, спектром продуцируемых цитокинов и, соответственно, функцией: миелоидные ДК (мДК), имеющие миелоидное происхождение, и плазмацитоидные ДК (пДК), дифференцированные из лимфоидных клеток-предшественников.

Миелоидные дендритные клетки (CD11c+) происходят из общего миелоидного гемопоэтического предшественника и моноцитов крови, не экспрессируют популяционные «линейные» маркеры других клеток иммунной системы, таких как таких как CD14 (моноциты, макрофаги и нейтрофилы), CD3 (Т-лимфоциты), CD19, CD20 (В-лимфоциты), CD56, CD57 (естественные киллеры), CD66b (гранулоциты).

В свою очередь, выделяют две разновидности ДК миелоидного происхождения: 1) клетки Лангерганса, локализованные преимущественно в коже и слизистых оболочках пищеварительной системы, репродуктивного тракта и дыхательных путей; 2) интерстициальные ДК. Интерстициальные ДК расположены в соединительной ткани практически всех внутренних органов, таких как печень, легкие, почки, сердце, скелетные мышцы, щитовидная и поджелудочная железа и др., локализуясь вблизи кровеносных сосудов и нервных окончаний.

CD11c+ миелоидные ДК крови разделяют на 2 крупные субпопуляции: DC1, экспрессирующие молекулу CD1c (BDCA-1), и DC2 ДК, которые экспрессируют молекулы CD141 (BDCA-3) и, по всей видимости, CD370 (CLEC9A), и функционально схожи с $CD8^+$ ДК мышей. Помимо основных субпопуляций мДК ряд исследователей выделяют ДК, экспрессирующие молекулы CD16 («воспалительные»/inflammatory ДК), CD11c+ ДК, не экспрессирующие ни CD1c, ни CD141, ДК, экспрессирующие AXL и CD327 (SIGLEC6) и многие другие. В крови помимо моноцитов, которые сами по себе являются прогениторными клетками для ДК, идентифицирована также популяция общих предшественников ДК, характеризующихся экспрессией молекул CD100 и CD34.

ДК активно захватывают, процессируют и экспонируют на поверхности мембраны чужеродные антигены в комплексе с молекулами HLA I и II классов. Выполняемые ДК функции захвата антигена и его представления на мембране Т-клеток обусловливают широкий спектр поверхностных молекул, к которым относят паттерн-распознающие рецепторы, молекулы ГКС II класса, костимуляторные (CD40, CD80 и CD86) и коингибиторные (семейство B7) молекулы, молекулы клеточной адгезии, хемокиновые рецепторы (таблица 4).

Таблица 4 – Основные маркерные молекулы нативных и in vitro-генерированных ДК.

Функциональный класс молекул	Представители	Функция
Молекулы антигенпредставления	CD1a, CD1c	Структурный аналог молекул ГКС I класса, участвуют в презентации липидных антигенов
	HLA-DR	ГКС 2-го класса, участие в антигенпрезентации
Костимуляторные молекулы	CD80 (B7-1) CD86 (B7-2)	Рецепторы для молекул CD28 и CD152 (CTLA-4), участвуют в костимуляции Т-лимфоцитов
Коингибиторные молекулы	CD273 (B7-DC) CD274 (B7-H1) CD275 (B7-H2) CD276 (B7-H3)	Рецепторы для PD-1, ICOS - снижают пролиферативную активность Т-лимфоцитов
Молекулы адгезии	CD11b (интегрин αM)	Рецептор для фрагмента iC3b 3-го компонента комплемента, фибриногена, фактора X и ICAM-1
	CD11c (интегрин αX)	Рецептор для фибриногена, играет важную роль в адгезии и хемотаксисе лейкоцитов; связывается с ICAM-1 (CD54) на мембране других иммунокомпетентных клеток, служит рецептором для компонента iC3b системы комплемента.
	CD54 (ICAM-1)	молекула, опосредующая процессы межклеточной адгезии АПК и Т-лимфоцитов
	CD106 (VCAM-1)	Молекула клеточной адгезии (участвует в адгезии лейкоцитов и эндотелиальных клеток, передаче сигналов)
	CD83	Высокоспецифичный маркер зрелых ДК – молекулы, участвующей в процессах активации Т-лимфоцитов
Хемокиновые рецепторы	CD197 (CCR7)	Хемокиновый рецептор для лигандов CCL19 и CCL21
ППР	CD205 (DEC205)	Рецептор, отвечающий за распознавание и кросс-презентацию антигенов клеток, находящихся в апоптозе или некрозе
	CD209 (DC-SIGN)	Лектин типа С, связывается с ICAM-3, ICAM-2; активирует фагоцитоз, опосредует взаимодействие ДК с эндотелием, активацию Т-клеток, а также распознавание патогенных гаптенов
	CD206	Фагоцитоз и пиноцитоз маннозосодержащих молекул
	CD207 (лангерин)	Рецептор лектинового типа
	CD208 (DC-LAMP)	Участвует в процессировании экзогенных антигенов
	CD209 (DC-SIGN)	Паттерн-распознающий рецептор
Разное	CD123	α-субъединица рецептора к интерлейкину-3 – маркер пДК
	CD141	Рецептор тромбина

