

# ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-ХЕЛПЕРЫ АКТИВИРОВАННЫЕ)

Хайдуков С.В.<sup>1,2</sup>, Зурочка А.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

<sup>2</sup> ФГУ Федеральный Научно-Клинический Центр детской гематологии, онкологии и иммунологии РОСЗДРАВА, Москва

<sup>3</sup> Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург

**Резюме.** В последние годы уделяется огромное внимание различным субпопуляциям Т-лимфоцитов. Особенно интенсивно развивается направление, связанное с изучением Т-хелперов. Данная группа клеток оказалась в значительной степени структурирована на различные клеточные субпопуляции. Выявлен и достаточно изучен целый ряд таких субпопуляций, получивших название Th1, Th2, Treg, Th17, а также активированные Т-хелперы. В настоящее время имеются четкие данные о рецепторах и функциональной значимости различных субпопуляций Т-хелперов. Использование этих данных в лабораторных исследованиях, несомненно, скажется на качестве диагностики нарушений функционирования иммунной системы и адекватности назначаемой иммунотерапии.

**Ключевые слова:** проточная цитометрия, Т-клетки, Th1, Th2, Treg, Th17

*Khaidukov S.V., Zurochka A.V.*

## ANALYSIS OF T HELPER SUBPOPULATIONS (Th1, Th2, Treg, Th17, ACTIVATED T-HELPERS) BY MEANS OF FLOW CYTOMETRY

**Abstract.** Over last years, huge efforts are made in order to improve analytic techniques for T lymphocyte subpopulations. Appropriate studies on T-helper cells are also subject to extensive research. These cellular compartments are substantially divided into various sub-classes. Such subpopulations, e.g., Th1, Th2, T-reg, Th17 and activated T-helpers, were classified and characterized to sufficient degree. Recently, a lot of distinct data about specific receptors and functional properties of various T-helper subpopulations was obtained. Applications of these results in laboratory research, without any doubt, will improve diagnostic quality when assessing functional alterations of immune system, as well as adequate therapy planning. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 1, pp 7-16)

**Keywords:** flow cytometry, T-helper cells, Th1, Th2, Treg, Th17

В последние годы уделяется огромное внимание различным субпопуляциям Т-лимфоцитов, особенно интенсивно развивается направление, связанное с изучением Т-хелперов. Данная группа клеток оказалась в значительной степени

структурирована на различные клеточные клоны. В настоящее время выявлен и достаточно изучен целый ряд таких клонов, получивших название Th1, Th2, Treg, Th17, а также активированные Т-клетки. Именно описанию данных субпопуляций Т-хелперов и посвящена настоящая статья. Она является продолжением серии статей, посвященных методу проточной цитофлюориметрии и анализу лимфоцитарных клеток периферической крови человека, их фенотипическим характеристикам и особенностям функционирования [2-6].

### Адрес для переписки:

Хайдуков Сергей Валерьевич,  
Институт биоорганической химии им. акад.  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.  
Тел.: (985) 923-41-62.  
E-mail: khsv@mail.ibch.ru; khsergey54@mail.ru

## Т-хелперы 1 и Т-хелперы 2 (Th1 и Th2)

Известно, что Т-хелперы дифференцируются в различные устойчивые субпопуляции, для которых характерной чертой является продукция специфических цитокинов. Эти клетки, в зависимости от секретируемых ими цитокинов, были разделены на два типа – Th1 и Th2. Данное разделение подтверждалось в экспериментах *in vitro* высокой стабильностью клонов клеток, продуцирующих определенный набор цитокинов [33]. Этот факт стал отправной точкой в появлении концепции Th1/Th2 типов ответа. Дальнейшие исследования показали, что за хроническое воспаление отвечают Th1 и тем самым обеспечивают помощь цитотоксическим Т-клеткам в защите против внутриклеточных патогенов. В то же время Th2-клетки играют важную роль в антительном ответе и, таким образом, защищают хозяина от внеклеточных патогенов.

Ведущая роль в изучении баланса Th1/Th2 принадлежит методу проточной цитометрии и процедуре внутриклеточного окрашивания [8, 21]. У здорового индивидуума большинство Т-клеток находится в состоянии покоя и не продуцирует обнаруживаемых количеств какого-либо цитокина. Для выявления клеток продуцентов используется неспецифическая активация (обычно с Phorbol Myristate Acetate/IonoMycin, PMA/IM или суперантигеном). После этой процедуры часть клеток начинает секретировать характерные цитокины: IFN $\gamma$  для Th1 или IL-4 для Th2 (рис. 1). Однако необходимым условием выявления цитокинов, представляющих собой секретируемые молекулы, является предотвращение их выхода из клетки. Для этих целей применяются блокаторы выхода белков из клетки (например, брифелдин).

Как правило, соотношение Th1- и Th2-клеток изменяется при различных типах иммунного ответа или иммунологических заболеваниях, и данный эффект может быть непосредственно как причиной, так и следствием текущего заболевания. Следовательно, обнаружение дисбаланса Th1/Th2 и понимание его причин дает возможность выбрать направление терапии для исправления патологии.

