

Изменение фенотипа лимфоцитов при неиммунодефицитных патологиях

Пичугина Л.В.

ЗАО БиоХимМак

Иммунокомпетентные клетки реагируют на протекающие в организме процессы (воспаление, колебания гормонального фона, стресс и др.) путем изменения степени экспрессии, появления или исчезновения поверхностных или внутриклеточных функциональных молекул. Таким образом клетка приспосабливается к сложившимся условиям, стремясь наиболее эффективно выполнять присущие ей регуляторные или эффекторные функции.

В настоящее время фенотипирование лимфоцитов имеет диагностическое значение при первичных и приобретенных иммунодефицитах и лимфопролиферативных заболеваниях. Для иммунодефицитов и лимфопролиферативных патологий уже довольно четко сформулированы диагностические критерии и фенотипические особенности клеток. Исследование поверхностных маркеров лимфоцитов при заболеваниях, не связанных с классифицированными иммунодефицитами или онкогематологией, не является диагностически значимым, однако позволяет оценивать распространенность, тяжесть заболевания и патогенетические особенности воспалительного процесса, прогнозировать развитие патологии.

T-хелперы (CD3⁺ CD4⁺) и цитотоксические T-клетки (CD3⁺CD8⁺)

Оценка CD3, CD4 и CD8 T-клеток наиболее широко распространена в практике лабораторий, проводящих фенотипирование лимфоцитов. Эти маркеры являются диагностически значимыми при первичных иммунодефицитах и СПИД. Многие заболевания, не связанные с классифицированными иммунодефицитами, также могут отражаться на содержании этих клеток в периферической крови. Динамика изменения абсолютного и относительного количества CD3, CD4 и CD8 клеток при некоторых патологиях может представлять ценность для контроля эффекта терапии и прогноза развития заболевания.

Физиологическая вариабельность, влияние образа жизни и лекарственных препаратов на содержание основных субпопуляций T-лимфоцитов в периферической крови человека

При оценке CD3, CD4 и CD8-клеток нужно учитывать, что численность популяций может зависеть от пола, возраста, этнической принадлежности, физического и физиологического стресса, лекарственных препаратов [9].

Отмечено, что процент CD4-лимфоцитов у женщин несколько выше, чем у мужчин, также как и отношение CD4:CD8. С возрастом отмечают повышение соотношения CD4:CD8 за счет увеличения CD4. После 20 летнего возраста этот показатель увеличивается на 0,09 отн.ед. каждые 10 лет. У 10% людей старше 70 лет соотношение CD4:CD8 выше общепринятой нормы [10].

Существуют некоторые расовые и национальные особенности экспрессии молекулы CD4. Так, соотношение CD4/CD8 у японцев ниже, чем у европейцев за счет повышенного уровня CD8⁺ клеток [11]. Среди негроидов и азиатов встречаются индивидуумы с полиморфизмом или полным/частичным отсутствием одного из эпитопов CD4 – ОКТ4 [12–15] или Leu-3a [16].

Изменения абсолютного количества лимфоцитов и отдельных субклассов CD4⁺ и CD8⁺ могут быть обусловлены сезонными ритмами, но при этом не отмечают значительных колебаний иммунорегуляторного индекса (ИРИ, соотношение CD4:CD8) и количества CD3 [17].

Отмечают также влияние суточных ритмов на соотношение CD4:CD8. Наиболее низкие значения наблюдаются в 12.30 с постепенным повышением до максимума в 20.30. Количество CD3 достигает своего максимума несколько позже – в 4.30 [18, 19]. Рекомендуется проводить исследование субпопуляций лимфоцитов на образцах крови, взятых в одно и то же время дня, особенно при исследовании динамики показателей [9].

Психологический стресс с повышением частоты сердечных сокращений и артериального давления, не влияющий на уровень кортизола и катехоламинов в сыворотке

крови, не отражается на абсолютном количестве субклассов Т-лимфоцитов. Физический стресс, вызывающий повышение частоты сердечных сокращений, артериального давления, адреналина и норадреналина в сыворотке крови, приводит к повышению абсолютного количества CD8 и снижению иммунорегуляторного индекса [20].

