

МАЛЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ Т-ХЕЛПЕРОВ (Th НАИВНЫЕ ТИМИЧЕСКИЕ, Th НАИВНЫЕ ЦЕНТРАЛЬНЫЕ, Th9, Th22 И CD4⁺CD8⁺ ДВАЖДЫ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ Т-КЛЕТКИ)

Хайдуков С.В.

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава РФ, Москва, Россия
Технопарк, ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Резюме. Одну из ключевых ролей в процессах, происходящих в организме при попадании чужеродного антигена, играют Т-клетки, а именно Т-хелперы (Th). Появление новых высокочувствительных инструментов позволило исследовать более тонкую структурную организацию Т-клеток, выявить среди них целый ряд функционально значимых малых субпопуляций. Данные Т-клетки были охарактеризованы как фенотипически, так и функционально. Представленный обзор посвящен Th наивным тимическим, Th наивным центральным, Th9, Th22 и CD4⁺CD8⁺ дважды положительным Т-клеткам, отражена их роль и функциональная значимость при различных патологических состояниях. В настоящее время имеются четкие данные о наличии определенных наборов мембранных молекул, транскрипционных факторов и продукции специфических медиаторов иммунной системы, отличающих эти субпопуляции.

Использование этих данных в лабораторных исследованиях, несомненно, скажется на качестве диагностики нарушений функционирования иммунной системы и адекватности назначаемой иммунотерапии.

Ключевые слова: цитометрия, наивные Т-клетки, Т-хелперы, Th9, Th22

Адрес для переписки:

Хайдуков Сергей Валерьевич
д.б.н., заведующий лабораторией клеточной иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева», старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
117997, Россия, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Тел.: 8 (985) 923-41-62.
E-mail: khsergey54@mail.ru

Авторы:

Хайдуков С.В. — д.б.н., заведующий лабораторией клеточной иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева», старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», Москва, Россия

Поступила 21.05.2013

Принята к печати 10.06.2013

MINOR SUBSETS OF T-HELPER CELLS (Th THYMIC NAIVE, Th CENTRAL NAIVE, Th9, Th22 AND CD4⁺CD8⁺ DOUBLE POSITIVE T-CELLS)

Khaidukov S.V.

*Dmitry Rogachev Federal Research and Clinical Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Russian Ministry of Health, Moscow, Russian Federation
Technopark, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

Abstract. T cell populations, specifically, T helper (Th) cells, are among key players in the processes occurring in the body following exposure to a foreign antigen. Usage of new, highly sensitive instruments allowed of more detailed studies of their structural arrangement, as well as to detect a number of functionally significant minor subsets. These T cell subtypes were characterized both phenotypically and functionally. Present review article concerns Th thymic naïve subsets, Th central naïve subpopulations, Th9, Th22, and CD4⁺CD8⁺ double-positive T cells. Their role and functional significance is discussed in various pathological conditions. At present time, there are convincing data about specific arrays of membrane molecules, transcription factors, production of specific mediators typical to either of these subsets. Application of these markers in laboratory studies, will certainly improve diagnostic quality when evaluating functional alterations of immune system and adequacy of prescribed immunotherapy. (*Med. Immunol.*, 2013, vol. 15, N 6, pp 503-512)

Keywords: cytometry, naïve T-cells, T-helpers, Th9, Th22

Address for correspondence:

Khaidukov Sergey V.
PhD, MD, Head of Laboratory of Cell Biology, Dmitry Rogachev Federal Research and Clinical Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Russian Ministry of Health Care, Senior Research Associate, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
117997, Russian Federation, Moscow, GSP-7,
Miklukho-Maklaya str., 16/10.
Phone: 7 (985) 923-41-62.
E-mail: khsergey54@mail.ru

Authors:

Khaidukov S.V., PhD, MD (Biology), Head of Laboratory of Cell Biology, Dmitry Rogachev Federal Research and Clinical Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Russian Ministry of Health Care, Senior Research Associate, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Received 21.05.2013

Accepted 10.06.2013

Иммунологическая наука, опираясь на огромный прогресс в инструментальной и реагентной базах, значительно расширила наши представления о процессах, происходящих в организме при попадании в него чужеродного антигена. Одну из ключевых ролей в этом играют Т-клетки, а именно Т-хелперы (Th). Появление новых высокочувствительных инструментов позволило исследовать более тонкую структурную организацию Т-клеток, а именно популяции Т-хелперов, выявить среди них целый ряд функционально значимых малых субпопуляций и охарактеризовать их как фенотипически, так и функционально. К таковым относятся Th1, Th2, Treg, Th17 и целый ряд других [1, 2]. Однако исследования, продолжающиеся в этом направлении, позволили локализовать отдельные субпопуляции среди наивных Т-хелперов, минорные популяции, специализирующиеся на продукции отдельных цитокинов, и достаточно подробно охарактеризовать популяцию Т-клеток, одновременно экспрессирующую маркеры как Т-хелперов, так и цитотоксических Т-клеток. Именно этим типам клеток посвящен данный обзор.

CD31^{+thymic} наивные и CD31^{-central} наивные CD4⁺Т-клетки

Термин «наивные Т-клетки» связан с выдвинутой гипотезой о том, что CD4⁺Т-клетки сразу же после выхода из тимуса еще не вступали в контакт с чужеродными антигенами. Таким образом, они еще не нацелены ни на какие антигены и не прошли дифференцировку до стадии эффекторных CD4⁺Т-клеток и последующей иммунологической памяти. Характерным фенотипом для наивных CD4⁺Т-клеток человека является экспрессия CD45RA, CD62L, CD27, CD28 и CCR7 и отсутствие или низкая экспрессия CD45R0, CD11a, CD44, CD95, CXCR3 и CCR4 [14, 47]. Исследования, направленные на исследование фенотипа CD4⁺Т-клеток в процессе их дифференцировки и активации, были продолжены, и оказалось, что поверхностные молекулы CD31 (PECAM-1) могут быть использованы для различения CD31⁺ тимических наивных (CD31^{+thymic}) и CD31⁻ центральных наивных (CD31^{-central}) CD4⁺Т-клеток в периферической крови здоровых людей [26].