До последнего времени наличие Th1- и Th2-клеток определяли исключительно по продукции внутриклеточных или внеклеточных цитокинов [15, 35, 39, 40], поскольку не было известно мембранных маркеров, характерных для каждого из этих типов Т-клеток. Однако в последнее время, в результате поиска специфических маркеров для Th1- и Th2-клеток, были получены антитела, которые взаимодействовали с мембранными молекулами Т-клеток, причем исключительно с Th2 [36]. Данные молекулы, относящиеся к семейству рецепторов хемоаттрактантов, получили название CRTH2 (Chemoattractant Receptor Th2). Фенотип CD4<sup>+</sup> клеток, экспрессирующих данный маркер, представляет собой следующее сочетание: CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Они продуцируют IL-4 (а также IL-5 и IL-13), но не IFN $\gamma$ . Таким образом, это антиген-активированные эффекторные Th-клетки. Впоследствии CRTH2 были обнаружены и на других типах клеток периферической крови, таких как базофилы, эозинофилы, активированные моноциты и на небольшом количестве CD8<sup>+</sup>Т-клеток. Моноклональные антитела против CRTH2 были изучены и клас-теризованы, а на 8-м рабочем совещании HLDA-8 (Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Аделаида, Австралия) отнесены к CD294 [56].

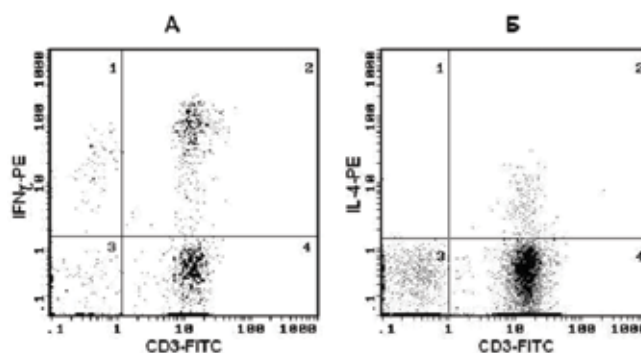


Рисунок 1. Распределение лимфоцитов периферической крови после неспецифической стимуляции и окрашивания Маb против IFN $\gamma$  и IL-4

Примечание. А- в квадранте 2 – Th1; Б- в квадранте 2 – Th2.

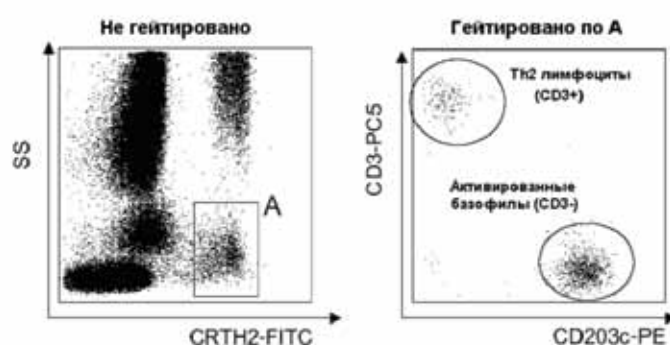


Рисунок 2. Локализация Th2-клеток с использованием моноклональных антител к CD294 (CRTH2). Анализ клеток периферической крови с использованием CD3-PC5, CD203c-PE и CRTH2-FITC (Boumiza R. et al., 2005 [12])

Многopараметрический анализ и CD294 (рис. 2) позволяет достаточно легко определить Th2-клетки, не прибегая к определению продукции внутриклеточных цитокинов [12].

Так, CRTH2 использовали для выявления Th2-клеток в многоцветном цитометрическом анализе при atopическом дерматите [23] и аллергических заболеваниях [20].

Использование данного подхода в клинической практике позволяет более точно определять преимущественную направленность регуляции иммунного ответа. Становится возможной диагностика не только при типичных состояниях, связанных с Th2-ответом (аллергия), но и, что очень важно, при комбинированных формах иммунопатологии (сочетание нескольких разнонаправленных процессов у одного пациента), а значит, появляется возможность адекватного назначения этиотропной и патогенетически обоснованной терапии.

