

РОЗДІЛ 12. РОЗВИТОК ЛІМФОЦИТІВ

Ефективне функціонування імунної системи потребує постійного поповнення пулу периферичних лімфоцитів для заміщення клітин, що загинули під час виконання своїх функцій в імунних реакціях, а також старих клітин, які так і не зустрілися зі своїм антигеном. Ці досить значні втрати клітин компенсуються завдяки постійному, незалежному від антигенних стимулів утворенню лімфоцитів у первинних лімфоїдних органах - тимусі (Т-лімфоцитів) і кістковому мозку (В-лімфоцитів). Завдяки процесам лімфопоезу, що здійснюються в цих органах, підтримується не лише загальна кількість Т- і В-лімфоцитів, а й різноманіття їх антигенспецифічних рецепторів. Клони лімфоцитів, що формують цей репертуар, здатні розвивати реакції практично на всі можливі антигени, з якими може зустрітися організм упродовж життя, виявляючи одночасно толерантність до аутоантигенів. Це досягається у процесі відбору, якого зазнають Т- і В-лімфоцити в центральних лімфоїдних органах і під час якого відбираються для подальшого дозрівання клітини, здатні розвивати реакції на чужорідні антигени, та елімінуються ауто агресивні клітини - потенційно реактивні до власних структур.

Джерелом лімфоцитів, як і всіх інших клітин імунної системи, є недиференційовані плюрипотентні гемопоетичні стовбурові клітини, що локалізуються у кістковому мозку. Стовбурові кровотворні клітини (СКК) є своєрідним "посівним матеріалом" для центральних органів імунної системи. Здатність СКК до самовідновлення своєї популяції (*self renewal*) і диференціювання в усі типи клітин крові є практично невичерпною, що дає змогу компенсувати постійні величезні втрати їх нащадків на периферії. Спочатку коротко зупинимося на характеристиці СКК, а потім розглянемо процес диференціювання їх на лімфоцити.

12.1. СТОВБУРОВІ КРОВОТВОРНІ КЛІТИНИ

У всіх ссавців у період ембріонального розвитку СКК спочатку утворюються в стінці жовткового мішка, потім мігрують у печінку, а згодом заселяють кістковий мозок. У плоді людини в жовтковому мішку СКК формуються на 3-му тижні, де знаходяться до 9-го тижня (так звана перша генерація СКК), на 5-6-му тижні заселяють ще й печінку, де знаходяться до кінця ембріонального розвитку (друга генерація СКК), а вже в кістковий мозок потрапляють на 10-11-му тижні (третя генерація СКК).

У кістковому мозку СКК розміщуються біля пристінної частини кістки в тісному контакті зі спеціалізованими стромальними клітинами, які створюють необхідне для їх розвитку мікрооточення. Крім самих СКК тут знаходяться також їхні похідні, так звані *напівстовбурові клітини* з більш обмеженими можливостями – комітовані попередники

клітин міелоїдного (еритроцитів, гранулоцитів, моноцитів, мегакаріоцитів) та лімфоїдного (Т-, В-лімфоцитів, НК-клітин) рядів.

Під впливом клітинного мікрооточення та локально продукованих цитокінів напівстовбурові та стовбурові клітини залучаються до проліферації та диференціювання. Ці процеси суворо регулюються, що забезпечує можливість самопідтримання відносно невеликої популяції СКК. Завдяки цій унікальній особливості – здатності до самопідтримання – СКК забезпечують постійне поповнення у кровотворній і лімфоїдній тканинах зрілих клітин з обмеженим життєвим циклом замість втрачених. Слід зазначити, що властивості СКК були вивчені задовго до ідентифікації їх морфології та фенотипу (див. розд. 1). Це стало можливим завдяки розробці відповідних методів їх дослідження.

Методи аналізу СКК. Вивчення функціональних характеристик СКК розпочалося в 1961 р., коли канадськими вченими Тілом і Мак-Куллахом був запропонований метод клонування цих клітин у селезінці смертельно опроміненних мишей (рис. 77). Після введення тваринам клітин кісткового мозку на стромі спустошеної опроміненням селезінки з'являються у вигляді вузлів колонії клітин (1-3 колонії на 10^4 введених клітин), які можна спостерігати візуально. Колонії на селезінці опроміненних тварин можна отримати також, якщо екранувати кістковий мозок під час опромінення. Колонії, що утворюються у разі екранування кісткового мозку тварин, називають *ендогенними*, а ті, що утворюються після трансплантації кісткового мозку, - *екзогенними*.



Рис. 77. Метод аналізу стовбурових кровотворних клітин:

1 - отримання клітин кісткового мозку (ККМ); **2** - трансплантація ККМ миші, попередньо опроміненій летальною для лімфоцитарних клітин дозою радіації; **3** - видалення у миші через 8 діб селезінки з колоніями еритроцитарних (Ер), гранулоцитарних (Гр) і мегакаріоци-

тарних (Мг) клітин; 4 — відбирання клітин еритроцитарної колонії; 5 - трансплантація Ер клітин миші, яка попередньо опромінена детальною для лімфоцитарних клітин дозою радіації; 6 - видалення у миші через 8 діб селезінки і підрахунок колоній клітин трьох видів (Ер, Гр і Мг)

Колонії у селезінці мають клональне походження, що було доведено за допомогою індукованих опроміненням хромосомних маркерів. Клітини, що отримали високу дозу (6,5 Гр) і вижили, як правило, несуть індуковані радіацією аберації – хромосомні маркери. За цими маркерами можна ідентифікувати вихідні клітини та їх *нащадків* під час каріологічного аналізу. У всіх клітин однієї колонії виявляється (якщо виявляється) однаковий хромосомний маркер. Це свідчить про те, що кожна окрема колонія (яка складається приблизно з 10^6 незрілих клітин) утворилася внаслідок розмноження однієї вихідної клітини, тобто є її клоном. Ці вихідні клітини, що здатні утворювати колонії в селезінці, називають колонієутворювальними одиницями селезінки (КУОс).

Колонії в селезінці гістологічно неоднорідні й представлені трьома типами: еритроцитарними, гранулоцитарно-моноцитарними і мегакаріоцитарними. Після ретрансплантації клітин колонії будь-якого типу новому опромінену реципієнту знову утворюються колонії всіх трьох типів з одним і тим самим хромосомним маркером (і завжди з однаковим співвідношенням: 42 % еритроцитарних, по 21 % гранулоцитарно-моноцитарних та мегакаріоцитарних і 16 % змішаних). Отже, клітини, що утворюють колонії, здатні до самопідтримання (в колонії з однієї КУОс утворюються інші КУОс) та диференціювання на *у* більш зрілі клітинні форми. При цьому підтримується лінія КУОс, що підтверджує існування спільного попередника клітин міелоїдного ряду.

Існування в кістковому мозку СКК, здатних диференціюватися у лімфоїдному напрямі, було показано в дослідах на радіохимерах. Радіохимери – тварини, отримані шляхом трансплантації алогенного кісткового мозку реципієнтам з пригніченою опроміненням імунною системою, внаслідок чого в їх організмі функціонують клітини різних генотипів. Після трансплантації опроміненим мишам лінії СВА клітин кісткового мозку з каріологічною міткою (СВА/Т6Т6) разом з лімфоцитами лімфатичних вузлів, що не мали мітки, останні першими заселяють лімфоїдні органи, але поступово витісняються клітинами, що походять з донорського кісткового мозку.

В останні роки існування в кістковому мозку КУО - попередників лімфоцитів (як і КУО - попередників різних типів клітин міелоїдного ряду) та їх здатність до самопідтримання підтверджені *in vitro* під час культивування клітин кісткового мозку в спеціальних напівтвердих середовищах (див. розд. 1). Для цього клітини кісткового мозку тривалий час (5-10 тижнів) культивують в присутності стромальних елементів кісткового мозку. Вважають, що довго жити у такій культурі можуть лише клітини з високим проліферативним потенціалом. Потім

такі клітини висівають на напівтверді середовища з високим вмістом цитокінів, необхідних для диференціювання у певні лінії клітин. На таких середовищах СКК можуть утворювати колонії як мієлоїдних, так і лімфоїдних клітин, залежно від наявності відповідних цитокінів.

Для того щоб ідентифікувати фенотип СКК, запропонували метод вибіркового вилучення з кісткового мозку гемопоетичних клітин, що активно проліферують. Для цього до клітин кісткового мозку додають флуоресцентний аналог урацилу - 5-флуоурацил, який накопичується в клітинах, що проходять по клітинному циклу. Далі на клітинному сортувальнику (цитофлуориметрі) можна виділити ці клітини за флуоресценцією. Така популяція мічених клітин буде значно збагачена на СКК.

Для ідентифікації СКК використовують два критерії: здатність до самовідновлення *in vitro* і відсутність поверхневих маркерів, характерних для всіх відомих гемопоетичних ліній (CD3⁻, CD4⁻, CD8⁻, CD19⁻, CD20⁻, CD56⁻, CD11b⁻, CD14⁻, CD15⁻). Такий фенотип скорочено позначають Lin⁻ (lineage⁻). Для того, щоб отримати Lin⁻ клітини, потрібно окремо вилучити всі інші субпопуляції клітин за допомогою антитіл до їх поверхневих маркерів.

Нині СКК мишей ідентифікують за експресією рецептора c-Kit до фактора стовбурових клітин та вибірковою експресією одного з маркерів Thy-1.1 чи Flk2. Тобто СКК миші мають фенотип Lin⁻c-Kit⁺Thy-1.1⁺(Flk2⁺).

Для аналізу СКК людини використовують трансплантацію кісткового мозку людини мишам з тяжкими вадами розвитку лейкоцитарних клітин, які отримують схрещуванням мишей ліній NOD і SCID. Ця експериментальна модель не є повністю адекватною, тому більшість дослідів зі СКК людини проводять у культурі *in vitro*.

Показано, що майже всі СКК людини експресують сіаломуцин CD34, який виявляється також на клітинах ендотелію, де він є лігандом для Р-селектину. Вважають, що CD34 може зумовлювати взаємодію СКК зі стромальними елементами кісткового мозку. На СКК людини відсутня експресія маркера CD38. Отже, найімовірніше, що СКК людини мають фенотип Lin⁻CD34⁺ CD38⁻.

Міграція СКК. Важливою особливістю СКК є їх здатність виходити з кісткового мозку в кров, циркулювати в кров'яному руслі та колонізувати інші відділи кровотворної й лімфоїдної систем (насамперед тимус) і навіть нелімфоїдні периферичні тканини.

Міграція СКК починається ще під час ембріогенезу. Як уже зазначалося, СКК з'являються спочатку в жовтковому мішку приблизно через 7,5 доби розвитку ембріона миші. Ці клітини дають початок першим еритроїдним клітинам та, ймовірно, клітинам судин - ендотеліоцитам. Тому їх ще називають гемангіобластами. Вони не мають здатності захищати смертельно опромінених дорослих тварин, очевидно, через відсутність у них хемокінових рецепторів і здатності за-

селювати кістковий мозок. Через 9-10 днів розвитку в ембріональній печінці з'являються СКК, які, ймовірно, потрапляють сюди з жовткового мішка. Ці клітини вже набувають здатності захищати опромінених реципієнтів та мігрувати в кістковий мозок. Аналогічні властивості набувають через 10 днів розвитку СКК жовткового мішка. На 12-ту добу печінка набуває максимальної гемопоетичної активності. СКК печінки Mac-1⁺ відрізняються від СКК кісткового мозку за профілем клітин, на які вони можуть диференціюватися. Так, тільки в ембріональній печінці утворюються В-клітини субпопуляції B-1 (CD5⁺) та V γ 3 і V γ 4 T-клітини. Крім того, з печінки виходять CD3⁻ CD4⁺ клітини, що експресують інтегрин α 4 β 7. Вважають, що такі клітини є напівстворуваними клітинами, які дають початок антигенпрезентувальним ДК (таким як клітини Лангерганса), НК-клітинам і, можливо, ФДК. На 16-17-ту добу розвитку СКК з печінки починають заселяти кістковий мозок. Отже, завдяки міграції ембріональних СКК забезпечується поетапне заселення різних гемопоетичних органів.

Певна частина СКК постійно циркулює з кров'ю і в дорослих мишей. Цей показник у мишей становить 0,3 % загальної кількості ($3,3 \cdot 10^3$) СКК в організмі. Концентрація СКК в крові ембріонів в кілька разів вища, ніж у дорослих, а максимальний рівень реєструється у пізній пренатальний і ранній постнатальний періоди. У процесі старіння мишей інтенсивність міграції СКК знижується.

У крові людини також спостерігається висока концентрація СКК в пренатальний період, тому клітини пуповинної крові можна використовувати як гемопоетичні клітини замість кісткового мозку при трансплантаціях. Очевидно, в перспективі будуть проводити кріоконсервацію пуповинної крові кожного народженого малюка, що дасть можливість (у разі потреби) проводити аутотрансплантацію власної гемопоетично активної тканини.

Ендотеліальні клітини кісткового мозку завжди експресують молекули адгезії VCAM-1, інтегрин VLA-4, L-селектин тощо, що зумовлює хомінг (*homing* - повернення додому) СКК, що мігрують. Крім того, СКК експресують хемокіновий рецептор CXCR4 і селективно відповідають на ліганд SDF-1 α , що експресується ендотеліоцитами кісткового мозку.

Переконливі докази здатності СКК до міграції були отримані (Р. В. Петров, Р. М. Хаїтов) в експериментах на з'єднаних у парабіоз (целярний анастомоз) сингенних мишах (лінії СВА/Н), що різнилися за хромосомним маркером Т6Т6. Одного із партнерів по парабіозу до операції опромінювали тотально, а іншому (з маркером) екранували задні кінцівки. У селезінці тотально опроміненого парабіонта всі ендогенні КУОс несли хромосомний маркер, що свідчить про міграцію їх з екранованого кісткового мозку *партнера*. Автори встановили, що міграція і рециркуляція СКК на рівні організму контролюється ендогенними глюкокортикоїдами (гормонами надниркових залоз). Фізіоло-

гічні концентрації цих гормонів вірогідно спричинюють стримувальний вплив на міграцію СКК, а підвищення їх рівня, наприклад, унаслідок інтенсивної дії різних стресових факторів, супроводжується зменшенням кількості СКК в циркуляції.

Міграція й рециркуляція СКК є важливим етапом імуногенезу. Імунізація антигенами і вакцинами значно інтенсифікує ці процеси. Після введення полісахаридних антигенів кількість СКК, що рециркулюють, збільшується в десятки разів. Процеси запалення і різні цитокіни та значні втрати крові стимулюють міграцію та рециркуляцію СКК.

Фізіологічна роль міграції СКК, крім міграції в тимус, залишається невідомою. Одним із можливих пояснень міграції є потреба в перерозподілі гемопоетичної тканини між комірками кісткового мозку. Завдяки міграції СКК можуть потрапляти в різні комірочки, що підтримує баланс кровотворної тканини в різних ділянках кісткового мозку. Припускають, що СКК можуть потрапляти в різні органи нелімфоїдної природи і диференціюватися на клітини цих органів. Так *in vitro* показана можливість диференціювання СКК на нервові клітини, гепатоцити, серцеві й скелетні м'язи тощо. Таке диференціювання СКК називають *трансдиференціюванням*. Чи має місце фізіологічне *трансдиференціювання in vivo*, поки що залишається предметом дискусій, але, припускають, що таке диференціювання може відбуватися у разі травм чи ураження периферичних тканин. Можливо, саме з цим пов'язаний підвищений рівень рециркуляції СКК під час запалення. Відомо, що під час запалення збільшується вихід з кісткового мозку в кров нейтрофілів, які частково розщеплюють позаклітинний матрикс на судинах, залишаючи "дірки" для виходу інших клітин. Показано, що інгібітори еластази нейтрофілів блокують підвищення рівня рециркуляції СКК під час запалення. Нині інтенсивно вивчається можливість використання СКК для відновлення ушкоджених тканин за різних патологічних станів, зокрема при інфаркті міокарда.

Отже, завдяки міграції й рециркуляції СКК та заселенню ними лімфоїдних органів, насамперед тимуса, де здійснюється їх диференціювання, в організмі підтримується гомеостаз гемопоетичної системи.

Проліферація і диференціювання СКК. Стовбурові клітини характеризуються двома важливими властивостями: здатністю до самовідновлення [*самопідтримання*] своєї популяції внаслідок поділу і здатністю до диференціювання на різні типи клітин крові. Здатність до самовідновлення зумовлює значну тривалість життя популяції СКК та її здатність швидко компенсувати можливі втрати різних типів клітин крові, зокрема *лімфоїдних*, впродовж усього життя організму. Можливість поповнення постійних втрат клітин за незначної частки проліферувальних СКК зумовлена існуванням напівстовбурових клітин (похідних від СКК). Останні, як уже зазначалося, інтенсивно проліферують, але диференціювання їх на комітовані попередники відбувається повільно, через багато мітотичних циклів.

У нормі переважна більшість СКК (90 %) перебувають у стадії спокою (G_0) або в тривалому періоді G_1 . Частка проліферуючих клітин є незначною і становить не більше 10% від загальної кількості (і лише у деяких ліній мишей близько 20 %). В умовах різких ушкоджувальних впливів на кістковий мозок (наприклад, під час опромінення) проліферація може індукуватися в усій популяції СКК, що збереглася. Однак навіть за цих умов здатність СКК до самопідтримання повністю не вичерпується завдяки чіткій регуляції процесів проліферації і диференціювання. Саме регуляція цих процесів забезпечує самопідтримання популяції СКК і захист їх від виснаження у результаті диференціювання в умовах величезного попиту на клітини різних типів на периферії.

Регуляція проліферації та диференціювання СКК здійснюється мікрооточенням і забезпечується тими сигналами, що індукуються контактами СКК зі стромальними клітинами кісткового мозку, та локальним продукуванням цитокінів. Перші дослідження, спрямовані на з'ясування ролі мікрооточення в регуляції проліферації і диференціювання СКК, були проведені наприкінці 60-х - на початку 70-х років ХХ ст. (N. S. Wolf, I. J. Frentin, 1968; А. Я. Фриденштейн та ін., 1973; Р. Л. Чертков, 1974).