Плазмацитоидные ДК также разделяют на CD303 $(BDCA\text{-}2)^{+}$ и CD304 $(BDCA\text{-}4)^{+}$ клетки. Плазмацитоидные ДК играют важную роль в защите организма от вирусных инфекций, поскольку являются основными продуцентами ИНФ-α. В экспериментах ex vivo показана способность пДК продуцировать ИНФ-α под воздействием цельного вируса и вирусной ДНК. Подтверждено, что действие вируса и его нуклеиновых кислот опосредовано через TLR-9-рецептор.

Известно, что компоненты микроорганизмов активируют антигенпредставляющие клетки посредством взаимодействия с внутриклеточными и поверхностными паттерн-распознающими рецепторами (ПРР).

В настоящее время выделяют 5 основных групп ПРР: toll-like-рецепторы (TLRs), рецепторы лектинового типа (CLRs), NOD-рецепторы (NLRs), RIG-I-рецепторы (RLRs) и AIM2-подобные рецепторы (ALRs).

Важную роль в нормальном функционировании ДК играют TLR, распознающие большинство ПАМП. К настоящему времени известно 10 представителей этого семейства рецепторов у человека. Локализация TLR различна. Так, рецепторы, распознающие компоненты микробной стенки, такие как пептидогликан (TLR2), ЛПС (TLR4), флагеллин (TLR5) и липопептиды (гетеродимеры TLR1/TLR2 и TLR6/TLR2) экспрессируются на поверхности мембраны ДК. В то же время, рецепторы к нуклеиновым кислотам бактерий и вирусов расположены внутриклеточно, локализуясь на мембране эндоплазматического ретикулума и лизосом. Такие рецепторы распознают одноцепочечную РНК вирусов (TLR7 и TLR8), двухцепочечную вирусную РНК (TLR3), и CpG-содержащие олигонуклеотиды ДНК (TLR9). Как видно, ПРР обладают специфичностью в отношении компонентов бактерий и вирусов.

ЛПС из клеточной стенки грамм-отрицательных бактерий является, пожалуй, самым сильным из известных стимуляторов микробного происхождения, способных активировать клетки иммунной системы. Действие ЛПС опосредовано через рецептор, который состоит из TRL4 и двух корецепторов: MD-2 и CD14 – ЛПС-связывающего белка. ЛПС способен индуцировать синтез как провоспалительных (ИЛ-6, ИЛ-12 и др.), так и противовоспалительных (ИЛ-10) цитокинов и эффекторных субстанций, таких как оксид азота. ДК, не экспрессирующие CD14-молекулу на мембране, отвечают на стимуляцию ЛПС при наличии в питательной среде растворимой формы CD14-молекулы (sCD14). Эффект ЛПС также опосредуется CD91-молекулой из семейства скавенджер-рецепторов – «рецепторов для мусора»,

которая опосредует распознавание и захват поверхностных ЛПС грамотрицательных бактерий и липотейхоевых кислот грамположительных микроорганизмов.

TLR5 распознает флагеллин грамм-позитивных и грамм-негативных бактерий; активация этого рецептора, опосредованно через NF-κB вызывает усиление продукции ФНО-α ДК.