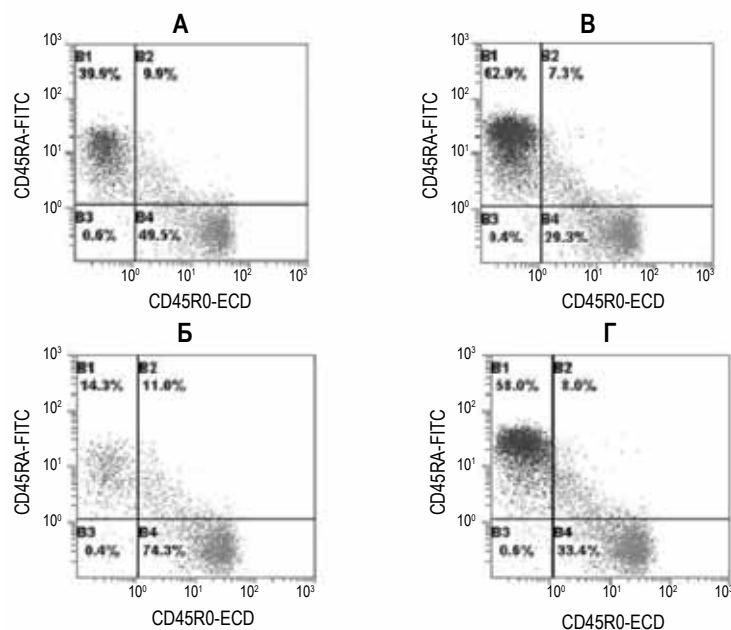
## Активированные Т-хелперы

Среди популяций Т-клеток в крови человека можно выявить как наивные Т-клетки, так и Т-клетки памяти, различающиеся между собой по функциональным и фенотипическим признакам [7]. Жизненный цикл Т-клеток в организме делится на две фазы: независимая от чужеродного антигена стадия дифференцировки Т-клеток и стадия, связанная с распознаванием чужеродного антигена. Первая из них завершается появлением в русле крови зрелых наивных Т-лимфоцитов, каждый из которых способен отвечать только на «свой» антиген. Стимулированные антигеном Т-клетки в ходе первичного ответа проходят дальнейшую дифференцировку.

Т-клетки памяти появляются в результате дифференцировки активированных антигеном наивных предшественников в ходе нормального развития первичного иммунного ответа *in vivo*. Экспрессия на клеточной поверхности различных изоформ молекулы CD45 позволяет разделить CD4<sup>+</sup>Т-лимфоциты человека на наивные Т-клетки и Т-клетки памяти. Принято относить субпопуляцию CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45R0<sup>+</sup>Т-лимфоцитов к Т-клеткам памяти и, соответственно, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup> — к наивным Т-клеткам. Подобное разделение основано исключительно на способности CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45R0<sup>+</sup>Т-клеток, а не наивных Т-лимфоцитов, интенсивно отвечать на повторный контакт с антигеном *in vitro*. В свою очередь, быстрый и усиленный ответ Т-клеток памяти на специфический антиген является их важнейшим функциональным отличием от наивных предшественников.

Покоящиеся CD4<sup>+</sup>Т-лимфоциты памяти также отличаются от наивных предшественников системой внутриклеточной сигнализации, обеспечивающей резистентность к воздействию Ca<sup>2+</sup>-ионофоров. Чувствительная к действию Ca<sup>2+</sup>-ионофоров популяция CD4<sup>+</sup>Т-клеток человека составляет основную часть покоящихся наивных CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45R0<sup>-</sup>Т-лимфоцитов [1]. В свою очередь, большинство резистентных к действию ионофоров CD4<sup>+</sup>Т-клеток являются покоящимися CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45R0<sup>+</sup>Т-лимфоцитами памяти.

Основная методическая сложность в исследованиях CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов в периферической крови здоровых доноров связана с тем, что активированные клетки составляют лишь незначительную часть. Как правило, в крови здоровых доноров доля активированных CD4<sup>+</sup>Т-



**Рисунок 3. Распределение лимфоцитов периферической крови условно здорового донора (А и В) и пациента в постоперационный период (Б и Г)**

**Примечание.** На гистограммах В и Г анализ лимфоцитов проводили только с гейтированием по CD45. На гистограммах А и Б анализировали клетки при помощи многоэтапного гейтирования по CD45 и CD4.

клеток составляет менее 10% от общего числа CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов.

Однозначным фенотипическим признаком дифференцировки покоящихся наивных CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>T-лимфоцитов человека в покоящиеся Т-клетки памяти принято считать появление на поверхности клеток молекул CD45RO вместо изоформы CD45RA. Данная особенность позволяет выявить три субпопуляции CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов человека: покоящиеся наивные CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>T-клетки, покоящиеся CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>T-клетки памяти и активированные — CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>T-клетки. Зрелых CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>-</sup>T-лимфоцитов в периферической крови человека не существует. Все активированные CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>T-лимфоциты появляются в процессе стимуляции наивных клеток антигеном *in vivo*.

Определение относительного количества CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> и CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> лимфоцитов может служить хорошим диагностическим признаком. При развитии инфекции или при хирургическом вмешательстве, поскольку происходит накопление доли CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> клеток и снижение CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>. Для более точной идентификации этих субпопуляций Т-клеток, как правило, используют многоцветный анализ и следующую комбинацию моноклональных антител — CD4/CD45RA/CD45RO/CD45 (рис. 3).

Появление молекул CD69 считают основным фенотипическим признаком наиболее ранней (первые часы) стадии активации наивных CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов. Как правило, в крови здоровых доноров не удается обнаружить присутствие более чем 1-4% CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>T-клеток [17].

В свою очередь, экспрессия молекул CD25 на поверхности CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов обычно рассматривается в качестве специфического признака стадии зависимой от антигена интенсивной пролиферации активированных Т-клеток. Отсутствие в крови здоровых доноров зрелых CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T-клеток позволяет корректно отличить данную стадию активации Т-клеток от предыдущей.

## Регуляторные Т-клетки (Treg)

Популяция CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T-клеток человека гетерогенна по функциональным свойствам и фенотипическим признакам. Она включает в себя популяции пролиферирующих CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> Т-клеток и «регуляторных» (Treg — T regulatory) CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>T-лимфоцитов [9, 24, 45]. Являясь реальными супрессорами, они играют ведущую роль во многих иммунологических процессах. Так, они регулируют Т-клеточный гомеостаз, предотвращают аутоиммунные заболевания, аллергии, гиперчувствительность, РТПХ.

