

Современные подходы к оценке фенотипа различных субпопуляций лимфоцитов*

С.В. Хайдуков

ФГБУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздрава России, УРАН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН, г. Москва

Первый официальный документ, регламентирующий деятельность иммунологических лабораторий в России, содержал такие показатели для оценки иммунного статуса при иммунофенотипировании лимфоцитов как количество Т- и В-лимфоцитов (приказ Минздрава СССР от 18.04.1986 № 539 «Об организации лабораторий клинической иммунологии»). В дальнейшем этот перечень был расширен за счет включения Т-хелперов, Т-цитотоксических и естественных киллеров (НК-клеток) (приказ Минздрава России от 25.12.1997 №380 «О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации»).

Бурное развитие фундаментальной иммунологии, основанное на достижениях молекулярной биологии и геномной инженерии, позволило выявить пути иммунопатогенеза аллергических, аутоиммунных, онкологических и инфекционных заболеваний. В то же время возросшие возможности метода проточной цитофлуориметрии обусловили целесообразность расширения перечня популяций лимфоцитов, исследование которых необходимо при оценке иммунного статуса.

В течение последних 20 лет анализ только пяти популяций лимфоцитов (Т-клетки, Т-хелперы, Т-цитотоксические, В-клетки и НК-клетки) в практике иммунологических лабораторий выявил недостаточную информативность этих показателей. С другой стороны, интенсивное изучение патогенеза различных заболеваний выявило ключевую роль активированных лимфоцитов, регуляторных Т-клеток, субпопуляций В- и НК-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 цитофлюориметрического анализа.

Однако при появлении новых лабораторных показателей одним из основных требований является стандартизация протокола определения этих показателей и установление интервалов распределения их у практически здоровых индивидов, т. е. «норма». Не является исключением и проточная цитофлуориметрия [1].

Для установления значений нормативных показателей клеток иммунной системы в данном исследовании использовали периферическую кровь 356 практически здоровых лиц в возрасте от 20 до 45 лет из различных регионов России.

Проделанная работа позволила сформировать комбинации моноклональных антител, позволяющие оценить как все основные популяции лимфоцитов, так и их малые субпопуляции, участвующие в развитии иммунного ответа. В результате проведенного исследования была предложена панель моноклональных антител для окрашивания лимфоцитов, которая соответствует современным требованиям для характеристики иммунного статуса пациентов (табл. 1). Поскольку данное исследование проводилось с использованием периферической крови практически здоровых лиц, его результаты могут лечь в основу нормативных показателей субпопуляционного состава клеток иммунной системы.

Анализ В-клеток и их субпопуляций. 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.

* Редакция благодарит журнал «Справочник заведующего КДЛ» за разрешение на перепечатку статьи.

Таблица 1.

Панель моноклональных антител для анализа основных и малых популяций лимфоцитов периферической крови практически здоровых доноров

Флуорохромы	FITC	PE	ECD	PC5
Моноклональные антитела	CD19	CD5	CD45	CD27
	CD8	CD4	CD3	CD45
	CD16	CD56	CD3	CD45
	CD8	CD38	CD3	CD45
	CD45RA	CD4	CD45R0	CD45
	CD4	CD127	CD25	CD45
	$\gamma\delta$ -TCR	$\alpha\beta$ -TCR	CD3	CD45
	CD3	CD25	HLA-DR	CD45

Для выявления В-клеток используют так называемые линейноспецифические маркеры. В-клетки экспрессируют целый ряд мембранных молекул, которые необходимы для формирования В-клеточного рецептора 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 молекула может экспрессироваться в низкой плотности на других популяциях лимфоцитов. Хотя CD20 первоначально был описан как В-клеточный