Курение вызывает повышение общего количества лейкоцитов, и, в частности CD4⁺ клеток, как у мужчин, так и у женщин. Алкоголь повышает количество лимфоцитов, но не меняет соотношения субпопуляций. Регулярное применение героина вызывает повышение количества Т-хелперов [21].

Лекарственные препараты, такие как зидовудин, цефалоспорины, цитостатики, никотин, стероидные препараты могут влиять на субпопуляционный состав лимфоцитов [9]. Так, глюкокортикоиды вызывают значительное снижение количества CD4 и CD8-клеток в периферической крови [22]. У пациентов с инсулинозависимым сахарным диабетом в зависимости от происхождения применяемого ими препарата инсулина может наблюдаться различная картина распределения субпопуляций лимфоцитов: человеческий инсулин значительно снижает содержание CD4⁺ и CD8⁺, а применение свиного инсулина, напротив, приводит к повышению относительного содержания CD4⁺ и CD8⁺ по сравнению с исходным уровнем [23].

При беременности также происходят изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов. В первых двух триместрах беременности наблюдается снижение абсолютного количества Т-хелперов, при этом относительное количество не меняется. Этот показатель нормализуется к третьему триместру [21].

Содержание основных субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови человека при неиммунодефицитных патологиях

Различные инфекции могут вызывать транзиторные изменения численности подклассов Т-лимфоцитов. В таблице 1 представлены изменения соотношения основных субпопуляций при инфекциях.

В целом, сложно сформулировать общие правила изменения субпопуляционного состава при инфекционных заболеваниях. Обобщая имеющиеся в современной литературе данные можно отметить, что острые/хронические вирусные инфекции чаще сопровождаются уменьшением ИРИ за счет повышения количества CD8 и/или снижения CD4 [таблица 1]. При бактериальных инфекциях могут наблюдаться различные варианты изменения субпопуляционного состава, т.к. тип иммунного ответа зависит от свойств инфекционного агента, его локализации (внутриклеточная, внеклеточная) [4], а также наличия сопутствующих инфекций и заболеваний.

Наличие неинфекционных заболеваний также может отражаться на численности субпопуляций. Отмечено значительное снижение ИРИ у пациентов с острым инфарктом миокарда в течение 3-х и более дней после инфаркта ($0,83 \pm 0,43$, контрольная группа – $2,12 \pm 1,13$) [24]. В периферической крови женщин с III-IV степенью эндометриоза обнаружено достоверное снижение общего количества Т-лимфоцитов, у женщин с I-II степенью эндометриоза наблюдалось снижение содержания клеток CD8⁺ фенотипа [41].

При заболеваниях, связанных с аутоиммунными процессами, таких как рассеянный склероз, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, синдром Шегрена, наблюдается снижение CD4⁺ клеток [21]. Есть данные и о повышении количества CD4⁺ клеток почти у половины пациентов с рассеянным склерозом [1]. При псориазе, болезни Бехчета наблюдается снижение количества Т-хелперов [1]. При целиакии у взрослых наблюдается снижение абсолютного количества основных субпопуляций лимфоцитов, однако относительное их количество существенно не изменяется [42].

При atopической бронхиальной астме может наблюдаться снижение количества CD4⁺ или CD8⁺ клеток [1], но есть также данные, свидетельствующие, что atopическая бронхиальная астма не связана с дисбалансом CD4⁺ и CD8⁺ клеток [43].

У пациентов с онкологическими заболеваниями может наблюдаться снижение количества CD4⁺ вне зависимости от проведения химиотерапии [21].

Естественные киллеры – NK-клетки (CD3⁻CD16⁺CD56⁺)

NK-клетки представляют собой особую популяцию больших гранулярных лимфоцитов. Эти клетки способны лизировать клетки-мишени, инфицированные вирусами и другими внутриклеточными агентами, мутировавшие опухолевые клетки, а также любые другие клетки аллогенного или ксеногенного происхождения. Литическая активность NK-клеток проявляется при первичном контакте без предварительной сенсibilизации, в отличие от Т-клеток [8].