С другой стороны, регуляторные Т-клетки снижают противоопухолевый иммунитет и иммунитет к инфекциям.

Первичный механизм супрессорной активности Тreg представляет собой деструкцию метаболизма. В результате наличия CD25 (альфа цепь рецептора IL-2), Тreg могут связывать IL-2, тем самым ингибируя активацию других Т-клеток. Снижая концентрацию IL-2, Тreg вызывают апоптоз IL-2-зависимых клеток, что было показано при некоторых клинических состояниях, включая ВИЧ [38]. Кроме того, эти клетки экспрессируют транскрипционный фактор подавления — FoxP3, который вовлечен в ингибирование клеточной активности. Так, Тreg могут потреблять IL-2 без активации иммунной функции и в то же самое время предотвращать активацию других Т-клеток. Кроме этого, из-за наличия на клеточной поверхности Тreg эктоэнзимов CD39 и CD73, они также способны модулировать ингибирование клеток через продукцию внеклеточного аденозина (Ado) из АТР (аденозин три фосфат), которые являются важными эндогенными сигнальными молекулами иммунитета и воспаления. Внеклеточный АТР играет роль сигнала опасности и ведет себя как хемоаттрактант для лимфоцитов, активируя про-воспалительный ответ, и является индуктором локальной боли [13].

Следует отметить, что CD39 представляет собой доминирующий эктоэнзим (гидролазу) с молекулярной массой 70-100 kDa и экспрессируется прежде всего на активированных лимфоидных клетках. У людей CD39 представляет собой маркер субпопуляций Тreg, которые могут быть вовлечены в контроль над воспалительными аутоиммунными заболеваниями [11].

С другой стороны, Тreg регулируют созревание дендритных клеток, модулируя взаимодействие через CD80/86 и CTLA-4. Известно, что CTLA-4 (цитостатический антиген Т-лимфоцитов 4, CD152) экспрессируется в высокой плотности Тreg-клетками и ингибирует иммунный ответ [51]. Показано, что CTLA-4 связывает молекулы CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2) с более высокой аффинностью чем CD28, тем самым ингибируется второй сигнал, необходимый для активации иммунного ответа [47]. Конститутивная экспрессия CTLA-4 среди CD4<sup>+</sup> клеток ограничена, прежде всего, Тreg и вовлечена в их иммуно-супрессорную функцию [42].

Еще одним механизмом супрессорной функции Тreg является цитолитическое посредство

гранзима А. Известно, что Тreg могут подавить иммунный ответ, вызывая апоптоз [37]. В данном случае механизмы апоптоза используются для регуляции развития тимоцитов, формирования репертуара Т-клеток, их селекции и для координации событий, ведущих к иммунному ответу на периферии [18]. Тreg могут управлять иммунным ответом при помощи перфорин/гранзимных путей. Показано, что адаптивные Тreg в основном экспрессируют гранзим В и могут убивать аллогенные клетки мишени в перфорин-зависимым путем. У людей активированные Тreg экспрессируют гранзим А и очень небольшое количество гранзима В [19]. Это свидетельствует в пользу того, что Тreg воплощают свою регулируемую способность через супрессию при помощи цитотоксической активности.

Кроме того, Тreg могут продуцировать ингибирующие цитокины, такие как IL-10, TGF-beta, и IL-35 [14, 32, 46]. И, наконец, они вовлечены в регуляцию периферийной толерантности к собственным антигенам [55].

Тreg-клетки имеют следующий фенотип CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD45R0<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>, однако наиболее важным их маркером является FOXP3. Недавние исследования показали что FOXP3, кодирующий фактор транскрипции скурфин (scurfin), является главным регулирующим геном для развития и функционирования CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> регуляторных Т-клеток. В настоящее время, самым точным маркером для идентификации Тreg клеток является как раз фактор транскрипции FOXP3. Однако идентификация этого маркера требует пермеабилзации клеток, что затрудняет работу по идентификации Тreg [44].

Недавно появились данные о рецепторе IL-7 (CD127) как возможном биомаркере для Тreg у людей. В периферической крови комбинация CD4, CD25 и CD127 выявляет группу Т-клеток, которая обладает высокой супрессивной активностью и высокой экспрессией FOXP3 [28].

В свою очередь, эксперименты *in vitro* показали, что экспрессия CD127 после активации Т-клеток резко снижается. CD127 представляет из себя α-цепь гетеродимерного рецептора IL-7, состоящего из CD127 и общей γ-цепи, которая представлена и у других рецепторов цитокинов (IL-2R, IL-4R, IL-9R, IL-15R, и IL-21R). CD127 экспрессируется на тимоцитах, Т- и В-предшественниках, зрелых Т-клетках, моноцитах и некоторых других лимфоидных и миелоидных клетках. Показано, что IL-7R играет

важную роль в пролиферации и дифференцировке зрелых Т-клеток [43, 44, 54].