Бактериальная ДНК, содержащая неметилированные CpG-мотивы, оказывает стимулирующее действие на ИКК посредством взаимодействия с внутриклеточным TLR9. TRL9 распознает исключительно неметилированные ДНК последовательности, присутствующие в геноме бактерий, но не активируется метилированными участками ДНК генома высших животных. Такое избирательное распознавание предотвращает активацию клеток иммунной системы в ответ на собственную ДНК. Данный рецептор экспрессируется на В-лимфоцитах, моноцитах/макрофагах, и, особенно, на пДК. Экспрессия TRL-9 на мДК человека отрицается большинством исследователей. Действие CpG-мотивов на клетки иммунной системы включает продукцию интерферонов I типа (особенно ИНФ-α) и ИЛ-12, способствуя тем самым индукции иммунного ответа по Th1-типу. Среди всех ИКК TLR9 экспрессируется в наибольшей степени пДК, которые в ответ на стимуляцию CpG-содержащими олигонуклеотидами, продуцируют максимальное количество ИНФ-α.

При распознавании TLR своих лиганд активируются внутриклеточные сигнальные адаптерные белки MyD88/TIRAP и TRAM/TRIF. MyD88 является универсальной адапторной молекулой, так как используется для передачи сигнала всеми TRL за исключением TRL3. Адапторы передают активационный сигнал на различные серин-треониновые киназы, которые активируют транскрипционные ядерные факторы NF-κB, AP-1 и IRF-3, индуцирующие экспрессию генов-мишеней. TRAM/TRIF-опосредованный сигнальный путь используется TLR3, а TLR4 способен передавать сигнал через оба пути, чем и объясняется разнообразие влияния ЛПС на клетки иммунной системы.

В результате происходит экспрессия ряда генов, образование продуктов активации и созревания ДК. Эти процессы также ассоциируются с экспрессией мембранных дифференцировочных и костимуляторных молекул – CD40, CD80, CD83, CD86 и HLA-DR, а также активацией генов и последующей продукцией ряда цитокинов, таких как FNO-α, IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 и INF I класса.

Каждый подтип ДК обладает уникальным спектром TLR, определяющих клеточную чувствительность к тем или иным ППР. Несмотря на некоторые различия данных, полученных разными исследователями, выявлены следующие закономерности. Естественные миелоидные ДК экспрессируют все TLR, кроме TLR7 и TLR9. ПДК экспрессируют TLR7, TLR9 и незначительные уровни остальных TLR.

Вирусные РНК распознаются семейством цитоплазматических рецепторов, известных как RLRs, это RIG-1, MDA5 и LGP2. RLRs присутствуют в различных типах клеток, в том числе в миелоидных, эпителиальных клетках, фибробластах, клетках центральной нервной системы. RIG-I и MDA5 по своей природе являются хеликазами и связывают различные вирусы. Общим адаптерным белком для трех RLR- рецепторов является белок MAVS (митохондриальный противовирусный сигнальный белок). После распознавания вирусного генома, RIG-I и MDA5 претерпевают конформационные перестройки, перемещаются наружу митохондриальной мембраны, где через CARD-домен связываются и активируют MAVS, что в конечном итоге приводит к синтезу интерферона-β и запуску иммунного ответа. RIG-I и MDA5 способны распознавать вирусную РНК на основе их первичной и вторичной структуры, размера и структуры 5`-конца РНК, и по метилированным 5`-кэппированным участкам. RIG-I обнаруживает трифосфатные участки на 5`-конце одноцепочечной РНК и короткие двухцепочечные РНК, в то время как MDA5 детектирует более длинные dsRNA.

NOD-подобные рецепторы (NLR) также являются важными компонентами иммунного ответа. В настоящее время у человека описано 23 NLR-рецептора, самыми важными из которых являются NOD1 и NOD2. NOD1 распознает пептидогликаны грамотрицательных бактерий, в то время как NOD2 узнает мурамиловые дипептиды грамотрицательных и положительных бактерий. Экспрессия этих молекул отмечена на макрофагах, дендритных клеток. NOD-рецепторы взаимодействуют с 2`,5` - олигоаденилат синтазой второго типа (OAS2) и активируют рибонуклеазу L, которая расщепляет вирусную РНК. NLRP3-рецептор, кроме бактериальных структур может также распознавать вирусную РНК и вызывать иммунный ответ через адаптерный белок MAVS и интерлейкин-1β.

Помимо ПРР, активация ДК сопровождается значительным усилением экспрессии Fc-рецепторов, опосредующих фагоцитоз: к IgG (CD16, CD32 и CD64) и рецепторов к компонентам системы комплемента CR1 (CD35), C5aR1 (CD88).