В периферической крови NK-клетки составляют от 5 до 20% циркулирующих лимфоцитов [45]. Зрелые циркулирующие NK-клетки имеют фенотип CD3⁻CD16⁺CD56⁺ и отличаются от Т-клеток отсутствием Т-клеточного рецептора. Активированные NK могут нести на своей поверхности CD25, HLA-DR, интегрин, CD69, трансферинный рецептор CD71, NK-рецепторы. Не обязательно присутствие всех маркеров. Среди NK-клеток встречаются подклассы CD16⁺CD56⁻

и CD16⁻CD56⁺ [46]. NK-клетки экспрессируют также альфа-цепь CD8, но в меньшей степени, чем Т-цитотоксические [47]. Функция CD8 на NK-клетках не ясна, однако известно, что при связывании CD8 с растворимой формой МНС-I, присутствующей в сыворотке человека, запускается апоптоз NK-клеток. Возможно, это один из путей регуляции цитолитической активности NK-клеток [48].

CD16 – мембранный низкоаффинный IgG-рецептор III типа. Эта молекула участвует в антителозависимой клеточной цитотоксичности, осуществляемой NK. Степень экспрессии CD16 может отражать функциональную активность NK-клеток. Различают NK клетки с высокой и низкой экспрессией CD16 – CD16^{bright} и CD16^{dim} и негативные по CD16 – CD16^{neg}. Последние обладают низкой цитолитической активностью по отношению

Таблица 1. Субпопуляции Т-лимфоцитов при инфекционных заболеваниях у ВИЧ-негативных индивидуумов (Laurence, 1993 [9], дополненная)

Заболевание	Кол-во пациентов [источник литературы]	CD4, кл/мкл, M±sd	CD8, кл/мкл, M±sd	Достоверность различий по сравнению с контрольной группой (p<0,05)
Бактериальные инфекции				
Инфекции мягких тканей	53 [25]	837±519	491±353	НД
Пиелонефрит	16 [25]	628±541	363±302	НД
Сепсис	30 [25]	669±400	382±264	Д ↓ CD4
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	26 [26]	748±52 (от 450 до 1450)	487±36 (от 200 до 950)	Д ↓ CD4
<i>Treponema pallidum</i>				
Сифилис вторичный кожи и слизистых	9 [27]	НП	НП	Д ↓ CD4%
Вирусные инфекции				
Вирус Эпштейн-Барра	8 [28]	1492±69	3356±1720	Д ↑ CD8
Мононуклеоз, острый	6 [29]	2444±907	7582±4629	НП
Цитомегаловирусный мононуклеоз				
острый	10 [30]	510±273	2939±2725	Д ↓ CD4
носители	53 [31]	996 (от 561 до 2071)	527 (от 249 до 1129)	НП
Вирус простого герпеса, тип II				
рецидив	10	480	480	Д ↑ CD8
ремиссия	14	500	250	НД
Гепатит В				
носители	7 [32]	1231±197	599±95	НД
рецидив хронического	12 [32]	739±122	425±51	Д ↓ CD4
Гепатит С	НП [33]	721±124	НП	Д ↓ CD4
Лимфотропный вирус Т-клеток человека, тип II	34 [34]	1385±579	744±369	Д ↑ CD4
Паразитарные и другие инфекции				
Токсоплазмоз				
острый	4 [35]	1085±160	380±74	НД
хронический	6 [36]	971±141	1096±307	Д ↑ CD8
Кандидоз, оральный	2 [37, 38]	484; 160	255; 90	НП
Криптококкоз	2 [39, 40]	108, 300	«норма», 300	НП
Пневмония и респираторные инфекции	47 [25]	574±451	305±265	Д ↓ CD4
Хронический тонзилит	28 [6]	НП	НП	Д ↑ CD4

НД – не достоверное изменение по сравнению с контролем; Д ↑ – достоверное (p<0,05) повышение показателя; Д ↓ – достоверное (p<0,05) снижение показателя; НП – не представлено.