Характерною особливістю СКК є те, що під час поділу вони утворюють нащадків, які не обов'язково стають на шлях диференціювання. Саме тому вони можуть зберігати свій проліферативний потенціал. В умовах стабільного кровотворення відбувається диференційний поділ СКК, коли після поділу материнської клітини одна дочірня залишається стовбуровою, заміщуючи материнську, а інша диференціюється в потрібному напрямі (так званий асиметричний поділ). У разі гемопоетичного стресу відбувається так звана розігнана проліферація, коли після поділу материнської клітини обидві дочірні залишаються стовбуровими (не залучаються до диференціювання). Для підтримання проліферації СКК і самооновлення їх популяції велике значення має продукування ними спеціального фактора росту (фактору стовбурових клітин) та експресія до нього рецептора (c-Kit)

Для задоволення потреб у кровотворенні СКК використовуються з урахуванням їхнього віку. До проліферації залучаються, насамперед, старіші клітини, які зробили більшу кількість поділів, отже, зберігається молодша їх популяція з вищою здатністю до самопідтримання.

Одночасно з проліферацією здійснюється диференціювання СКК – багатостадійний процес, у ході якого клітина втрачає здатність до самопідтримання і вибирає один із можливих шляхів розвитку – комітується. Перетворення СКК на спеціалізованого попередника завершується лише через кілька десятків поділів. У диференціюванні (як і в проліферації) СКК важлива роль належить їх клітинному мікрооточенню і факторам, що діють локально, у тих органах, де здійснюється цей процес.

Молекулярні механізми, що визначають комітування СКК у тому чи іншому напрямі розвитку, почали інтенсивно вивчати лише в останні роки. Значний прогрес у вивченні цього питання був досягнутий завдяки розвитку методів специфічного порушення (вимкнення) генів у мишей, які дістали назву "нокауту генів". Розвиток методів генетичного нокауту вимагає спеціальної системи позначення генотипів змінених тварин. Наявність певного гена в інтактному стані позначають символом "+", а відсутність – символом "-" після назви відповідного гена. Наприклад, генотип гомозиготних мишей, дефектних за фактором транскрипції *Rax5*, позначають *Rax5*^{-/-}. Гетерозиготи, у яких відсутній лише один ген *Rax5* з алейної пари, позначають відповідно *Rax5*^{+/-}.

Іншим важливим методом, який дав можливість аналізувати програму розвитку клітин, є метод аналізу генної експресії на рівні однієї клітини. Завдяки застосуванню цих методів нині з'ясовано ряд транскрипційних факторів, які є необхідними для диференціювання різних типів гемопоетичних клітин, хоча причини активації цих факторів у багатьох випадках ще залишаються невідомими (див. нижче)

Усі етапи диференціювання більшості типів клітин мієлоїдного ряду, за винятком моноцитів, здійснюються безпосередньо в кістковому мозку і завершуються утворенням функціонально повноцінних клітин, що виходять на периферію, де й виконують притаманні їм функції (див. розд. 1, 2).

Диференціювання спільних попередників лімфодних клітин у напрямі Т- та В-лімфоцитів потребує різних умов мікрооточення і відбувається в різних лімфоїдних органах. Крім того, навіть проходження послідовних стадій диференціювання клітин однієї лімфоїдної лінії всередині одного органа залежить від факторів мікрооточення в різних його компартментах. Диференціювання В-лімфоцитів відбувається безпосередньо в кістковому мозку. Диференціювання Т-лімфоцитів здійснюється за умови спрямованої міграції їх попередників з кісткового мозку до тимуса, в різних компартментах якого і відбуваються різні стадії диференціювання. Особливістю лімфоїдних клітин-попередників, яка відрізняє їх від клітин-попередників інших ліній кровотворення, є збереження в них експресії унікального ферменту СКК - теломерази, що відновлює довжину теломер) хромосоми. Це свідчить про закладені в них великі проліферативні можливості, які будуть реалізовані цими клітинами не лише у лімфопоезі, а й у процесі розвитку лімфоцитами імунної відповіді.

У життєвому циклі лімфоцитів можна виділити дві фази: дозрівання в центральних лімфоїдних органах за відсутності антигенного стимулу та постактиваційне диференціювання на периферії після контакту з чужорідним антигеном. Процес дозрівання супроводжується позитивним і негативним відбором репертуару рецепторів, зумовленим взаємодією незрілих лімфоцитів з власними антигенами, і завершується утворенням зрілих наївних лімфоцитів, які несуть рецептори,

реактивні щодо чужорідних і толерантні щодо власних антигенів. Диференціювання, індуковане активацією наївних лімфоцитів чужорідним антигеном, призводить до збільшення кількості специфічних до цього антигену лімфоцитів і до утворення клонів ефекторних клітин та клітин пам'яті.

Постактиваційне диференціювання Т- і В-клітин було розглянуто у розд. 10 і 11. Тому в цьому розділі детально розглянемо лише антигеннезалежне диференціювання Т- і В-лімфоцитів зі стовбурових гемопоетичних клітин і процеси відбору рецепторів певної специфічності, які відбуваються ще до контактування лімфоцитів з чужорідними антигенами.

12.2. РОЗВИТОК Т-ЛІМФОЦИТІВ У ТИМУСІ

Розвиток Т-лімфоцитів відбувається в тимусі, куди мігрують їхні кістково-мозкові попередники, і тому їх назвали тимусзалежними лімфоцитами, або Т- клітинами.

Роль тимуса в розвитку Т-клітин було доведено в експериментах, в яких цей орган вилучали у нормальних мишей або пересаджували його безтимусним мишам.

12.2.1. Роль тимуса в розвитку Т-клітин

Т-клітини, як уже зазначалося, виконують ефекторні функції в реакціях клітинного імунітету і відіграють важливу роль у гуморальних імунних реакціях на тимусзалежні антигени, активуючи В-лімфоцити та стимулюючи їх до синтезу антитіл. Саме тому тимусу належить провідна в забезпеченні імунної реактивності організму. Однак важливість тимуса для функціонування імунної системи довго залишалася не з'ясованою і вважалася сумнівною, оскільки видалення органа у дорослих тварин не спричинює істотного впливу на імунореактивність. Як виявилось, це пов'язано з існуванням Т-клітин пам'яті і здатних до самопідтримання популяцій Т-клітин, локалізованих у слизових оболонках та шкірі.

Виняткова важливість тимуса для імунітету і розвитку Т-лімфоцитів була доведена лише на початку 60-х років ХХ ст. (Міллер та ін., 1961, 1962) в експериментах, в яких, на відміну від усіх попередніх спроб, тимус був видалений відразу після народження мишей. Така рання (неонатальна) тимектомія призводить до розвитку в мишей імунодефіцитного стану, що проявляється втратою здатності розвивати клітиноопосередковані реакції, синтезувати антитіла на тимусзалежні антигени та різким зниженням кількості лімфоцитів, особливо в тимусзалежних зонах периферичних лімфоїдних органів і тканин. Пізніше роль тимуса в розвитку Т-лімфоцитів була підтверджена на безтимусних лініях мишей *nude*, в яких кількість Т-лімфоцитів становить лише близько 3% від їх рівня у нормальних мишей. Клінічні спостереження також свідчать, що у дітей з вродженими вадами (гіпоплазією

чи аплазією) тимуса, як, наприклад, при синдромі Ді Джорджі, формується Т-клітинний імунодефіцит з порушенням дозрівання Т-клітин та зниженням імунореактивності. Отже, рання тимектомія і природжена відсутність тимуса призводять до розвитку глибокого Т-імунодефіциту.

Усі явища імуноної недостатності повністю ліквідуються після пересаджування неонатально тимектомованим і безтимусним мишам сингенного тимуса новонароджених тварин. Відновлення імуноної реактивності після пересаджування тимуса спостерігається також у Т-імунодефіцитних дітей, однак цей ефект обмежується терміном функціонування аlogenного трансплантата. Після пересаджування тимуса відбувається міграція Т-лімфоцитів у периферичні лімфоїдні органи та заселення ними Т-зон з одночасним відновленням імуноних функцій. Часткове відновлення імуноної реактивності відбувається і тоді, коли тимус пересаджують у мікродифузійних мембранах, крізь пори яких клітини не проходять. Це свідчить про те, що тимус здійснює імунорегуляторні функції за допомогою продукованих гуморальних факторів. Однак спроби замістити функції тимуса за допомогою екстрагованих із нього гормональних факторів (тимозини, тимопоедини, тимулін) не дали очікуваних результатів. Це пояснюється тим, що розвиток Т-лімфоцитів залежить не стільки від гуморальних факторів, продукованих клітинами тимічного мікрооточення, як, передусім, від прямих взаємодій з цими клітинами. Імуностимулювальний ефект тимусних препаратів, які використовуються для терапії вторинних імунодефіцитів, зумовлений переважно їхнім впливом на функціональне дозрівання клітин, що виселилися з тимуса.

Слід зазначити, що імуновідновлювальний ефект пересаджування тимуса у разі дефектів розвитку цього органу можливий лише за умови функціональної повноцінності СКК, які дають початок попередникам Т-лімфоцитів. За тих форм імунодефіцитів, що характеризуються дефектами тимуса та ураженням СКК, пересаджування лише тимуса не дає відновлювального ефекту. Отже, тимус забезпечує здійснення генетично детермінованої програми розвитку Т-лімфоцитів із СКК. Функціонально повноцінні СКК є і в безтимусних мишей.

Безпосередня роль тимуса в диференціюванні СКК на Т-лімфоцити чітко доведена в експериментах, в яких неонатальна тимектомія у мишей поєднується зі смертельним опроміненням і наступною трансплантацією кісткового мозку. У таких тварин Т-лімфоцити не утворюються, а імуноні функції не відновлюються. І навпаки, в опроміненіх мишей, яким тимектомія не проводилася, ці процеси після трансплантації кісткового мозку відбуваються нормально.

Важливу роль тимічної строми в диференціюванні Т-попередників демонструють результати експериментів, в яких використовували дві лінії мутантних мишей з різко зниженою кількістю Т-клітин, що була зумовлена різними причинами. У мишей *nude* Т-імунодефіцит пов'я-

заний з дефектом розвитку тимічного епітелію, а в мишей *scid* (*severe combined immune deficiency*) - з дефектом реорганізації генів ТкР. Після трансплантації кісткового мозку *nude* мишам *scid* розвиток Т-попередників в організмі реципієнтів відбувається нормально. Власні кістковомозкові Т-попередники також розвиваються у мишей *nude* нормально за умови трансплантації їм тимуса мишей *scid*.

Тимус забезпечує специфічне мікрооточення, здатне ефективно підтримувати розвиток Т-лімфоцитів з клітин-попередників, що походять із кісткового мозку.

Тимічне мікрооточення. У створенні тимічного мікрооточення беруть участь спеціалізовані клітини строми органа в тісній взаємодії з локалізованими в ньому лімфоїдними клітинами. Стромальні клітини тимуса представлені епітеліоцитами та клітинами мезенхіми.

Головним компонентом тимічного мікрооточення є епітеліальні клітини. Разом з іншими стромальними клітинами вони формують щільну тривимірну сітку, в якій містяться клітини гемопоетичного походження, що колонізують тимус: тимоцити, макрофаги та дендритні клітини.

Онтогенетичне походження клітин тимічного епітелію нині залишається дискусійним. Невідомо, чи всі вони походять із однієї стовбурової клітини, яка дає початок кортикальним і медулярним епітеліоцитам, чи генерація цих типів епітеліальних клітин забезпечується двома пулами стовбурових клітин - екто- та ендодермального походження. Виявлено субпопуляції тимічних епітеліоцитів, що одночасно експресують маркери TR4 та TR5 або кератини K8 та K5, які зазвичай експресуються відповідно виключно на кортикальному та медулярному епітелії. Припускають, що ці клітини, які коекспресують специфічні для кортикального і медулярного епітелію маркери, можуть бути проміжною стадією в розвитку епітеліальних клітин тимуса і дають початок кортикальним та медулярним епітеліоцитам.

Важливу роль у регуляції розвитку тимічного епітелію та його функції відіграють фактори транскрипції, серед яких найвідоміший *Whn*, що продукується локусом *nude* і є важливим для розвитку тимуса в гризунів. У дорослих мишей *nude*, у яких *Whn* немає, є лише рудимент тимуса, тоді як зародковий тимус у цих мишей (як і у *Whn*-нокаутних мишей) має відносно нормальну морфологію до колонізації його лімфоцитами. Припускають, що *Whn* впливає на розвиток найбільш ранніх тимічних епітеліальних клітин, а тому за його відсутності утворення нормальної архітектури тимуса не відбувається. Активну участь у диференціюванні та функції тимічних епітеліоцитів беруть й інші експресовані ними фактори транскрипції, дефіцит яких призводить до значних порушень: атимії (Ноха3 та Рах9), зменшення кількості тимоцитів (Рах1).

Епітеліальні клітини, що формують тимічне мікрооточення, морфологічно і функціонально досить гетерогенні й представлені кількома

типами. На розвиток тимоцитів епітеліальні клітини можуть впливати встановленням прямих міжклітинних контактів та за допомогою секретованих гуморальних факторів.

Секреторні епітеліальні клітини локалізуються в субкапсулярній та медулярній зонах та продукують цитокіни (ІЛ-1, -3, -6,-7, КСФ) і гуморальні фактори з властивостями гормонів (тимозини, тимопоетини, тимулін). Гормони відіграють лише допоміжну роль у розвитку тимоцитів у тимусі, однак дуже важливу – в дозріванні Т-клітин після міграції останніх на периферію.

Іншим типом тимусних епітеліоцитів є клітини-няньки, або клітини-годувальниці, - клітини великих розмірів з відростками, що локалізуються у зовнішніх шарах кортикальної зони і в своїх цитоплазматичних заглибинах ("кишенях") містять великі агрегати (до кількох десятків) тимоцитів. Вважають, що ці клітини здійснюють вплив на дозрівання та диференціювання на субпопуляції незрілих тимоцитів і здійснюють елімінацію загиблих унаслідок апоптозу клітин, а можливо, й самі індукують цей процес.

Епітеліальні клітини, що утворюють складну тривимірну сітку в кортексі, впливають на розвиток тимоцитів за допомогою індукування сигналів унаслідок прямих міжклітинних контактів. Взаємодія тимоцитів з епітеліоцитами, які експресують молекули МНС, є основою позитивного відбору.

Важливими компонентами тимічного мікрооточення є макрофаги та дендритні клітини. Макрофаги локалізуються в обох зонах тимуса і приблизно половина з них експресують молекули МНС II, а ДК переважно зосереджуються в кортикомедулярній ділянці, менше - в медулярній зоні та всі без винятку несуть МНС II. Серед ДК є клітини мієлоїдного і лімфоїдного походження. ДК і макрофаги утворюються безпосередньо в тимусі з кістковомозкових попередників.

Експериментальні дані свідчать про вплив медулярного епітелію на розвиток у тимусі певних субпопуляцій ДК. У мишей, які не експресують транскрипційний фактор RelB, у тимусі відсутні деякі субпопуляції медулярних епітеліоцитів і немає лімфоїдних CD8⁺ДК, хоча наявні мієлоїдні CD8-ДК. Разом з тим після введення RelB^{-/-} кісткового мозку опроміненим особинам дикого типу в них утворюються ДК обох субпопуляцій. Локалізовані в тимусі ДК та макрофаги (МНС II⁺) відіграють роль факторів, що підтримують розвиток тимоцитів і зумовлюють елімінацію потенційно аутореактивних клітин.

Крім тимічного епітелію, на розвиток тимоцитів можуть впливати тимусні клітини мезенхімного походження, що представлені в кортексі. Їхній вплив реалізується на стадії незрілих подвійно-негативних тимоцитів (CD4⁻ CD8⁻ CD44⁺ CD25⁺) і, як припускають, здійснюється опосередковано - сорбцією (і презентацією) факторів росту та цитокінів на міжклітинному матриксі. Мезенхімальні клітини можуть впливати також на формування раннього тимічного епітелію, вірогідно

стимулюючи ріст і диференціювання епітеліоцитів безпосередньо — за допомогою продукованих факторів росту фібробластів.

Слід зазначити, що самі тимоцити можуть безпосередньо впливати на формування необхідного для їх розвитку мікрооточення. Тимоцити спричинюють регуляторний вплив на розвиток як кортикального, так і медулярного епітелію. Так, у трансгенних мишей з мутаціями гена ϵ -ланцюга молекули CD3 пригнічення розвитку тимоцитів на ранній стадії поєднується з глибокими аномаліями розвитку тимічного кортексу. Розвиток медулярного епітелію може регулюватися локалізованими в медулі зрілими тимоцитами. Підтвердженням цього є дані про виникнення дефектів в організації медулярного епітелію під час блокування розвитку тимоцитів та відновлення структури медулярної речовини після введення Т-клітин, наприклад у мишей *scid* з тяжким комплексним імунodefіцитом.

Отже, різні взаємодії і взаємовплив епітеліального та лімфоїдного компартментів тимуса забезпечують утворення в різних зонах органа специфічних клітинних мікрооточень, які впливають на різні стадії розвитку Т-лімфоцитів зі спеціалізованих клітин-попередників.

12.2.2. Заселення тимуса Т-попередниками та їх дозрівання

Заселення зачатка тимуса попередниками Т-лімфоцитів з ембріональної печінки у птахів і ссавців відбувається у вигляді кількох міграційних актів. У розвинений тимус Т-попередники проникають у постнатальний період з кісткового мозку постійно. Так, в ембріонів мишей заселення відбувається у вигляді двох хвиль: через 11-13 та 17-19 діб ембріогенезу, а в дорослих мишей - починаючи з 7-ї доби після народження.