Таким образом, окончательный фенотип Treg-клеток будет выглядеть следующим образом:  $CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD127^{dim-to-neg}FOXP3^+$  и для их детектирования можно использовать данный фенотип Treg, без выявления FOXP3. Для более точной идентификации Treg-клеток предпочтительно использовать многоцветный анализ и многоэтапное «гейтирование» с использованием следующего набора моноклональных антител – CD45/CD4/CD25/CD127 (рис. 4).

Концепция двух последних десятилетий, использующая модель Th1-Th2, обеспечила понимание в Т-клеточной биологии и взаимодействии врожденного и адаптивного иммунитета.

Наивные Т-клетки дифференцируются в эффекторные Т-клетки, у которых значительно повышается функциональный потенциал. Этот процесс необходим для освобождения организма от патогенов. В значительной степени это происходит под действием цитокинов, продуцируемых клетками врожденной иммунной системы, которые, в свою очередь, были активированы при взаимодействии с патогенами. Это вторичное обучение пост-тимических Т-клеток обеспечивает механизм соответствия адаптивного иммунитета и врожденной иммунной системы.

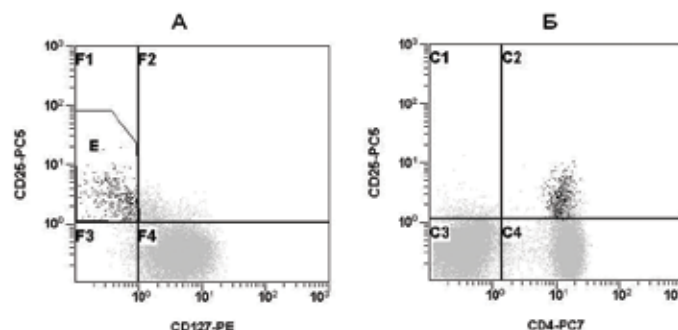
## Т-хелперы 17 (Th17)

$CD4^+$ Т-клетки после активации и экспансии дифференцируют в различные Т-хелперные субпопуляции с различными профилями цитокина и различными эффекторными функциями. До недавнего времени Т-хелперы были раз-

делены на Th1- или Th2-клетки, в зависимости от цитокинов, которые они продуцируют. Однако в настоящее время была обнаружена и охарактеризована третья субпопуляция эффекторных Т-хелперов, продуцирующих IL-17, которая получила название Th17. Было показано, что трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ ) предотвращает дифференцировку в направлении Th1 и Th2, вызывая преобразование наивных  $CD4^+$ Т-клеток в FOXP3-экспрессирующие регуляторные Т-клетки [34, 50]. Напротив, в присутствии про-воспалительных цитокинов, включая IL-6, TGF- $\beta$  не только ингибирует экспрессию FOXP3, но и вызывает дифференцировку про-воспалительных эффекторных Th17-клеток, продуцирующих IL-17 [10, 31, 49].

Таким образом, Th17-клетки, вероятно, имеют взаимосвязь с Treg-клетками. Эта взаимосвязь выявляется при помощи общего индуктора TGF- $\beta$ . В этом случае наблюдается перекрывание профиля хемокиновых рецепторов и экспрессии Th17-связанного фактора транскрипции ROR $\gamma$ t [22, 48]. Имеются данные о том, что TGF- $\beta$  индуцирует экспрессию FOXP3 в наивных Т-клетках. С другой стороны, IL-6 подавляет TGF- $\beta$ -индуцированную экспрессию FOXP3, а совместно TGF- $\beta$  и IL-6 индуцируют экспрессию ROR $\gamma$ t и запускают транскрипционную программу для Th17. На молекулярном уровне баланс между Th17-клетками и FOXP3 $^+$ Treg устанавливается за счет антагонистического взаимодействия факторов транскрипции FOXP3 и ROR $\gamma$ t. У мышей показано, что Treg-клетки могут преобразовываться в IL-17-продуцирующие Т-клетки [41, 52, 53].

Кроме того было показано, что Treg-клетки человека, идентифицированные как



**Рисунок 4. Многоэтапное гейтирование при анализе Treg-клеток в периферической крови**

**Примечание.** А – гистограмма распределения CD127 и CD25 после одновременного гейтирования по CD4 и CD45. В зоне E находятся регуляторные клетки. Б – гистограмма распределения CD4 и CD25 после гейтирования только по CD45. Черные точки – Treg-клетки.

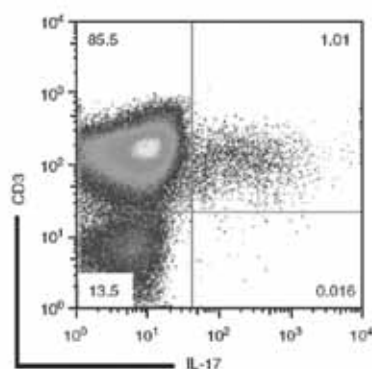


Рисунок 5. Анализ Th17 у пациента с атопическим дерматитом. Лимфоциты инкубировали 8 часов с РМА/ИМ и затем окрашивали Маb против IL-17 (Koga C. et al., 2008 [26])

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>, дифференцировались до IL-17-продуцирующих Т-клеток и этот процесс сопровождался повышением экспрессии ROR $\gamma$ t и CCR6 [25].