к опухолевым линиям, в отличие от CD16^{bright} и CD16^{dim}. Предполагают, что CD16^{neg} и CD16^{dim} являются менее зрелыми формами NK-клеток [49].

CD56 – адгезионная молекула, широко представленная в нервной ткани. Другое название этой молекулы

NCAM (neural cell adhesion molecule). Кроме естественных киллеров CD56 экспрессируется на многих типах клеток, в том числе на Т-лимфоцитах [3, 4].

В таблице 2 представлен перечень патологий, при которых возможны изменения количества NK-клеток в пе-

Таблица 2. Патологические состояния, при которых могут наблюдаться изменения численности или активности NK-клеток (по Whiteside et al., 1994 [46])

Изменение количества/активности NK-клеток	Патологические состояния, при которых встречаются такие изменения	Сопутствующие симптомы и риски
Постоянно низкое количество/активность	Иммунодефициты врожденные и приобретенные (включая СПИД)	Высокий риск возникновения онкологического процесса и повышенная частота развития инфекций
	Синдром Чедиака-Хигасси	Повышенный риск развития лимфомы
	Дефицит CD11/CD18 CAM-семейства	Повышенная чувствительность к вирусным инфекциям
	Онкологические заболевания	Метастазирование
	Семейные онкологические заболевания	Вероятность малигнизации выше нормальной
	Лейкемия	Снижение активности/количества NK предшествует рецидиву
	X-сцепленный лимфопролиферативный синдром	Повышенная чувствительность к вирусу Эпштейн-Барра
	Рак молочной железы (при ранее установленном диагнозе)	Неблагоприятный прогноз
	Рак головы и шеи (до терапии)	Неблагоприятный прогноз
	Терапия цитостатиками	Высокая частота рецидивирования
	Вирусные инфекции (цитомегаловирус, вирус Эпштейн-Барра, герпесвирус)	Высокая частота, тяжесть и продолжительность заболевания
	Другие вирусные и бактериальные инфекции заболевания	Высокая частота, тяжесть и продолжительность заболевания
	Аутоиммунные заболевания	Возможно более тяжелое течение болезни, повышенная частота инфекций
	Психические расстройства	Утомляемость, нарушение умственной деятельности, лихорадка.
	Синдром дефицита NK	Сильная утомляемость, апатия, повышенная частота вирусных заболеваний
	Синдром хронической усталости	Разнообразные симптомы
	Депрессия	Неспособность справляться с ежедневными проблемами, усталость.
	Хронический стресс	Неизвестно
	Постоянно высокое количество/активность	Лимфопролиферация NK-клеток
Хроническая LGL ⁺ -пролиферация		Встречается в сочетании с активной лейкемией/лимфомой
Острая LGL-пролиферация		Неизвестно
	Гепатит	Неизвестно

* LGL – large granular lymphocytes – большие гранулярные лимфоциты

риферической крови.

Т-клетки с функциями естественных киллеров – НКТ-клетки

НКТ-клетки – уникальный подкласс Т-клеток, которому присущи фенотипические особенности как Т-клеток, так и НК-клеток. НКТ несут на своей поверхности Т-клеточный рецептор (ТКР) и маркеры НК-клеток (CD16, CD56, CD161) [50]. Особенностью НКТ является экспрессия инвариантного ТКР ($V\alpha_2J\alpha_0$, $V\beta_{11}$), который распознает гликолипидный антиген в комплексе с неклассической молекулой МНС I класса – CD1d [51]. Известно, что у человека среди НКТ- встречаются как $CD4^-CD8^-$, $CD4^+CD8^-$, а также $CD4^-CD8^+$ -НКТ-клетки [52].

НКТ-клетки регулируют продукцию, а также сами являются продуцентами важнейших цитокинов, направляющих течение иммунной реакции (провоспалительные и противовоспалительные цитокины) [50]. Распределение в тканях человека НКТ-клеток еще неясно, известно только, что эти клетки созревают в тимусе, в печени эти клетки составляют до 4% от лимфоцитов, небольшое их количество встречается в периферической крови – <1% [52], от 0,1 до 0,3% [51].