В ембріонів попередники Т-клітин потрапляють до тимуса через мезенхімну капсулу, оскільки перша колонізація органа передуює васкуляризації. В дорослих організмів клітини-попередники проникають усередину тимуса крізь стінки великих венул у кортикомедулярній ділянці, долаючи гематотимічний бар'єр. В утворенні бар'єра беруть участь судинні ендотеліальні клітини, що частково перекривають одна одну, розміщений за ними шар макрофагів і базальна мембрана (зовнішня епітеліальна вистилка). Бар'єр забезпечує вибіркове проникнення в тимус СКК (попередників Т-клітин), запобігаючи проникненню клітин інших типів. Подолання бар'єра Т-попередниками зумовлено наявністю на їхній поверхні рецепторів хомінгу (молекула CD44, інтегринів VLA-4 і 6, L-селектину), за допомогою яких вони розпізнають комплементарні структури на судинному ендотелії та позаклітинному матриксі. Лігандами молекули CD44 є похідні гіалуронової кислоти на ендотелії та компонент міжклітинного матриксу фібронектин, а лігандами інтегринів VLA-4 і VLA-6 – білки матриксу фібронектин і ламінін. L-селектин розпізнає кінцеві залишки D- β -N-ацетилглюкозаміну в

складі глікопротеїнів ендотелію. Проходження крізь базальну мембрану зумовлюється інвазивними властивостями Т-попередників - продукуванням ферментів гіалуронідази та колагенази.

Т-попередники рекрутуються до тимусу за допомогою певних хемотаксичних факторів, що продукуються клітинами цього органа. Одним із можливих кандидатів, відповідальним за залучення попередників Т-лімфоцитів з кісткового мозку до тимуса, вважається хемокін CCL25 (ТЕСК). Цей хемокін експресується тимічними ДК та індукує міграцію *in vitro* незрілих та зрілих тимоцитів, що несуть рецептор до нього (CCR9), але не є хемоатрактантом для зрілих периферичних Т-клітин. Однак, як виявилось, МкАТ до цього хемокіну не перешкоджають колонізації тимуса. Це може свідчити про те, що ТЕСК не відповідає за міграцію попередників Т-клітин до тимуса або принаймні не є єдиним хемоатрактантом для них. Є дані, що функцію хемоатрактантів для Т-попередників виконують такі хемокіни, як XCL1 (лімфотактин) та CCL2 (MCP-1).

Важливими процесами у розвитку Т-лімфоцитів є комітування попередників до диференціювання на Т-клітини та вибір між $\alpha\beta$ та $\gamma\delta$ Т-клітинними лініями. Тривалий час було невідомо, чи комітування клітин-попередників до розвитку на Т-клітини відбувається ще до проникнення їх у тимус, чи їхній розвиток детермінується вже всередині органа кортикальним мікрооточенням. Нещодавно отримані експериментальні дані свідчать на користь другого припущення.

Першими в ембріональному тимусі розвиваються $\gamma\delta$ Т-клітини з попередників першої хвилі міграції. $\alpha\beta$ Т-клітини диференціюються з попередників другої хвилі міграції, що проникли в тимус із ембріональної печінки. Попередники з кісткового мозку, що після народження заселяють тимус мишей, переважно диференціюються на $\alpha\beta$ Т-клітини, які поповнюють периферичний пул Т-лімфоцитів.

Стадії диференціювання Т-клітин. Після проникнення всередину тимуса клітини-попередники мігрують до зовнішнього шару кори – в субкапсулярну ділянку. У міру дозрівання клітини переміщуються у глибший внутрішній шар кори та в медулярну зону. Розвиток попередників на зрілі Т-клітини відбувається внаслідок багатоетапного диференціювання. На всіх етапах диференціювання в тимусі клітини називають *тимоцитами*, а процес розвитку Т-клітин у тимусі – *дозріванням*. На сьогодні детально досліджено розвиток $\alpha\beta$ Т-клітин, хоча деякі важливі моменти, зокрема механізми їх позитивного відбору, залишаються ще недостатньо з'ясованими.

Дозрівання Т-клітин супроводжується змінами їх фенотипу - появою або зникненням поверхневих молекул. Певні специфічні комбінації цих молекул є маркерами Т-клітин на різних стадіях дозрівання і дають змогу диференціювати різні субпопуляції тимоцитів. Серед численних молекул клітинної поверхні найважливішими є ті, що свідчать про стан

функціонального дозрівання Т-клітин. Це насамперед Т-рецепторний комплекс (ТкР і CD3) та корецептори CD4 і CD8. Кістковомозкові клітини-попередники, що вперше колонізують тимус, можуть давати початок як $\gamma\delta$ і $\alpha\beta$ Т-лімфоцитам, так і лімфоїдним ДК. Після диференціювання і проліферації впродовж тижня вони вже несуть специфічні для Т-клітинної лінії молекули (наприклад, CD2 у людини, Thy1 у мишей), але не експресують жодного з трьох функціонально значущих маркерів (ТкР-CD3, CD4, CD8).

Важливими подіями у розвитку $\alpha\beta$ Т-клітин є реорганізація й експресія генів α - і β -ланцюгів ТкР та відбір репертуару незрілих $\alpha\beta$ ТкР. Нагадаємо, що перебудові генів ТкР передують активація генів рекомбінази RAG1 і RAG2 та гена TdT (термінальної дезоксинуклеотидилтрансферази), що каталізує синтез олігонуклеотидних вставок у ДНК у місцях з'єднання V-, D- і J-генетичних сегментів.

Процес диференціювання $\alpha\beta$ Т-клітин у тимусі можна поділити залежно від експресії ними корецепторів CD4 і CD8 на три стадії: I - *подвійно-негативних* (CD4⁻ CD8⁻), II - *подвійно-позитивних* (CD4⁺ CD8⁺) та III - *монопозитивних* (CD4⁺ чи CD8⁺) тимоцитів. У табл. 54 показано зміни експресії основних функціональних маркерів ($\alpha\beta$ ТкР, CD3, CD4, CD8) у процесі диференціювання Т-клітин у різних анатомічних зонах тимуса і зазначено, на яких етапах відбуваються процеси позитивного та негативного відбору (див. далі).

Подвійно-негативні тимоцити. Стадію подвійно-негативних тимоцитів зазвичай поділяють на етапи залежно від експресії молекули міжклітинної адгезії CD44 та молекули CD25 – α -ланцюга рецептора ІЛ-2. На ранньому етапі ці клітини експресують CD44, але не несуть CD25. Гени обох ланцюгів ТкР у цих клітин, що мають фенотип CD44⁺ CD25⁻, зберігають зародкову конфігурацію. На наступному етапі дозрівання клітини починають експресувати CD25, набуваючи фенотип CD44⁺ CD25⁺, і розпочинають реорганізацію генів, що кодують β -ланцюг ТкР. Спочатку відбувається D-J-реаранжування генів β -ланцюга, причому в обох хромосомах. Пізніше ці клітини зменшують експресію CD44 за збереження рівня експресії CD25. На цьому етапі клітини фенотипу CD44^{low} CD25⁺ затримуються до повного завершення реорганізації генів β -ланцюга (відбувається V-DJ-рекомбінація, але тільки в одній хромосомі) та експресують цитоплазматичну форму CD3. Експресований β -ланцюг з'єднується з сурогатним α -ланцюгом пТ α - пре-Т-cell α (gp33), внаслідок чого формується пре-ТкР (пТ $\alpha\beta$), який у невеликій кількості експресується в асоціації з CD3 на поверхні клітини.

Клітина припиняє експресію CD25 (набуває фенотипу CD44⁻ CD25⁻) та реорганізацію генів β -ланцюга, виходить зі стану спокою в клітинний цикл і проліферує. Показано, що в індукуванні утворення CD44⁻ CD25⁻ тимоцитів головну роль відіграє транскрипційний фактор

GATA-3, а в регуляції проліферації тимоцитів після успішного утворення пре-ТкР бере участь молекула Notch-3. Внаслідок проліферації накопичується велика кількість клітин з певним β -ланцюгом, але з ще не реорганізованими генами α -ланцюга. Пізні подвійно-негативні тимоцити, що активно проліферують, мають морфологію бластних клітин і тому їх іноді називають *великими подвійно-негативними лімфоцитами*. На цій стадії вони залишаються впродовж шести поділів. Під час проліферації клітини розпочинають експресувати молекули CD4 та CD8 і переходять до наступної стадії розвитку.

Подвійно-позитивні тимоцити. Після припинення проліферації клітини реорганізують гени α -ланцюга ТкР та експресують повноцінний $\alpha\beta$ -Т-клітинний рецептор в асоціації з комплексом CD3 і набувають статусу *малих подвійно-позитивних* ($CD4^+ CD8^+$) *тимоцитів*. Щільність експресії ТкР на їхній поверхні низька. На цій стадії відбувається *позитивний відбір* - скринінг (перевірка) тимоцитів на здатність їхніх рецепторів розпізнавати власні молекули МНС. Якщо зв'язування ТкР з комплексами власних МНС - пептид не відбудеться, клітини гинуть. Середня тривалість життя цих $CD4^+ CD8^+$ -тимоцитів - 3-4 доби. Тимоцити, рецептори яких уже провзаємодіяли з комплексами власні МНС - пептид, виживають і продовжують диференціювання. Пізні подвійно-позитивні тимоцити, що пройшли позитивний відбір, починають експресувати велику кількість комплексів ТкР – CD3. Вони зазнають подальшого позитивного відбору на здатність розпізнавати МНС I або МНС II і визначають свою майбутню спеціалізацію.

Монопозитивні тимоцити. Згодом подвійно-позитивні тимоцити припиняють експресію одного з корецепторів і стають монопозитивними $CD4^+$ або $CD8^+$ тимоцитами. $CD4^+$ Т-клітини у функціональному відношенні є попередниками хелперів, а $CD8^+$ Т-клітини - попередниками цитотоксичних Т-лімфоцитів.

Під час розвитку тимоцити зазнають не лише позитивного, а й *негативного відбору* - скринінгу на аутореактивність, який відбувається як під час монопозитивної, так і під час подвійно-позитивної стадій розвитку. Аутореактивні клітини елімінуються.

Клітини, що мігрують у медулярну зону, затримуються тут на досить тривалій проміжок часу - два тижні з трьох, впродовж яких триває у мишей процес дозрівання в тимусі Т-клітин з їхніх попередників. У медулярній зоні, очевидно, триває диференціювання монопозитивних $CD4^+$ і $CD8^+$ Т-клітин, яке супроводжується зміною профілю експресії багатьох поверхневих молекул ($CD24$, $Qa2$, $CD62L$, $CD69$, $3G11$). Однак не з'ясовано, чи диференціювання на стадії монопозитивних тимоцитів здійснюється автономно, чи під впливом певних стромальних (але не епітеліальних) клітин. На цьому етапі відбувається незалежна від взаємодії з МНС проліферація зрілих Т-клітин (щонайменше шість мітотичних циклів), яка принаймні частково індукується ІЛ-7. При-

пускають, що друга хвиля внутрішньотимічної проліферації зрілих Т-клітин перед їхньою міграцією з тимуса потрібна для збільшення кількості відібраного репертуару Т-клітин.

Отже, тимоцити на різних стадіях диференціювання різняться за експресією основних функціональних маркерів. Тимоцити першої стадії (ранні) не несуть корецепторів CD4 і CD8, реорганізують гени β -ланцюга ТкР та експресують пре-ТкР (комплекс β -ланцюга з сурогатним α -ланцюгом) в асоціації з молекулою CD3. Тимоцити другої стадії (проміжні) коекспресують корецептори CD4 і CD8, реорганізують гени α -ланцюга ТкР та експресують невелику кількість комплексів $\alpha\beta$ -ТкР з CD3. Тимоцити третьої стадії (зрілі) несуть лише один із корецепторів (CD4 або CD8) і велику кількість комплексів $\alpha\beta$ -ТкР з CD3 (табл. 43).

Крім зазначених маркерів, Т-клітини несуть інші поверхневі молекули, експресія яких може змінюватися на різних стадіях диференціювання або залишатися постійною впродовж дозрівання в тимусі чи навіть після міграції з нього. Експресію маркерів на різних стадіях дозрівання Т-клітин у людини наведено на рис. 78.

Одним із перших Т-клітинних маркерів, що експресуються на клітинах-попередниках ще до проникнення їх у тимус, є молекула CD7 (експресується на лімфоїдних стовбурових клітинах і на зрілих Т-клітинах). Однак за певних умов вони можуть диференціюватися також на В-лімфоцити, НК-клітини, ДК. Ця здатність зберігається у них ще впродовж короткого періоду після проникнення в тимус.

Таблиця 43. Етапи диференціювання Т-клітин у тимусі

| Анатомічна зона тимуса | Клітини мікро оточення | Мембранний фенотип тимоцитів | Основні процеси, що відбуваються з тимоцитами |
|------------------------|--|--|--|
| Субкапсулярна ділянка | Епітеліальні клітини | CD3 ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁻ | Інтенсивна проліферація подвійно-негативних попередників з неореорганізованими генами Т-рецептора |
| Зовнішній шар кори | Епітеліальні клітини, дендритні клітини | pT $\alpha\beta$ +CD3 +CD4-CD8- | Реорганізація подвійно-негативними тимоцитами генів β -ланцюга та експресія останнього з сурогатним α -ланцюгом і молекулою CD3. Проліферація |
| Внутрішній шар кори | Епітеліальні клітини, дендритні клітини, макрофаги | pT $\alpha\beta$ + CD3 + CD4 ⁺ CD8 ⁺ | Експресія поодвійно-позитивними тимоцитами пре-Т-рецептора (β -ланцюга з сурогатним α -ланцюгом) в асоціації з CD3 |

| | | | |
|--------------------------------------|--------------------------------|--|---|
| Корти- ко- меду- лярна зона | Те саме | $\alpha\beta$ -ТкP ⁺ CD3 ^{low} CD4 ⁺ CD8 ⁺ | Реорганізація подвій- но-позитивними тимоцитами генів α -ланцюга та експресія у невеликій кількості повноцін- ного $\alpha\beta$ -рецептора в асоціації з молекулою CD3 |
| Медуляр на зона | Епітелі- альні клі- тини | $\alpha\beta$ -ТкP ⁺ CD3 ^{hi} CD4 ⁺ $\alpha\beta$ -ТкP ⁺ CD3 ^{hi} CD8 ⁺ | Експресія монопозитив- ними тимоцитами Т-рецепторного комплексу у великій кількості. Негативний відбір. Проліферація |

З появою на поверхні тимоцитів молекули CD25, яка збігається в часі з експресією маркера Т-клітин - молекули CD2, диференціювальні *можливості* Т-попередників звужуються. На цьому етапі вони зберігають здатність диференціюватися, крім Т-клітин, також на ДК, однак втрачають її одночасно з втратою експресії молекули CD44. До речі, молекула CD44, що виконує роль рецептора хомінгу під час проникнення клітин-попередників у тимус, зберігається лише на найбільш юних тимоцитах і знову експресується у невисокому рівні на зрілих тимоцитах перед міграцією їх на периферію. Вона експресується також Т-клітинами пам'яті та ефекторними Т-клітинами і відіграє певну роль у їхній міграції.

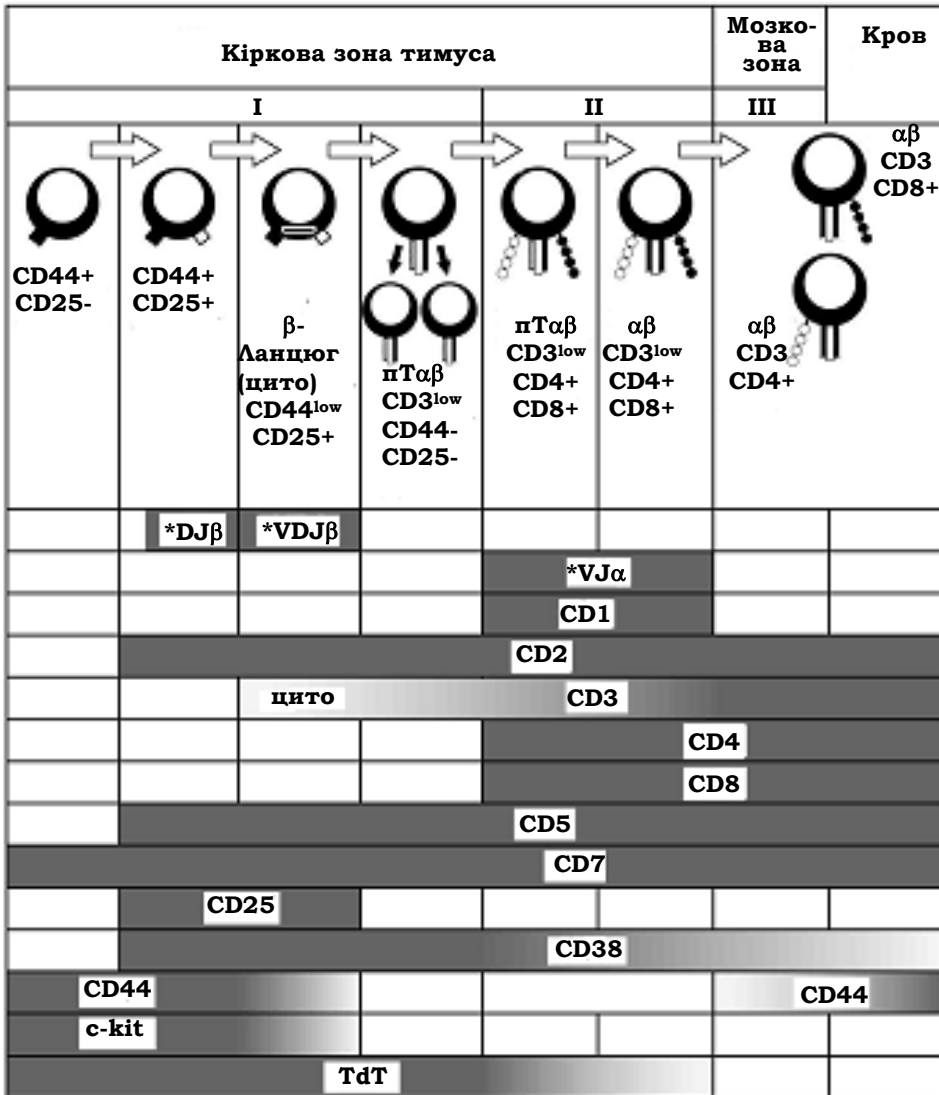


Рис. 78. Стадії розвитку αβТ-клітин і зміна їх антигенного фенотипу в процесі дозрівання в тимусі (знаком * позначено перебудову генів α- і β-ланцюгів ТкР); pТа - сурогатний α-ланцюг; pТаβ - пре-ТкР; αβ - αβ-ТкР; цито - експресія у цитоплазмі

Іншим маркером Т-попередників є фермент TdT, активність якого найбільша у CD4-CD8⁻ – тимоцитах, зменшується у CD4⁺CD8⁺ – тимоцитах і зникає у зрілих монопозитивних Т-клітинах. TdT відіграє важливу роль у створенні репертуару ТкР.