Следует также отметить, что поскольку происходит одновременный захват как собственных, так и чужеродных антигенов, ДК выполняют сложную функцию распознавания опасного и неопасного сигнала. Внутриклеточные механизмы данного процесса изучены недостаточно, но именно благодаря этой функции ДК, становится возможным избежать развития аутоиммунного или хронического воспалительного процесса, ассоциированного с данным антигеном.

CD16 (FcγRIII) – это рецептор, который представляет собой олигодимерный комплекс, состоящий из α-цепи, связывающей Fc-фрагмент IgG, ζ-цепи, рецептора Т-клеток, и γ-цепи FcεRI, содержащий цитоплазматические активирующие мотивы иммунных рецепторов на основе тирозина (ITAM), необходимые для запуска клеточной активации. Активация CD16 на поверхности клеток естественных киллеров происходит в результате последовательного запуска киназного каскада и членов семейства Syk – Syk и ZAP70. Последующие сигнальные события включают фосфолирирование

тирозина и активацию фосфолипазы С γ1 и γ2, что сопровождается увеличением концентрации Ca^{2+} во внутриклеточном пространстве. Кроме ДК и естественных киллеров, обнаруживается также у провоспалительных моноцитов, нейтрофилов.

CD32 (FcγRII) – это низкоафинный рецептор IgG, который экспрессируется на поверхности ДК, В-клеток, нейтрофилов, моноцитов и макрофагов. Он связывает IgG1-4 типы иммуноглобулинов. Этот рецептор имеет 2 внеклеточных Ig-подобных домена – С-терминальный для связывания Fc-фрагмента IgG, трансмембранный домен, и длинный цитоплазматический хвост, состоящий из 76 аминокислот, который содержит 2 YxxL последовательности, разделенных спейсерным участком из 12 аминокислот, что все вместе составляет единый ITAM-мотив. После распознавания и связывания IgG, рецептор группируется и перемещается в липидный слой. Взаимодействие ITAM-участка с киназами Syk и Scr семейств, которые располагаются преимущественно в липидном слое, приводит к фосфорилированию и влечет за собой такие эффекты, как актин-цитоскелетные перестройки, инициирование кислородного взрыва, увеличение концентрации кальция, эндоцитоз и деградацию рецепторов.

CD64 (FcγRI) – это единственный высокоафинный Fcγ-рецептор, который может связывать мономеры IgG. Этот рецептор отличается от остальных Fcγ-рецепторов тем, что имеет в своей структуре 3 внеклеточных Ig-подобных домена. Он был обнаружен на поверхности моноцитов, макрофагов, дендритных клеток и активированных нейтрофилов.

Несмотря на активный захват патогенов, незрелые ДК не способны активировать Т-клетки, что обусловлено низким уровнем процессинга антигена, а также невысокой экспрессией молекул ГКС и костимуляторных молекул. Выполнение ДК антигенпредставляющей функции начинается лишь с созреванием клетки.

Созревание ДК протекает в два этапа: первый – в очаге воспаления, второй – в Т-клеточных зонах вторичных лимфоидных органов. Созревание ДК – это

сложный процесс, сопровождающийся перестройкой всех клеточных функций. Его суть сводится к падению антигенпоглощающей и к повышению антигенпредставляющей и костимуляторной способности ДК. Процесс созревания запускается только в условиях развития инфекционного процесса, разрушения тканей и воспаления. Основными индукторами созревания ДК в очаге воспаления являются следующие факторы: 1) вещества микробного происхождения, являющиеся лигандами TLR, компоненты клеточной стенки (пептидогликан, ЛПС, липопротеины), бактериальная ДНК, содержащая неметилированные CpG-олигонуклеотиды, одно- и двухцепочечная вирусная РНК; 2) продукты некроза тканей, такие как белки теплового шока и нуклеиновые кислоты; 3) провоспалительные цитокины (FNO-α, IL-1β и IL-6), компоненты системы комплемента.

Процесс созревания ДК характеризуется следующим: 1) снижается экспрессия антиген-распознающих рецепторов; 2) кратковременно усиливаются, а затем полностью прекращаются макропиноцитоз, фагоцитоз и иное поглощение антигенов; 3) повышается активность лизосомальных ферментов и иммунопротеасом, осуществляющих процессинг антигенов; 4) повышается поверхностная экспрессия молекул ГКС I и II классов, усиливается антигенпредставление; 5) повышается экспрессия молекул костимуляции; 6) повышается экспрессия молекул CD83, CD208, CMRF-44 и CMRF-56, которые являются маркерами зрелых ДК; 7) индуцируется экспрессия иммунорегуляторных цитокинов (IL-lβ, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, FNO-α и др.); 8) изменяется морфология ДК: увеличивается количество крупных и мелких отростков, которые увеличивают площадь контакта ДК с Т-клетками; 9) увеличивается подвижность ДК, снижается их адгезивность к пластику и биологическим субстратам.