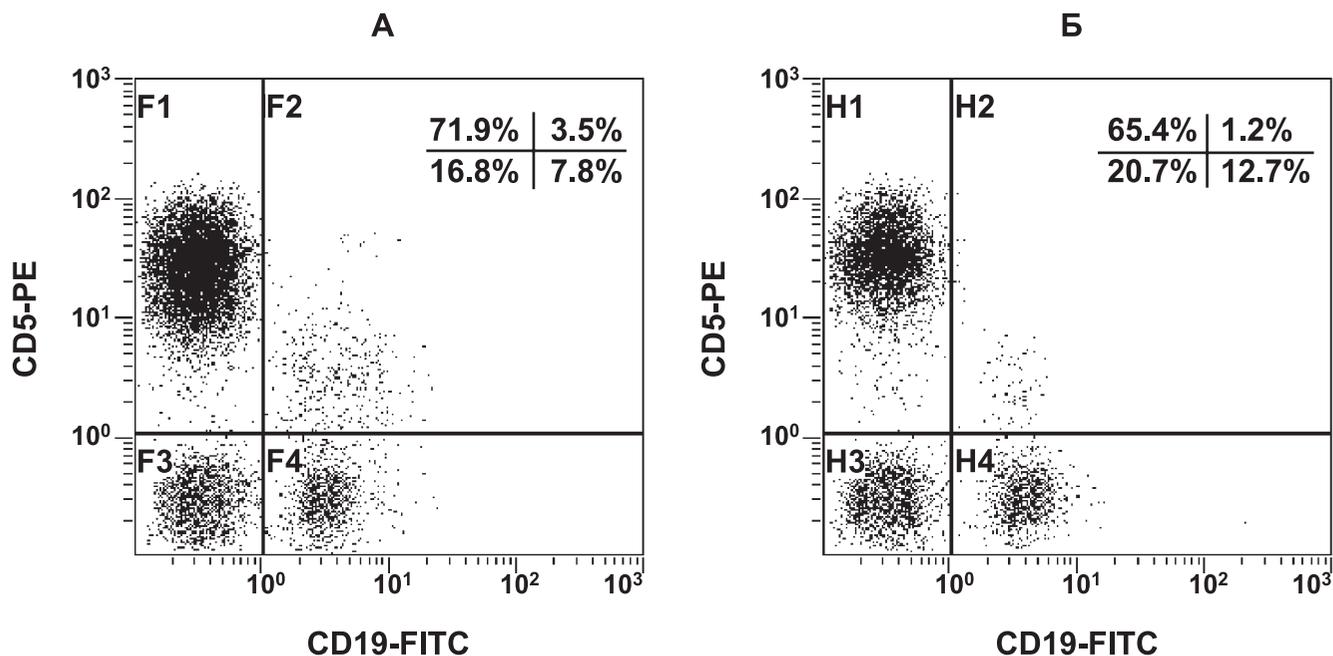
точный линейный маркер, оказалось, что небольшая субпопуляция Т-клеток человека может экспрессировать CD20 в низкой плотности и составлять $2,4 \pm 1,5\%$ от лимфоцитов периферической крови.

Хотя оценка экспрессии CD20 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 до десяти субпопуляций, но для лабораторных исследований особый интерес представляют В1-, В2-клетки 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 (В1) и обычные CD5⁻ В-клетки (В2) [2].

Хотя точная функциональная роль CD5 все еще до конца не изучена, для этих молекул была показана физическая ассоциация с антигенспецифическим 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 [3].

В1-клетки вызывают значительный интерес за счет того, что их ассоциируют с продукцией аутоантител и, как следствие, с аутоиммунными заболеваниями. Значитель-

**Рисунок 1.**

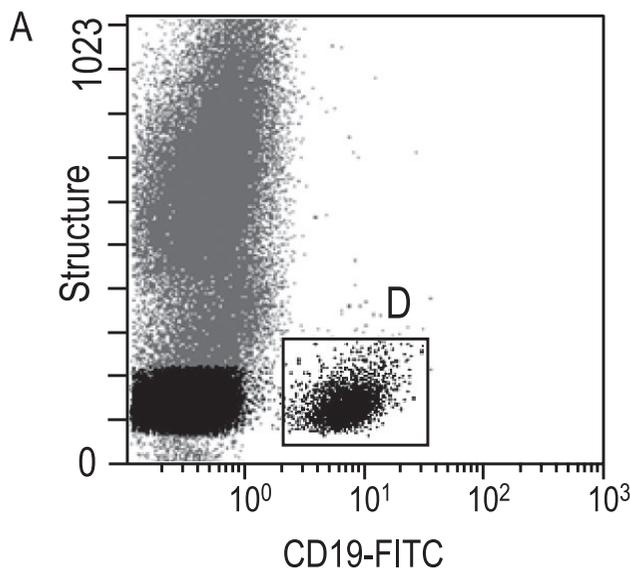
Гистограмма распределения CD5 и CD19 на лимфоцитах периферической крови. Субпопуляции В1-лимфоцитов у пациента X с аутоиммунным тиреозитом: А – до терапии; Б – в процессе терапии

Таблица 2.

Патологии, при которых определение относительного уровня В1-клеток является диагностическим параметром для мониторинга за течением заболевания

Заболевание	Повышение относительного уровня В1-клеток
1. Системная красная волчанка	++++
2. Синдром Шегрена	++++
3. Ревматоидный артрит	+++
4. Инсулинзависимый диабет	+++
5. Аутоиммунный тиреозит	
6. Миастения	+++++
7. Неспецифический язвенный колит	+++
8. Аутоиммунные поражения при инфекционных заболеваниях (хламидиоз, синдром Рейтера, бруцеллез и др.)	+++
9. Другие заболевания, имеющие в своей основе аутоиммунные механизмы	+

ная роль В1-клеток была отмечена при ревматоидном артрите, системной красной волчанке и синдроме Шегрена. Увеличение количества CD5⁺ В-клеток наблюдали у пациентов, страдающих миастенией, инсулинзависимым диабетом и тиреозитом Хашимото [4]. На рис. 1 представлены гистограммы распределения В1- (CD19⁺CD5⁺) и В2- (CD19⁺CD5⁻) лимфоцитов при аутоиммунном тиреозите.