CD31 (PECAM-1) представляет собой одноцепочечную молекулу, содержащую 6 Ig-подобных внеклеточных доменов, короткий трансмембранный сегмент и хвост, погруженный в цитоплазму [34]. Было выдвинуто предположение о том, что CD31 функционирует как молекула клеточной адгезии за счет наличия Ig-подобных доменов и их высокой плотности в эндотелиальных межклеточных пространствах [35]. Экспериментальные исследования действительно показали, что моноклональные антитела, специфичные к CD31, блокируют миграцию моноцитов и нейтрофилов [31]. Однако, в противоположность этому, *in vitro* [6] и *in vivo* [50]

исследования выявили, что наличие экспрессии CD31 на лимфоцитах отрицательно коррелирует с их миграцией.

Дальнейшие исследования показали, что у взрослых людей Т-клетки периферической крови в основном не экспрессируют CD31, причем это относится главным образом к CD45RA⁺CD45R0⁺ клеткам (Т-клетки памяти) [49, 52]. Кроме того, потеря CD31 наблюдалась при активации и дифференцировке Т-лимфоцитов [15], особенно этим отличались CD4⁺Т-клетки [29]. Однако, механизм, лежащий в основе утраты CD31 с поверхности Т-клеток, не известен.

С другой стороны, было продемонстрировано значительно более высокое содержание TREC (T-cell Receptor Excision Circle) у CD31^{+thymic} по сравнению с CD31^{-central} наивными CD4⁺Т-клетками [24, 25, 26]. Следует отметить, что во время дифференцировки Т-клеток первые TREC генерируются при вычлениении TCR D локуса в течение TCR-α перегруппировки. В дальнейшем, содержание TREC в Т-клетках уменьшается за счет пролиферации, то есть при каждом делении количество их снижается, поскольку TREC не реплицируются во время митоза, и перераспределяется в дочерние клетки. Таким образом, количественная оценка TREC позволяет оценить историю пролиферации Т-клеток [16].

В связи с тем, что высокое содержание TREC у CD31^{+thymic} наивных CD4⁺Т-клеток лишь не намного уменьшается по сравнению с тимоцитами, это позволяет предположить, что данная субпопуляция в основном содержит клетки-эмигранты из тимуса. С другой стороны, резкое снижение содержания TREC у CD31^{-central} наивных CD4⁺Т-клеток подразумевает их пролиферацию в периферии [29]. Косвенно это подтверждается и другими данными. Так, CD31^{-central} наивные CD4⁺Т-клетки предпочтительно инфицируются ВИЧ по сравнению с CD31^{+thymic} наивными CD4⁺Т-клетками [10]. Этот факт свидетельствует в пользу того, что пролиферативно-активные CD31^{-central} наивные CD4⁺Т-клетки более восприимчивы к инфекции и тем самым обеспечивают резервуар для ВИЧ у человека.

Таким образом, CD31^{+thymic} наивные CD4⁺Т-клетки представляют собой отличный клеточный маркер для характеристики активности тимуса человека по нескольким причинам. Во-первых, измерение TREC по уровню ДНК имеет несколько недостатков, в частности данный анализ ограничен для клеточных субпопуляций. Помимо этого, для определения TREC используют различные методы, и, соответственно, опубликованные результаты по среднему содержанию TREC в CD4⁺Т-клетках периферической крови нормальных здоровых людей проявляют значительные вариации [27, 37, 44]. В противоположность этому, цитометрический анализ абсолютного количества CD31^{+thymic}

наивных CD4⁺T-клеток предоставляет возможность прямой оценки на уровне одной клетки и его легко стандартизировать. Кроме того, для анализа необходимо незначительное количество крови, а подготовка образца для анализа и измерение выполняется в течение часа.

Подтверждением того, что CD31 возможно использовать в качестве прямого маркера для контроля за функционированием тимуса, является то, что после аутологичной трансплантации стволовых клеток практически все вновь появившиеся наивные CD4⁺T-клетки экспрессируют CD31 [51]. На рисунке 1 представлены результаты анализа лимфоцитов периферической крови на 90 день после аутологичной трансплантации стволовых клеток. В квадранте H2 находятся CD31⁺thymic наивные CD4⁺T-клетки. Анализ CD31 позитивных клеток был также успешно использован при различных экспериментах, например, в процессе исследования гемопоэтических стволовых клеток [32, 51], трансплантации органов [36], при аутоиммунных заболеваниях [18] и ряде других патологий [8, 46]. Интересно отметить, что увеличение частоты встречаемости CD31⁺thymic наивных CD4⁺T-клеток после аутотрансплантации стволовых клеток было статистически значимым, в то время как изменения в уровне TRESC не было выявлено [32]. Несмотря на то, что это может быть результатом более высокой чувствительности или меньшей изменчивости цитометрического анализа по сравнению с полимеразной цепной реакцией (ПЦР), оценка CD31 может быть предпочтительна, по крайней мере, в определенных условиях.

На сегодняшний день использование данного подхода приобрело широкое применение. Так, было показано, что относительное и абсолютное число CD31⁺thymic наивных CD4⁺T-клеток, обогащенных TRESC, коррелирует с возрастом здоровых людей, и это связано с особенностями функционирования

тимуса [15, 28]. Кроме того, была выявлена значительная корреляция между CD4⁺T-клетками, содержащими TRESC, и частотой CD31⁺thymic наивных CD4⁺T-клеток как у пациентов с различными иммунодефицитами [21], так и рассеянным склерозом [18].

Хотя определение CD31⁺thymic наивных CD4⁺T-клеток, по-видимому, может даже заменить анализ TRESC в условиях ограниченной доступности образцов или в затрудненных лабораторных условиях, комбинированная оценка результатов данных, полученных разными методами, может быть весьма полезна. Однако следует отметить, что интерпретация данных анализа TRESC может быть затруднена тем, что в результате гомеостатической пролиферации происходит изменение состава анализируемой T-клеточной популяции, а это существенно влияет на конечные результаты. В данном случае исследователи должны это учитывать, что особенно важно при анализе патологических состояний. Именно в этих условиях параллельное измерение CD31⁺thymic наивных и CD31⁻central наивных CD4⁺T-клеток может помочь интерпретировать результаты, а гомеостатическая пролиферация найдет свое отражение в увеличении CD31⁻central наивных CD4⁺T-клеток.

