

Фролов А.К.¹, Литвиненко Р.А.¹, Фролова Л.А.², Макеева Л.В.³, Федотов Е.Р.¹

¹Запорожский национальный университет, Запорожье, Украина

²Запорожская медицинская академия последипломного образования, Запорожье, Украина

³Запорожский государственный медицинский университет, Запорожье, Украина

Dynamics of homeostatic T-cell and natural killer cells activation in human blood after extracorporeal short cold incubation of cells

¹, Litvinenko R.O.¹, Frolova L.O.², Makyeyeva L.V.³, Fedotov Ye.R.¹

¹Zaporizhzhia National University, Zaporizhzhia, Ukraine

² Zaporizhzhia Medical Academy of Postgraduate Education, Zaporizhzhia, Ukraine

³Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine

Аннотация

—

—

—

—

—

Открытие и углубленное изучение наличия и распространения на клетках иммунной системы (ИС) паттерн-распознающих рецепторов расширило представление о ее гомеостатической роли, которая реализуется через функциональную интеграцию врожденного и адаптивного иммунитета [1]. При этом, выявлено, что свою основную роль ИС проявляет через морфогенетическую функцию, направленную на контроль соответствия клеточного и гуморального гомеостаза организма его генотипу на определенном этапе онтогенеза и в адекватных данным условиям среды [2]. В этой связи основной стратегией лабораторной иммунологии является разработка и применение методов определения интенсивности гомеостатической активации и последующей пролиферации лимфоцитов как показатель состояния ИС [3]. Перспективным при реализации данного направления может быть анализ динамики плотности CD-структур на лимфоцитах крови, как остаточного признака предшествующего иммуногенеза в лимфоидных органах. Известно, что после стимуляции лимфоцитов антигеном или митогеном, в них активируются метаболические процессы и на их поверхности увеличивается плотность соответствующих рецепторов, в том числе и CD-структур, а следовательно и avidность к соответствующим лигандам [4]. Нами предложен иммуногенезный подход к тестированию пула активированных лимфоцитов крови по плотности CD-структур на плазмолемме, отражающий функциональное состояние клеток, предшествующее взятию крови на анализ по их avidности к эритроцитам барана (ЭБ) при постановке реакции розеткообразования [5].

В этой связи целью нашей работы стало изучение доли активированных лимфоцитов крови человека и её изменение при краткосрочной холодовой инкубации *in vitro*

⁺-лимфоциты определяли двумя способами: методом спонтанного розеткообразования (Е-РОК СП) и моноклональных антител к CD-структурам (CD2, CD4, CD8 и CD16), связанных с эритроцитами. В последнем случае использовали эритроцитарный диагностикум (Витебск, Беларусь), состоящий из фиксированных ЭБ, нагруженных моноклональными антителами против соответствующих CD-структур [7].

Для создания оптимального рецептор-лигандного взаимодействия, приближенного к внутренней среде организма человека, лимфоцитарные и эритроцитарные суспензии приготавливали на питательной смеси: среда 199; 10 % ЭТС; 0,2 мкг/мл глутамин; 0,02 мкг/мл аспарагина; 20 мМ HEPES; 10 мМ 2-меркаптоэтанол; 100 мкг/мл гентамицина. Проводили также щадящую фиксацию клеток глутаровым альдегидом рН 7,2 в конечной концентрации 0,6%/мл и приготовление препаратов, минимизирующее механическое повреждение образовавшихся розеток. В 4-х местах препарата анализировали 200 лимфоцитов, распределяя их на статистические классы (КЛ) по количеству присоединивших ЭБ: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и более 8 (КЛ 0 ЭБ, КЛ 1 ЭБ и т.д.), считая что avidность присоединения зависит от плотности CD-структуры. Суспензию лимфоцитов, оставшуюся после первого исследования Е-РОК, инкубировали в холодильнике при 4°C в течение 24 часов, после чего образцы лимфоцитов помещали в термостат на 1 час