**Таблица 3.**

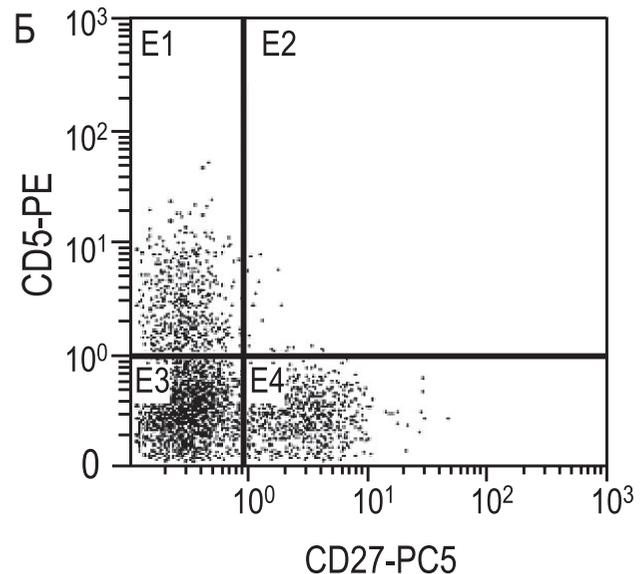
Патологии, при которых определение относительного уровня В-клеток памяти является диагностическим параметром для мониторинга за течением заболевания

Изменение количества В-клеток памяти	Заболевание
Повышение относительного уровня В-клеток памяти	Множественный склероз
	Ревматоидный артрит
Понижение относительного уровня В-клеток памяти	Первичные иммунодефициты
	Синдром Шегрена
	Хронической грануломатоз
	Бактериальные инфекции дыхательного тракта
	Бактериальные инфекции желудочно-кишечного тракта

Как видно из рисунка, 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.

В таблице 2 представлены патологии, при которых наблюдается повышение относительного уровня В1-клеток.

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

**Рисунок 2.**

Гистограммы распределения CD19, CD5 и CD27 на лимфоцитах периферической крови. 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 4.

Интервалы распределения популяций лимфоцитов в зависимости от их фенотипов у практически здоровых доноров [9]

Субпопуляции	Содержание	
	Относительное (%)	Абсолютное количество (кл/л)
В-клетки (CD3 ⁻ CD19 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺)	7,0 – 17,0	0,111 – 0,376 × 10 ⁹
В1-клетки (CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD27 ⁻ CD45 ⁺)	0,5 – 2,1	0,022 – 0,115 × 10 ⁹
В2-клетки (CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD27 ⁺ CD45 ⁺)	6,5 – 14,9	0,081 – 0,323 × 10 ⁹
В-клетки памяти (CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD27 ⁺ CD45 ⁺)	1,8 – 6,8	0,012 – 0,040 × 10 ⁹
NK-клетки (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ CD45 ⁺)	0,2 – 1,0	0,003 – 0,022 × 10 ⁹
NK-клетки цитолитические (CD3 ⁻ CD16 ⁺ (or high) CD56dimCD45 ⁺)	8,0 – 18,0	0,123 – 0,369 × 10 ⁹
NK-клетки цитокин-продуцирующие (CD3 ⁻ CD16 ⁻ (or low) CD56brightCD45 ⁺)	7,8 – 17,0	0,120 – 0,347 × 10 ⁹
T-клетки (CD3 ⁺ CD19 ⁻ CD45 ⁺)	61,0 – 85,0	0,946 – 2,079 × 10 ⁹
T-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD45 ⁺)	35,0 – 55,0	0,576 – 1,336 × 10 ⁹
T-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁻ CD45 ⁺)	19,0 – 35,0	0,372 – 0,974 × 10 ⁹
T-хелперы активированные/памяти (CD4 ⁺ CD45R0 ⁺ CD45RA ⁻ CD45 ⁺)	5,0 – 25,0	0,068 – 0,702 × 10 ⁹
T-хелперы наивные (CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45R0 ⁻ CD45 ⁺)	20,0 – 40,0	0,272–1,123 × 10 ⁹
αβT-клетки (CD3 ⁺ αβ-TcR ⁺ γδ-TcR ⁻ CD45 ⁺)	70,5 – 9,7	0,924 – 1,964 × 10 ⁹
γδT-клетки (CD3 ⁺ γδ-TcR ⁺ αβ-TcR ⁻ CD45 ⁺)	4,6 – 2,8	0,022 – 0,115 × 10 ⁹
T-NK-клетки (CD16 ⁻ CD56 ⁺ CD3 ⁺ CD45 ⁺)	0,5 – 6,0	0,007 – 0,165 × 10 ⁹
T-клетки активированные (CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ CD25 ⁺ CD45 ⁺)	0,5 – 6,0	0,007 – 0,165 × 10 ⁹
Регуляторные T-клетки (CD4 ⁺ CD25brightCD127negCD45 ⁺)	1,6 – 5,8	0,009 – 0,078 × 10 ⁹
Индекс соотношения (T-хелперы/T-цитотоксические)	1,5 – 2,6	

маркера памяти В-клеток [5] 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 [4]. В таблице 3 представлены патологии, при которых наблюдается изменение относительного уровня В-клеток памяти.