Нині залишається ще не з'ясованим функціональне значення експресії молекули CD25 (α-ланцюга рецептора до ІЛ-2). Ця молекула експресується лише на ранніх CD4-CD8⁻ (CD4-CD8⁻) – тимоцитах, що характеризуються високою проліферативною активністю (зникає пі-

сля перебудови β -ланцюга ТкР). Однак після руйнування гена ІЛ-2 внаслідок нокауту, розвиток Т-клітин у мишей відбувається нормально. Можливо, ІЛ-2 поряд з іншими цитокінами (ІЛ-1,-6, ГМ-КСФ, ФНП- α) виконує роль костимулятора проліферації тимоцитів (зокрема, на етапі відбору тимоцитів, що пройшли реаранжування генів β -ланцюга). Певну роль у проліферативних процесах на ранній стадії, очевидно, відіграє і фактор стовбурових клітин, рецептор для якого (CD117) експресується на СКК, Т-попередниках і на ранніх CD4-CD8-тимоцитах. Після інактивації гена цього фактора кількість тимоцитів зменшується вдвічі.

Невідома також роль молекули CD1, яка експресується у п'яťох ізоформах (a, b, c, d, e) тимоцитами тільки на стадії CD4⁺CD8⁺, коли відбувається перебудова генів α -ланцюга ТкР і позитивний відбір тимоцитів.

Маркерами проліферації тимоцитів є рецептор трансферину (CD71) та молекула CD38, що експресуються на кортикальних тимоцитах і лише на незначній частині медулярних та частині зрілих периферичних Т-клітин.

Зазначимо, що більшість етапів диференціювання Т-клітин відбувається в кортикальній зоні, в різних її ділянках, у міру просування тимоцитів до медулярної зони, де цей процес завершується. Міграція тимоцитів усередині тимуса є спрямованим процесом, що чітко регулюється. Важливу роль у регуляції міграції тимоцитів відіграють хемокіни, що виробляються самими тимоцитами та тимічними стромальними клітинами.

Відомо, що в тимусі експресується не менш як 12 хемокінів (MDC, TARC, 6 SKine, SDF-1, TECK, IP-10, I-TAC, еотаксин, Lptn, MIP-1 α , MIP-3 α , MIP-3 β) і, як вважають, специфічна локалізація субпопуляцій тимоцитів у різних зонах (кортексі чи медулі) може бути зумовлена їх диференційною чутливістю до різних хемокінів. У процесі розвитку тимоцити змінюють профіль експресії хемокінових рецепторів і набувають чутливість до інших хемокінів, що зумовлює їх міграцію з одних ділянок тимуса до інших. Наприклад, експресія рецептора CXCR4 та хемотактична відповідь на його ліганд CXCL12 (SDF-1) *in vitro* спостерігаються на всіх стадіях розвитку тимоцитів. На такі хемокіни, як CCL22 (MDC) та CCL17 (TARC) – ліганди рецептора CCR4, – відповідають тільки пізньокортикальні та ранньомедулярні тимоцити. Зрілі медулярні тимоцити експресують рецептор CCR6 і відповідають на його ліганд – хемокін CCL25 (TECK). Перед міграцією з тимуса тимоцити втрачають експресію CCR6, а з нею і чутливість до TECK, та набувають чутливість до хемокінів, які залучають їх до вторинних лімфоїдних органів (див. нижче). Є також дані, що локалізовані в кортексі субпопуляції тимоцитів CD4-CD8⁻ та CD4⁺CD8⁺, чутливіші до дії хемокіну CXCL12 (SDF-1), а зрілі CD4 та CD8 Т-клітини мозкової ре-

човини – до дії CCL19 (MIP-3β).

У процесі внутрішньотимічної міграції тимоцити взаємодіють з клітинами строми, які впливають на їх дозрівання. Цей вплив здійснюється через встановлення прямих міжклітинних контактів, які забезпечують адгезію тимоцитів до епітеліальних та допоміжних клітин тимуса, і продукування цитокінів. Основою адгезії є взаємодії комплексарних молекул, що експресуються на тимоцитах і клітинах строми: CD2 з LFA-3 (CD58), LFA-1 (CD11/ CD18) з ICAM-1 (CD54). Серед секретованих цитокінів (ІЛ-1,-3,-6,-7, ГМ-КСФ, ФНП-β) найважливішим для розвитку Т-клітин є ІЛ-7. У людей та мишей, що мають дефект гену рецептору для ІЛ-7, Т-клітини не розвиваються.

Взаємодії клітин за участю рецепторних, адгезивних і, можливо, унікальних костимуляторних молекул відіграють важливу роль у реалізації позитивного та негативного відбору Т-клітин за специфічністю їх ТкР під час розвитку в тимусі.

Відбір репертуару Т-клітин. Зрілі Т-клітини мають бути здатні відповідати на чужорідні антигенні пептиди в асоціації з власними молекулами МНС (тобто мають бути МНС-рестрикованими) і не здатні реагувати на власні антигенні пептиди в комплексі з власними МНС (тобто бути аутолерантними). Репертуар МНС-рестрикованих і аутолерантних Т-клітин формується під час дозрівання їх у тимусі в процесі подвійного відбору. Перевірка Т-клітин на МНС-рестрикцію здійснюється позитивним відбором, а перевірка на аутолерантність – у процесі негативного відбору. МНС-рестриковані Т-клітини підтримуються позитивним відбором, а аутореактивні елімінуються внаслідок апоптозу в процесі негативного відбору. Факторами відбору в обох випадках є комплекси власних пептидів з МНС, які презентуються тимоцитам як класичними (макрофагами, ДК), так і некласичними (епітеліальними і мезенхімальними клітинами) АПК. Механізми, за допомогою яких здійснюються процеси відбору, є предметом інтенсивних експериментальних досліджень (деякі з них буде розглянуто нижче).

Позитивний відбір Т-клітин. Явище позитивного відбору було відкрито на радіаційних кістковомозкових химерах (радіохимерах, див. вище), яких отримували введенням клітин кісткового мозку F₁ гібридів генотипу МНС^{а×b} летально опроміненим мишам батьківського генотипу, наприклад МНС^а. У цих химер Т-клітини, що розвинулися в тимусі, та всі АПК гемопоетичного походження, як у тимусі, так і на периферії мають генотип МНС^{а×b}.

Якщо проімунізувати химер антигеном, то його пептиди будуть презентуватися АПК в асоціації як з МНС^а, так із МНС^b. Однак Т-клітини химер відповідають *in vitro* переважно на антиген, презентований молекулами МНС^а. Це свідчить про те, що МНС-рестрикцію Т-клітин визначають клітини тимічного оточення, в якому вони до-

зрівають.

У наступних експериментах на тимектомованих F₁ гібридних мишах, захищених тимусом батьківського гаплотипу, було підтверджено, що за формування МНС-рестрикції і за позитивний відбір Т-клітин відповідальна радіорезистентна строма тимуса. Схему експерименту наведено на рис. 79. Гібридів МНС^{axb} F₁ після тимектомії та імплантації тимуса МНС^a або МНС^b опромінювали для елімінації власних Т-клітин і вводили сингенний кістковий мозок (МНС^{axb}) як джерело СКК. Промунізувавши мишей антигеном, вивчали *in vitro* проліферативну реакцію Т-клітин лімфовузлів гібридів на антиген, презентований АПК батьківських гаплотипів і для контролю – гібридного гаплотипу (рис. 89). Т-клітини гібридів з пересадженим тимусом гаплотипу МНС^a розпізнавали антиген і проліферували лише в комплексі з молекулами МНС^a, але не МНС^b, а Т-клітини з тимусом гаплотипу МНС^b – лише в асоціації з МНС^b. Т-клітини гібридів із сингенним тимусом були здатні розвивати реакцію на антиген, що був презентований як на МНС^a-, так і на МНС^b- клітинах. Отже, МНС-рестрикція визначається МНС-фенотипом не самих Т-клітин, а фенотипом тимуса, в якому вони дозрівали. Попереднє оброблення тимуса дезоксигуанідином, що руйнує дендритні клітини та макрофаги, не впливало на виникнення МНС-рестрикції:

| Гаплотип миші | Тип імплантованого тимуса | Проліферативна реакція на антиген, презентований АПК типу: | |
|---------------|----------------------------------|--|------------------|
| | | МНС ^a | МНС ^b |
| a × b | a × b | ++ | ++ |
| a × b | a | ++ | - |
| a × b | a (оброблення дезоксигуанідином) | ++ | -- |
| a × b | b | - | ++ |
| a × b | b (оброблення дезоксигуанідином) | - | ++ |

Виникнення МНС-рестрикції відбувається за участю радіорезистентних стромальних клітин тимуса, якими є, як з'ясувалося пізніше, кортикальні епітеліоцити (див. далі).

Велике значення для вивчення процесу позитивного відбору (та ролі власних молекул МНС у дозріванні тимоцитів) має використання трансгенних мишей з внесеними повністю реорганізованими генами ТкР, що кодують рецептор відомої специфічності. У таких мишей переважна більшість Т-клітин експресують введені гени ТкР, а

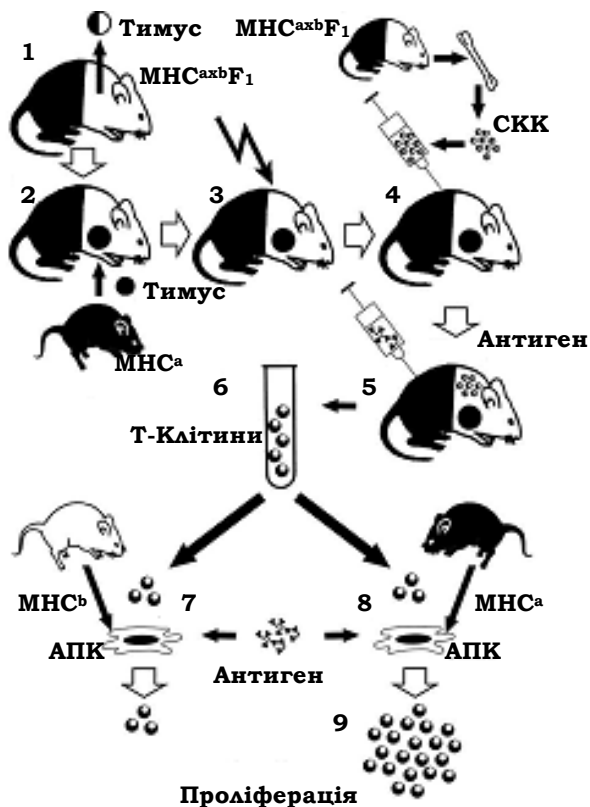


Рис. 79. Схема експерименту, що демонструє явище МНС-рестрикції Т-клітин у тимусі: 1 - видалення тимуса у миші, яка є гібридом I покоління (F_1) з генотипом MHC^{a^*b} ; 2 - трансплантація тимуса від ембріона миші батьківської лінії з генотипом MHC^a ; 3 - опромінення миші з пересадженим тимусом дозою радіації, що вбиває лімфоцитарні клітини; 4 - пересаджування стовбурових клітин кісткового мозку від особини F_1 ; 5 - імунізація антигеном; 6 - виділення з імунізованої миші Т-лімфоцитів; 7 - перенесення виділених Т-клітин у змішану культуру лімфоцитів *in vitro* разом з антигеном і АПК мишей батьківської лінії з генотипом MHC^b ; 8 - перенесення виділених Т-клітин у змішану культуру лімфоцитів *in vitro* разом з антигеном і АПК мишей батьківської лінії з генотипом MHC^a ; 9 - проліферація Т-клітин експериментальної миші після розпізнавання антигенного пептиду в комплексі з MHC^a на АПК миші саме тієї батьківської лінії, від якої було трансплантовано тимус

реорганізація власних генів ТкР інгібується. Отже, отримуючи трансгенних мишей з наперед відомим ТкР, рестрикованим за певними молекулами МНС, можна простежити роль саме цих молекул МНС у дозріванні тимоцитів. Показано, що у трансгенних за ТкР мишей Т-клітини дозрівають лише тоді, коли їхні рецептори рестрикто-

вані за МНС саме цього гаплотипу. Т-Клітини, що не можуть розпізнавати молекули власних МНС на епітелії тимуса, гинуть на стадії подвійно-позитивних тимоцитів.

У процесі позитивного відбору визначається експресія корецепторів CD4 та CD8 на зрілих Т-клітинах, яка чітко відповідає специфічності ТкР до власних МНС. Якщо подвійно-позитивний тимоцит (CD4⁺CD8⁺) розпізнає МНС I, то він перетворюється на монопозитивний CD8⁺-тимоцит, а якщо МНС II - то на CD4⁺-тимоцит. У мишей, трансгенних за ТкР, рестрикованим за власними молекулами МНС I, майже всі зрілі Т-клітини експресують цей рецептор і корецептор CD8, а у мишей, трансгенних за ТкР, рестрикованим за МНС II рецептором, - корецептор CD4. Залежність експресії молекул CD4 та CD8 на зрілих Т-клітинах від МНС I- чи МНС II-рестрикції ТкР чітко простежується в імунодефіцитних людей з синдромом оголених лімфоцитів *bare lymphocyte syndrome*, для якого характерна відсутність експресії молекул МНС на лімфоцитах та епітеліоцитах тимуса. Особи, в яких втрачена експресія молекул МНС I або МНС II, мають відповідно лише CD4 або CD8 Т-клітини. Така сама залежність спостерігається також у мишей, в яких експресія МНС I чи МНС II блокована генним нокаутом. Отже, в процесі позитивного відбору Т-клітин у тимусі відбувається координування експресії рецептора та корецептора у суворій відповідності до молекул МНС. Дозвіл на виживання і подальший розвиток отримують ті тимоцити, які експресують корецептор, здатний зв'язувати ту саму молекулу МНС, що й рецептор до антигену. Одночасно з розгалуженням розвитку тимоцитів у напрямі CD4⁺ чи CD8⁺-клітин відбувається їхнє програмування до виконання подальших функцій. CD4Т-клітини майже всі програмуються для секретування цитокінів, а CD8Т-клітини – для здійснення цитотоксичної функції.

Механізми, за якими здійснюється вибір експресії корецептора і напряму диференціювання тимоцитів у CD4 і CD8 Т-клітини, на сьогодні недостатньо вивчені. Важливу роль у цьому процесі відіграють рецептори родини Notch, які експресуються на різних стадіях диференціювання (від детермінування $\alpha\beta/\gamma\delta$ -ТкР до позитивного відбору CD4⁺CD8⁺) тимоцитів. Підвищення експресії рецептора Notch-1 у тимоцитах комітує їхній розвиток у напрямі CD8-клітин, що може свідчити про роль сигналу, генерованого взаємодією цієї молекули з її лігандом у тимусі, в інгібуванні диференціювання тимоцитів на зрілі CD4Т-клітини.

Позитивний відбір тимоцитів відбувається у глибоких шарах тимічного кортексу і визначається кортикальними епітеліальними клітинами. Докази цього були отримані в експериментах на мишах, трансгенних за молекулами МНС I чи МНС II, які експресувалися лише на кортикальних епітеліоцитах. Після введення мишам, в яких власні гени МНС були зруйновані, векторів з генами відсутніх МНС та екс-

пресії цих векторів у кортикальних епітеліоцитах розвиток рестрикованих за відповідними молекулами МНС Т-клітин відбувається нормально. При цьому нормалізація розвитку Т-клітин спостерігається лише за умови взаємодії молекул МНС на поверхні кортикального епітеліоцита з відповідним корецептором (МНС I - CD8, МНС II - CD4) тимоцита.

Отже, в процесі позитивного відбору здійснюється перевірка тимоцитів на правильність побудови Т-рецептора і його здатність впізнати антигенний пептид у комплексі з МНС. Факторами відбору є експресовані на кортикальних епітеліоцитах власні пептиди в комплексі з власними молекулами МНС, а об'єктом відбору - CD4⁺CD8⁺, - тимоцити, що розпізнають ці комплекси.

У результаті позитивного відбору формується популяція Т-клітин, рецептори яких мають ту чи іншу спорідненість до власних молекул МНС і здатні розпізнавати в асоціації з ними широкий спектр пептидів (власних і чужорідних). Ці тимоцити проходять подальшу перевірку на аутореактивність у процесі негативного відбору.

Негативний відбір Т-клітин. Серед позитивно відібраних у тимусі тимоцитів є специфічні до досить поширених власних антигенів. Після дозрівання в тимусі та виходу на периферію вони можуть завдати шкоди організму, ушкоджуючи нормальні клітини, що експресують аутоантигени. Для запобігання цьому потенційно аутореактивні Т-клітини елімінуються в тимусі внаслідок інтенсивного *негативного відбору*. Основою відбору є відповідь тимоцита під час розвитку на комплекси власних пептидів з власними МНС. Елімінуються ті тимоцити, які, впізнаючи ці комплекси, виявляють певну реактивність щодо них.

Негативний відбір тимоцитів здійснюють тимічні клітини кількох типів, серед яких найефективнішими є професійні АПК - дендритні клітини та макрофаги. Миші-химери, отримані трансплантацією кісткового мозку гібридів МНС^{a×b} F₁ мишам батьківської лінії МНС^a, не відторгають пересаджені клаптики шкіри мишей генотипів як МНС^a, так і МНС^b. У цих мишей підтримується толерантність не тільки до власних пептидів у комплексі з власними МНС^a, а й до комплексів пептидів з МНС^b. Толерантність сформувалася в результаті негативного відбору (елімінації) тимоцитів цими комплексами, презентованими тимічними клітинами. В тимусі химер презентувати комплекси МНС^b з пептидами здатні тільки ДК і макрофаги, що походять із пересадженого кісткового мозку. Вони здебільшого й опосередковують негативний відбір тимоцитів.