После захвата антигена под влиянием хемотаксических факторов незрелая ДК по афферентным лимфатическим сосудам мигрирует в лимфатическую ткань вторичных лимфоидных органов, где цитокины и иные факторы микроокружения стимулируют дальнейший процесс созревания ДК.

В процессе созревания на ДК значительно снижается экспрессия рецепторов к хемокинам воспаления, в частности CCR6. В то же время усиливается экспрессия CCR7, лигандами которого являются хемокины CCL19 и CCL21, продуцируемые клетками стромы в Т-клеточных зонах вторичных лимфоидных органов и эндотелиоцитами сосудов в очагах воспаления. В результате зрелые ДК мигрируют по афферентым лимфатическим сосудам во вторичные лимфоидные органы. Разные типы ДК по-разному экспрессируют рецепторы к хемокинам. Экспрессия рецепторов CCR1, CCR5 и CCR7, лигандами которых являются CCL3, CCL4 и CCL5, показана на миелоидных ДК. ПДК экспрессируют CXCR4 и CCR2 (лиганды CXCL12 и CCL2). МДК избирательно продуцируют хемокины CCL17 и CCL22, рецептором для которых является CCR4, в то время как пДК их практически не экспрессируют. Продукция провоспалительного хемокина CCL3 (монокина) показана только в отношении пДК, а CCL4 и CXCL8 (ИЛ-8) секретируются клетками обеих типов. Продукция лигандов рецептора CCR4 миелоидными ДК определяет их способность привлекать в места воспаления регуляторные Th2-клетки, а секреция лигандов CCR1/CCR5 пДК – Th1-лимфоциты.

ДК приобретают способность активировать Т-клетки на последней, зрелой стадии дифференцировки. Зрелые ДК осуществляют процессинг и презентацию антигена наивным Т-лимфоцитам в комплексе с молекулой ГКС II класса на своей мембране, экспрессируют костимуляторные молекулы CD80 и CD86, TLR 1-8 типов, специфический маркер зрелых ДК – молекулу CD83, секретируют широкий спектр цитокинов (ИЛ 6, 8, 10, 12, 18, 23, ФНО-α).

Взаимодействуя с Т-хелперами, ДК представляют три активационных сигнала. Антигенспецифический сигнал – взаимодействие антигенного пептида в комплексе с молекулой ГКС II класса на поверхности ДК с комплексом TCR/CD3/CD4 на поверхности Т-хелпера. Костимуляторный сигнал – взаимодействие молекул CD80 и CD86 на поверхности ДК с молекулой CD28 на поверхности Т-хелпера, необходимый для индукции пролиферации Т-

клеток. Третий сигнал, опосредованный цитокиновым микроокружением, который определяет дифференцировку Т-хелперов.

Следует особо выделить взаимодействие молекул CD40 и CD40L. Известно, что CD40-молекула является членом суперсемейства рецепторов к ФНО, представлена на всех АПК, включая ДК, В-лимфоциты, моноциты, макрофаги, а также на эндотелиальных и эпителиальных клетках. CD40L – это ФНО-подобная молекула, которая экспрессирована преимущественно на активированных $CD4^+$ Т-лимфоцитах, а также присутствует в виде растворимой формы (sCD40L). Взаимодействие между парой CD40 – CD40L приводит к созреванию и активации ДК.

ДК способны эффективно активировать наивные Т-клетки, и индуцировать тем самым первичный адаптивный ответ. ДК являются сильными стимуляторами первичного и вторичного иммунного ответа. Известно, что ДК являются единственными АПК, способными презентировать наивным Т-клеткам неизвестные антигены. Их стимулирующий эффект на Т-клетки при этом сохраняется значительно дольше, чем у других АПК, таких как макрофаги и В-лимфоциты. Помимо этого, стимулирующее влияние на Т-лимфоциты, оказываемое ДК в 10-100 раз сильнее, по сравнению с другими АПК, а количество антигена, необходимое для стимулирования Т-клеток, в 5-10 раз ниже. Показано, что каждая ДК взаимодействует с 5000 Т-лимфоцитами в течение одного часа. Такими образом, ДК играют роль связующего звена между врожденным и приобретенным иммунитетом.