Субпопуляция Т-хелперов, секретирующая IL-9 (Th9-клетки)

Цитокин IL-9 был идентифицирован и его основные характеристики были описаны более чем три десятилетия тому назад [53]. Ранее IL-9 считался цитокином Th2-клеток, так как он способствует развитию аллергического воспаления и связан с различными ответами по типу Th2 [20]. Более поздние исследования показали многофункциональную активность этого цитокина.

Большое значение имеет недавнее открытие субпопуляции CD4⁺T-клеток, секретирующих IL-9 (клетки Th9) и отличающихся от Th1, Th2 и Th17. Одной из основных характеристик Th9 клеток явля-

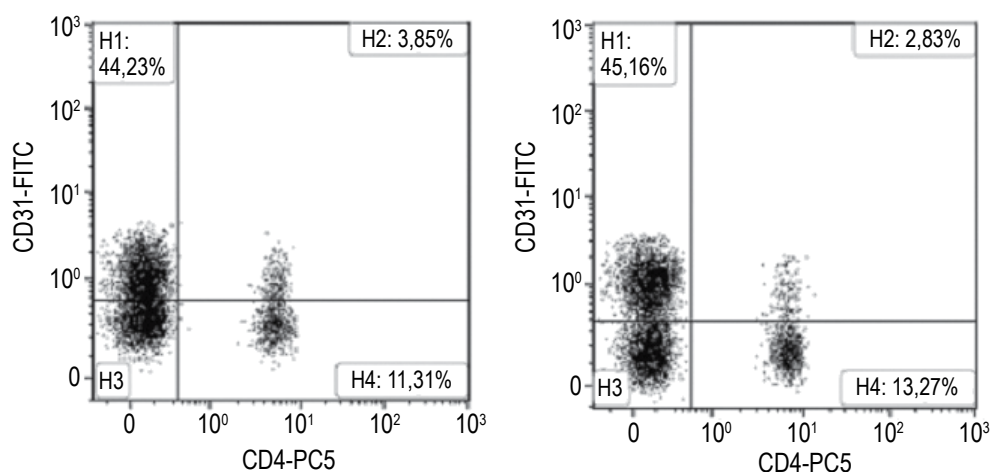


Рисунок 1. Анализ лимфоцитов периферической крови двух пациентов на 90 день после аутологичной трансплантации стволовых клеток. В квадранте H2 находятся CD31⁺thymic наивные CD4⁺T-клетки

ется продукция IL-9 и IL-10 и их дифференцировка из наивных CD4⁺ предшественников, обусловленная совокупным воздействием TGF-β и IL-4 [13, 54]. Кроме этого, особенностью этой субпопуляции является наличие транскрипционного фактора PU.1. Данный фактор является ключевым фактором транскрипции в программе дифференцировки Th9. PU.1 экспрессируется в Th9-клетках в значительно больших количествах, чем в Th2-клетках. PU.1 негативно регулирует развитие Th2-клеток, и эктопическая экспрессия PU.1, по крайней мере, частично увеличивает продукцию IL-9. Наивные CD4⁺Т-клетки, полученные от мышей дефицитных по PU.1, в условиях, необходимых для культивирования Th9, сокращали продукцию IL-9 [12].

Несмотря на продукцию противовоспалительного цитокина IL-10, данный тип клеток способствует аллергическому воспалению. Исследования показали, что Th9-клетки способны индуцировать воспаление тканей в модели колита [30], а также отмечена их роль при туберкулезном плеврите [58]. Что еще более важно, IL-9 оказался ключевой молекулой, которая влияет на дифференцировку Th17-клеток и функцию Treg. Так, между Th17 и Th9 наблюдается обратная взаимосвязь, поскольку IL-9 совместно с TGF-β направляет дифференцировку наивных CD4⁺Т-клеток в сторону Th17, а в это же время секреция IL-9 регулируется Th17-клетками. С другой стороны, IL-9 усиливает супрессорную функцию FoxP3⁺CD4⁺Treg *in vitro*, а отсутствие IL-9 сигнализации понижает подавляющую активность Tregs *in vivo*, что приводит к увеличению эффекторных клеток и ухудшению экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАМ). Недавно было показано, что нейтрализации IL-9 и дефицит его рецептора приводят к затуханию ЭАМ, и этот эффект коррелирует с уменьшением клеток Th17 [38].

Существует мнение, что Th9-клетки могут быть причиной аллергических заболеваний. Анализ образцов, взятых у пациентов с аллергией, показал, что Т-клетки могут быть существенным источником IL-9. С другой стороны, на моделях с экспериментальными животными показано, что IL-9 имеет несколько эффектов в развитии и поддержании аллергического воспаления дыхательных путей [48].

Таким образом, Th9-клетки являются провоспалительными и действуют в широком спектре аутоиммунных заболеваний и аллергических воспалений. Их точная функция, вероятно, зависит от микросреды ткани, в которой они находятся, и других вспомогательных Т-клеточных цитокинов, которые присутствуют в месте воспаления.

Субпопуляция Т-хелперов, секретирующая IL-22 (Th22-клетки)

IL-22 является членом семейства цитокинов IL-10 и, прежде всего, продуцируется Th17 Т-клетками. Отношения между IL-22 и IL-17 представляют особый интерес, и их продукция часто

связана с провоспалительными процессами. IL-22 проявляет функции, подобные IL-17, так оба цитокина вносят вклад в контроль за внеклеточными бактериальными инфекциями [56]. Однако IL-22 могут продуцировать и другие субпопуляции Т-хелперов, отличные от Th17 [17]. Кроме того, IL-22 имеет ряд специфических функций, таких как индукция заживления ран и репарация ткани, защищающая от миокардита [11] и при заболеваниях печени [59], в то время как IL-17 в этих случаях не играет никакой роли.

Первоначально субпопуляция Th22 была идентифицирована при воспалительных заболеваниях кожи. Основной особенностью этой субпопуляции является продукция IL-22 и наличие транскрипционного фактора AHR [3, 19]. Поскольку Th22 были охарактеризованы сравнительно недавно, то данные клетки нуждались в подтверждении, как независимая Т-хелперная субпопуляция.