Крім ДК і макрофагів у здійсненні негативного відбору тимоцитів певну роль відіграють також епітеліальні клітини медулярної зони тимуса. Це доведено в експериментах на мишах, трансгенних за такими білками, як панкреатичний гормон, соматостатин та печінковий

C-реактивний білок, які експресуються, як з'ясувалося в досліджах, й невеликою часткою медулярних епітеліоцитів. Як вважають, на відміну від ДК, що здійснюють делецію аутореактивних Т-клітин, медулярні епітеліоцити можуть індукувати ауто толерантність за допомогою ще й інших механізмів.

Процес негативного відбору Т-клітин безпосередньо у тимусі вдалося простежити у мишей, які експресують ендogenous суперантигени (Mls - мінорні лімфоцит-стимулювальні антигени), що кодується інтегрованим у хромосому геномом мишачого вірусу пухлини молочної залози (MMTV). На відміну від звичайних анти-генів, які зв'язуються з активним центром специфічного Т-рецептора, Mls-білки (як й інші суперантигени) зв'язують з високою афінністю молекули МНС та V β -домени певних типів ТкР незалежно від антигенної специфічності останніх. Експресовані в тимусі Mls-білки зв'язуються з великою кількістю тимоцитів з ТкР відповідного типу, індукуючи у них апоптоз, і сприяють виникненню у мишей специфічної толерантності. Показано, що у тимічному кортексі уражених вірусом MMTV мишей міститься велика кількість CD4⁺CD8⁺-тимоцитів, що експресують рецептори, здатні зв'язатися з Mls-білком, тоді як у медулярній зоні (та на периферії) вони відсутні. Зважаючи на це, було зроблено припущення, що клональна делеція специфічних до Mls лімфоцитів відбувається вже на пізніх стадіях розвитку тимоцитів під час міграції з кіркової до медулярної зони в ділянці їх з'єднання, де зосереджена велика кількість ДК.

Отже, зв'язування ТкР одного і того самого комплексу власного МНС з власним пептидом індукує різні процеси: подальший розвиток тимоцитів за позитивного відбору та загибель їх за негативного відбору. Як це відбувається сьогодні ще невідомо, але для пояснення механізмів цих процесів запропоновано дві гіпотези – *гіпотезу авідності* та *гіпотезу диференційної сигналізації*.

Згідно з гіпотезою авідності, виживання чи загибель тимоцита залежить від сили сигналу, що передається від рецептора, який розпізнає антиген, усередину клітини. Слабкий або частковий (неповний) сигнал індукує виживання клітини (позитивний відбір), а сильний сигнал – її загибель (негативний відбір). Сила сигналу залежить від афінності рецептора та щільності розпізнаних комплексів пептид-МНС на поверхні кортикальних епітеліоцитів тимуса. Тимоцити, що зв'язують комплекси власний пептид-МНС з високою афінністю, елімінуються, але такий механізм діє лише щодо незрілих клітин. Зв'язування з високою афінністю цих комплексів зрілими Т-клітинами призводить до їх активації.

Загибель тимоцитів у разі негативного відбору може бути зумовлена також відсутністю додаткових (костимуляторних чи інших) сигналів. Можливо, при цьому важливу роль відіграє природа сигналу, як це передбачає гіпотеза диференційної сигналізації. За цією гіпотезою,

сигнали позитивного і негативного відбору тимоцитів різняться не кількісно, а якісно. На користь цього припущення свідчать результати досліджень, в яких сигнали від зв'язаних з антигеном рецепторів імітували за допомогою пептидів-антагоністів та перехреснозшивних реагентів.

Пептиди-антагоністи є пептидами, що здатні замінити собою оригінальний антигенний пептид у комплексах МНС-пептид. ТкР взаємодіє з комплексом пептид-антагоніст-МНС під іншим кутом, ніж з оригінальним комплексом МНС-пептид, унаслідок чого корецептор Т-клітин усувається від участі у проведенні сигналу, оскільки "не може доставити" зв'язану з ним кіназу Lck до цитоплазматичних ділянок CD3. Зріла Т-клітина не отримує повного сигналу і не відповідає на цей антиген. Отже, пептиди-антагоністи можуть бути ефективною моделлю для вивчення ролі корецепторів у процесах селекції тимоцитів. Перехреснозшивні реагенти, або крос-лінкери, - це реагенти, що здатні ковалентно зшивати наближені один до одного рецептори або корецептори Т-клітин.

В експериментах використовували дві трансгенні культури тканини тимуса. Одна культура експресувала молекули МНС, які утворювали комплекси з пептидами-антагоністами та які були здатні взаємодіяти лише з певним трансгенним ТкР. Інша культура була дефектна за молекулами МНС обох класів та експресувала ТкР однієї специфічності. Було досліджено, відбір яких тимоцитів (CD4 чи CD8) відбувається в разі надходження до клітини різних сигналів, а саме, під час зшивання крос-лінкерами лише ТкР, ТкР з корецепторами та під час утворення потрійного комплексу ТкР-пептид-антагоніст - МНС.

Застосування такого методичного підходу дало змогу встановити, що позитивний відбір CD4- і CD8-тимоцитів відбувається за різних умов. Зшивання одних лише ТкР крос-лінкерами або зв'язування ТкР з комплексами пептид-антагоніст - МНС зумовлює позитивний відбір CD8 Т-клітин, але не CD4 Т-клітин. Для розвитку CD4 Т-клітин і негативного відбору CD8 Т-клітин потрібні сигнали, які генеруються зшиванням ТкР з корецепторами (CD4, CD8) і, отже, є подібними до сигналів, що індукуються в нормі під час активації. З урахуванням цього припускають, що позитивний відбір CD8 Т-клітин може індукуватися зв'язуванням ТкР тимоцитів з комплексами ендогенний пептид-МНС на кортикальних епітеліоцитах, за якого генерується слабкий або частковий сигнал. Позитивний відбір CD4 Т-клітин може індукуватися лише сильним сигналом, рівнозначним активаційному, який генерується зв'язуванням Т-рецептора і будь-якого з двох корецепторів. Існує також думка, що кортикальні епітеліоцити можуть експресувати унікальні, поки що невідомі молекули, які передають костимуляторні або допоміжні сигнали під час позитивного відбору тимоцитів і відрізняються від молекул, задіяних під час активації зрілих Т-клітин.

Основою негативного відбору за механізмами апоптозу, як вважають, можуть бути взаємодії молекул CD30, що експресуються на активованих аутоантигенами тимоцитах фенотипу CD4⁺CD8⁺CD45RO⁺CD30⁺IL-4K⁺, з їхніми лігандами CD30L, які містяться у великій кількості на ДК та епітеліоцитах мозкової зони (*тимуса*).

Слід зазначити, що уявлення про елімінацію аутореактивних Т-клітин у тимусі не пояснює, як формується толерантність імунної системи до власних антигенів, що наявні лише в периферичних тканинах. Відомо, що усунення аутореактивних клітин від імунної відповіді на периферії реалізується переважно за рахунок інших механізмів (див. розд. 13), а не апоптозу, який є основним механізмом реалізації негативного відбору тимоцитів у тимусі.

Отже, розвиток Т-лімфоцитів з попередників і пов'язані з ним процеси відбору супроводжуються інтенсивною проліферацією та масовою загибеллю тимоцитів. Кожної доби у тимусі молодих дорослих мишей утворюється приблизно $5 \cdot 10^7$ нових клітин, а виходить із тимуса лише $1 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^6$ зрілих Т-клітин. Однак кількість клітин у тимусі залишається постійною і становить $1 \cdot 10^8$ - $2 \cdot 10^8$. Більшість тимоцитів, що розвиваються в тимусі (близько 98 %), гинуть унаслідок апоптозу. Тому тимус прирівнюють до "інтенсивно працюючої фабрики смертників". Проліферативний потенціал і схильність до апоптозу змінюються в процесі розвитку Т-лімфоцитів, і тимоцити на різних стадіях дозрівання різняться за цими властивостями. Найбільшою проліферативною активністю характеризуються ранні подвійно-негативні (CD4⁻CD8⁻) тимоцити. Завдяки цьому забезпечується постачання необхідної кількості CD4⁺CD8⁺-тимоцитів - "матеріалу" для ефективного відбору, в процесі якого більшість цих клітин "вибраковується".

Схильність до апоптозу, як відомо, залежить від співвідношення експресії факторів в клітині, що сприяють та запобігають цьому процесу, зокрема молекули Fas (CD95), яка є провідником апоптозу, та молекули Bcl-2, що захищає від апоптозу. Більшість (80-90 %) CD4⁺CD8⁺-тимоцитів, що зазнають позитивного відбору, несуть молекулу Fas і лише незначна їх частка (5-10 %) містить молекулу Bcl-2. Серед їх попередників - CD4⁻CD8⁻-тимоцитів лише 10-15 % клітин експресують Fas і 25-40 % - молекулу Bcl-2, а їхні нащадки монопозитивні CD4⁺CD8⁻ і CD4⁻CD8⁺-тимоцити всі без винятку несуть Bcl-2. При цьому значна частина CD4⁺CD8⁻ - (48-65 %) і CD4⁻CD8⁺ - (40-68 %) тимоцитів експресує молекулу Fas, з якою пов'язана регуляція їх проліферації та функціонування.

Серед трьох субпопуляцій тимоцитів CD4⁺CD8⁺ є найчутливішими до дії індукторів апоптозу. Саме тому на дію багатьох стимулювальних впливів вони відповідають не активацією, а розвитком апоптозу. Тому, як вважають, сильні сигнали, що надходять від ДК (індуковані зв'я-

зуванням комплексів МНС - пептид), які зазвичай зумовляють активацію зрілих Т-клітин, у незрілих тимоцитів індукують апоптоз. Цим пояснюється і висока чутливість кортикальних CD4⁺CD8⁺-тимоцитів до випромінювання та кортикостероїдів. Фармакологічні дози цих гормонів спричиняють в експерименті майже повне виснаження (99 %) популяції тимоцитів. В індукуванні (*індукції*) апоптозу тимоцитів під час відбору важливу роль відіграє внутрішньотимічний гормон прегненолон, продуцентами якого є епітеліальні клітини тимуса. Медулярні тимоцити нечутливі до дії кортикостероїдів, що зумовлюється як підвищенням у них експресії гена Bcl-2, так і насамперед наявністю ферменту 20 α -гідроксилстероїддегідрогенази.

Однією з причин загибелі тимоцитів може бути також накопичення в них токсичних метаболітів пуринового обміну – ГТФ та дезокси-ГТФ. Це зумовлено підвищеною активністю в тимоцитах порівняно зі зрілими Т-клітинами екто-5'-нуклеотидази та аденозиндезамінази і зниженою активністю пуриннуклеотидилфосфорилази – ферментів, що каталізують послідовні фази перетворення пуринових нуклеотидів.

Згідно з сучасними уявленнями, розвиток Т-клітин відбувається у дві стадії відбору, які здійснюються за поки що до кінця не з'ясованими механізмами різними клітинами тимічного мікрооточення внаслідок контактних взаємодій з тимоцитами та, можливо, за допомогою секретованих цитокінів. Основою відбору є перевірка антигенрозпізнавальних рецепторів тимоцитів, що розвиваються, на ауто-МНС-рестрикцію та аутоотолерантність. Підраховано, що приблизно 2 % з утворених у тимусі тимоцитів переживають подвійний скринінг, дозрівають до монопозитивних Т-клітин і виходять на периферію. Відібрані клітини залучаються до проліферації для утворення клонів антигенспецифічних Т-лімфоцитів. Специфічністю відібраних Т-клітин і визначається клональний репертуар популяції зрілих Т-лімфоцитів, які після виселення на периферію забезпечують захист від чужорідних антигенів.

12.3. РОЗВИТОК В-ЛІМФОЦИТІВ

12.3.1. Розвиток В2-лімфоцитів у кістковому мозку

В-Лімфоцити, так само, як і Т-лімфоцити, проходять складний процес розвитку, що супроводжується формуванням широкого репертуару специфічностей їхніх рецепторів. Оскільки диференціювання В-клітин вимагає перебудови генів, що кодують антигенспецифічні рецептори, більшість етапів розвитку В-клітин аналогічні до етапів розвитку Т-клітин.

На відміну від розвитку Т-лімфоцитів незалежне від антигену диференціювання В-лімфоцитів у ссавців майже повністю відбувається у кістковому мозку. У птахів є спеціалізований орган для розвитку В-клітин - сумка Фабриціуса, яка заселяється стовбуровими клітинами

ще під час ембріонального розвитку птахів і впродовж життя генерує нові В-лімфоцити. В-лімфопоєз у ссавців залежить від локального мікрооточення, яке формується у кістковому мозку.

Мікрооточення в кістковому мозку. Кровотворний кістковий мозок розміщений у комірках трубчастих кісток (див. розд. 1). З внутрішнього боку кісткова тканина вкрита ендостом - спеціалізованою сполучною тканиною. Біля ендосту знаходяться власне СКК, які у міру диференціювання переміщуються від стінок комірки до середини. В середині комірки проходять судини, крізь стінки яких зрілі клітини надходять у кров. Навколо синусоїдв розміщені ретикулярна тканина та острівці жирової тканини, а також місцеві макрофаги. Ретикулярні клітини утворюють волокна, встановлюють адгезивні контакти з СКК, синтезують ростові фактори і хемокіни, які регулюють утворення та міграцію клітин різних типів. Зокрема, для комітування СКК у бік лімфоїдного ряду головну роль відіграє ІЛ-7, що синтезується ретикулоцитами. Завдяки здатності утворювати безпосередні контакти з СКК ретикулярні клітини надають певні коstimуляторні сигнали, необхідні для комітування тих чи інших клітин та їх міграції у міру дозрівання. Завдяки жорсткій структурі кісткова тканина обмежує об'єм кісткового мозку, а жирова - створює необхідний тиск для підтримання функціонування капілярів і виходу зрілих клітин у циркуляцію. Судини кісткового мозку адаптовані до забезпечення переходу нових клітин крові у судинне русло. Процес міграції вибіркової, оскільки до кровотоку надходять лише зрілі клітини. Функцію розпізнавання зрілих клітин виконують клітини, які "обгортають" венозний синусоїд - адвентиційні клітини ("клітини-ворота"), які мають морфологію, характерну для ретикулярних клітин з великими відростками. Вони є "пропускним пунктом" для виходу клітин з кісткового мозку в кров. Ендотеліальні клітини судин мають лабільні контакти між собою, що забезпечує здатність утворювати пори, крізь які проходять клітини.

В-лімфопоєз відбувається у прошарку сполучної тканини навколо дрібних артеріол. Починається розвиток В-клітин біля ендосту, де проходить попереднє комітування СКК. У міру дозрівання попередники В-лімфоцитів мігрують у напрямі до синусоїдв, постійно підтримуючи контакти з ретикулярними клітинами.

Стадії диференціювання В2-лімфоцитів у кістковому мозку. Основними подіями під час антигеннезалежного диференціювання В-лімфоцитів у кістковому мозку є перебудова генів імуноглобулінів, унаслідок чого на поверхні В-клітини має експресуватися повноцінний імуноглобуліновий рецептор. Залежно від стадії перебудови генів імуноглобулінів антиген-незалежний розвиток В-клітин у кістковому мозку поділяють на чотири стадії.

1. Ранні про-В-клітини (стадія А).
2. Пізні про-В-клітини (пре-В1)* (стадія В).

(*У дужках позначено альтернативні назви цих стадій, що також

трапляються у спеціальній літературі).

3. Великі пре-В-клітини (великі пре-ВІІ) (стадіяС).

4. Маленькі пре-В-клітини (маленькі пре-ВІІ) (стадія D).

Процес антигеннезалежного диференціювання В-клітин у кістковому мозку закінчується утворенням клітин з повністю сформованим ВкР. Цю стадію називають стадією незрілих клітин (стадія E). Незрілі В-клітини виходять із кісткового мозку і заселяють селезінку, де завершуються процеси їх дозрівання, тобто набуття здатності відповідати на розпізнавання антигену. Закінчується цей процес формуванням зрілих наївних лімфоцитів (стадія F), які переходять до рециркуляції та заселяють вторинні лімфоїдні органи.

Розглянемо докладніше стадії антиген-незалежного диференціювання В-клітин (рис. 80).

Ранні про-В-клітини. Ранні про-В-клітини - це попередники В-лімфоцитів, які ще не мають рецепторів до антигену, але вже визначили свій подальший розвиток. У цих клітинах починає відбуватися реаранжування D-J-сегментів у локусі генів важкого ланцюга імуноглобулінів. При цьому D-J-реаранжування не зазнає алейного виключення, тобто воно може відбуватися в обох хромосомах. Важливою передумовою активації процесів реаранжування генів є експресія ферментів рекомбіназ RAG1 і RAG2 у цих клітинах. Оскільки D-сегмент потенційно може транслюватися в трьох різних рамках зчитування, то, ймовірно, ніякого контролю за "правильністю" перебігу D-J-реаранжування в клітинах не відбувається.

Слід зазначити, що після з'єднання сегментів D і J може активуватися промотор перед сегментом D, внаслідок чого може експресуватися мРНК-транскрипт неповного гена важкого ланцюга. Однак функціональне значення такої експресії залишається невідомим, крім того, не встановлено, чи існує білковий продукт, що може зчитуватися з такого мРНК-транскрипту.

Стадія розвитку ранніх про-В-клітин характеризується експресією на поверхні ряду маркерів, таких як МНС II, CD34, CD45R (B220), CD10, CD19, CD38, c-Kit, IL-7R. Деякі з них характерні ще для стовбурових клітин-попередників (CD34, CD45, c-Kit, IL-7R), а інші – лише для В-клітин (CD10, CD19, CD38).