Таким образом, наиболее полную характеристику количества В-клеток и их субпопуляционного состава можно получить при следующей комбинации моноклональных антител: CD19/CD5/CD27/CD45 (рис. 2).

Анализ В1-, В2-клеток и В-клеток памяти в периферической крови человека с использованием этой комбинации моноклональных антител позволил определить интервалы распределения как относительного, так и абсолютного количества этих субпопуляций у практически здоровых лиц, результаты представлены в таблице 4.

Использование дополнительного логического ограничения по CD19⁺ клеткам позволяет получить дополнительную информацию по интервалам распределения В1-, В2-клеток и В-клеток памяти внутри популяции В-клеток у практически здоровых лиц (табл. 5).

Анализ T-клеток и их субпопуляций. 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 α- и β-цепей, появляется на ранних стадиях онтогенеза. TcR2 состоит из γ- и δ-цепей.

γδТ-клетки были изучены относительно недавно. В отличие от αβТ-клеток, γδТ-клетки распознают непептидные антигены, полученные из микробных патогенов, независимо от главного комплекса тканевой совместимости (МНС) [6]. Данная субпопуляция выполняет целый ряд важных функций; так, они могут усиливать иммунный ответ, производя большие количества интерферона-γ (IFNγ), фактора некроза опухолей-α (TNFα) и хемокинов. Кроме этого, γδТ-клетки имеют эффекторную (цитотоксическую) активность. С эволюционной точки зрения γδТ-клетки занимают уникальное место между высокоспецифичными αβТ-клетками и врожденной иммунной системой для выполнения задачи защиты организма от патогенов. Весьма существенна роль γδТ-клеток в обеспечении устойчивости организма против целого ряда бактериальных и вирусных инфекций, включая вирус ВИЧ. Кроме того, γδТ-клетки принимают участие и в противоопухолевом ответе. Однако γδТ-клетки могут играть не последнюю роль при некоторых иммунопатологических

Таблица 5.

Интервалы распределения содержания малых субпопуляций лимфоцитов в периферической крови взрослых практически здоровых доноров относительно основных популяций лимфоцитов [9]

Субпопуляции	Содержание клеток (%)
B1-клетки	относительно общих В-клеток 4,1 – 17,5
B2-клетки	82,1 – 96,3
В-клетки памяти	22,8 – 39,7
$\gamma\delta$ T-клетки	относительно общих Т-клеток 1,7 – 12,6
$\alpha\beta$ T-клетки	87,2 – 98,4
Регуляторные Т-клетки	относительно Т-хелперов 1,65 – 5,75
CD16+ (or high) CD56dim NK-клетки цитолитические	относительно общих NK-клеток 93,75 – 97,5
CD16- (or low) CD56bright NK-клетки цитокин-продуцирующие	2,5 – 6,25

ких состояниях, таких как диабет, аутоиммунные расстройства, болезнь Бехчета [7].

Содержание $\gamma\delta$ T-клеток в периферической крови может варьироваться, что в частности обусловлено половыми и возрастными различиями. Количество $\gamma\delta$ T-клеток увеличивается с момента рождения до наступления половой зрелости и в дальнейшем постепенно снижается. У женщин количество $\gamma\delta$ T-клеток несколько выше, и этот уровень сохраняется значительно дольше, чем у мужчин.

Обнаружение увеличенной циркулирующей субпопуляции $\gamma\delta$ T-клеток, особенно на слизистых оболочках, позволяет предположить наличие недавней или продолжающейся хронической стимуляции иммунной системы. Для клиницистов эта информация может служить дополнительным критерием, свидетельствующим о наличии 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 эффективности терапии, прогноза развития и течения заболевания. Патологии, при которых изменяется количество $\gamma\delta$ T-клеток, представлены в таблице 6.

Для наиболее полной фенотипической характеристики Т-клеток проводили анализ не только линейно-специфичного маркера Т-клеток CD3, но и определяли субпопуляционный

Таблица 6.