Однако в последние годы был проведен целый ряд исследований с целью более подробно охарактеризовать данную субпопуляцию. Так, помимо основных маркеров, характерных для Т-хелперов, эти клетки экспрессируют рецепторы хемокинов CCR10, CCR6 и CCR4 и продуцируют IL-22, но ни IL-17, ни интерферона-γ (IFNγ). С другой стороны, было выявлено, что IL-6 и TNFα, наряду с дендритными клетками (ДК), могут способствовать преобразованию наивных Т-хелперов в Th22-фенотип [17].

Значительная роль IL-22 и, как следствие этого, Th22-клеток была отмечена при целом ряде заболеваний, таких как ревматоидный артрит, болезнь Крона, псориаз и атопический дерматит, системная красная волчанка, острый респираторный дистресс-синдром, саркоидоз и экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит [60].

Таким образом, Th22-клетки играют важную и сложную роль в воспалительных и аутоиммунных заболеваниях. Продукция IL-22 в основном обеспечивается специальными клетками иммунной системы, такими как Th22. Однако этой функцией обладают и некоторые другие типы клеток, такие как Th1, Th17, классические и неклассические NK-клетки (NK-22) и NKT-клетки. Основная биологическая роль IL-22 включает в себя усиление врожденного иммунитета, защиту от повреждений, а также повышение регенерации. Клетками-мишенями этого цитокина являются клетки кожи, печени и почек, а также органов дыхательной и желудочно-кишечной системы. В зависимости от характера поражения ткани IL-22 может играть либо защитную, либо патогенную роль при хронических воспалительных заболеваниях. Продукция IL-22 активированными иммунными клетками отражается в расширенном присутствии этого цитокина при

различных хронических воспалительных заболеваниях, особенно в тех, которые связаны с доминирующей ролью продуцирующих IL-22 клеток популяции Т-хелперов (Th22, Th1 и Th17) [57].

CD4⁺CD8⁺ дважды положительные Т-клетки периферической крови человека

Как полагали ранее, одновременная экспрессия CD4 и CD8 на зрелых периферических CD3⁺Т-клетках представляет собой взаимоисключающее событие, поскольку результатом селекции в тимусе является дифференцировка основных субпопуляций Т-клеток (Т-хелперов и Т-цитотоксических) с присущими им конкретными функциями. В противоположность этому, циркулирующие CD4⁺CD8⁺ дважды положительные Т-клетки (ДП Т-клетки) были обнаружены в периферической крови человека и составляли от 1 до 3% от общей популяции Т-лимфоцитов [7]. В отдельных случаях у здоровых людей в периферической крови может содержаться значительная доля ДП Т-клеток. Роль этих ДП Т-клеток в норме и патологии недостаточно изучена. Хотя большинство из них имеют фенотип клеток памяти и способны продуцировать более высокие уровни цитокинов, чем клетки, экспрессирующие по отдельности маркеры CD4 и CD8 [41].

Первоначально существование этих нетрадиционных и редких субпопуляций лимфоцитов в периферической крови объясняли преждевременным выбросом CD4⁺CD8⁺Т-клеток из тимуса в периферию [9], где продолжалась их дифференцировка до окончательного либо CD4⁺, либо CD8⁺ вида [23]. Тем не менее, было показано, что в периферической крови ДП Т-клетки отличаются от таковых в тимусе [33].

В настоящее время существует немало свидетельств увеличения количества периферических ДП Т-клеток при вирусных инфекциях. Так, при вирусном иммунодефиците человека (ВИЧ) или при инфекции вирусом Эпштейна—Барр (EBV) процент ДП Т-клеток может возрасти до 20% от всех циркулирующих лимфоцитов [40, 55].

Кроме того, ранее полученные данные указывают на то, что доля ДП Т-клеток в крови может увеличиваться или они могут быть локализованы в определенных тканях во время некоторых заболеваний, связанных с воспалением. Например, при аутоиммунных патологиях, характеризующихся хронической активацией лимфоцитов, таких как аутоиммунный тиреоидит [22], при миастениях [5] и системном склерозе/склеродермии [42], аллергиях, т.е. атопическом дерматите [4] и некоторых неоплазиях [40, 45].

Несмотря на значительное количество данных относительно людей, очень мало известно об антигенной специфичности и функции ДП

Т-клеток. Это особенно бросается в глаза, так как на моделях животных CD4⁺CD8⁺Т-клетки были описаны как антиген-специфические клетки памяти, которые могут быть индуцированы во время вакцинации [39, 43, 61]. Таким образом, крайне важным является выяснение роли и значения периферических CD4⁺CD8⁺Т-клеток в организме человека, так как они потенциально могут способствовать адаптивной иммунной реакции против патогенов.

В частности, было показано, что CD4⁺CD8⁺Т-клетки периферической крови человека представляют собой зрелые антиген-специфические эффекторные клетки памяти, и они вносят вклад в адаптивный иммунный ответ при вирусных инфекциях. Так, использование большой панели вирусных антигенов показало, что ДП Т-клетки представляют собой конкретную Т-клеточную популяцию, обладающую типичными CD4 и CD8 Т-клеточными функциями. В частности, CD4⁺CD8⁺Т-клетки секретируют цитокины, характерные для Th1/Tc1, в ответ на антигены, ограниченные по МНС класса II и МНС класса I. Кроме того, содержание перфорина и гранзимов в CD4⁺CD8⁺Т-клетках было сравнимо с таковым в CD8⁺Т-клетках, что свидетельствует о том, что ДП клеточная популяция может способствовать быстрому лизису клеток, инфицированных вирусом [33].

С помощью проточной цитометрии и основываясь на интенсивности экспрессии CD4 и CD8, можно выделить две субпопуляции ДП Т-клеток: CD4^{dim}/CD8^{bright} и CD4^{bright}/CD8^{dim} [40].