Крім того, в цитоплазмі таких клітин починають експресуватися молекули, необхідні для формування пре-В-клітинного рецептора: молекули для передавання сигналу I α і I β , молекули λ 5 і VpreB, які складають інваріантний легкий ланцюг рецептора, а також кілька транскрипційних факторів - EBF, E2A, Pax5 (див. далі).

| Стадії | A | B | C | D | E | F |
|----------------|---------------------|---------------------|----------------------|--------------------|-------------------|-----------------|
| Лімфо-ідна СКК | Ранні про-В-клітини | Пізні про-В-клітини | Великі пре-В-клітини | Малі пре-В-клітини | Незрілі В-клітини | Зрілі В-клітини |
| | | | | | | |
| | *VJ _H | | | | | |
| | | *VDJ _H | | | | |
| | | | | *VJ _κ | | |
| | | | | *VJ _λ | | |
| | CD10 | | | | | |
| | CD19 | | | | | |
| | CD20 | | | | | |
| | CD21 | | | | | |
| | CD22 | | | | | |
| | | | | | | CD23 |
| | | | CD24 | | | |
| | | CD25(IL-2R) | | | | |
| | CD38 | | | | | |
| | CD40 | | | | | |
| | CD43 | | | | | |
| | CD72 | | | | | |
| | TdT | | | | | |
| | | | BP-1 | | | |
| | CD45R(B220) | | | | | |
| | c-Kit | | | | | |
| | IL-7R | | | | | |

Рис. 80. Стадії розвитку В-клітин і зміна їх антигенного фенотипу в процесі дозрівання (знаком * позначено VJ- і VDJрекомбінацію генів для легких (κ, λ) і важких (H) ланцюгів імуноглобулінів)

Ймовірно, ранні про-В-клітини є зворотною стадією розвитку, оскільки ознаки D-J-реаранжування в H-локусі генів імуноглобулінів

можна виявити навіть у лейкоцитах мієлоїдного ряду.

Пізні про-В-лімфоцити. Після завершення D-J-реаранжування в H-локусі починається V-DJ-реаранжування, тобто приєднання V-генів до об'єднаних раніше DJ-сегментів. З V-DJ-реаранжування починається стадія пізніх про-В-лімфоцитів. V-DJ-реаранжування підпорядковується правилу алельного виключення, тобто відбувається лише в одній з пари гомологічних хромосом. Крім активації продуктів генів RAG1 і RAG2, V-DJ-реаранжування потребує участі ферменту TdT, який вносить додаткові нуклеотиди у зону з'єднання V- і DJ-сегментів. Важливо, що під час утворення В-клітин в печінці ембріону, а також у перші дні після народження фермент TdT не активується. Крім того, активація TdT не відбувається під час розвитку В1-клітин.

Головним наслідком V-DJ-реаранжування має стати повноцінний ген важкого ланцюга імуноглобулінів. Для цього потрібно, щоб V-, J- і C-сегменти знаходилися у необхідній рамці зчитування. Оскільки процес соматичної рекомбінації під час реаранжування може відбуватися з помилками, слід контролювати "якість рекомбінації". Тому після V-DJ-реаранжування клітина експресує утворений ген важкого ланцюга. Отже, пізні про-В-клітини можуть експресувати лише один з поліпептидних ланцюгів, що входять до складу антигенспецифічних рецепторів.

Для того щоб на поверхні В-клітин міг експресуватися повний імуноглобуліновий рецептор, має відбутися об'єднання важкого ланцюга з легким. Оскільки гени легких ланцюгів залишаються ще не перебудованими, пізня про-В-клітина використовує інваріантний (сурогатний) легкий ланцюг для утворення повної імуноглобулінової молекули. Сурогатний легкий ланцюг складається з двох молекул: $\lambda 5$ -субодиниці, що аналогічна С-домену легкого ланцюга, і VpreB-субодиниці, що аналогічна V-домену легкого ланцюга. Комплекс двох молекул H-ланцюга з двома молекулами $\lambda 5$ і двома VpreB називають пре-ВкР. Якщо гени важкого ланцюга були перебудовані правильно, то пре-ВкР збирається і може експресуватися на мембрані разом з молекулами I α і I β . Сигнал від пре-ВкР необхідний для проходження наступних стадій диференціювання. Однак невідомо, чи розпізнає будь-який ліганд пре-ВкР. Ймовірно, що ні, оскільки перехресне зв'язування пре-ВкР на поверхні про-В-клітин за допомогою M κ AT проти $\lambda 5$ -ланцюга чи μ -ланцюга не впливає на розвиток про-В-клітин *in vitro*. Можливо, що сам факт експресії пре-ВкР на мембрані є сигналом до позитивної селекції про-В-лімфоцитів. Як показали С. Janeway і співавтори, у мишей, не здатних переключити експресію мембранних імуноглобулінів на синтез розчинних антитіл, подальший розвиток про-В-клітин блокується. Очевидно, лігандом, який розпізнають про-В-лімфоцити за допомогою пре-В-клітинного рецептора, є розчинні антитіла, синтезовані іншими попередньо активованими В-лімфоцитами.

Якщо V-DJ-реаранжування відбулося з помилками, внаслідок чого з'являється нефункціональний важкий ланцюг, який не може утворити комплекс із сурогатним легким ланцюгом, то в клітині включається реаранжування локусу H-генів в іншій хромосомі. Ймовірність вдалої рекомбінації генів важкого ланцюга на одній хромосомі становить 1/3, тому ймовірність того, що хоча б на одній із хромосом процес відбудеться правильно, становить 2/3. Отже, близько 30 % пізніх про-B-клітин гине внаслідок нездатності правильно реаранжувати гени важкого ланцюга імуноглобулінового рецептора.

Пізнні про-B-клітини експресують ті самі поверхневі маркери, що й ранні про-B-клітини, і ще ряд додаткових маркерів – CD20, CD40. Крім того, вони втрачають експресію рецептора c-Kit до фактора стовбурових клітин і починають експресувати CD25 – α -ланцюг рецептора до IL-2. Лише частина цих клітин експресує поверхневий рецептор пре-BкР, але у цитоплазмі всіх клітин виявляється білковий продукт трансляції генів важкого ланцюга.

Великі пре-B-лімфоцити. Після вдалого завершення процесів перебудови сегментів в H-локусі генів імуноглобулінів попередники B-клітин переходять до наступної стадії диференціювання. Природа намагається зберегти такі клітини і збільшити їхню кількість, оскільки процес реаранжування генів не завжди приводить до продуктивного результату. Тому клітини з перебудованими генами важкого ланцюга починають розмножуватися й утворювати клон. Під час розмноження пре-B-клітини набувають морфології бластних клітин, тому вони мають великі розміри, через що й дістали свою назву. У великих пре-B-клітинах не спостерігається наявності активних ферментів-рекомбіназ RAG1 і RAG2 та ферменту TdT, хоча в цитоплазмі міститься мРНК цих ферментів. Кожна така клітина може здійснити близько шести поділів, а отже, утворити клон з 64 однакових пре-B-клітин. На поверхні великих пре-B-клітин завжди міститься пре-BкР, хоча функціональне значення його експресії залишається невідомим. Такі клітини продовжують експресувати рецептори до IL-2 і IL-7, а також набувають нових поверхневих маркерів - амінопептидазу BP-1, молекулу CD24 тощо.

Маленькі пре-B-клітини. Після розмноження великих пре-B-клітин вони зменшують свої розміри і починають реаранжувати гени легкого ланцюга імуноглобулінів. Для цього знову активується експресія генів RAG1 і RAG2. Спочатку відбувається перебудова генних сегментів у k-локусі генів легкого ланцюга. При цьому спостерігається явище аельного виключення. Як правило, перша рекомбінація наближує певний Vк-сегмент до Jк1-сегмента. Правильно перебудований k-ланцюг експресується разом з важким μ -ланцюгом на поверхні B-клітини. Якщо така експресія стає можливою, подальші процеси перебудови припиняються, а якщо перша V-J-рекомбінація генів

к-ланцюга виявляється непродуктивною, включається рекомбінація генів на іншій хромосомі. У разі непродуктивності рекомбінації в обох к-локусах включається перебудова генів у λ -локусі. Тому у мишей співвідношення імуноглобулінів з к-ланцюгом до імуноглобулінів з λ -ланцюгом становить 10 : 1. У людини це співвідношення приблизно 3 : 1. Отже, після завершення стадії малих пре-В-лімфоцитів утворюються незрілі В-клітини, які мають сформовані IgM-рецептори до антигену, але ще не пройшли негативного відбору. IgM-Рецептор експресується на мембрані разом з молекулами, необхідними для передавання сигналу (Iga і Ig β , фосфатазою CD40R, корецептором CD19), а також МНСII та іншими маркерами (CD20, CD24, CD40, ВР-1 тощо). Маленькі В-лімфоцити втрачають експресію рецепторів до інтерлейкінів 2 і 7.

Отже, антигеннезалежний розвиток В-лімфоцитів пов'язаний з перебудовою генів їхніх рецепторів. Головним наслідком його має бути експресія повноцінного білкового продукту, який може зчитуватися з перебудованих генів та експресуватися на мембрані клітин. Про-В-лімфоцити перебудовують гени важкого ланцюга імуноглобулінів, а пре-В-лімфоцити - легкого. Під час цих перебудов відбувається перевірка правильності перебудови, яку можна розглядати як позитивний відбір В-лімфоцитів.

У миші за добу утворюється приблизно $5 \cdot 10^7$ незрілих В-клітин. В-Клітини, які утворилися внаслідок антигеннезалежного диференціювання, зазнають негативного відбору. Підраховано, що на периферію надходить лише 10 % утворених у кістковому мозку клітин. Усі інші В-клітини, як вважають, гинуть унаслідок апоптозу завдяки аутореактивності їхніх рецепторів.

Відбір репертуару В2-клітин. Розвиток В-клітин — досить складний процес і тому потребує кількох "точок контролю". В таких точках контролю звіряється відповідність програми розвитку лімфоцита і визначається його подальша доля. Якщо лімфоцит відповідає необхідним вимогам, він продовжує подальший розвиток, а якщо ні, - то гине. Як і у Т-клітин, під час розвитку В-лімфоцитів відбувається їхній позитивний та негативний відбір.

Позитивний відбір можна назвати "контролем якості" клітин. Такий відбір зумовлює появу клітин з функціонально активними рецепторами, оскільки клітини, які виявилися нездатними правильно реаранжувати гени імуноглобулінів, гинуть під час розвитку. Головним наслідком першого етапу позитивного відбору є відбір клітин, що експресують функціональний важкий ланцюг імуноглобулінів у складі пре-ВкР, а другого - функціональний легкий ланцюг у складі ВкР. Донині невідомо, що за сигнал отримують попередники В-лімфоцитів від пре-ВкР. Не з'ясовано також, чи існує певний ліганд, який має зв'язати пре-ВкР. Найімовірніше, що сигналом про правильну пере-

будову генів важкого ланцюга рецептора є власне експресія пре-ВкР на мембрані незалежно від зв'язування ліганду. На користь цієї гіпотези свідчить той факт, що МкАТ, специфічні до певних компонентів пре-ВкР, а саме, $\lambda 5$, VpreB або μ -ланцюга, не впливають на розвиток пре-В-клітин. Водночас антитіла проти μ -ланцюга повністю блокують розвиток незрілих В-лімфоцитів, у яких уже сформований IgM-рецептор.

Негативний відбір В-лімфоцитів можна назвати "контролем безпечності" клітин, оскільки під час цього процесу знищуються небезпечні та небажані клітини, які несуть специфічні до власних антигенів рецептори. Існування негативної селекції передбачав ще Бернет у своїй теорії селекції клонів.

Негативний відбір В-лімфоцитів може відбуватися у два етапи - на стадії маленьких пре-В-клітин у кістковому мозку та на стадії незрілих В-клітин у селезінці, куди вони мігрують з кісткового мозку і де завершується їхнє дозрівання. Відповідно перший етап негативного відбору називають *центральною толяризацією В-клітин*, а другий - *периферичною*.

Якщо незрілі В-клітини зв'язують власні антигени в кістковому мозку чи в селезінці, вони не здатні активуватися, а швидше загинуть чи залишаться назавжди нездатними активуватися. Однак існує механізм, який може "залишити живими" аутоспецифічні незрілі В-клітини, що розпізнали аутоантиген у кістковому мозку, і змінити специфічність їхніх рецепторів. Деякі В-клітини повторно можуть активувати експресію ферментів-рекомбіназ RAG1 і RAG2 і здійснювати подальше реаранжування генів легких ланцюгів рецептора. Якщо першими до Vк-сегмента приєднується Jк1-сегмент, то подальші перебудови генів легкого ланцюга можуть використовувати інші Vк-сегменти і з'єднувати їх з Jк2-, Jк3-, Jк4-сегментами тощо. Такий процес подальшої перебудови генів легкого ланцюга називають *процесом редагування рецепторів*. Ці процеси характерні також для розвитку Т-клітин, коли після високоафінного розпізнавання аутоантигенів у тимусі може відбуватися додаткове реаранжування генів α -ланцюга ТкР.

У деяких випадках взаємодія рецепторів незрілих В-клітин з аутоантигенами призводить до диференціювання таких В-клітин у В1-клітини, які продукують поліспецифічні антитіла.

12.3.2. Розвиток В1-клітин

На відміну від традиційного розвитку В2-клітин у кістковому мозку розвиток В1-клітин відбувається на периферії. Вважають, що комітовані попередники В1-клітин закладаються у фетальній печінці у процесі ембріонального розвитку, після чого заселяють черевну і плевральну порожнину, а також великий і малий сальники, де і підтри-

мують свій подальший розвиток. Такі клітини можуть відновлювати свою популяцію, тобто здатні до розмноження без диференціювання. Мабуть, саме тому більшість відомих лімфом є переродженими В1-клітинами, які експресують поверхневий маркер CD5.

В1-Клітини у своєму розвитку проходять етапи, аналогічні розвитку В2-клітин. Однак під час перебудови генів важкого ланцюга В1-клітини використовують лише V-генні сегменти, які знаходяться поблизу D-сегментів. Крім того, в таких клітинах не активується фермент TdT, а отже, місця з'єднання V-, D- і J-генних сегментів не мають вставок додаткових нуклеотидів. Тому різноманіття рецепторів В1-клітин більш обмежене, ніж рецепторів В2-клітин, але їхні рецептори здатні зв'язати ширший спектр антигенів.

12.4. ТРАНСКРИПЦІЙНІ ФАКТОРИ, ЩО ВИЗНАЧАЮТЬ ДИФЕРЕНЦІОВАННЯ ЛІМФОЦИТІВ

Транскрипційні фактори, що визначають розвиток лімфоїдних клітин, перебувають у певній ієрархії, тобто ті фактори, що активувалися раніше, активують фактори, необхідні для проходження наступних стадій диференціювання.

На підставі експериментальних даних, які були накопичені за останні роки, Т. Enver і М. Greaves зробили припущення, що для комітування СКК до певного розвитку потрібно, щоб відбулася активація специфічних для цієї лінії розвитку генів і стійка репресія генів, що є характерними для інших ліній розвитку. Властивість активувати та репресувати різні генетичні програми може мати навіть один транскрипційний фактор, але, як правило, для цього необхідно кілька різних транскрипційних факторів.

Роль фактора PU.1 в комітуванні стовбурових клітин. Першим транскрипційним фактором, що значно обмежує потенціал СКК, є фактор PU.1, який експресується лише в гематопоетичних клітинах, що можуть дати початок усім білим клітинам крові (лейкоцитам), але не еритроцитам та мегакаріоцитам. Нокаутні за PU.1 миші гинуть через 18 днів ембріонального розвитку, і їхні ембріони позбавлені макрофагів, гранулоцитів та лімфоцитів, хоча мають нормальну кількість еритроцитів і мегакаріоцитів. Іноді у таких ембріонах виявляють попередники Т-клітин.

Встановлено, що фактор PU.1 активує і підтримує експресію на СКК рецепторів до ІЛ-7, що необхідні для розвитку лімфоїдних клітин, та рецепторів до М-КСФ, необхідних для розвитку лейкоцитів мієлоїдного ряду (переважно макрофагів).

Отже, відкриття фактора PU.1 свідчить про те, що, можливо, лейкоцити мієло- та лімфоїдного рядів більше "споріднені" між собою, ніж це передбачає загальноприйнята схема гематопоезу.

Транскрипційні фактори, що контролюють розвиток В-клітин. Специфічними молекулярними маркерами комітування СКК до роз-

витку в В-лімфоцитарному напрямі, як уже зазначалося, є перші ознаки перебудови генів важкого ланцюга імуноглобулінів (DJ-рекомбінація) та експресія генів сурогатного легкого ланцюга, тобто генів, що кодують модулі передавання сигналу $Ig\alpha$ та $Ig\beta$ від майбутнього ВкР. Для розвитку В-клітин необхідна попередня активація відповідних транскрипційних факторів ще до того, як з'являються перші з наведених ознак комітування.

Активация транскрипційних факторів E2A і EBF під час розвитку В-клітин. Перші етапи В-лімфопоезу визначають два транскрипційних фактори – E2A і EBF, які разом активують генетичну програму розвитку В-клітин.

Активация факторів E2A і EBF є необхідною, але недостатньою умовою для розвитку В-клітин із СКК. Ці фактори діють скоординовано, оскільки порушення генів кожного з них призводить до повного блокування утворення В-клітин. Мішенями їхньої дії є гени сурогатного легкого ланцюга імуноглобулінів – $\lambda 5$ і $VpreB$, гени рекомбіназ RAG1 і RAG2, гени сигнальних молекуларецептора $Ig\alpha$ (CD79a) і $Ig\beta$ (CD79b). Ці фактори також регулюють експресію перебудованого μ -ланцюга імуноглобулінів, можливо, навіть після DJ-рекомбінації. Отже, фактори E2A і EBF контролюють синтез молекул, які необхідні для експресії пре-ВкР на мембрані та передавання сигналу від нього.

В-Клітини E2A-дефектних мишей не експресують корецептор CD19, крім того, для них не характерні перебудови в H-локусі генів імуноглобулінів. В-Клітини EBF-дефектних мишей не експресують сурогатний легкий ланцюг імуноглобулінів і також не здатні активувати процеси перебудови генів імуноглобулінів.

Після факторів E2A і EBF активується експресія транскрипційного фактора Pax5, який визначає подальший перебіг процесів диференціювання попередників В-клітин.