Изменение относительного количества $\gamma\delta$ T-клеток при различных заболеваниях и патологиях

Изменение относительного количества $\gamma\delta$ T-клеток памяти	Заболевание
Повышение относительного уровня $\gamma\delta$ T-клеток	Вирусные инфекции:
	● ВИЧ
	● цитомегаловирус
	● вирус Эпштейна-Бар
	Бактериальные инфекции:
	● туберкулез легких Mycobacterium
	● легионеллез Legionella
	● туляриемия Francisella tularensis
	● сальмонеллез Salmonella
	● боррелиоз (болезнь Лайма) Borellia
Понижение относительного уровня $\gamma\delta$ T-клеток	Атопический дерматит (у детей)
	Болезнь Корна
	Болезнь Бехчета
	Первичные иммунодефициты
	Атопический дерматит (у взрослых)
	Возрастное снижение относительного уровня $\gamma\delta$ T-клеток

состав Т-клеток по экспрессии Т-клеточного рецептора, а именно $\gamma\delta$ - и $\alpha\beta$ TCR. Для этих целей были использованы следующие комбинации моноклональных антител: CD3/CD4/CD8/CD45 и $\alpha\beta$ TCR/ $\gamma\delta$ TCR/CD3/CD45 (рис. 3), результат представлен в таблицах 4 и 5.

В случае анализа $\alpha\beta$ T-клеток и $\gamma\delta$ T-клеток использование дополнительного логического ограничения по CD3⁺ клеткам позволило получить дополнительную информацию по интервалам распределения этих клеток в основной популяции Т-клеток (табл. 5).

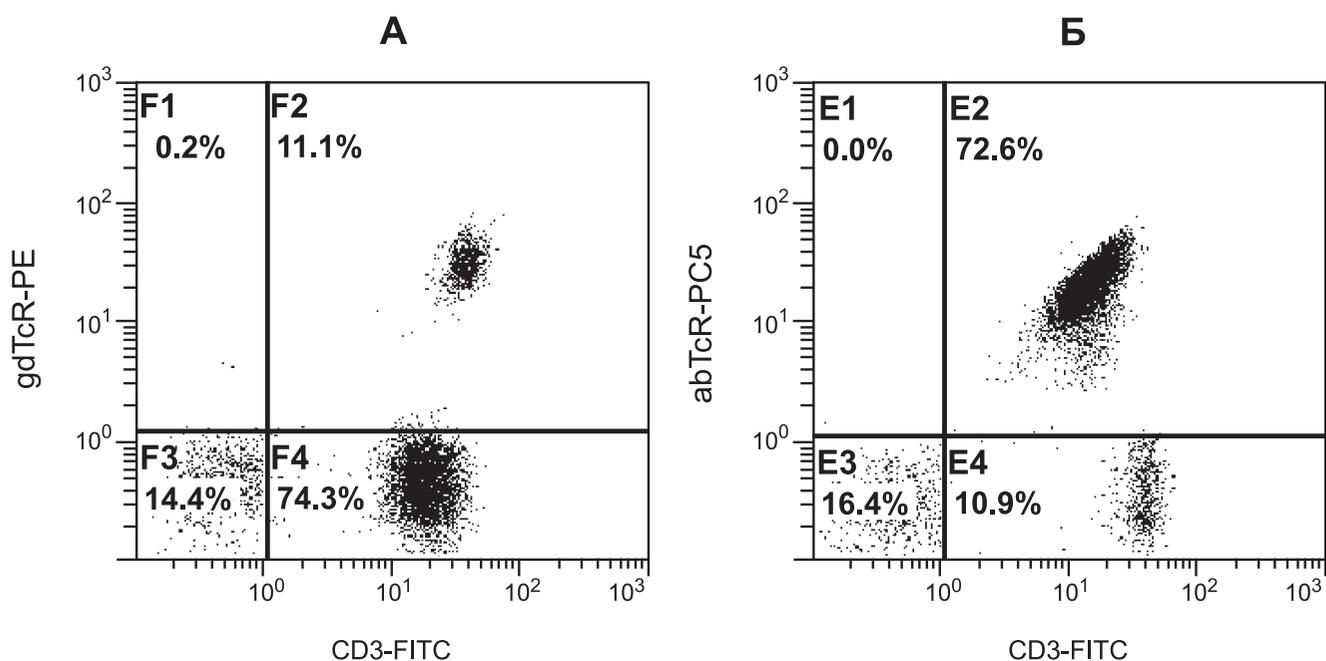


Рисунок 3.

Двухпараметрические гистограммы распределения T-клеток, полученные в результате многоцветного анализа лимфоцитов периферической крови пациента с хроническим носительством вируса Эпштейна-Бар.

В последние годы большой интерес у исследователей вызывает такая популяция T-клеток, как регуляторные T-клетки (T-reg). Они играют важную роль в супрессии иммунных реакций (регулируют T-клеточный гомеостаз, предотвращают аутоиммунные заболевания, аллергии, гиперчувствительность, реакцию трансплантат против хозяи-

на, но снижают иммунитет к инфекциям). Таким образом, наличие и количественные характеристики этой популяции служат важным диагностическим признаком.

