

Doi: 10.52341/20738080_2025_138_5_81

ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ $\gamma\delta$ T-ЛИМФОЦИТОВ ИЗ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ: ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

СВИТИЧ О.А.,
академик РАН, д.м.н., профес-
сор РАН, директор ФГБНУ «На-
учно-исследовательский ин-
ститут вакцин и сывороток
им. И.И. Мечникова», проф-

ессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), svitichoa@yandex.ru



КАЛИНИЧЕНКО Е.О.,
к.м.н., научный сотруд-

ник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», eugeniuscallinicus@yandex.ru



БИШЕВА И.В.,
научный сотрудник лабора-

тории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», ibisheva@yandex.ru



СОРОКИНА Е.В.,
д.м.н., доцент, ведущий науч-

ный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», заведующая лабораторией механизмов регуляции иммунитета, профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии Академии постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», sorokina-cathrine@yandex.ru

Способность $\gamma\delta$ T-лимфоцитов распознавать антигены независимо от главного комплекса гистосовместимости, а также продуцировать цитокины и цитотоксические молекулы делает их перспективными объектами для иммунотерапии. Тканерезидентные $\gamma\delta$ T-клетки играют важную роль в иммунном надзоре, поддержании гомеостаза и патогенезе различных заболеваний, включая инфекционные, онкологические и аутоиммунные процессы. Однако методы выделения и культивирования $\gamma\delta$ T-лимфоцитов остаются сложными и недостаточно стандартизированными, особенно для тканевых источников. В данном обзоре рассматриваются современные подходы к получению этих клеток из различных тканей человека (биоптатов, операционного материала) и животных (преимущественно мышей).

Ключевые слова: $\gamma\delta$ T-лимфоциты, тканерезидентные лимфоциты, выделение клеток, культура лимфоцитов.

ISOLATION AND CULTIVATION OF $\gamma\delta$ T-LYMPHOCYTES FROM TISSUES AND ORGANS OF HUMANS AND ANIMALS: PRINCIPAL APPROACHES. REVIEW OF LITERATURE

Svitich O., Kalinichenko E., Bisheva I., Sorokina E.

The $\gamma\delta$ T-lymphocytes' capacity to recognize antigens regardless of the major histocompatibility complex and to produce cytokines and cytotoxic molecules makes them promising objects for immunotherapy. The tissue-resident $\gamma\delta$ T-cells play an important role in immune surveillance, maintaining homeostasis and pathogenesis of various diseases including infectious, oncological and autoimmune processes. However the methods for isolating and cultivating $\gamma\delta$ T-lymphocytes remain complicated and poorly standardized, especially for those derived from tissue sources. This review focuses on the modern approaches to isolation of these cells from various tissues of humans (biopsies, surgical materials) and animals (mainly mice).

Key words: $\gamma\delta$ T-lymphocytes, tissue-resident lymphocytes, isolating cells, culture of lymphocytes.

Введение

$\gamma\delta$ Т-лимфоциты представляют собой уникальную субпопуляцию Т-клеток, обладающую свойствами как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Они отличаются от $\alpha\beta$ Т-клеток экспрессией Т-клеточного рецептора (TCR), составленного из γ - и δ -цепей и потому имеющего значительно отличающиеся рецепторные репертуар и специфичность. Их способность распознавать антигены независимо от главного комплекса гистосовместимости, а также продуцировать широкий спектр цитокинов и цитотоксических молекул делает их перспективными объектами для иммунотерапии и фундаментальных исследований [1]. Являясь одними из первых Т-клеток, образующихся в эмбриональном периоде, $\gamma\delta$ Т-клетки вскоре распространяются по периферическим тканям, в которых они становятся тканерезидентными клетками, участвующими в иммунном надзоре и поддержании тканевого гомеостаза [2, 3]. Тканерезидентные $\gamma\delta$ Т-клетки отличаются от циркулирующих в крови по фенотипу, рецепторному профилю, репертуару TCR и функциональным свойствам. Более того, $\gamma\delta$ Т-клетки различных тканей заметно отличаются друг от друга [4, 5, 6, 7].