Фенотипический анализ НКТ в крови затрудняется их малым количеством на периферии, что увеличивает вероятность ошибки. Для количественной оценки этих клеток используют антитела к инвариантным цепям ТКР (анти- $V\alpha_2J\alpha_0$, анти- $V\beta_{11}$) в комбинации с анти-CD3 [53], либо тетрамер CD1d нагруженный α -галактозилцерамидом (CD1d- α GC), который специфически связывается с инвариантным ТКР [51, 54]. Кроме того, тетрамер CD1d- α GC активирует НКТ, что используется для оценки их функциональной активности [53].

В настоящее время накоплено немного данных об изменении численности НКТ-клеток в периферической крови при различных патологиях. Снижение количества НКТ в периферической крови может наблюдаться при различных органоспецифических и системных аутоиммунных процессах, таких как инсулинозависимый сахарный диабет, системная красная волчанка, рассеянный склероз [53], в острый период ревматической полимиалгии [55]. При введении пациентам терапевтических доз гранулоцитарного колониестимулирующего фактора также можно наблюдать снижение относительного количества НКТ-клеток за счет увеличения количества $CD3^+$ клеток, но абсолютное количество НКТ при этом существенно не изменяется [56]. Часто изменение численности НКТ-клеток можно обнаружить непосредственно в очаге заболевания. Так, Kita et al., 2002 [57] показали, что при первичном биллиарном циррозе количество

НКТ-клеток повышалось у пациентов в печени, но содержание этих клеток в периферической крови не менялось. При неврологической форме болезни Бехчета количество ТНК в периферической крови снижается параллельно с повышением содержания клеток этого фенотипа в ликворе [58].

Т-клетки, экспрессирующие маркеры НК-клеток

Фенотип таких клеток – $CD3^+CD16^+CD56^+$. У здорового человека они составляют до 10% от общего количества лимфоцитов [45]. Эта популяция содержит НКТ-клетки и Т-клетки, экспрессирующие CD56.

Оценка популяции $CD3^+CD16^+CD56^+$ может иметь клиническое значение. Так, показано, что у пациентов с болезнью Бехчета относительное количество $CD3^+CD56^+$ лимфоцитов значительно выше, чем у здоровых [59]. Болезнь Грависа сопровождается снижением количества $CD3^+CD16^+CD56^+$ [60].

В-клетки

В-клетки являются продуцентами антител. На поверхности В-лимфоцита расположены антитела (иммуноглобулины) определенной специфичности, которые функционируют как В-клеточный рецептор. Преобладающей формой мембранных иммуноглобулинов является IgM, который присутствует на поверхности всех зрелых В-лимфоцитов, не контактировавших с антигенами. В-клетки, созревание которых уже завершилось в костном мозге, наряду с IgM, несут рецептор IgD. В процессе иммунного ответа происходит смена изотипа рецептора на IgG, IgA, IgE [4].

В-клеточный рецептор кроме иммуноглобулина содержит дополнительные молекулы, не связанные с распознаванием, но необходимые для передачи сигнала. Среди них CD19, CD21, которые формируют корецепторный комплекс вместе с CD81 [4].

Кроме молекул рецепторного и корецепторного комплекса на поверхности В-клеток экспрессируются молекулы гистосовместимости II класса HLA-DR, т.к. В-лимфоциты являются антигенпрезентирующими клетками.

При воспалительных заболеваниях отмечено снижение относительного количества В-клеток при остром панкреатите, хроническом тонзиллите и пародонтите, гнойном осложнении травм, а при острых и хронических формах гепатитов В и С возможно повышение этого показателя [1].

Кроме количественных изменений, могут происходить функциональные изменения В-клеток, например их активация. Для активированных В-клеток характерна экспрессия CD86 – костимуляторной молекулы, которая

является лигандом для CD28 на Т-клетках и участвует в их активации. Vijl et al., 2001 [61] показали, что у пациентов с системной красной волчанкой экспрессия CD86 на CD19⁺ В-клетках коррелирует с тяжестью заболевания.