Индукция первичного Т-клеточного ответа — основная функция ДК. В ходе первичного иммунного ответа наивные Т-хелперы могут дифференцироваться в эффекторные клетки как Th1-типа, так и Th2-типа. Установлено, что дифференцировка Т-хелперов типа 1 происходит в следующих условиях: 1) при активации большого количества TCR, чему способствует высокая плотность антигенных пептидов, представляемых на поверхности ДК, и высоком соотношении ДК и Т-клеток (1:10 и выше); 2) при продукции ДК провоспалительных цитокинов (IL-12, IL-23, IL-18 и IL-27, INF I

типа, при этом основным Thl-дифференцировочным сигналом является IL-12p70 и сходный с ним цитокин IL-23). Индукции Th2-дифференцировки способствуют: 1) активация небольшого количества TCR, что имеет место при низкой плотности антигенных пептидов на поверхности ДК и низком соотношении ДК и Т-клеток (1:300 и ниже); 2) экспрессии OX-40L (CD252) – поверхностной молекулы, принадлежащей к суперсемейству ФНО; 3) присутствие IL-4 и IL-10 в момент активации Т-клеток. Таким образом, тип дифференцировки Т-хелперов определяется как силой антигенспецифического сигнала, так и наличием специализированного «цитокинового» сигнала, исходящего от ДК. В то же время известно, что все подтипы ДК человека обладают функциональной пластичностью.

С учетом того, что именно ДК являются ключевыми клетками в инициации иммунного ответа, нарушение их функции может рассматриваться в качестве возможной причины возникновения и неблагоприятного течения онкологических и хронических инфекционных заболеваний.

В то же время, ДК сами являются средством для лечения заболеваний, где необходима стимуляция или подавление иммунного ответа против определенного антигена. Суть клеточной иммунотерапии заключается в получении дендритных клеток в лабораторных условиях из аутологичных (собственных) моноцитов или стволовых клеток пациента, их праймировании антигенами опухоли и реинфузии пациенту. Таким образом, пациент получает собственные клетки, которые уже «обучены» стимулировать лимфоциты бороться с опухолью. Клинические исследования в направлении использования дендритных клеток в клинической практике с целью лечения злокачественных новообразований проводятся в ведущих медицинских центрах мира с конца 90-х годов прошлого века. Результаты многих проведенных клинических исследований обнадеживающие, показана безопасность применения дендритных клеток, активация иммунной системы в ответ на проводимую терапию и неплохой клинический эффект. Так, например, убедительные доказательства безопасности и эффективности лечения рака простаты при

помощи ДК, показанные на 512 пациентах, позволило Управлению по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов (FDA) США в 2010 г. одобрить использование ДК для лечения пациентов с данным заболеванием.

С конца 90-ых годов прошлого столетия ведется активное изучение ДК в свете выполнения ими толерогенной функции и участия в формировании периферической толерантности к антигенам. Известно, что ДК, праймированные антигеном и подвергнутые инкубации с иммуносупрессивными веществами, приобретают свойство подавлять иммунный ответ против данного антигена. Проводятся исследования, направленные на разработку методов лечения и профилактики СД 1 типа, рассеянного склероза, ревматоидного артрита и других аутоиммунных заболеваний.

Таким образом, биомедицинские клеточные продукты на основе МСК ОВ и МСК-индуцированных ДК в перспективе могут применяться в клеточной терапии иммунных заболеваний. Важным преимуществом применения толерогенных ДК будет возможность подавления пролиферации Т-клеток, специфичных к конкретному причинному антигену(антигенам), чего невозможно достичь на сегодняшний день другими известными способами.

2.3 Миелоидные супрессорные клетки представляют собой крайне гетерогенную популяцию активированных незрелых клеток миелоидного происхождения, которая обладает способностью подавлять эффекторный иммунный ответ.

У мышей описано 2 субпопуляции МЛСК: гранулоцитарные МЛСК (Г-МЛСК) – $CD11b^{+}Gr\text{-}1^{high}$ или $CD11b^{+}Ly\text{-}6G^{+}Ly6C^{low}$ и моноцитарные (М-МЛСК) – $CD11b^{+}Gr\text{-}1^{low}$ или $CD11b^{+}Ly\text{-}6G^{-}Ly6C^{high}$.