Роль транскрипційного фактора Pax5 у диференціюванні В-клітин. Як і фактори E2A і EBF, фактор Pax5 починає експресуватися на ранніх стадіях розвитку попередників В-клітин і продовжує експресуватися навіть до стадії плазматичних клітин. Нокаутування гена Pax5 зумовлює припинення розвитку попередників В-клітин на стадії ранніх про-В-клітин. Такі клітини мають перебудовані DJ-сегменти генів у H-локусі та експресують ряд генів, характерних для В-клітинного диференціювання, за винятком CD19 та $Ig\alpha$. Ці клітини можуть проліферувати як завгодно довго під дією IL-7 та стромальних клітин кісткового мозку, але не виявляють при цьому ознак подальшого диференціювання. Якщо ген Pax5 ввести в клітини за допомогою ретровірусного вектора, вони починають нормально диференціюватися у зрілі В-клітини.

Однак з'ясувалося, що у Pax5^{-/-} мишей про-В-клітини відрізняються від про-В-клітин мишей дикого типу. Про-В-клітини Pax5^{-/-} мають

багато ознак СКК і можуть дати початок різним популяціям лейкоцитів. Так, додавання до середовища культивування Рах5⁻/- про-В-клітин *in vitro* М-КСФ (замість ІЛ-7) призводить до утворення повноцінних макрофагів, ГМ-КСФ - ДК, Г-КСФ - гранулоцитів, ІЛ-2 - НК-клітин. Після внесення таких про-В-клітин у тимус вони дають початок Т-лімфоцитам. Цікаво, що у мишей дикого типу про-В-клітини здатні диференціюватися лише у напрямі В-лімфоцитів.

У Рах5⁻/- про-В-клітин залишаються активованими кілька генів, які є характерними для інших клітинних ліній, зокрема гени рецепторів до різних гемопоетичних факторів. Отже, Рах5 необхідний не лише для подальшого розвитку про-В-клітин, а й для блокування інших шляхів розвитку попередника В-клітин, тобто для репресії генів, які специфічно експресуються іншими типами лейкоцитів. Зокрема, молекулярними методами було підтверджено, що Рах5 дійсно репресує гени рецептора до гемопоетичного фактора М-КСФ. Ймовірно, функцію репресії певних генів фактор Рах5 виконує не сам, а разом з іншими корепресорами, наприклад корепресорами родини *Groucho*.

Що індукує активацію фактора Рах5 у попередниках В-клітин, залишається невідомим. Нині припускають, що експресія фактора Рах5 активується в клітинах спонтанно, але з невеликою ймовірністю, і саме такі клітини диференціюються на В-лімфоцити. Отже, визначення процесів розвитку СКК у В-лімфоцитарному напрямі можна розглядати як стохастичний процес, який відбувається автономно на рівні кожної клітини.

Транскрипційні фактори, що регулюють розвиток Т-клітин. На відміну від В-клітин транскрипційні фактори, що регулюють розвиток Т-клітин, менш вивчені. З'ясовано, що найважливішим сигналом для комітування СКК у бік Т-клітинного ряду є сигнал від рецептора Notch1, який ці клітини отримують саме в тимусі.

Рецептори родини Notch належать до родини рецепторів, які можна розглядати як попередники транскрипційних факторів. Після зв'язування ліганду позаклітинною частиною рецептора його внутрішньоклітинна частина протеолітично відщеплюється та мігрує в ядро, де виконує функцію фактора транскрипції після з'єднання з іншими ядерними факторами, наприклад СBF1/RBP-*jk*

У тимусі експресується ліганд Jagged2 для рецептора Notch1 тимоцитів. Саме взаємодія Jagged2 з Notch1 зумовлює комітування СКК до розвитку на Т-лімфоцити. Сигналінг від Notch1 активує експресію генів *Hes* (*Hairy enhancer of split*), продукти яких репресують активність транскрипційних факторів E2A і EBF (переважно E2A), необхідних для розвитку В-клітин. Якщо в СКК зруйнувати гени Notch1, розвиток тимоцитів закінчується на стадії попередників CD25⁺CD44⁺ (елімінація експресії Notch1 на стадії CD25⁺CD44⁻ розвитку тимоцитів не впливає на утворення і позитивний відбір CD4⁺CD8⁺ клітин). Крім того, в тимусі

накопичуються В-клітини, розвиток яких у цьому органі за нормальних умов інгібується внаслідок сигналіngu від Notch1.

Якщо в клітини кісткового мозку внести вектор, що експресує лише цитоплазматичний домен рецептора Notch1, тобто власне ділянку з активністю транскрипційного фактора, то розвиток Т-клітин може відбуватися навіть у кістковому мозку незалежно від тимуса.

Показано, що сигнал від рецептора Notch1 в основному сприяє утворенню $T\alpha\beta$ та CD8 Т-клітин і незначною мірою $\gamma\delta T$ і CD4 Т-клітин. З цього випливає, що для стимуляції розвитку $\gamma\delta T$ і CD4 Т-клітин мають бути додаткові, поки що невідомі транскрипційні фактори.

Отже, виходячи з сучасних уявлень про механізми активації транскрипційних факторів, які контролюють розвиток Т- і В-лімфоцитів, можна зробити висновок, що диференціювання лімфоїдних попередників на В-клітини відбувається "за дефолтом", а на Т-клітини - під дією "інструктивних сигналів" тимуса.

На ранньому етапі В-лімфопоезу два фактори - E2A і EBF разом активують генетичну програму, необхідну для розвитку В-клітин. Фактор Pax5 репресує випадкову експресію інших генів, що остаточно комітує попередників для розвитку на В-клітини. Вважають, що активація фактора Pax5 відбувається стохастично з певною ймовірністю у клітинах кісткового мозку, а отже, розвиток В-клітин детермінований лише внутрішніми процесами, що відбуваються у клітині, тобто не залежить від зовнішніх впливів. На відміну від В-клітин розвиток Т-клітин контролюється інструктивними сигналами, які клітина-попередник отримує від тимічного оточення через рецептор Notch1.

12.5. МІГРАЦІЯ ЛІМФОЦИТІВ У ПЕРИФЕРИЧНІ ЛІМФОЇДНІ ОРГАНИ І ТКАНИНИ

Після дозрівання в центральних лімфоїдних органах лімфоцити виходять із них і заселяють периферичні. Перед виходом із кісткового мозку і тимуса Т- та В-лімфоцити починають експресувати молекули, необхідні для здійснення міжклітинних взаємодій і проникнення у периферичні органи й тканини. Серед них молекула хомінгу - селектин L, що експресується у великій кількості на поверхні Т- і В-лімфоцитів, а також рецептори для хемокінів. Крім того, лімфоцити зазнають інших змін, що є важливими для їх виживання і функціонування на периферії. Наприклад, на Т-лімфоцитах модифікуються вуглеводні залишки у складі мембранних глікопротеїнів, які можуть розпізнаватися лектиновими рецепторами макрофагів. На зрілих монопозитивних тимоцитах кінцеві цукри блокуються залишками сіалової кислоти (завдяки активації сіалілтрансферази), що забезпечує захист Т-клітин від фагоцитів після еміграції з тимуса.

12.5.1. Еміграція лімфоцитів із центральних лімфоїдних ор-

ганів і заселення периферії

З тимуса першими виходять $\gamma\delta$ T-клітини, які утворюються ще в ембріогенезі. Через 14—15 днів (у мишей) ембріонального розвитку тимус залишають $V\gamma 3$ T-клітини, а незабаром і $V\gamma 4$ T-клітини, які мігрують відповідно в епідерміс шкіри та у слизові язика і репродуктивних органів самок. Популяції цих T-клітин самопідтримуються місцево впродовж усього життя мишей. Інші T-клітини — $V\gamma 2$ і $V\gamma 1$, а також $V\gamma 9$, що становлять більшість периферичних $\gamma\delta$ T, емігрують із тимуса переважно відразу після народження - до 13-ї доби постнатального розвитку.

У дорослих мишей $\gamma\delta$ T, що утворюються в тимусі, становлять менш як 1 % усіх тимоцитів. Однак на периферії їх вміст значно більший (10-15% усіх T-лімфоцитів), що пояснюється самопідтриманням у слизових та шкірі популяції T-клітин, які виселилися на периферію в ембріогенезі. Крім того, $V\gamma 4\delta 4$ T-клітини взагалі розвиваються поза тимусом у кишках або печінці з кістковомозкових попередників. Більшість (99 %) T-лімфоцитів, що утворилися в тимусі, становлять $\alpha\beta$ T. Еміграція $\alpha\beta$ T з тимуса розпочинається через 6 днів після народження. За добу з тимуса емігрує $1 \cdot 10^6 - 2 \cdot 10^6$ T-клітин (1 % загальної кількості тимоцитів).

Серед B-клітин на периферії першими з'являються B1-клітини, що несуть маркер CD5. У людини ранні B1-клітини - "іммігранти" - виявляються в селезінці та лімфовузлах на 17-му тижні внутрішньоутробного розвитку плоду. В дорослому організмі основним джерелом B-клітин є сальник і перитонеальна порожнина, де популяція їхніх попередників самопідтримується впродовж усього життя. Частка B-клітин становить 20 % загальної кількості B-лімфоцитів у дорослому організмі.

В постнатальному періоді в кістковому мозку утворюються і виселяються з нього лише B2-клітини, що становлять більшість периферичних B-лімфоцитів. За добу з кісткового мозку мишей емігрує $1,5 - 5 \cdot 10^7$ B2-клітин.

Вийшовши з кісткового мозку і тимуса, лімфоцити з венозною кров'ю рухаються до серця, де переходять в артеріальну кров і з нею потрапляють до периферичних лімфоїдних органів і тканин. Залежно від характеру лімфоїдних утворень та їх переважної участі у тому чи іншому виді імунної відповіді в них вибірково мігрують певні популяції та субпопуляції лімфоцитів. Так, лімфатичні вузли, що більше спеціалізуються на розвитку реакцій клітинного типу, заселяють переважно T-лімфоцити (70 %), серед яких близько 40 % становлять CD4 T-клітини і близько 30 % CD8T-клітини. В органах, основним призначенням яких є продукування антитіл (селезінка, пейерові бляшки), T-лімфоцити становлять не більше 30 %.

У периферичних лімфоїдних органах T- і B-лімфоцити локалізуються

у спеціалізованих ділянках, які відповідно називають тимусзалежними (Т-клітинними) та тимуснезалежними (В-клітинними) зонами (далі Т- і В-зони). В селезінці Т-зонами є періартеріолярні муфти, а в лімфовузлах - паракортикальна ділянка.

В-Зонами в селезінці є біла пульпа, а в лімфовузлах - кортикальна ділянка. В тимуснезалежних ділянках В-лімфоцити утворюють фолікули. Проникнення лімфоцитів з кров'яного русла в органи чи тканини (екстравазація) пов'язане з подоланням ними ендотеліального бар'єра, а міграція в Т- і В-зони - з переміщенням усередині тканини (хемотаксис). Процес екстравазації лімфоцитів детально висвітлено в розд. 1. Розглянемо основні події посттрансендотеліальної міграції лімфоцитів та роль хемокінів і позаклітинного матриксу в цьому процесі.

Нагадаємо, що лімфоцит проходить чотири послідовні стадії під час затримки в кровноносній судині та проникненні через неї: ролінг, активація, адгезія, діapedез (рис. 81).

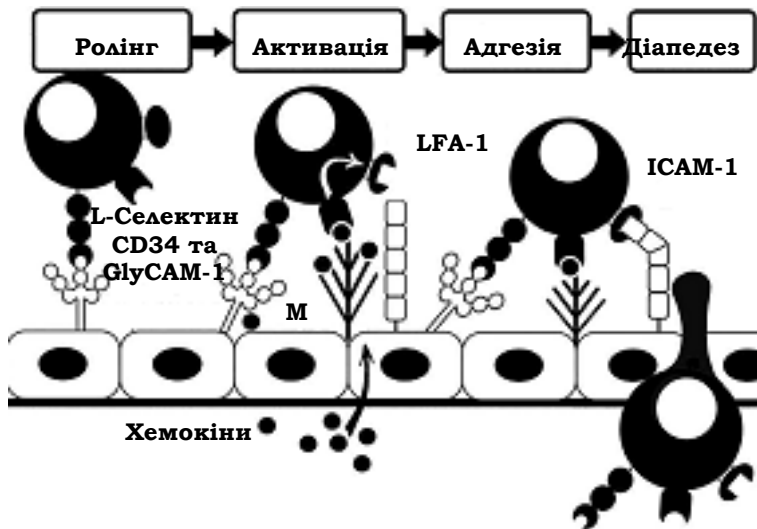


Рис. 81. Стадії трансендотеліальної міграції лімфоцитів

Ролінг реалізується за допомогою лімфоцитарних селектинів (CD62L та ін.) та їхніх лігандів на ендотелії лімфовузлів (CD34, GlyCAM-1) і слизових оболонок (MadCAM-1). Активацію інтегринів на поверхні лімфоцита ($\alpha_L\beta_2$ під час міграції у лімфовузли та $\alpha_4\beta_7$ і $\alpha_L\beta_2$ - у пейерові бляшки) опосередковують експресовані на ендотелії хемокіни. Адгезію зумовляють активовані інтегрини, зв'язуючись з їхніми лігандами на ВЕВ лімфовузлів (ICAM-1, ICAM-2) та слизових оболонок (MadCAM-1). У діapedезі беруть участь експресовані на лімфоциті молекули CD31, які також забезпечують контакт між клітинами ендотелію.

Після проникнення через ВЕВ у лімфовузлах і пейерових бляшках або потрапляння з маргінальної зони в білу пульпу селезінки лімфоцити

мігрують у дискретні ділянки лімфоїдної паренхіми - Т- і В-зони.

Зауважимо, що В-лімфоцити, як буде зазначено далі, набувають здатності рециркулювати і заселяти В-зони периферичних лімфоїдних органів лише після завершення дозрівання у селезінці, куди

вони мігрують з кісткового мозку не повністю зрілими. Розглянемо процес міграції лімфоцитів у Т- і В-клітинні зони на прикладі заселення лімфатичних вузлів (рис. 82).

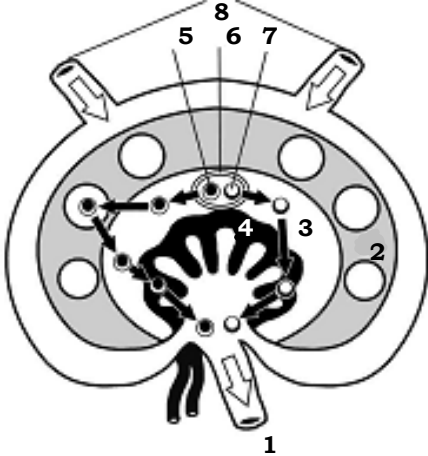


Рис. 82. Схема міграції наївних Т- і В-клітин через різні зони лімфатичного вузла: 1 - еферентна лімфатична судина; 2 - кортикальна (В-клітинна) зона; 3 - паракортикальна (Т-клітинна) зона; 4 - медулярна зона; 5 - В-лімфоцит; 6 - венули з високим ендотелієм (ВЕВ); 7 - Т-лімфоцит; 8 - аферентні лімфатичні судини

Слід зазначити, що Т- і В-лімфоцити спочатку мігрують до Т-зон лімфовузлів. Більшість Т-лімфоцитів залишається у Т-зонах і лише незначна частка їх мігрує безпосередньо до В-зон. Серед останніх CD4 Т-клітини чисельно переважають над CD8 Т-клітинами. Більшість В-лімфоцитів залишають Т-зони, однак подальша доля їх залежить від активації у Т-зонах. Якщо В-лімфоцити активуються в Т-зонах, вони мігрують до В-зон, де утворюють зародкові центри. Неактивовані в Т-зонах В-лімфоцити також мігрують до В-зон, але не залишаються там, а проходять через Т-зони та медулу і виходять із лімфовузла через еферентні лімфатичні судини. Аналогічно Т-лімфоцити, що залишилися в Т-зонах, але не були активовані, з часом мігрують через медулу з лімфовузла в еферентну лімфу. Отже, більшість наївних Т-клітин проходить усередині лімфовузлів значно коротший шлях, ніж наївні В-клітини.

Механізми, що зумовляють різні шляхи міграції лімфоцитів через Т- і В-компарменти лімфовузлів та інших лімфоїдних органів, поки що остаточно не з'ясовані. Очевидно, що в цьому процесі значну роль відіграють різні фактори, серед яких важливими є склад позаклітинного

матриксу та хемокіни.

12.5.2. Роль хемокінів у міграції лімфоцитів

Хомінг як Т-, так і В-лімфоцитів до вторинних лімфоїдних органів (лімфовузлів та пейєрових бляшок) реалізується, як вважають, за участю одних і тих самих молекул адгезії, але різних хемокінів. За залучення наївних Т-клітин до лімфовузлів, пейєрових бляшок та селезінки відповідає хемокін, який називають хемокіном вторинних лімфоїдних органів - CCL21 (SLC). CCL21 експресується на ВЕВ вторинних лімфоїдних органів і взаємодіє з експресованим на Т-клітинах рецептором CCR7. Крім наївних Т-клітин SLC залучає субпопуляцію центральних Т-клітин пам'яті та ДК, що експресують CCR7. У CCR7-дефектних мишей значно знижена кількість наївних Т-клітин у вторинних лімфоїдних органах і спостерігаються структурні аномалії Т-зон. Порушення міграції наївних Т-клітин до лімфоїдних органів характерно також для мишей з дефектами продукування SLC та іншого ліганда CCR7 - CCL9 (ELC -ліганд рецептора, індукованого вірусом Епштейн-Барр). SLC та ELC продукуються локалізованими в Т-зонах зрілими дендритними та стромальними клітинами. Вважають, що обидва хемокіни забезпечують близьку локалізацію CCR7⁺ Т-клітин, що мігрували до Т-зон, з АПК, сприяючи їх взаємодії та ініціюванню імунної відповіді. Хемокіновий рецептор CCR7 експресується також на деяких В-клітинах, хоча і в меншій кількості, ніж на Т-клітинах. Ці В-клітини можуть заселяти Т-зони.