Th17-клетки были обнаружены при различных заболеваниях суставов, но их функциональная роль не была установлена. Так, Th17-клетки были обнаружены при ревматоидном артрите, однако остается неясно Th1 и/или Th17-клетки приводят к хронизации заболевания [29]. На модели экспериментального артрита был выявлен значительный вклад Th17-клеток в развитии воспалительного процесса [30]. В то же время предварительные исследования свидетельствуют в пользу того, что в течение хронической стадии атопического дерматита не последняя роль принадлежит Th17 (рис. 5) [16, 26].

Таким образом, помимо Th1- и Th2-клеток Th17-клетки составляют третью субпопуляцию эффекторных Т-хелперов с отличительными эффекторными функциями. Для них были идентифицированы факторы дифференцировки (TGF- $\beta$  плюс IL-6 или IL-21) и факторы транскрипции (STAT3, IRF4, ROR $\gamma$ t, и ROR $\alpha$ ), которые определяют транскрипционную программу Th17.

IL-21 непосредственно продуцируется Th17-клетками. IL-21 совместно с TGF- $\beta$  способен вызывать Th17 дифференцировку и может быть частью положительной петли обратной связи для увеличения количества предшественников Th17-клеток.

IL-23 не является фактором дифференцировки Th17-клеток. Однако IL-23 стабилизирует дифференцировку Th17-клеток и лидирует в дальнейшем процессе созревания Th17-клеток, например, индуцируя IL-22 в Th17-клетках.

Th17-клетки являются важными эффекторными клетками в защите хозяина против некоторых патогенов типа *Candida albicans* и определенных внеклеточных бактерий. Однако широкое распределение рецепторов к IL-17 и IL-22, как правило, заканчивается массовым клеточным ответом после активации Th17-клеток. Этот широкий ответ на эффекторные цитокины, продуцируемые Th17, может быть основанием для объяснения способности Th17-клеток вызвать воспаление с деструкцией тканей и аутоиммунные расстройства [27].

Несмотря на всю важность и функциональную значимость Th17, определение их пока мало используется в широкой клинической лабораторной практике. Это связано с тем, что их идентификация достаточно трудоемка и находится в начальной стадии внедрения.

Таким образом, в настоящее время имеются четкие данные о рецепторах и функциональной значимости различных субпопуляций Т-хелперов. Их изучение позволит расшифровать новые механизмы реагирования иммунной системы в норме и при различной патологии, что, несомненно, скажется на качестве постановки лабораторного диагноза нарушений иммунной системы и адекватности назначаемой иммунотерапии.

## Список литературы

1. Хайдуков С.В., Холоденко И.В., Литвинов И.С. Иономицин-резистентная субпопуляция CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов периферической крови человека. Фенотипическая характеристика // Цитология — 2003. — 45 (3). — С. 249-254.
2. Хайдуков С.В. Подходы к стандартизации метода проточной цитометрии для иммунофе-

нотипирования. Настройка цитометров и подготовка протоколов для анализа // Медицинская Иммунология. — 2007. — Т. 9 (6). — С. 569-574.

3. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине // Медицинская Иммунология. — 2007. — Т. 9 (4-5). — С. 373-378.

4. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Расширение возможностей метода проточной цитометрии для клинко-иммунологической практики // Медицинская Иммунология. — 2008. — Т. 10 (1). — С. 5-12.

5. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. Многоцветный цитометрический анализ. Идентификация Т-клеток и их субпопуляций по экспрессии  $\alpha\beta$ -TCR и  $\gamma\delta$ -TCR // Медицинская Иммунология. — 2008. — Т. 10 (2-3). — С. 115-124.

6. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тотоян Арег А., Черешнев В.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) // Медицинская Иммунология. — 2009. — Т. 11 (2-3). — С. 227-238.

7. Ahmed R., Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation // Science. — 1996. — Vol. 272 (5258). — P. 54-60.

8. Assenmacher M., Schmitz J., Radbruch A. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells // Eur. J. Immunol. — 1994. — Vol. 24. — P. 1097-1101.

9. Baecher-Allan C., Brown J.A., Freeman G.J., Hafler D.A. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood // J. Immunol. — 2001. — Vol. 167 (3). — P. 1245-1253.

10. Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M., Weiner H.L., Kuchroo V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells // Nature. — 2006. — 441. — P. 235-238.

11. Borsellino G., Kleinewietfeld M., Di Mitri D., Sternjak A., Diamantini A., Giometto R., Höpner S., Centonze D., Bernardi G., Dell'Acqua M.L., Rossini P.M., Battistini L., Röttschke O., Falk K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3<sup>+</sup> Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune

suppression // Blood. — 2007. — Vol. 110 (4). — P. 1225-1232.

12. Boumiza R., Debarb A.-L., Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives // Clin. and Mol. Allergy. — 2005. — Vol. 3 (9). — P. 1-8.

13. Bours M.J., Swennen E.L.R., Di Virgilio F., Cronstein B.N., Dagnelie P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation // Pharmacology. Therapeutics. — 2006. — Vol. 112 (2). — P. 358-404.

14. Collison L.W., Workman C.J., Kuo T.T., Boyd K., Wang Y., Vignali K.M., Cross R., Sehy D., Blumberg R.S., Vignali D.A. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function // Nature. — 2007. — Vol. 450 (7169). — P. 566-569.