МЛСК человека также имеют моноцитарное либо гранулоцитарное происхождение. Известно, что Г-МЛСК являются незрелыми миелоидными клетками, не несущими популяционных маркеров зрелых гранулоцитов и молекул II класса ГКС, но экспрессирующими молекулы CD11b, CD33/CD15.

Наиболее часто иммунофенотип Г-МЛСК описывают как $Lin^{-}HLA\text{-}DR^{-}CD33^{+}CD11b^{+}CD15^{+}$, а иммунофенотип М-МЛСК как $Lin^{-}HLA\text{-}DR^{-}CD14^{+}$.

В то же время, ряд авторов под МЛСК понимает $CD33^{+}HLA\text{-}DR^{-}$ клетки, под Г-МЛСК – $CD66b^{+}/CD33^{int}/HLA\text{-}DR^{-}$ клетки, а под М-МЛСК – $CD33^{+}/CD14^{+}/HLA\text{-}DR^{low}$ клетки, причем этот список можно было бы существенно пополнить. В некоторых исследованиях авторами была предпринята попытка идентифицировать МЛСК как $CD11b^{+}VEGFR1^{+}CD66b^{+}CD62L^{lo/neg}CD16^{lo/neg}$ или $CD33^{+}HLA\text{-}DR^{low}HIF1\alpha^{+}/STAT3^{+}$ и $CD11b^{+}HLA\text{-}DR^{low}C/EBP\beta^{+}$ клетки. Тем не менее, такая классификация до сих пор не получила широкого распространения и несмотря на многочисленные исследования, популяция МЛСК продолжает оставаться относительно слабо охарактеризованной.

К настоящему времени накоплена информация о роли МЛСК в иммунопатогенезе рака. Показано значительное увеличение доли МЛСК у пациентов, страдающих раком разной локализации, преимущественно на поздних стадиях болезни. Так, у пациентов, страдающих раком поджелудочной железы, показано существенное увеличение числа циркулирующих и инфильтрирующих опухоль $Lin^{-}HLA\text{-}DR^{-}CD33^{+}CD11b^{+}CD15^{+}$ Г-МЛСК и $Lin^{-}HLA\text{-}DR^{-}CD14^{+}$ М-МЛСК в сравнении со здоровыми добровольцами и пациентами с хроническим панкреатитом.

У пациентов, страдающих раком почки, толстого кишечника и легких выявлено увеличенное количество Г-МЛСК в периферической крови, в то время как увеличение числа М-МЛСК показано у пациентов, страдающих меланомой, раком простаты, гепатоцеллюлярной карциномой. Показано, что число М-МЛСК у пациентов с раком мочевого пузыря коррелировало с размером опухоли и клинической стадией злокачественного процесса, с наличием отдаленных метастатазов и отсутствием ответа на химиотерапию у пациентов с немелкоклеточным раком легкого.

В экспериментах ex vivo установлено, что $CD14^{-}HLA\text{-}DR^{-/low}$ клетки, выделенные из периферической крови пациентов с гепатоцеллюлярной

карциномой, при сокультивировании с аутологичными Т-клетками индуцируют дифференцировку $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Т-регуляторных клеток, ингибируют пролиферацию Т-клеток и продукцию ими ИНФ-γ. Также известно, что Г-МЛСК обладают более выраженным супрессивным потенциалом в сравнении с М-МЛСК.