γδ-Т-клетки

Большинство Т-лимфоцитов периферической крови несут на своей поверхности ТКР, состоящий из α- и β-цепей, но есть небольшая фракция циркулирующих Т-клеток, которым свойственна экспрессия γ- и δ-цепей. Основная часть этих лимфоцитов имеет интраэпителиальную локализацию и, в отличие от αβ-Т-клеток, этот субкласс способен распознавать антиген непосредственно или в контексте молекулы МНС 1b [4]. Наряду с NK-клетками γδ-Т-клетки относят к врожденному иммунитету [4]. В периферической крови здорового человека этот класс Т-клеток может составлять до 10% [62].

Кроме экспрессии γ- и δ-цепей ТКР к фенотипическим особенностям γδ-Т-клеток можно отнести более высокую экспрессию CD3, чем на αβ-Т-клетках. В исследовании Lambert, Genin, 2004 [63] показано, что у 84% обследованных ими доноров можно четко выявить фракцию Т-лимфоцитов с высокой экспрессией CD3 (CD3^{bright}). Количество этих клеток коррелировало с количеством γδ-Т-клеток. Среди γδ-Т-клеток были дубль-негативные (CD4⁻CD8⁻) клетки, но большинство из них экспрессировали CD8⁺. По наблюдениям авторов обнаружение значительной фракции CD3^{bright}-лимфоцитов при рутинном анализе субпопуляций лимфоцитов может свидетельствовать о повышенном уровне γδ-Т-клеток у данного пациента [63]. Кроме CD8 на поверхности γδ-Т-клеток обнаруживают CD94 [64], маркеры NK-клеток CD56 [65, 66], CD161 [64].

Существуют половые и возрастные различия в содержании γδ-Т-клеток в периферической крови. Так, количество этих клеток нарастает с рождения до половозрелости, а после 30 лет постепенно снижается [67]. У женщин содержание γδ-Т-клеток выше, чем у мужчин и сохраняется на высоком уровне дольше [67].

Бактериальные инфекции и инфекции простейшими вызывают увеличение количества γδ-Т-клеток в перифе-

рической крови и инфильтрацию ими лимфоидных органов [62]. Значительно повышено содержание γδ-Т-клеток в периферической крови пациентов с туберкулезом легких [68], легионеллезом [69], туляремией [70]. Отмечено повышение циркулирующих γδ-Т-клеток при вирусных инфекциях – у ВИЧ-инфицированных [63], при цитомегаловирусной инфекции у пациентов после пересадки почки [71].

Повышение количества γδ-Т-клеток в периферической крови наблюдается также при болезни Крона [72], atopическом дерматите у детей [73]. У взрослых, напротив, при atopическом дерматите наблюдается снижение численности γδ-Т-клеток [74]. Такие же изменения наблюдаются у пациентов со склеродермией, болеющих менее 3-х лет [75] и диффузном склерозе [76], болезни Грависа [60].

Заключение

Следует обратить внимание на то, что все приведенные в тексте и таблицах факты, касающиеся изменения субпопуляционного состава, относятся к групповым исследованиям и оценивают средние значения в сравнении с контрольными группами. Они позволяют лишь сориентироваться в тенденциях изменения того или иного показателя при некоторых патологиях. Поэтому лечащий врач должен больше обращать внимание не на отклонение показателей относительно нормы, а на соответствие характера отклонения показателя, значимого при той или иной патологии, клинической картине заболевания [45]. Индивидуальные значения показателей у пациентов с воспалительными заболеваниями могут «укладываться» в нормативные интервалы. Следует учесть также, что результаты не соответствующие нормативным показателям, еще не свидетельствуют о наличии патологии. Фенотипирование лимфоцитов у пациентов с воспалительными заболеваниями дает дополнительную информацию о текущем состоянии больного и может использоваться для мониторинга состояния иммунной системы пациента в процессе лечения.

Полная версия статьи и список литературы представлены на сайте www.biochemmack.ru