15. Crucian B., Dunne P., Friedman H., Ragsdale R., Pross S., Widen R. Detection of altered T helper 1 and T helper 2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis utilizing intracellular cytokine detection by flow cytometry and surface marker analysis // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 1996. — Vol. 3 (4). — P. 411-416.

16. Di Cesare A., Di Meglio P., Nestle F.O. A role for Th17 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis? // J. Investigat Dermatology. — 2008. — 128. — P. 2569-2571.

17. Gerosa F., Tommasi M., Scardoni M., Accolla R.S., Pozzan T., Libonati M., Tridente G., Carra G. Structural analysis of the CD69 early activation antigen by two monoclonal antibodies directed to different epitopes. // Mol. Immunol. — 1991. — Vol. 28 (1-2). — P. 159-168.

18. Giovannetti A., Pierdominici M., Di Iorio A., Cianci R., Murdaca G., Puppo F., Pandolfi F., Paganelli R. Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases // Current. Pharmaceutical. Design. — 2008. — Vol. 14 (3). — P. 253-268.

19. Grossman W.J., Verbsky J.W., Barchet W., Colonna M., Atkinson J.P., Ley T.J. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death // Immunity. — 2004. — Vol. 21 (4). — P. 589-601.

20. Hsu S.C., Chen L.C., Kuo M.L., Huang J.L., Huang S.K. Novel SNPs in a candidate gene, CRTH2, for allergic diseases // Genes. Immun. — 2002. — Vol. 3 (2). — P. 114-116.



21. Hu-Li J., Huang H., Ryan J., Paul W. In differentiated CD4<sup>+</sup> T cells, interleukin 4 production is cytokine-autonomous, whereas interferon gamma production is cytokine-dependent // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94. – P. 3189-3194.
22. Ivanov I.I., McKenzie B.S., Zhou L., Tadokoro C.E., Lepelley A., Lafaille J.J., Cua D.J., Littman D.R. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells // *Cell.* – 2006. – 126. – P. 1121-1133.
23. Iwasaki M., Nagata K., Takano S., Takahashi K., Ishii N., Ikezawa Z. Association of a new-type prostaglandin D2 receptor CRTH2 with circulating T helper 2 cells in patients with atopic dermatitis // *J. Invest. Dermatol.* – 2002. – Vol. 119 (3). – P. 609-616.
24. Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M., Tuettenberg A., Knop J., Enk A.H. Identification and functional characterization of human CD4(+) CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood // *J. Exp. Med.* – 2001. – Vol. 193 (11) – P. 1285-1294.
25. Koenen H.J., Smeets R.L., Vink P.M., van Rijssen E., Boots A.M., Joosten I. Human CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>pos</sup> regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells // *Blood.* – 2008. – 112. – P. 2340-2352.
26. Koga C., Kabashima K., Shiraishi N., Kobayashi M., Tokura Y. Possible pathogenic role of th17 cells for atopic dermatitis // *J. Investigat Dermatology.* – 2008. – 128. – P. 2625-2630.
27. Korn T., Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V.K. IL-17 and Th17 Cells // *Annu. Rev. Immunol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 485-517.
28. Liu W., Putnam A.L., Xu-Yu Z., Szot G.L., Lee M.R., Zhu S., Gottlieb P.A., Kapranov P., Gingeras T.R., Fazekas de St Groth B., Clayberger C., Soper D.M., Ziegler S.F., Bluestone J.A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T-reg cells // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203 (7). – P. 1701-1711.
29. Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? // *Cytokine.* – 2008. – Vol. 41. – P. 84-91.
30. Lubberts E., Koenders M.I., van den Berg W.B. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models // *Arthritis. Res. Ther.* – 2005. – Vol. 7. – P. 29-37.
31. Mangan P.R., Harrington L.E., O'Quinn D.B., Helms W.S., Bullard D.C., Elson C.O., Hatton R.D., Wahl S.M., Schoeb T.R., Weaver C.T. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage // *Nature.* – 2006. – Vol. 441. – P. 231-234.
32. Miyara M., Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression // *Trends. Molecular. Medicine.* – 2007. – Vol. 13 (3). – P. 108-116.
33. Mosmann T., Cherwinski H., Bond M., Giedlin M., Coffman R. Two types of murine helper T cell clone. 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins // *J. Immunol.* – 1986. – Vol. 136. – P. 2348-2357.
34. Mucida D., Kutchukhidze N., Erazo A., Russo M., Lafaille J.J., Curotto de Lafaille M.A. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs // *J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115. – P. 1923-1933.
35. Murphy E., Shibuya K., Hosken N., Openshaw P., Maino V., Davis K., Murphy K., O'Garra A. Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 183 (3). – P. 901-913.
36. Nagata K., Tanaka K., Ogawa K., Kemmotsu K., Imai T., Yoshie O., Abe H., Tada K., Nakamura M., Sugamura K., Takano S. Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells *in vivo* // *J. Immunol.* – 1999. – Vol. 162. – P. 1278-1286.
37. Pandiyan P., Zheng L., Ishihara S., Reed J., Lenardo M.J. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup> T cells // *Nature. Immunology.* – 2007. – Vol. 8 (12). – P. 1353-1362.
38. Pandolfi F., Pierdominici M., Marziali M., Livia Bernardi M., Antonelli G., Galati V., D'Offizi G., Aiuti F. Low-dose IL-2 reduces lymphocyte apoptosis and increases naive CD4 cells in HIV-1 patients treated with HAART // *Clinical. Immunology.* – 2000. – Vol. 94 (3). – P. 153-159.
39. Picker L.J., Singh M.K., Zdraveski Z., Treer J.R., Waldrop S.L., Bergstresser P.R., Maino V.C. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry // *Blood.* – 1995. – Vol. 86 (4). – P. 1408-1419.
40. Quint D.J., Bolton E.J., McNamee L.A., Solari R., Hissey P.H., Champion B.R., MacKenzie A.R., Zanders E.D. Functional