Важно отметить, что молекула CD8, экспрессируемая на поверхности CD4^{bright}/CD8^{dim} ДП Т-клеток, не то же самое, что экспрессируется типичными CD8⁺ цитотоксическими Т-клетками. Молекула CD8 существует в виде димеров мембранных гликопротеинов, состоящих из двух субъединиц, либо в виде гомодимера из двух α-цепей или гетеродимер из α- и β-цепи. CD8⁺ цитотоксические Т-клетки в значительной степени экспрессируют CD8-αβ гетеродимер, тогда как только CD8-αα гомодимер присутствует на CD4^{bright}/CD8^{dim} ДП Т-клетках человека. Плотности экспрессии этих двух форм CD8 на поверхности клетки отличаются, CD8-αα гомодимер присутствует в более низкой плотности, чем CD8-αβ гетеродимер. Таким образом, различие в уровне экспрессии двух форм CD8 отражено в CD4^{bright}/CD8^{dim} фенотипе ДП Т-клеток человека [62]. На рисунке 2 представлен случай увеличения количества ДП Т-клеток в периферической крови у здорового донора.

Дальнейший фенотипический анализ ДП Т-клеток показал, что они не экспрессируют маркеры активации (CD25, HLA-DR), маркеры пролиферации (CD38, CD71) и маркер натуральных

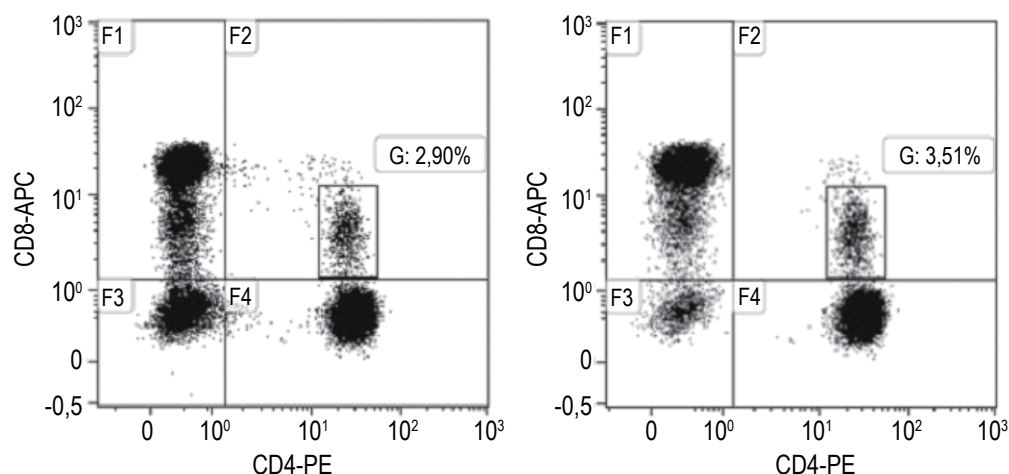


Рисунок 2. Гистограммы распределения CD4 и CD8 на Т-клетках

Примечание. В зоне G находятся $CD4^{bright}CD8^{+}$ Т-клетки периферической крови человека.

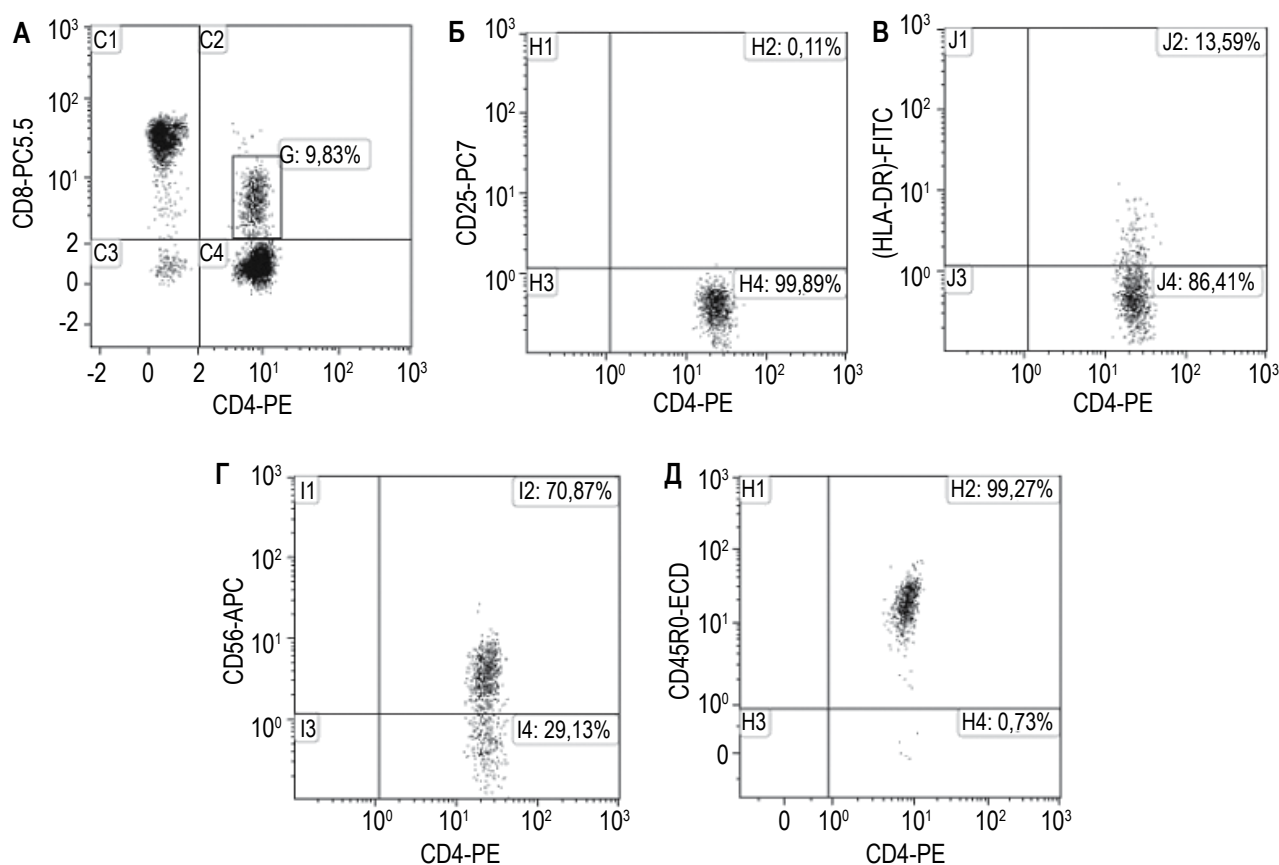


Рисунок 3. Распределение HLA-DR, CD25, CD56 и CD45R0 на $CD4^{bright}CD8^{+}$ Т-клетках: А – в зоне G $CD4^{bright}CD8^{+}$ Т-клетки; Б, В, Г, Д: распределение HLA-DR, CD25, CD56 и CD45R0 на клетках, попадающих в зону G

киллеров CD16. Однако CD56 и CD57 были обнаружены на большинстве ДП Т-клеток в периферической крови нормальных здоровых доноров. В свою очередь CD29 отличался очень высокой экспрессией на клетках данного типа. Кроме того, почти 100% клеток экспрессировали маркер Т-клеток памяти CD45R0 [45]. На рисунке 3 представлены

гистограммы распределения CD56, CD25, HLA-DR и CD45R0 на ДП Т-клетках.