Тканерезидентные $\gamma\delta$ Т-клетки принимают участие в патогенезе различных заболеваний: инфекционных, онкологических и аутоиммунных, причем роль этих клеток разнонаправлена при различных патологиях. С одной стороны, $\gamma\delta$ Т-клетки выполняют свою функцию как составная часть иммунной системы, с другой, могут служить компонентами патогенных механизмов при хронических воспалительных заболеваниях, в т.ч. аутоиммунных. Принимая участие в механизмах противоопухолевого иммунитета, они могут иногда способствовать росту и метастазированию опухолей [1, 4]. В связи с этим в последнее время $\gamma\delta$ Т-клетки оказались в фокусе исследований патогенеза различных заболеваний [4, 6]. Наиболее распространены $\gamma\delta$ Т-клетки в эпителиальных тканях, особенно несущих функцию барьерных (кожа, слизистые оболочки дыхательных путей, пищеварительного и репродуктивного трактов). Там они составляют часть более крупной группы иммунных клеток, интенсивно изучаемой (внутриэпителиальных лимфоцитов). Присутствуют они и в таких эпителиальных органах, как легкие и печень [1].

Изучение локализации и функций $\gamma\delta$ Т-клеток порой приводит исследователей к неожиданным находкам и выводам: например, *M. Ribeiro et al.* предполагают участие менингеальных $\gamma\delta$ Т-клеток в процессах синаптической пластичности и формирования памяти [8]. Однако методы выделения

и культивирования $\gamma\delta$ Т-клеток остаются сложными и недостаточно стандартизированными, особенно при работе с плотными тканями. Большинство существующих протоколов ориентировано на получение $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов из периферической крови человека, что связано с их клиническим применением, например, в терапии онкологических заболеваний. Получение клеточных суспензий из тканей требует сочетания механической и ферментативной диссоциаций, при этом этап гомогенизации не имеет принципиальных различий между образцами человека и животных. Но последующее выделение и размножение $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов из тканевых источников остается менее изученным, особенно в контексте *in vitro* культивирования и экспансии.

В данной статье рассматриваются современные подходы к выделению и культивированию $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов из различных тканей человека и животных, прежде всего, в целях изучения их функции в поддержании иммунного гомеостаза и роли в механизмах патогенеза заболеваний.

Выделение $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов из тканей человека

Поскольку методы получения и размножения $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов имеют в основном клиническую направленность, большинство протоколов описывает использование крови человека. Гораздо реже описывается выделение и тем более культивирование $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов из плотных тканей – как правило, в статьях, посвященных анализу функций тканерезидентных клеток иммунной системы. У человека источником этих клеток могут быть биопсийный материал и удаленные при оперативных вмешательствах ткани и органы, в то время как у животных получение любых тканей и органов вызывает меньше затруднений. Поэтому массив статей, посвященных $\gamma\delta$ Т-клеткам как лимфоидных, так и любых других плотных тканей, в основном представлен исследованиями на модельных животных – прежде всего на мышах.

Как правило, $\gamma\delta$ Т-клетки получают методом магнитной (MACS) или флуоресцентной (FACS) сепарации из суспензии клеток, предварительно обогащенной разделением в градиенте плотности (аналогично получению мононуклеарных клеток крови [PBMC]). И если кровь представляет собой уже готовую суспензию клеток, то разделение других тканей требует особых подходов, которые делятся на механические (раздробление с помощью различных технических средств – от стеклянного гомогенизатора до разнообразных специализированных лабораторных приборов) и ферментные (применение литических ферментов для

разрушения межклеточного матрикса и межклеточных контактов). Во многих протоколах получения клеточных суспензий из тканей используются комбинации обоих подходов. В то же время этап получения суспензии клеток не имеет больших методических различий между образцами, полученными от человека или животных, и является общим для протоколов по выделению различных типов клеток.

I.J. Jensen et al. обобщили методы выделения иммунных клеток из различных тканей организма человека [9]. *N.E.G. Upton et al.* разработали протоколы получения лимфоцитов из биоптатов слизистой оболочки [10]. *M. Iwamuro et al.* [11] рассматривают выделение лимфоцитов из слизистой желудка человека на примере биопсийных образцов, полученных при гастроскопии, используя различные комбинации способов механического измельчения ткани и применения разнообразных литических ферментов; в работе *B.L. Shacklett et al.* [12] анализируются методы получения лимфоцитов из биоптатов прямой кишки, полученных при ректосигмоидоскопии. Есть работы по выделению лимфоцитов из эндометрия [13], в том числе при кесаревом сечении [14, 15], из легких [16], из печени [17, 18].