T-reg клетки имеют следующий фенотип – $CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD45R0^+CD95^+$, однако наиболее важным их маркером является фактор транскрипции скурфин

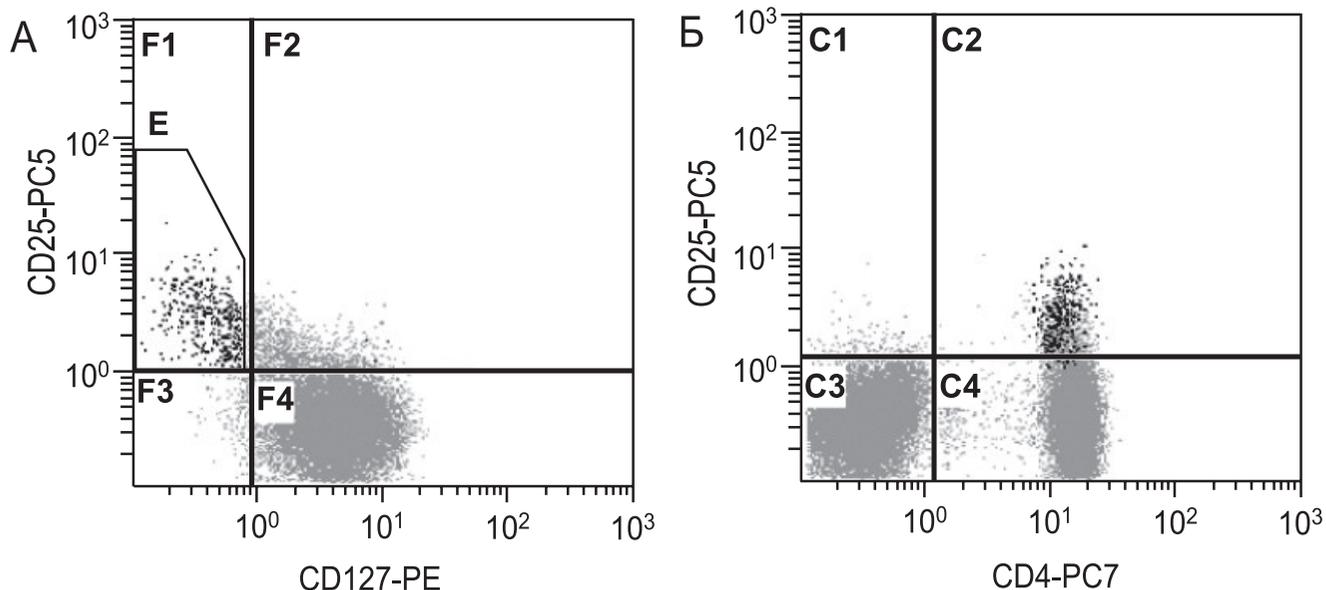


Рисунок 4.

Многоэтапное логическое ограничение при анализе T-reg клеток в периферической крови. А – гистограмма распределения CD127 и CD25 после логического ограничения по CD4 и CD45. В зоне E находятся регуляторные клетки. Б – гистограмма распределения CD4 и CD25 после логического ограничения только по CD45. Черные точки – T-reg клетки