Наличие этих клеток в очагах воспаления, слизистой кишечника и при аллотрансплантации почек наводит на мысль об их иммунорегуляторной функции. Сравнительный анализ функциональных различий между $CD4^{+}CD8^{-}$ и $CD4^{+}CD8^{+}$ лимфоцитами,

скорее всего, обеспечит понимание их роли в клеточной иммунной защите против инфекционных агентов, отторжении трансплантата, иммунологической толерантности и аутоиммунных заболеваниях.

Дополнительные молекулярные, фенотипические и функциональные исследования будут

способствовать дальнейшему выяснению природы субпопуляций Т-хелперов. Все это в целом позволит понять истинное значение их присутствия в периферической крови пациентов, правильно трактовать происходящие в организме процессы и назначать необходимую терапию.

Список литературы

1. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) // Медицинская иммунология. — 2011. — Т. 13, № 1. — С. 7-16.
2. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. Цитометрический анализ в клинической иммунологии. — Екатеринбург: УрО РАН. — 2011. — 221 с.

Ссылки 3-62 см. в References (см. 510-512). See References for numbers 3-62 at pp. 510-512.

References

1. Khaidukov S.V., Zurochka A.V. Tsitometricheskii analiz subpopulyatsiy T-khelferov (Th1, Th2, Treg, Th17, T-khelfery aktivirovannye) [Analysis of T helper subpopulations (Th1, Th2, Treg, Th17, activated T-helpers) by means of flow cytometry]. *Meditsinskaya immunologiya — Medical Immunology*, 2011, vol. 13, no. 1, pp. 7-16.
2. Khaidukov S.V., Zurochka A.V., Chereshev V.A. Tsitometricheskii analiz v klinicheskoy immunologii [Cytometric analysis for clinical immunology]. *Ekaterinburg, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2011. 221 p.
3. Annunziato F., Romagnani S. Heterogeneity of human effector CD4⁺ T cells. *Arthritis. Res. Ther.*, 2009, vol. 11, no. 6, p. 257.
4. Bang K., Lund M., Wu. K., Mogensen S.C., Thestrup-Pedersen K. CD4⁺CD8⁺ (thymocyte-like) T lymphocytes present in blood and skin from patients with atopic dermatitis suggest immune dysregulation. *Br. J. Dermatol.*, 2001, vol. 144, pp. 1140-1147.
5. Berrih S., Gaud C., Bach M.A., Le Brigand H., Binet J.P., Bach J.F. Evaluation of T cell subsets in myasthenia gravis using anti-T cell monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Immunol.*, 1981, vol. 45, pp. 1-8.
6. Bird I.N., Spragg J.H., Ager A., Matthews N. Studies of lymphocyte transendothelial migration: analysis of migrated cell phenotypes with regard to CD31 (PECAM-1), CD45RA and CD45RO. *Immunology*, 1993, vol. 80, pp. 553-560.
7. Blue M.L., Daley J.F., Levine H., Schlossman S.F. Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. *J. Immunol.*, 1985, vol. 134, pp. 2281-2286.
8. Bofill M., Martinez-Picado J., Ruiz-Hernandez R., Cabrera C., Marfil S., Erkizia I., Bellido R., Romeu J., Clotet B., Ruiz L. Naive CD4(+) T cells and recent thymic emigrant levels in treated individuals with HIV: clinical relevance. *AIDS. Res. Hum. Retroviruses*, 2006, vol. 22, pp. 893-896.
9. Bonomo A., Kehn P.J., Shevach E.M. Premature escape of double-positive thymocytes to the periphery of young mice: possible role in autoimmunity. *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, pp. 1509-1514.
10. Brechley J.M., Hill B.J., Ambrozak D.R., Price D.A., Guenaga F.J., Casazza J.P., Kuruppu J., Yazdani J., Migueles S.A., Connors M., Roederer M., Douek D.C., Koup R.A. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) *in vivo*: implications for HIV pathogenesis. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, pp. 1160-1168.
11. Chang H., Hanawa H., Liu H., Yoshida T., Hayashi M., Watanabe R., Abe S., Toba K., Yoshida K., Elnaggar R., Minagawa S., Okura Y., Kato K., Kodama M., Maruyama H., Miyazaki J., Aizawa Y. Hydrodynamic-based delivery of an interleukin-22-Ig fusion gene ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. *J. Immunol.*, 2006, vol. 177, no. 6, pp. 3635-3643.
12. Chang H.C., Sehra S., Goswami R., Yao W., Yu Q., Stritesky G.L., Jabeen R., McKinley C., Ahyi A.N., Han L., Nguyen E.T., Robertson M.J., Perumal N.B., Tepper R.S., Nutt S.L., Kaplan M.H. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat. Immunol.*, 2010, vol. 11, pp. 527-534.
13. Dardalhon V., Awasthi A., Kwon H., Galileos G., Gao W., Sobel R.A., Mitsdoerffer M., Strom T.B., Elyaman W., Ho I.C., Khoury S., Oukka M., Kuchroo V.K. IL-4 inhibits TGF- β -induced FoxP3⁺ T cells and, together with TGF- β , generates IL-9⁺IL-10⁺FoxP3⁺ effector T cells. *Nat. Immunol.*, 2008, vol. 9, pp. 1347-1355.
14. De Rosa S.C., Herzenberg L.A., Herzenberg L.A., Roederer M. 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat. Med.*, 2001, vol. 7, pp. 245-248.
15. Demeure C.E., Byun D.G., Yang L.P., Vezzio N., Delespesse G. CD31 (PECAM-1) is a differentiation antigen lost during human CD4 T-cell maturation into Th1 or Th2 effector cells. *Immunology*, 1996, vol. 88, pp. 110-115.
16. Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H., Gage E.A., Massey J.M., Haynes B.F., Polis M.A., Haase A.T., Feinberg M.B., Sullivan J.L., Jamieson B.D., Zack J.A., Picker L.J., Koup R.A. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, 1998, vol. 396, pp. 690-695.