and phenotypic analysis of human T-cell clones which stimulate IgE production *in vitro* // Immunology. – 1989. – Vol. 67 (1). – P. 68-74.

41. Radhakrishnan S., Cabrera R., Schenk E.L., Nava-Parada P., Bell M.P., Van Keulen V.P., Marler R.J., Felts S.J., Pease L.R. Reprogrammed FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cells become IL-17<sup>+</sup> antigen-specific autoimmune effectors *in vitro* and *in vivo* // J. Immunol. – 2008. – Vol. 181. – P. 3137-3147.

42. Read S., Malmstrom V., Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation // J. Exp. Med. – 2000. – Vol. 192 (2). – P. 295-302.

43. Ryan D.H., Nuccie B.L., Ritterman I., Liesveld J.L., Abboud C.N., Insel R.A. Expression of interleukin-7 receptor by lineage-negative human bone marrow progenitors with enhanced lymphoid proliferative potential and B-lineage differentiation capacity // Blood. – 1997. – Vol. 89 (3). – P. 929-940.

44. Schubert L.A., Jeffery E., Zhang Y., Ramsdell F., Ziegler S.F. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. // J. Biol. Chem. – 2001. – 276 (40). – P. 37672-37679.

45. Shevach E.M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers // Nat. Rev. Immunol. – 2002. – Vol. 2 (6). – P. 389-400.

46. Shevach E.M. Immunology: regulating suppression // Science. – 2008. – Vol. 322 (5899). – P. 202-203.

47. Shevach E.M. Mechanisms of FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cell mediated suppression // Immunity. – 2009. – Vol. 30 (5). – P. 636-645.

48. Van Hamburg J.P., de Bruijn M.J., de Almeida C.R., van Zwam M., van Meurs M., de Haas E., Boon L., Samsom J.N., Hendriks R.W. Enforced expression of GATA3 allows differentiation of IL-17-producing cells, but constrains Th17-mediated pathology // Eur. J. Immunol. – 2008. – Vol. 38. – P. 2573-2586.

49. Veldhoen M., Hocking R.J., Atkins C.J., Locksley R.M., Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports

de novo differentiation of IL-17-producing T cells // Immunity. – 2006. – Vol. 24. – P. 179-189.

50. Wahl S.M., Wen J., Moutsopoulos N. TGF-beta: A mobile purveyor of immune privilege // Immunol. Rev. – 2006. – Vol. 213. – P. 213-227.

51. Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P., Yamaguchi T., Miyara M., Fehervari Z., Nomura T., Sakaguchi S. CTLA-4 control over FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cell function // Science. – 2008. – Vol. 322 (5899). – P. 271-275.

52. Xu L., Kitani A., Fuss I., Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta // J. Immunol. – 2007. – Vol. 178. – P. 6725-6729.

53. Yang X.O., Pappu B.P., Nurieva R., Akimzhanov A., Kang H.S., Chung Y., Ma L., Shah B., Panopoulos A.D., Schluns K.S., Watowich S.S., Tian Q., Jetten A.M., Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma // Immunity. – 2008. – Vol. 28. – P. 29-39.

54. Zaunders J.J., Dyer W.B., Munier M.L., Ip S., Liu J., Amyes E., Rawlinson W., De Rose R., Kent S.J., Sullivan J.S., Cooper D.A., Kelleher A.D. CD127<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>CD38<sup>+++</sup> CD4<sup>+</sup> Th1 effector cells are an early component of the primary immune response to vaccinia virus and precede development of interleukin-2<sup>+</sup> memory CD4<sup>+</sup> T cells // J. Virol. – 2006. – Vol. 80 (20). – P. 10151-10161.

55. Ziegler S.F. FOXP3: of mice and men // Annual. Review. Immunology. – 2006. – Vol. 24. – P. 209-226.

56. Zola H., Swart B., Nicholson I., Aasted B., Bensussan A., Boumsell L., Buckley C., Clark G., Drbal K., Engel P., Hart D., Horejsi V., Isacke C., Macardle P., Malavasi F., Mason D., Olive D., Saalmueller A., Schlossman S.F., Schwartz-Albiez R., Simmons P., Tedder T.F., Ugucioni M., Warren H. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules // Blood. – 2005. – Vol. 106 (9). – P. 3123-3126.

поступила в редакцию 20.10.2010  
отправлена на доработку 01.11.2010  
принята к печати 30.11.2010