Продемонстрирована возможность индукции МЛСК из мононуклеарных клеток периферической крови путем сокультивирования последних с иммортализированными линиями клеток 4-998, SCCL-MT1 и HNSCC. Также показана возможность получения МЛСК из моноцитов культивированием с линиями клеток, полученными от пациентов с глиомами – U87 и U251, в сравнении с первичными культурами астроцитов человека. Полученные клетки продуцировали ИЛ-10, ТРФ-β, отличались усиленной экспрессией молекул CD80, сниженной фагоцитарной активностью и возросшей способностью индуцировать апоптоз Т-клеток. Теми же авторами в исследованиях были апробированы различные смеси цитокинов на предмет возможного использования для генерации МЛСК ex vivo. Установлено, что $CD33^+$ клетки с выраженной иммуносупрессивной активностью генерируются при помощи культивирования в смеси ГМ-КСФ и ИЛ-6, а также с цитокиновым коктейлем, включающим ГМ-КСФ, ИЛ-1β, PGE_2, ФНО-α/VEGF. Фенотипически полученные супрессорные клетки отличались высокой экспрессией молекул CD11b, CD66b, низкой – HLA-DR, и умеренной степенью экспрессии молекулы ИЛ-13Rα2. Клетки характеризовались высокой экспрессией мРНК генов iNOS, ТРФβ, VEGF и NOX2. Считают, что иммуносупрессивная активность МЛСК в отношении Т-клеток ассоциирована с метаболизмом L-аргинина. L-аргинин служит субстратом для двух ферментов: 1) iNOS, который генерирует оксид азота, способный вызвать анергию Т-клеток и снижение экспрессии ими молекул HLA-DR, и 2) Arg-1, который метаболизирует аргинин до мочевины и L-орнитина. Другим механизмом, посредством которого МЛСК супрессируют иммунный ответ, является высокая продукция этими клетками свободных радикалов кислорода (ROS), которые индуцируют повреждение ДНК

иммунокомпетентных клеток, замедляют дифференцировку моноцитов в ДК, нарушают взаимодействие MHC – TCR путем прямого воздействия на Т-клеточный рецептор.

Также установлена способность МЛСК индуцировать дифференцировку Т-регуляторных клеток путем взаимодействия CD80 и CTLA-4, продукции ИЛ-10, ингибирования пролиферации Т-клеток. Показано, что МЛСК могут представлять антигены $CD8^+$ Т-клеткам, снижать экспрессию последними L-селектина, при этом индуцируя супрессию иммунного ответа. Также установлено, что одним из механизмов формирования анергии Т-клеток МЛСК является взаимодействие CD279 (PD-1) и CD274 (B7-H1, PD-1L). Кроме того, установлено, что М-МЛСК слабо экспрессируют молекулы CD86 и CD16 в сравнении с $HLA\text{-}DR^+$ моноцитами.

Анализ числа МЛСК периферической крови показал, что их количество увеличивается с возрастом. Ряд экспериментов указывают на позитивную роль МЛСК в формировании иммунологической толерантности. Учитывая выявленную способность МЛСК подавлять пролиферацию и вызывать анергию Т-клеток, в том числе $CD8^+$ лимфоцитов, стимулировать формирование Т-регуляторных клеток, ингибировать функциональную активность АПК, в последние годы предположено, что МЛСК играют важную роль в хронизации вирусных инфекций. Так, в ряде работ дискутируется роль МЛСК в патогенезе хронического гепатита С. Показано, что $CD33^+$ клетки после культивирования с гепатоцитами, зараженными HCV или HCV core-белком, приобрели иммунофенотип характерный для МЛСК – $CD14^+CD11b^{+/low}HLA\text{-}DR^{-/low}$ и отличались способность подавлять активацию Т-клеток. Показано увеличение числа МЛСК у пациентов с Ходжкинской лимфомой, ассоциированной с ВЭБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Murphy, K. Janeway’s immunobiology / K. Murphy, C. Weaver. – 9th ed. – New York : Garland Science, 2016. – 924 p.
2. Ratcliffe, M. J. H. Encyclopedia of Immunobiology / M. J. H. Ratcliffe. – New York : Elsevier, 2016. – 3126 p.
3. Sampson, H. A. Allergy and Clinical Immunology / H. A. Sampson. – New York : John Wiley & Sons, 2015. – 480 p.
4. Immunology / D. Male [et al.]. – 8th ed. – New York : Elsevier, 2012. – 482 p.
5. Macey, M. G. Flow Cytometry Principles and Applications / M. G. Macey. – New York : Hunama press, 2007. – 294 p.

Учебное издание

МАСЛОВА Людмила Вячеславовна
ГОНЧАРОВ Андрей Евгеньевич

МИНОРНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК КРОВИ

Учебно-методическое пособие

В авторской редакции

Подписано в печать 20. 12. 2017. Формат 60x84/16. Бумага «Discovery».
Печать ризография. Гарнитура «Times New Roman».
Печ. л. 1,87. Уч.- изд. л. 1,43. Тираж 100 экз. Заказ 23.
Издатель и полиграфическое исполнение –
Белорусская медицинская академия последипломного образования.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/136 от 08.01.2014.
220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3.