17. Duhon T., Geiger R., Jarrossay D., Lanzavecchia A., Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature. Immunology*, 2009, vol. 10, no. 8, pp. 857-863.
18. Duszczyszyn D.A., Beck J.D., Antel J., Bar-Or A., Lapierre Y., Gadag V., Haegert D.G. Altered naive CD4 and CD8 T cell homeostasis in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: thymic versus peripheral (non-thymic) mechanisms. *Clin. Exp. Immunol.*, 2006, vol. 143, pp. 305-313.
19. Eyerich S., Eyerich K., Pennino D., Carbone T., Nasorri F., Pallotta S., Cianfarani F., Odorisio T., Traidl-Hoffmann C., Behrendt H., Durham S.R., Schmidt-Weber C.B., Cavani A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J. Clin. Invest.*, 2009, vol. 119, no. 12, pp. 3573-3585.
20. Hauber H.P., Bergeron C., Hamid Q. IL-9 in allergic inflammation. *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 2004, vol. 134, pp. 79-87.
21. Isgro A., Marziali M., Mezzaroma I., Luzi G., Mazzone A.M., Guazzi V., Andolfi G., Cassani B., Aiuti A., Aiuti F. Bone marrow clonogenic capability, cytokine production, and thymic output in patients with common variable immunodeficiency. *J. Immunol.*, 2005, vol. 174, pp. 5074-5081.
22. Iwatani Y., Hidaka Y., Matsuzuka F., Kuma K., Amino N. Intrathyroidal lymphocyte subsets, including unusual CD4⁺CD8⁺ cells and CD3loTCR alpha-beta loy-CD4⁺CD8⁻ cells, in autoimmune thyroid disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 1993, vol. 93, pp. 430-436.
23. Jimenez E., Sacedon R., Vicente A., Hernandez-Lopez C., Zapata A.G., Varas A. Rat peripheral CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes are partially immunocompetent thymus-derived cells that undergo post-thymic maturation to become functionally mature CD4⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.*, 2002, vol. 168, pp. 5005-5013.
24. Junge S., Kloeckener-Gruissem B., Zufferey R., Keisker A., Salgo B., Fauchere J.C., Scherer F., Shalaby T., Grotzer M., Siler U., Seger R., Güngör T. Correlation between recent thymic emigrants and CD31⁺ (PECAM-1) CD4⁺ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *Eur. J. Immunol.*, 2007, vol. 37, pp. 3270-3280.
25. Kilpatrick R.D., Rickabaugh T., Hultin L.E., Hultin P., Hausner M.A., Detels R., Phair J., Jamieson B.D. Homeostasis of the naive CD4⁺ T cell compartment during aging. *J. Immunol.*, 2008, vol. 180, pp. 1499-1507.
26. Kimmig S., Przybylski G.K., Schmidt C.A., Laurisch K., Möwes B., Radbruch A., Thiel A. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J. Exp. Med.*, 2002, vol. 195, pp. 789-794.
27. Koetz K., Bryl E., Spickschen K., O'Fallon W.M., Goronzy J.J., Weyand C.M. T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, pp. 9203-9208.
28. Kohler S., Thiel A. Life after the thymus: CD31⁺ and CD31⁻ human naive CD4⁺ T-cell subsets. *Blood*, 2009, vol. 113, pp. 769-774.
29. Kohler S., Wagner U., Pierer M., Kimmig S., Oppmann B., Möwes B., Jülke K., Romagnani C., Thiel A. Post-thymic *in vivo* proliferation of naive CD4⁺ T cells constrains the TCR repertoire in healthy human adults. *Eur. J. Immunol.*, 2005, vol. 35, pp. 1987-1994.
30. Li H., Rostami A. IL-9: basic biology, signaling pathways in CD4⁺ T cells and implications for autoimmunity. *J. Neuroimmune. Pharmacol.*, 2010, vol. 5, pp. 198-209.
31. Muller, W.A., Weigl S.A., Deng X., Phillips D.M. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.*, 1993, vol. 178, pp. 449-460.
32. Muraro P.A., Douek D.C., Packer A., Chung K., Guenaga F.J., Cassiani-Ingoni R., Campbell C., Memon S., Nagle J.W., Hakim F.T., Gress R.E., McFarland H.F., Burt R.K., Martin R. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J. Exp. Med.*, 2005, vol. 201, pp. 805-816.
33. Nascimbeni M., Shin E.C., Chiriboga L., Kleiner D.E., Rehermann B. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood*, 2004, vol. 104, pp. 478-486.
34. Newman P.J. Switched at birth: a new family for PECAM-1. *J. Clin. Invest.*, 1999, vol. 103, pp. 5-9.
35. Newman P.J., Berndt M.C., Gorski J., White II G.C., Lyman S., Paddock C., Muller W.A. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*, 1990, vol. 247, pp. 1219-1222.
36. Nickel P., Kreutzer S., Bold G., Friebe A., Schmolke K., Meisel C., Jurgensen J.S., Thiel A., Wernecke K.D., Reinke P., Volk H.D. CD31⁺ naïve Th cells are stable during six months following kidney transplantation: implications for posttransplant thymic function. *Am. J. Transplant.*, 2005, vol. 5, pp. 1764-1771.
37. Nobile M., Correa R., Borghans J.A., D'Agostino C., Schneider P., De Boer R.J., Pantaleo G. De novo T-cell generation in patients at different ages and stages of HIV-1 disease. *Blood*, 2004, vol. 104, pp. 470-477.
38. Nowak E.C., Weaver C.T., Turner H., Begum-Haque S., Becher B., Schreiner B., Coyle A.J., Kasper L.H., Noelle R.J. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J. Exp. Med.*, 2009, vol. 206, pp. 1653-1660.
39. Ober B.T., Summerfield A., Mattlinger C., Wiesmüller K.H., Jung G., Pfaff E., Saalmüller A., Rziha H.J. Vaccine-induced, pseudorabies virus-specific, extrathymic CD4⁺CD8⁺ memory T-helper cells in swine. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, pp. 4866-4873.