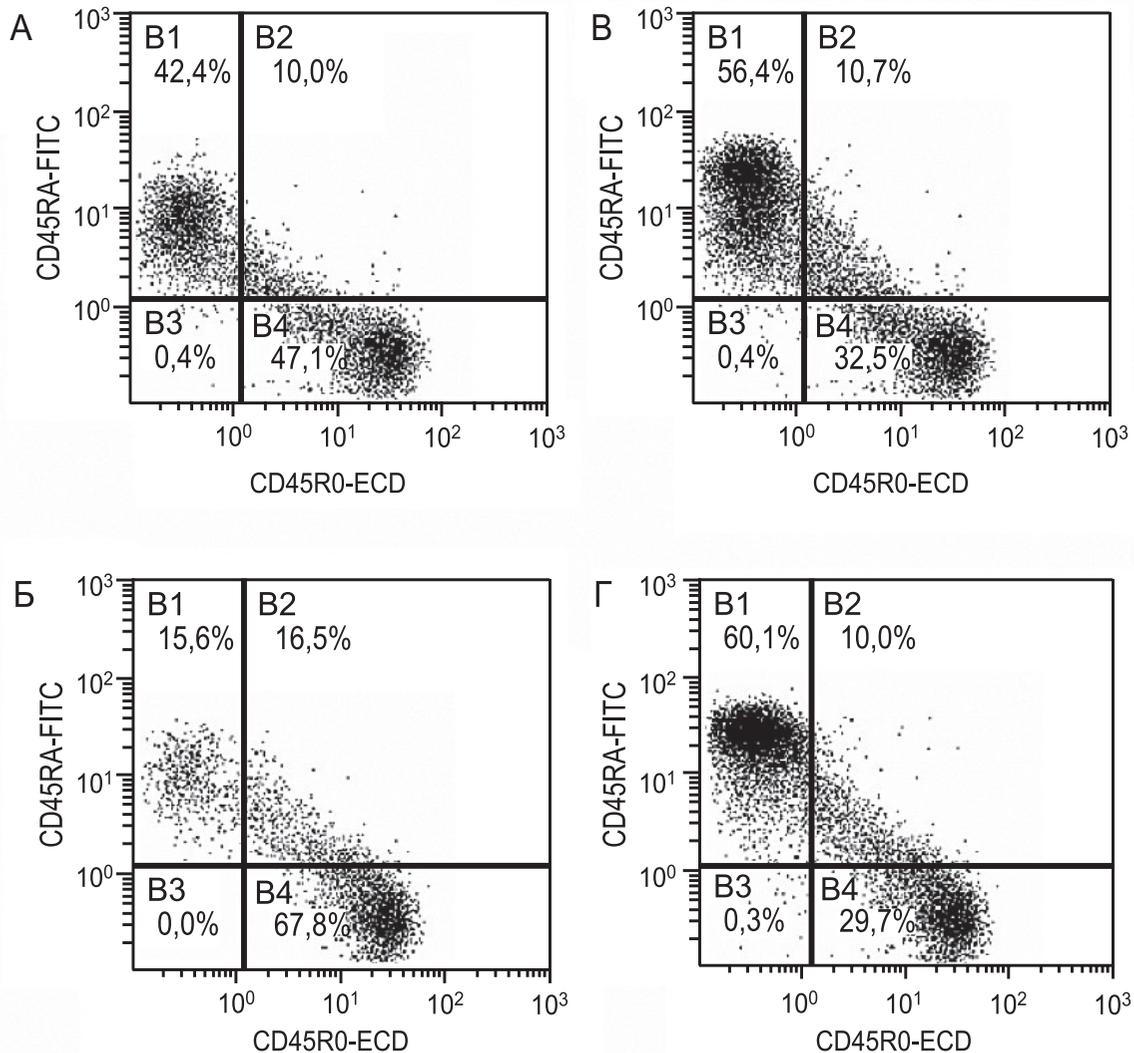


Рисунок 5.

Распределение лимфоцитов практически здорового донора (В и Г) и пациента в послеоперационный период (А и Б). На гистограммах А и В представлен результат анализа общей популяции CD45 позитивных лимфоцитов. На гистограммах Б и Г анализировали только CD45 и CD4 позитивные клетки, локализованные при помощи многоэтапного логического ограничения по этим маркерам.

(scurfin, FOXP3), который находится внутри клеток, что затрудняет работу по идентификации T-reg клеток.

Исследования последних лет показали, что экспрессия CD127 на T-reg клетках снижена или отсутствует и их локализация возможна без выявления FOXP3 [8].

Для выявления T-reg клеток был использован многоцветный цитометрический анализ с многоэтапным введением логических ограничений и следующая комбинация моноклональных антител: CD45-FITC, CD4-PC7, CD25-PC5 и CD127-PE (рис. 4).

Результаты анализа T-reg клеток взрослых практически здоровых лиц представлены в таблице 4. Подход с исполь-

зованием множественных логических ограничений выявил интервалы распределения T-reg клеток в основной популяции T-клеток практически здоровых лиц (табл. 5).

Не меньший интерес вызывает анализ наивных T-клеток. Экспрессия на клеточной поверхности различных изоформ молекулы CD45 позволяет выделить среди CD4⁺ T-лимфоцитов человека наивные T-клетки. Принято относить субпопуляцию CD4⁺CD45RA⁻CD45R0⁺ T-лимфоцитов к T-клеткам памяти и соответственно CD4⁺CD45RA⁺CD45R0⁻ – к наивным T-клеткам. Подобное разделение основано исключительно на способности CD4⁺CD45RA⁻CD45R0⁺ T-клеток, а не наивных T-лимфо-

Таблица 7.

Примеры отклонений в активности и количестве НК-клеток, связанные с проявлением клинических признаков или увеличенным риском заболеваний у людей [12]