$CD2^+$ -лимфоцитов крови обследованных экстракорпоральной холодовой инкубацией клеток. Перспективность, фундаментальность выбора данной структуры состоит в том, что, во-первых, она представлена на всех Т-лимфоцитах и большей части натуральных киллеров (НК). Во-вторых, $CD2$ -структура одной из первых появляется на лимфоцитах при иммунопозе и сохраняется на дифференцированных лимфоцитах. Данная динамика $CD2$ -структуры на лимфоцитах определена ее важной функцией: обеспечение адгезии при клеточных взаимодействиях и проведение активирующего и митогенного сигнала в клетку альтернативно Т-клеточному рецептору (ТКР) и другим митогенным структурам на НК и клетках других тканей. Если учесть, что лигандом для $CD2$ -структуры является $CD58$ (LFA-3), который распространен на всех ядросодержащих клетках, то можно считать, что ее регуляторная роль распространяется не только на лимфоциты, но и на клетки других гистогенетических рядов [4]. Функциональная значимость $CD2$ -структуры также обозначена ее высокой плотностью на Т-лимфоцитах, которая составляет 83000-98000 на клетку, что почти на порядок выше по сравнению с другими структурами [8].

В таблице 1 представлены данные выявления количества Е-РОК и их авидных к ЭБ классам лимфоцитов в зависимости от метода их определения. Нами было обнаружено, что при спонтанном методе (Е-РОК СП) выявление $CD2^+$ -лимфоцитов происходит полнее (на 4-5%), чем при использовании МКАТ к $CD2$ структуре (Е-

$CD2^+$ -популяции лимфоцитов. Более низкие показатели $CD2^+$ -лимфоцитов, выявляемые с помощью Е-РОК МКАТ $CD2$ варианта метода, можно объяснить тем, что гибридные МКАТ специфичны к какой-либо случайной антигенной детерминанте $CD2$. Ее аффинность значительно уступает природным рецепторно-лигандным связям ($CD2 - CD58$). Поэтому дальнейший анализ динамики авидных к ЭБ классов $CD2^+$ -лимфоцитов мы проводили методом спонтанного розеткообразования с ЭБ.

Так, из таблицы 1 следует, что в первый день инкубации (интактные лимфоциты) общее количество $CD2^+$ -лимфоцитов составило $66,9 \pm 1,16\%$. Определение Е-РОК с учетом всех авидных к ЭБ лимфоцитов более соответствует наличию $CD2^+$ -лимфоцитов в циркулирующей крови, включающих популяции Т-лимфоцитов и части НК. Долю оставшихся лимфоцитов составляет популяция В-лимфоцитов и «нулевых» клеток, а также часть $CD2^+$ -лимфоцитов, плотность рецептора на которых минимальна и находится за пределами разрешающей способности метода. Следует отметить, что уровни $CD2^+$ -клеток, выявленные методом спонтанного розеткообразования с ЭБ (Е-РОК СП) сравнимы с таковыми по данным непрямой люминисценции и проточной цитометрии [10]. Удержанию даже минимального количества ЭБ (1-2) $CD2^+$ -лимфоцитами способствует агглютинация данного рецептора на цитоплазматической мембране клеток с низкой плотностью. Поэтому учет (КЛ 1 ЭБ и КЛ 2 ЭБ) как $CD2^+$ -лимфоцитов допустимы при экспериментальных исследованиях количества частот низко- и среднеавидных к ЭБ классов лимфоцитов. В нашем исследовании изменения этих авидных классов происходили на ста-

цитов (КЛ_ ⁺-лимфо-

⁺-лимфоцитов (КЛ_

⁺-лимфоцитов связаны достоверные различия общего количества Е-РОК в разных группах обследованных доноров и изменения их количества после холодовой инкубации. Этот факт подкрепляет наше заключение, что именно высокоавидные к ЭБ классы лимфоцитов (КЛ_