В работе *X. He et al.* [19] предлагается протокол выделения лимфоцитов из кожи человека, в котором из биоптатов кожи с помощью автоматизированного диссоциатора и обработки коллагеназой получают суспензию клеток. *A. Polakova et al.* получали лимфоциты из биоптатов кожи с помощью инкубации измельченной вручную кожи в растворе коллагеназы IV и ДНКазы I при перемешивании [20]. В работах *W. Du et al.* [21] и *M. Salimi et al.* [22] также использовалась комбинация механического и энзиматического расщеплений. Для выделения $\gamma\delta$ T-клеток из кожи человека *S. Gargas et al.* [23] предлагают использовать трехмерную культуру экплантатов кожи человека с помощью матриц CytoMatrix.

В подобных работах, как правило, выделенные лимфоциты (в том числе и $\gamma\delta$ T) используются для фенотипического анализа либо краткосрочной культуры, предназначенной для проведения функциональных тестов.

Методы получения и размножения $\gamma\delta$ T-клеток животных

Эти методы освещены в научной литературе гораздо слабее. Встречаются работы по исследованиям таких клеток у различных организмов, например, свиней [24–26], коров [27–29], крыс [30] и, конечно, мышей. Во всех этих случаях, как правило, алгоритм выделения тот же – выделение РВМС по плотности из суспензии клеток (крови или

же расщепленной ткани), а далее – выделение популяции $\gamma\delta$ T-лимфоцитов, основанное на взаимодействии антиген-антитело (с $\gamma\delta$ TCR) – MACS или FACS. Методы размножения $\gamma\delta$ T-лимфоцитов животных разработаны слабо.

Исследований мышиных $\gamma\delta$ T-клеток относительно мало, в первую очередь потому, что эти клетки оказались трудно изолировать, размножать и характеризовать [31]. Для выделения $\gamma\delta$ T-клеток мышей существуют коммерческие наборы, основанные на их позитивной магнитной изоляции [32]. У мышей отсутствует популяция клеток, схожих с $\gamma\delta$ 2T-клетками человека, способными делиться под воздействием фосфоантигенов, что сужает возможности добиться размножения их $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в культуре.

L. Williams et al. разработали метод размножения $\gamma\delta$ T-клеток мыши, основанный на стимуляции IL-2 и антителами к CD3 и CD28. В этом исследовании $\gamma\delta$ T-клетки получали из суспензии клеток селезенки после лизиса эритроцитов, удаляя CD4+, CD8+, B220+ и CD11b+клетки с помощью магнитной сепарации. Размножение $\gamma\delta$ T-клеток достигало 150-кратного размера к 8-му дню культивирования и поддерживало эффективную и воспроизводимую дифференциацию *in vitro* [31].

Y. Wang и J. Yan [33] предлагают протокол размножения $\gamma\delta$ T-клеток из периферических лимфоузлов мыши, в котором на ячейки культурального планшета адсорбировали антитела к $\gamma\delta$ TCR мыши (клон UC7, исходная концентрация 0,25 мг/мл, для сорбции использовали раствор в фосфатно-солевом буфере с концентрацией 1 мкг/мл). Для этого 25 мкл антител растворяли в 6,25 мл фосфатно-солевого буфера, вносили раствор в ячейку 24-луночного планшета и инкубировали от 02.00 час. до целой ночи при 37°C (удаляя раствор непосредственно перед внесением клеток). У мышей C57BL/6J возрастом 6–8 недель вырезали лимфоузлы и растирали их в стерильных условиях, пропуская через 40-мкм-клеточное сито, промывая его средой RPMI-1640. Суспензию клеток центрифугировали в пробирке при 500×g и температуре 4°C 5 мин., супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 1 мл полной среды RPMI-1640 и подсчитывали число клеток, после чего доводили концентрацию клеток до 2 млн/мл в среде с добавлением IL-1 β (10 нг/мл) и IL-23 (10 нг/мл), рассеивая их по 1 мл в лунки планшета. При этом через 3 дня культивирования доля $\gamma\delta$ T-клеток достигала 30–50%. Живет такая культура 7–8 дней. У большинства клеток был фенотип CD27-, характерный у мышей для IL-17-секретирующих $\gamma\delta$ T-лимфоцитов [34].