40. Ortolani C., Forti E., Radin E., Cibin R., Cossarizza A. Cytofluorimetric identification of two populations of double positive (CD4⁺, CD8⁺) T lymphocytes in human peripheral blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, vol. 191, pp. 601-609.
41. Pahar B., Lackner A.A., Veazey R.S. Intestinal double-positive CD4⁺CD8⁺ T cells are highly activated memory cells with an increased capacity to produce cytokines. *Eur. J. Immunol.*, 2006, vol. 36, pp. 583-592.
42. Parel Y., Aurrand-Lions M., Scheja A., Dayer J.M., Roosnek E., Chizzolini C. Presence of CD4⁺CD8⁺ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis. Rheum.*, 2007, vol. 56, pp. 3459-3467.
43. Periwal S.B., Cebra J.J. Respiratory mucosal immunization with reovirus serotype 1/L stimulates virus-specific humoral and cellular immune responses, including double-positive (CD4⁽⁺⁾/CD8⁽⁺⁾) T cells. *J. Virol.*, 1999, vol. 73, pp. 7633-7640.
44. Ponchel F., Morgan A.W., Bingham S.J., Quinn M., Buch M., Verburg R.J., Henwood J., Douglas S.H., Masurel A., Conaghan P., Gesinde M., Taylor J., Markham A.F., Emery P., van Laar J.M., Isaacs J.D. Dysregulated lymphocyte proliferation and differentiation in patients with rheumatoid arthritis. *Blood*, 2002, vol. 100, pp. 4550-4556.
45. Sala P., Tonutti E., Feruglio C., Florian F., Colombatti A. Persistent expansions of CD4⁺CD8⁺ peripherals blood T cells. *Blood*, 1993, vol. 82, pp. 1546-1552.
46. Schmid J.M., Junge S.A., Hossle J.P., Schneider E.M., Roosnek E., Seger R.A., Gungor T. Transient hemophagocytosis with deficient cellular cytotoxicity, monoclonal immunoglobulin M gammopathy, increased T-cell numbers, and hypomorphic NEMO mutation. *Pediatrics*, 2006, vol. 117, pp. e1049-e1056.
47. Song K., Rabin R.L., Hill B.J., De Rosa S.C., Perfetto S.P., Zhang H.H., Foley J.F., Reiner J.S., Liu J., Mattapallil J.J., Douek D.C., Roederer M., Farber J.M. Characterization of subsets of CD4⁺ memory T cells reveals early branched pathways of T cell differentiation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, vol. 102, pp. 7916-7921.
48. Soroosh P., Doherty T.A. Th9 and allergic disease. *Immunology*, 2009, vol. 127, no. 4, pp. 450-458.
49. Stockinger H., Schreiber W., Majdic O., Holter W., Maurer D., Knapp W. Phenotype of human T cells expressing CD31, a molecule of the immunoglobulin supergene family. *Immunology*, 1992, vol. 75, pp. 53-58.
50. Tada Y., Koarada S., Morito F., Ushiyama O., Haruta Y., Kanegae F., Ohta A., Ho A., Mak T.W., Nagasawa K. Acceleration of the onset of collageninduced arthritis by a deficiency of platelet endothelial cell adhesion molecule 1. *Arthritis. Rheum.*, 2003, vol. 48, pp. 3280-3290.
51. Thiel A., Alexander T., Schmidt C.A., Przybylski G.K., Kimmig S., Kohler S., Radtke H., Gromnica-Ihle E., Massenkeil G., Radbruch A., Arnold R., Hiepe F. Direct assessment of thymic reactivation after autologous stem cell transplantation. *Acta. Haematol.*, 2008, vol. 119, pp. 22-27.
52. Thiel A., Schmitz J., Miltenyi S., Radbruch A. CD45RA-expressing memory/effector Th cells committed to production of interferon-gamma lack expression of CD31. *Immunol. Lett.*, 1997, vol. 57, pp. 189-192.
53. Van Snick J., Goethals A., Renauld J.C., Van Roost E., Uyttenhove C. Cloning and characterization of a cDNA for a new mouse T cell growth factor (P40). *J. Exp. Med.*, 1989, vol. 169, pp. 363-368.
54. Veldhoen M., Uyttenhove C., van Snick J., Helmby H., Westendorf A., Buer J., Martin B., Wilhelm C., Stockinger B. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.*, 2008, vol. 9, pp. 1341-1346.
55. Weiss L., Roux A., Garcia S. Persistent expansion, in a human immunodeficiency virus-infected person, of V beta-restricted CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes that express cytotoxicity-associated molecules and are committed to produce interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J. Infect. Dis.*, 1998, vol. 178, pp. 1158-1162.
56. Wolk K., Sabat R. Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. *Cytokine. Growth. Factor. Rev.*, 2006, vol. 17, pp. 367-380.
57. Wolk K., Witte E., Wallace E., Docke W.D., Kunz S., Asadullah K., Volk H.D., Sterry W., Sabat R. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur. J. Immunol.*, 2006, vol. 36, no. 5, pp. 1309-1323.
58. Ye Z.J., Yuan M.L., Zhou Q., Du R.H., Yang W.B., Xiong X.Z., Zhang J.C., Wu C., Qin S.M., Shi H.Z. Differentiation and recruitment of Th9 cells stimulated by pleural mesothelial cells in human Mycobacterium tuberculosis infection. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 2, p. e31710.
59. Zenewicz L.A., Yancopoulos G.D., Valenzuela D.M., Murphy A.J., Karow M., Flavell R.A. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity*, 2007, vol. 27, no. 4, pp. 647-659.
60. Zhang N., Pan H.F., Ye D.Q. Th22 in inflammatory and autoimmune disease: prospects for therapeutic intervention. *Mol. Cell. Biochem.*, 2011, vol. 353, pp. 41-46.
61. Zuckermann F.A. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Veterinary. Immunol. Immunopathol.*, 1999, vol. 72, pp. 55-66.
62. Zuckermann F.A., Husmann R.J. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immunology*, 1996, vol. 87, pp. 500-512.