⁺-лимфоцитов в интактных (исходных) образцах лимфоцитов в 3-х группах обследованных вероятно связаны с разным иммунологическим состоянием их иммунной системы. Так, в третьей группе обследованных, в которую входили женщины молодого и среднего возрастов без диагностированных патологий, уровни активированных CD2⁺-лимфоцитов в интактных (исходных) образцах лимфоцитов соответствовали их физиологическим значениям. Большинство обследованных 1 и 2 групп составляли больные среднего возраста с различной патологией (см. материалы и методы). Поэтому значительные отклонения количества активированных CD2⁺-лимфоцитов в их исходных образцах крови, очевидно, связаны с определенным напряжением их ИС, разным расположением органов нарушения антигенструктурного гомеостаза и зависимым от него направлением миграции активированных лимфоцитов для купирования патологии. Обнаружена дихотомия избирательной миграции лимфоцитов в иммунную систему слизистых (желудочно-кишечный, респираторный, мочевой тракт), иммунную систему кожи, нервной системы [12]. Поэтому можно предположить, что в первой группе обследованных антигенструктурные очаги находились в компетенции иммунной системы кожи, нервной системы, к которым направлялись активированные лимфоциты, увеличение количества которых происходило за счет их перераспределения, что мы и

$CD8^+$ и $CD16^+$) до $0,57 \pm 0,09$ для активированных фракций (КЛ_

in vitro

in vitro,

$CD8^+$) также снижается после холодной инкубации. Например, Т-РИ в интактных образцах лимфоцитов равнялся $1,79 \pm 0,20$ и $2,04 \pm 0,17$ для общих Е-РОК и их активированной фракции (КЛ_

$CD4^+$ -лимфоцитов в процессе модификации их функционального состояния экстракорпоральной холодной инкубацией (таблица 3). У большинства женщин этой группы после холодной инкубации статистически не изменялось общее количество Е-РОК и их активированной фракции (КЛ_

$CD4^+$ -активированных лимфоцитов крови у человека (КЛ_

$CD4^+$ -лимфоцитов и их активированной фракции (КЛ_ $CD4^+$ и $CD16^+$ -лимфоцитов остались стабильными и даже с некоторой тенденцией к увеличению. Сдвиг $CD2^+$ субпопуляций наглядно отражают регуляторные индексы. При этом наиболее информативным проявил себя $CD2$ регуляторный индекс (РИ): отношения количества $CD4^+$ -лимфоцитов к сумме $CD8^+$ - и $CD16^+$ - лимфоцитов ($CD4^+/CD8^++CD16^+$) по сравнению с общепринятым, мы его назвали Т-регуляторным индексом ($CD4^+/CD8^+$). Так, в интактных образцах лимфоцитов $CD2$ РИ среди общей популяции $CD2^+$ -лимфоцитов равнялся $0,88 \pm 0,11$ и еще ближе приближался к единице ($0,98 \pm 0,11$) для их активированной фракции (КЛ_

$CD4^+$) и его супрессирующих - отрицательно регулирующих ($CD8^+$ и $CD16^+$). После холодной инкубации соотношение регуляторных

Таблица 1. Количество авидных к ЭБ классов CD2⁺-лимфоцитов крови доноров (n=120) при спонтанном и МКАТ к CD2 вариантах розеткообразования (Е-РОК) в интактных и после холодовой инкубации образцах лимфоцитов, %

лимфоцитарный	⁺ -лимфоцитов, %							Всего
	1	2	3	4	5	6	7	
								—
Примечание: Инт – интактный лимфоцитарный образец постановки Е-РОК в день взятия образца крови у доноров, Хол – лимфоцитарный образец после 24 ч. холодовой инкубации, * - показатели, статистически достоверно отличающиеся от данных при спонтанной постановке Е-РОК (рd"0,05).								
⁺-структуры на лимфоцитах крови в группах (1, 2, 3) доноров после экстракорпоральной холодовой инкубации клеток, %								
—								