Следует полагать, что для описанных методов источник клеток не является принципиальным, в частности, он легко воспроизводим для получения культуры $\gamma\delta$ T-клеток из крови и лимфоидных органов. Но для получения культуры $\gamma\delta$ T-клеток других органов потребуется более сложный этап гомогенизации. Протоколы получения клеток лейкоцитарного ряда (например, интраэпителиальных лимфоцитов) из тканей и органов мышей хорошо разработаны: так, они описывают выделение из кишечника [35–39] и печени [40], а в работе *J. Zhang et al.* [41] предлагаются универсальные протоколы выделения лимфоцитов из кишечника, печени, матки и легких как грызунов, так и человека. В работах *Y. Ye et al.*, а также *Н. Снегиревой и соавт.* описано, что из полученных интраэпителиальных лимфоцитов кишечника мыши выделяли $\gamma\delta$ T-клетки иммуномагнитным методом (MACS) для анализа и краткосрочной культуры [42, 43].

Протокол *S. Gargas et al.* по получению $\gamma\delta$ T-клеток кожи мыши (дендритных эпидермальных T-клеток) предполагает разделение кожи мыши C57BL/6j в возрасте 6–8 недель на эпидермис и дерму с помощью 0,3%-го раствора трипсина, а далее – ферментное расщепление эпидермиса с помощью того же раствора с добавлением 0,1% ДНКазы, после чего – фильтрацию суспензии через 70-мкм-клеточное сито для удаления детрита и неразделившихся клеток, выделение лимфоцитов из суспензии клеток центрифугированием в градиенте плотности (с помощью препарата Lympholyte M) и их культивирование в среде RPMI-1640, содержащей 20 U/мл IL-2, 3 мкг/мл конканавалина А и 1 мкг/мл индометацина, с заменой половины среды на свежую с IL-2 каждые 3–4 дня и с рестимуляцией конканавалином каждые 3 недели [23].

Схожий способ получения дендритных эпидермальных $\gamma\delta$ T-клеток описывается в работе *I. Rana et al.*, но при этом способе используются новорожденные мышата той же линии, кожа с которых снимается полностью, и с помощью трипсина отделяется эпидермис, из которого делают суспензию и разделяют на различные типы клеток с помощью FACS [44].

Заключение

$\gamma\delta$ T-лимфоциты представляют собой уникальную популяцию иммунных клеток, играющих ключевую роль в поддержании тканевого гомеостаза, в иммунном надзоре и в патогенезе различных заболеваний. Их способность функционировать как на стыке врожденного и адаптивного иммунитета, так и в качестве самостоятельных эффекторных клеток, делает их перспективными мишенями для иммунотерапии и

фундаментальных исследований. В связи с этим интенсивно изучается роль ткане-резидентных $\gamma\delta$ T-клеток в патогенезе различных заболеваний как на тканях тела человека, так и (гораздо более широко) на животных моделях. Однако методы выделения и культивирования $\gamma\delta$ T-клеток из тканей остаются сложными и недостаточно стандартизированными.

В данном обзоре рассмотрены современные подходы к получению $\gamma\delta$ T-лимфоцитов из различных тканей человека и животных. Для человека основными источниками служат биопсийный материал и операционные образцы, тогда как исследования на животных (прежде всего мышах) позволяют изучать тканеспецифичные субпопуляции этих клеток. Несмотря на различия в доступности материала, ключевые этапы выделения $\gamma\delta$ T-клеток включают комбинацию механической и ферментативной диссоциаций тканей с последующей магнитной или флуоресцентной сортировками.

Особую сложность представляет культивирование и экспансия $\gamma\delta$ T-лимфоцитов *in vitro*, особенно для животных моделей, где методы стимуляции и поддержания клеточных культур разработаны слабее, чем для человека. Тем не менее появляются новые протоколы, позволяющие добиваться эффективного размножения этих клеток, что открывает перспективы для их дальнейшего изучения и потенциального применения в клеточной терапии.

Перспективы дальнейших исследований связаны с оптимизацией протоколов культивирования, направленной на сохранение фенотипа и функциональной активности клеток, разработкой методов размножения редких субпопуляций, совершенствованием доклинических моделей на основе $\gamma\delta$ T-лимфоцитов животных.

Таким образом, совершенствование методов выделения и культивирования ткане-резидентных $\gamma\delta$ T-лимфоцитов необходимо для углубленного понимания их функций в норме и при патологии, а также для разработки новых стратегий иммунотерапии онкологических, инфекционных и аутоиммунных заболеваний. Дальнейшие исследования в этой области требуют междисциплинарного подхода, сочетающего современные клеточные технологии, иммунологические методы и экспериментальные модели *in vivo*.

Литература