Изменение количества и активности НК-клеток	Патологическое состояние	Ассоциированные симптомы и риски	
Постоянно низкие активность и количество НК-клеток	Приобретенный или врожденный иммунодефицит, включая СПИД	Высокий риск возникновения онкологических заболеваний и достаточно частые инфекционные заболевания	
	Синдром Чедиака-Хигасси	Повышенный риск образования лимфом	
	Дефицит CD11/CD18 молекул семейства клеточной адгезии	Увеличенная восприимчивость к вирусным инфекциям	
	Онкологические заболевания	Распространение метастазов	
	Онкологические заболевания, связанные с наследственностью	Вероятность появления злокачественного образования выше нормального	
	Лейкемия	Предшествует рецидиву	
	X-связанный лимфопролиферативный синдром	Повышенная чувствительность к вирусу Эпштейна-Бара	
	Рак молочной железы (при диагнозе)	Неблагоприятный прогноз	
	Рак шеи и головы (до терапии)	Неблагоприятный прогноз	
	Терапия цитостатиками	Более высокая вероятность рецидива	
	Вирусная инфекция (цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Бара, вирус герпеса)	Более высокая частота, серьезность и продолжительность заболевания	
	Другие вирусные и бактериальные инфекции	Более высокая частота, серьезность и продолжительность заболевания	
	Аутоиммунные заболевания	Возможно более активное течение болезни, увеличенная частота инфекций	
	Психические расстройства:		
	- Синдром дефицита НК-клеток	Усталость, сниженная восприимчивость, лихорадка	
- Синдром хронической усталости	Повышенная утомляемость, апатичность, увеличенная частота вирусных заболеваний		
- Депрессия	Более серьезные признаки		
- Хронический стресс	Неспособность справляться с ежедневными проблемами, усталость		
Постоянно высокие активность и количество НК-клеток	Лимфопролиферация НК-клеток		
	Хроническая пролиферация больших гранулярных лимфоцитов (LGL-пролиферация)	LGL лимфоцитоз, цитопения, спленомегалия	
	Острая пролиферация больших гранулярных лимфоцитов (LGL-пролиферация)	Встречается совместно с активной лейкемией/лимфомой	

цитов 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 [9]. 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 5, определение относительного количества CD45RA⁺ и CD45R0⁺ клеток по всей популяции лимфоцитов малоинформативно (рис. 4А и 4В). 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. 5Б и 5Г).

В процессе исследования количество наивных Т-клеток было проанализировано при помощи следующей комбинации

Таблица 8.

Сопоставление интервалов распределения основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови взрослых здоровых лиц, полученных авторами, с литературными данными

Субпопуляции	Zidovec Lepej S. et al. [17] n=50	Pope V. et al. [16] n=246	Comans-Bitter W. et al. [15] n=51	Тотолян Арег А. и др. [14]	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 (0,5–6,0)
В-лимфоциты (CD19+)	9,7 (4,4–26,4)	13,3 (6–23)	12 (6–19)	13,5 (5–22)	12 (7–17)
NK-клетки(CD3-, CD16+, CD56+)	3,9 (0,4–19,3)	12,2 (5–23)	13 (7–31)	11,5 (3–20)	15 (12–18)

моноклональных антител: CD4/CD45RA/CD45R0/ CD45. Результаты анализа наивных Т-клеток взрослых практически здоровых лиц представлены в таблице 2.

Анализ NK-клеток и их субпопуляций. Иммунофенотипирование с использованием многоцветного анализа особенно важно для характеристики высокоспециализированных субпопуляций лимфоцитов, таких как NK-клетки. В таблице 7 представлены патологии, при которых меняется количество NK-клеток.

NK-клетки являются носителями двух основных функций. Во-первых, это лизис опухолей и инфицированных вирусами клеток [10], а во-вторых, регуляция врожденного и адаптивного иммунных ответов [11].

Для локализации NK-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-NK-клетки). Для разделения этих отличающихся от Т-клеток популяций используют молекулу CD3, т. к. NK-клетки никогда ее не экспрессируют.

Популяция NK-клеток по своему составу обладает достаточной гетерогенностью. Среди популяции циркулирующих NK-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 низкой 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 [13].

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 комбинации моноклональных антител CD3/CD16/CD56/CD45. Этот подход позволил 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 4 и 5.

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. 8), 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 [14–17].

Однако по-прежнему остается открытым вопрос о референтных интервалах, связанных с региональными особенностями отдельных областей и этнических групп населения РФ. В качестве примера можно привести так называемый «северный фенотип» – повышенное содержание NK-клеток. В данном случае их количество находится около верхней границы распределения, а в некоторых случаях и превышает ее, хотя для этих регионов такое является нормой. Все это требует объединения усилий различных лабораторных коллективов в проведении исследований в данном направлении.

Развитие проточной цитофлуориметрии 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 в диагностических целях (диагностика аутоиммунных процессов, септических состояний и др.). В то же время во многом остается дискуссионным вопрос о референтных значениях различных клеточных субпопуляций как для страны в целом, так и для различных регионов и этносов. Учитывая насущную необходимость в формировании таких референтных значений, нами была предпринята попытка по регламентации нормативных показате-

телей наличия популяций и субпопуляций лимфоцитов по их фенотипу. Подобранный комбинация моноклональных антител и использование многоцветного цитофлуориметрического анализа с многоэтапным гейтированием позволили адекватно и точно определить их в периферической крови. Предложенные алгоритмы и полученные данные могут служить основой для исследователей и врачей-иммунологов (врачей клинической лабораторной диагностики и врачей-клиницистов) при трактовке полученных результатов у пациентов с той или иной иммунопатологией.*

* Список литературы находится в редакции