Примечание: Инт – интактный лимфоцитарный образец постановки Е-РОК в день взятия образца крови у доноров, Хол – лимфоцитарный образец после 24 ч. холодовой инкубации, * - показатели, статистически достоверно отличающиеся от данных в интактной крови (рd"0,05), ** - (рd"0,01), 1 – группа доноров, у которых произошло снижение Е-РОК после холодовой инкубации (38 чел.), 2 - группа доноров, у которых произошло увеличение Е-РОК (18 чел.), 3 - Е-РОК не изменялась в пределах сигмы (64 чел.)

Примечание: Инт – интактный лимфоцитарный образец постановки Е-РОК в день взятия образца крови у доноров, Хол – лимфоцитарный образец после 24 ч. холодовой инкубации, * - показатели, статистически достоверно отличающиеся от данных в интактной крови (рd"0,05)

⁺-лимфоцитов (КЛ_

⁺-лимфоци-
тов, определяемые в Е-РОК в основном опос-
редованы их активированной фракцией
(КЛ_

in vitro

—

—

—

1. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунология образ-
разпознающих рецепторов. Изд. 2-е. М.: Книжный дом «Либ-
роком»; 2013.
2. Полетаев А.В. Физиологическая иммунология. М.:
Миклош, 2010.
3. Козлов В.А. Гомеостатическая пролиферация лимфо-
цитов в аспекте иммунопатогенеза различных заболева-
ний. Иммунология. 2006; 6: 378-382.
4. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЕОТАР-Медиа; 2010.
5. Фролова Л.А. Фролов О.К. Количественные и функци-
ональные изменения показателей лимфоцитов крови у
женщин в различные периоды онтогенеза. Иммунопато-
логия, аллергология, инфектология. 2013; 1: 20-25.
6. Митин А.Н., Литвина М.М., Комогоров В.В. и соавт.
Вклад гомеостатической пролиферации и связанных с ней
процессов в восстановлении популяции периферических

Т-клеток в условиях индуцируемой облучением. Иммуно-
логия. 2013; 5: 242-247.

7. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Янченко В.В. Методы
определения Т- и В-лимфоцитов диагностикумами на ос-
нове моноклональных антител (инструкция на метод).
Иммунопатология, аллергология, инфектология 2000; №2:
31-33.
8. Davis Simon J., Anton van der Merve. The structure and
ligand interactions of CD2: implications for T-cell function.
Immunology Today. 1996; 17: 177-187.
9. Сенчило И.В. Реакция активного розеткообразования
как метод оценки функции Т-лимфоцитов в клинической
практике. Тер. архив. 1991;7: 135-138.
10. Новиков П.Д., Коневалова Н.Ю., Титова Н. Д. Принци-
пы оценки иммунного статуса и диагностики иммуноде-
фицитных болезней. Иммунопатология, аллергология, ин-
фектология. 2005; 2: 8-22.

11. Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton et al. *Roitt's essential immunology*. NJ: Wiley-Blackwell, 2011.
12. Фролов О. К., Копійка В. В., Федотов Є. Р. Патогенетичний аналіз імунної системи: основні принципи. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2004; 4: 12-18.
13. Фролов А.К., Арцимович Л.Г., Сохин А.А. Иммуноцитогенетика. М.: Медицина; 1993.
14. Cho B. K., Rao V. P., Ge Q., et al. Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T-cells to differentiate directly into memory T-cells. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 549-556.
15. Dummer W., Ernst B., LeRoy E et al. Autologous regulation of naive T-cell homeostasis within the T-cell compartment. *J. Immunol.* 2001; 166: 2460-2468.
16. Нефедов В.П., Ясайтис А.А., Новосельцев В.Н. и соавт. Гомеостаз на различных уровнях организации биосистем: монография. Новосибирск: Наука. Сиб. отделение; 1991.

Поступила 18.01.2014 г.