Міграцію В-лімфоцитів до вторинних лімфоїдних органів та локалізацію в них визначає хемокін CXCL3 (BCA-1 - хемокін 1, що активує В клітини; у мишей називається BLC), який взаємодіє з рецептором CXCR5 В-клітин. CXCL3 експресується на ВЕВ фолікулярних судин та судин фолікулярної мантії і відповідає за формування фолікулів у селезінці, лімфовузлах та пейєрових бляшках. Крім В-клітин CXCR5 експресує також мінорна субпопуляція центральних CD4Т-клітин пам'яті, що несуть і рецептор CCR7. Ці CXCR5⁺ Т-клітини локалізуються у фолікулярних ділянках і допомагають *in vitro* В-клітинам у синтезі антитіл. Тому їх називають фолікулярними В-хелперними Т-клітинами (Т_{fh}). Взаємодії цих Т- і В-клітин, можливо, можуть відбуватися у фолікулярних ділянках, куди вони залучаються BCA-1, однак експресія Т-клітинами CXCR5 не є постійною.

Крім систем SLC - CCR7 (або ELC - CCR7) і BCA-1 - CXCR5, у регуляції заселення вторинних лімфоїдних органів лімфоцитами беруть участь також інші хемокіни та їхні рецептори. Так, CXCL12 (SDF-1, фактор 1, похідний від стромальних клітин) - хемоатрактант В-лімфоцитів, залучає до вторинних лімфоїдних органів периферичні наївні В- і В-клітини пам'яті, але не В-клітини зародкових центрів, що, можливо, пов'язано зі зниженою експресією на останніх його рецептора - CXCR4. Інший хемокін CCL18 (DC-CK1 - хемокін 1 дендритних

клітин) продукується ІДК та ФДК (локалізованими відповідно в Т- і В-зонах) та впливає на наївні Т- і Т-клітини пам'яті, що були залучені хемокіном SLC до міграції через ВЕВ у лімфоїдні органи. Припускають, що продукований ІДК DC-СК1, так само, як і ELC, залучає наївні Т- і Т-клітини пам'яті у Т-зони. DC-СК1, що продукується ФДК, скеровує міграцію Т-клітин до зародкових центрів, де він, очевидно, підтримує активацію Т-клітин пам'яті та стимулює взаємодію Т- і В-клітин.

Роль хемокінів у регуляції руху лімфоцитів у нелімфоїдних тканинах, на відміну від лімфоїдних, вивчено недостатньо. Отримано дані про контроль хемокінами хомінгу Т-клітин пам'яті до шкіри та кишок. Міграцію CLA⁺ Т-клітин пам'яті до шкіри визначає хемокіновий рецептор CCR10, що експресується переважно на цих клітинах, і його ліганд CCL27 (STACK - шкірний хемокін, що атрактує Т-клітини). У регуляції хомінгу CLA⁺ Т-клітин задіяні також експресований на їхній поверхні CCR4 та наявний на ендотелії кровоносних судин нормальної та запаленої шкіри його ліганд CCL17 (TARC - хемокін, регульований активацією та тимусом). Хомінг $\alpha\beta7^+$ Т-клітин пам'яті до кишок контролює хемокін CCL25 (TECK - хемокін, експресований тимусом), що взаємодіє з рецептором CCR9 Т-клітин.

Отже, хемокіни регулюють трансендотеліальну міграцію лімфоцитів та їхнє переміщення в тканині лімфоїдних органів. Експресовані на ендотеліоцитах хемокіни зумовлюють активацію інтегринів та затримують ті лімфоцити, що несуть відповідні хемокінові рецептори. Після екстравазації лімфоцитів певні хемокіни в тканинах спрямовують їхній рух у позаклітинному матриксі. Чутливі до дії певних хемокінів лімфоцити завдяки реорганізації цитоскелета та адгезивним взаємодіям з позаклітинним матриксом рухаються за градієнтом концентрації цих хемокінів.

12.5.3. Роль позаклітинного матриксу в міграції лімфоцитів

Після екстравазації лімфоцити потрапляють з двовимірного простору на ендотелії судин у тривимірний - у міжклітинне середовище, так званий позаклітинний матрикс (ПКМ). Основним компонентом ПКМ є волокна колагену різних типів, поперечно зшиті з іншими компонентами, такими як фібронектин, ламінін, гіалуронан, які здатні адсорбувати хемокіни та інші цитокіни і містять ліганди, з якими зв'язуються рецептори лімфоцитів.

У лімфоїдних органах ПКМ формує стабільну високоорганізовану тяжеподібну сітку з порами діаметром 3—15 мкм, що нагадують каналоподібні структури. Ці структури зорієнтовані в лімфовузлах у бік фолікулярних В-клітинних зон, а в пейєрових бляшках — у напрямі склепіння фолікула (в зону презентації антигену) і є провідними шляхами міграції лімфоцитів. Подібні структури виявлено і в шкірі.

Міграція лімфоцитів (як і інших типів лейкоцитів - нейтрофілів,

моноцитів) через ПКМ, так само, як і переміщення через поверхню судинного ендотелію, здійснюється за принципами амебоїдного руху і пов'язана з поляризацією клітин. Поляризація індукується градієнтами хемоатрактантів, розчинними та іммобілізованими на ПКМ, або певними його лігандами і скеровується в напрямі градієнта. В результаті поляризації відбувається активація і керований цитоскелетом перерозподіл поверхневих рецепторів, передусім хемокінових, та молекул адгезії до різних компартментів поляризованої клітини. Докладніше вивчено міграцію в ПКМ Т-лімфоцитів.

Для дослідження молекулярних механізмів міграції Т-лімфоцитів у тканинах використовують штучно створені дво- і тривимірні моделі з фізіологічних компонентів ПКМ як з волокон колагену в чистому вигляді, так і з вмістом фібронектину, ламініну тощо. Перерозподіл поверхневих рецепторів реєструють міченням їх антитілами, забарвленими флуоресцентними барвниками, а роль окремих молекул у міграційному процесі — блокуванням їх антитілами.

У штучному тривимірному матриксі Т-клітини в процесі переходу від нерухомого до міграційного стану змінюють свою форму і набувають вигляду завислої краплі з лідерним кінцем, основною частиною (тілом) клітини округлої форми та замикальним кінцем - уроподом. На лідерному кінці поляризованої Т-клітини акумулюються кіназа фокальних контактів, рецептори клітинної адгезії LFA-1 і CD45RO, а в активованих клітинах і хемокінові рецептори - CCR2, здатний зв'язувати CCL2, 7, 13 (відповідно MPC-1, -3, -4), та CCR5, лігандами якого є CCL4 і CCL5 (відповідно MIP-1 β і RANTES). Цей компартмент забезпечує сприйняття хемотаксичних сигналів, реорганізацію цитоскелета та утворення точкових контактів у місці взаємодії клітини з субстратом. В основному тілі клітини містяться організаційний центр мікротрубочок та протеїнкіназа C, відповідальна за ініціювання хемокініндукованої міграції. Уропод формується цитоплазматичними виростами, містить численні елементи цитоскелета й молекули адгезії: β 1-інтегрини, ICAM-1, -3, CD44, CD43 (антиадгезійна молекула), можлива тимчасова експресія LFA-1 і CD45. Уропод є місцем взаємодії поверхневих рецепторів клітини з цитоскелетом і виконує адгезивну та якірну функції під час міграції.

Поляризація забезпечує можливість послідовної та поетапної взаємодії певних поверхневих структур лімфоцитів із субстратом (ПКМ), що зумовлює циклічне прикріплення і відкріплення клітин та сприяє їх переміщенню. Хоча точні механізми міграції лімфоцитів у ПКМ ще остаточно не з'ясовані, проте отримані експериментальні дані свідчать про важливу роль у цьому процесі самого матриксу.

Як виявилось, умови міграції Т-клітин через штучно створений тривимірний матрикс відрізняються від таких через двовимірний субстрат. У двовимірних моделях, у яких взаємодія клітини з плоским

субстратом обмежується лише базальним боком, неактивовані Т-лімфоцити не здатні рухатися, хоча інтенсивно змінюють форму, здійснюючи "біг на місці". У разі внесення Т-лімфоцитів у тривимірне штучне середовище, в якому клітини з усіх боків оточені матриксом, вони можуть активно мігрувати навіть за відсутності активації β_1 -інтегринів завдяки численним точковим та ланцюговим контактам із субстратом.

Міграція Т-клітин у тривимірному оточенні залежить як від розміру, ригідності та функціонального стану клітини, експресії нею різних інтегринів, так і від властивостей ПКМ і може бути як інтегриннезалежною (базовою), так і інтегринзалежною. Серед інтегринів провідну роль як рецепторів адгезії відіграють інтегрини β_1 -родини. Зокрема, інтегрини $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ зв'язуються переважно з колагеном, $\alpha_4\beta_1$ та $\alpha_5\beta_1$ - з фібронектином, $\alpha_6\beta_1$ — з ламініном, а $\alpha_v\beta_1$ здатний взаємодіяти з багатьма компонентами ПКМ. Крім інтегринів у цьому процесі беруть участь члени родин імуноглобулінів, наприклад LFA-1/ICAM-1, та кадхеринів. Важливим індуктором β_1 -інтегринзалежної міграції є хемокіни CCL4 і CCL5. Хемокіни можуть ініціювати міграцію Т-клітин, впливаючи на сигнальну систему активації цитоскелета й посилюючи адгезивні контакти з субстратом.

Швидкість міграції Т-лімфоцитів залежить від сили адгезії до субстрату, яка визначається щільністю (і афінністю) рецепторів на клітині та їхніх лігандів на субстраті. Оптимальна швидкість спостерігається за середньої та низької сили адгезії, оскільки саме така адгезія забезпечує легке прикріплення лідерного та відкріплення замикального кінця клітини. Слід зазначити, що у неактивованих та більшості субпопуляцій активованих Т-лімфоцитів рецептори зв'язування інтегринів β_1 -родини мають низьку афінність, що зумовлює низьку силу адгезії клітин до більшості субстратів.

Сигнали, що індукують інтегриннезалежну поляризацію та міграцію Т-клітин, виникають при перехресному зшпванні α_4 -інтегринів, LFA-1, ICAM-3 або CD43, активації протеїнкінази C та кінази фокальних контактів. При цьому інтегрини індукують міграцію Т-клітин через фосфорилування за тирозином кінази фокальних контактів, а хемокінові рецептори - через G-білок та протеїнкіназу C.

За опосередкованими рецепторами механізмами відбувається міграція Т-клітин у хронічно запалених тканинах, де у високих концентраціях містяться хемокіни та інші цитокіни й достатньо адгезивні ділянки. Водночас показано, що Т-клітини можуть мігрувати у тривимірному матриксі й за відсутності лігандспецифічних зв'язувань завдяки зміні форми клітини, утворенню філоподій та виростів мембрани, контактів за участю заряджених залишків вуглеводів, гідрофобних зв'язків. Такий спосіб міграції характерний для неактивованих Т-клітин у ретикулярних тканинах за відсутності запалення та всере-

дині фіброзної сітки лімфатичних органів.

Таким чином, ПКМ відіграє важливу роль у міграції Т-лімфоцитів і здійснює контактну регуляцію цього процесу як за наявності, так і за відсутності хемотаксичних градієнтів.

Дозрівання лімфоцитів на периферії. У периферичних лімфоїдних органах лімфоцити, передусім популяції В, зазнають подальшого розвитку, оскільки вони виходять із центральних лімфоїдних органів неповністю зрілими. Незрілі В-клітини після стадій дозрівання в кістковому мозку мігрують до периферичних лімфоїдних органів, здебільшого до селезінки. В селезінці В-клітини проходять останні стадії дозрівання, після чого надходять для рециркуляції і заселяють В-зони вторинних лімфоїдних утворів. Однак не зовсім зрозуміло, як саме відбувається дозрівання В-лімфоцитів у селезінці. Вважають, що в селезінці незрілі В-клітини затримуються близько чотирьох діб. За цей час має відбутися толяризація В-клітин "на периферії". Якщо незрілі В-клітини зустрічають антиген, до якого специфічні їхні рецептори, вони не активуються, а гинуть. Наслідком цього є толяризація В-лімфоцитів до аутоантигенів, які не містилися в кістковому мозку, але були достатньо поширені в організмі. Після дозрівання в селезінці з незрілих В-клітин утворюються *наївні В-лімфоцити*, які мають досить тривалий термін життя - близько 15 тижнів. За цей час вони рециркулюють в організмі й "очікують" зустрічі з чужорідним антигеном. На відміну від незрілих В-лімфоцитів наївні В-клітини експресують на своїй мембрані не лише IgM-, а й IgD-рецептор. Функціональне значення експресії IgD-рецептора на наївних В-клітинах залишається невідомим, оскільки миші з нокаутом гена *Cd* не зазнають ніяких порушень у розвитку та активації В-клітин.

У периферичних лімфоїдних органах завершується також процес негативного відбору (периферична толяризація) Т-клітин та їх функціональне дозрівання. Зауважимо, що Т-лімфоцити виходять із тимуса у вигляді наївних Т-клітин, які є попередниками ЦТЛ і Т-хелперів. Важливу роль у дозріванні Т-клітин на периферії відіграють секретовані тимічним мікрооточенням гормони, що циркулюють у крові. Гормони тимуса сприяють підвищенню функціонального потенціалу Т-клітин завдяки посиленню їхньої цитокінпродукувальної здатності. Зокрема, показано, що зрілі периферичні Т-клітини є більш ефективними продуцентами ІЛ-2, ніж клітини заключної стадії диференціювання в тимусі - медулярні тимоцити.

У цьому відношенні на особливу увагу заслуговує гіпотеза про існування механізму підтримання життєздатності та проліферації Т-клітин на периферії. Допускається, що так само, як під час позитивного відбору тимоцитів у тимусі, сигнали від комплексів своїх пептидів з власним МНС на АПК підтримують життєздатність і навіть проліферацію Т-клітин на периферії. Ця проліферація підтримується

на низькому рівні і, як і в тимусі, не пов'язана з синтезом і секрецією цитокінів (та розвитком імунореактивності).

Наївні Т- і В-лімфоцити - це повністю зрілі клітини, які вже пройшли контроль на безпечність для організму, але ще не зустрілися з антигеном. Саме на цьому етапі стає можливим контакт Т- і В-клітин з чужорідним антигеном і залучення антигенспецифічних клітин до імунної відповіді. Після зустрічі з антигеном відбувається остання стадія диференціювання Т- і В-клітин, яку називають *постактиваційним диференціюванням*. При цьому В-клітини також проходять низку важливих етапів розвитку, під час яких можуть відбуватися як процеси зміни афінності їхніх рецепторів, так і процеси додаткової селекції В-клітин з найбільш афінними рецепторами. Останні етапи є характерними виключно для розвитку В-клітин і не мають аналогів у розвитку Т-клітин (див. розд. 11).

ВИСНОВКИ

Лімфоцити - головні клітини імунної системи — утворюються з гемопоетичних стовбурових клітин. Т-лімфоцити утворюються в тимусі, В-лімфоцити - в кістковому мозку (у птахів - у фабрицієвій сумці). Під час розвитку Т- і В-лімфоцити зазнають перевірки на правильність будови антигензв'язувальних рецепторів. У тимусі підтримуються для подальшого розвитку Т-лімфоцити, які здатні впізнавати антигенні пептиди в асоціації з власними молекулами МНС (позитивний відбір за МНС-рестрикцією), і елімінуються Т-лімфоцити, що потенційно здатні виявляти реактивність проти комплексів власних МНС-пептид (негативний відбір на ауто толерантність). В-лімфоцити зазнають позитивного і негативного відбору в кістковому мозку, але ліганд, який вони розпізнають під час позитивного відбору, залишається нез'ясованим. У результаті двохетапного відбору формується репертуар Т- і В-рецепторів, що спроможні розпізнати всі можливі антигени, з якими може контактувати організм. Відібрані лімфоцити залучаються до проліферації й утворюють клони (нащадки однієї клітини), які становлять популяції Т- і В-лімфоцитів.

Сформовані клони Т- і В-лімфоцитів виходять із центральних лімфоїдних органів та мігрують до периферичних органів і тканин, де поселяються в дискретних спеціалізованих ділянках - Т-і В-клітинних зонах. Міграція пов'язана з проходженням через ендотелій (екстравазація) та переміщенням у тканині (екотаксис). Основою міграції є взаємодія молекул адгезії лімфоцита з їхніми лігандами на ендотелії та позаклітинному матриксі. Міграція лімфоцитів регулюється системою хемокінів, які, діючи як хемоатрактанти, спрямовують рух лімфоцитів. Мікрооточення Т- і В-клітинних зон створює умови для активації лімфоцитів та кооперації Т- і В-клітин під час розвитку імунної відповіді на антиген, що надходить у лімфоїдну систему.

Контрольні запитання

1. Яке біологічне значення має постійне оновлення лімфоїдних клітин в організмі?
2. Якими властивостями характеризуються стовбурові клітини, яка їх роль в онтогенезі та які існують методи їх аналізу?
3. Як відбувається рециркуляція стовбурових клітин і яка її роль?
4. Схарактеризуйте етапи диференціювання Т- і В-лімфоцитів, простежте появу та зміни експресії їх основних функціональних маркерів, розділення на субпопуляції.
5. Які зміни генетичного апарату відбуваються в процесі розвитку Т- і В-клітин?
6. Які аналогії та відмінності у стадіях розвитку Т- і В-лімфоцитів?
7. Які транскрипційні фактори визначають напрям диференціювання клітин імунної системи?
8. Які клітини формують мікрооточення Т- і В-лімфоцитів у різних компартментах тимуса і кісткового мозку та яка їхня роль у дозріванні лімфоцитів?
9. Що таке позитивний та негативний відбір Т- і В-клітин і як він здійснюється?
10. Яке значення мають генно-інженерні методи для вивчення процесів відбору лімфоцитів?
11. Як здійснюється розселення Т- і В-лімфоцитів у периферичні лімфоїдні органи та які молекулярні механізми міграції їх у спеціалізовані ділянки - Т- і В-клітинні зони?