

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ Т-ЭФФЕКТОРНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ МЕТОДОМ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ОКРАШИВАНИЯ ЦИТОКИНОВ

Лагерева Ю.Г.¹, Меньшиков С.В.¹, Савинова Т.Л.²,
Бейкин Я.Б.¹, Черешнев В.А.³

¹ МБУ «Клинико-диагностический Центр», г. Екатеринбург

² Управление здравоохранения администрации, г. Екатеринбург

³ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург

Резюме. Для оценки содержания эффекторных субпопуляций Т-лимфоцитов у детей и взрослых использовали метод внутриклеточного окрашивания маркерных цитокинов. Результаты исследования показали, что в 7-12-месячном возрасте у детей, на фоне снижения содержания Th1 и Tc1-субпопуляций, количество Th2-лимфоцитов соответствует возрастной норме взрослых, а абсолютное содержание Tc2-лимфоцитов выше, чем во всех остальных возрастных группах. Абсолютное содержание Th17-, Tnc17-лимфоцитов у детей 7-12 месяцев превышает их содержание у взрослых. Таким образом, на 7-12 месяце жизни у ребенка наблюдается преимущественная поляризация дифференцировки Т-лимфоцитов по пути Th2 (Tc2) и Th17 (Tnc17), что, по всей видимости, способствует манифестации Th2-опосредованных аллергических заболеваний у детей первого года жизни. У детей старше одного года абсолютное количество Th1- и Tc1-, а также Th2- и Tc2-лимфоцитов значимо не отличается от содержания этих субпопуляций у взрослых. В подростковой группе (15-18 лет) на фоне снижения содержания Th2-субпопуляции наблюдается увеличение относительного содержания IL-17А-позитивных лимфоцитов, что может способствовать предрасположенности к индукции различных аутоиммунных заболеваний в подростковом возрасте. Увеличение по мере взросления ребенка относительного содержания Th1- и Tc1-субпопуляций лимфоцитов непосредственно связано с формированием пула Т-клеток памяти.

Ключевые слова: Т-эффекторы/клетки памяти, проточная цитометрия, дети, взрослые.

Lagereva Yu.G., Menshikov S.V., Savinova T.L., Beykin J.B., Chereshev V.A.

EVALUATION OF T-CELL EFFECTOR SUBPOPULATIONS DISTRIBUTION IN CHILDREN AND ADULTS BY MEANS OF INTRACELLULAR STAINING OF CYTOKINES

Abstract. An intracellular staining technique of marker cytokines was applied for evaluation of quantitative distribution of T-lymphocyte effector subsets in children and adults. The results of this study have shown that the numbers of Th2 lymphocytes in infants (7 to 12 months old) correspond to appropriate normal values in adults, being accompanied by decreased Th1 and Tc1 cell contents, whereas absolute amounts of Tc2 lymphocytes proved to be higher than in all other age groups. Absolute counts of Th17 and Tnc17 subsets in infants of 7 to 12 months were higher than in adults. Hence, these infants exhibited a shift of immune response towards Th2 (Tc2) and Th17 (Tnc17), thus presenting a potential factor of Th2-mediated allergic disorders in the children under one year. In children over 1 year, absolute amounts of Th1 and Tc1, as well as Th2 and Tc2 lymphocyte counts did not significantly differ from adult values. Th2 lymphocyte counts among adolescents (15 to 18 years)

Адрес для переписки:

Лагерева Юлия Геннадьевна
620142, Свердловская обл., г. Екатеринбург,
ул. Декабристов, 38.
Тел.: (343) 257-72-13.
Факс: (343) 257-67-02.
E-mail: anna-lagereva@yandex.ru

were decreased, along with relative increase of IL-17A-positive lymphocyte scores, thus reflecting a probable predisposition for autoimmune disorders induced at this age. The age-dependent increase in Th1 and Tc1 counts in children may immediately correlate with formation of T-cell memory pool. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 4-5, pp 295-304)

Keywords: T-cell effectors/memory cells, flow cytometry, children, adults.

Введение

В соответствии с Th1/Th2 парадигмой в течение нескольких десятилетий представления о гетерогенности CD4 Т-лимфоцитов ограничивались существованием двух полярных субпопуляций Т-хелперов, ответственных за формирование клеточно-опосредованного и гуморального типов протективного иммунного ответа и вовлеченных в патогенез различных заболеваний. Несмотря на описание новых цитокинов и новых субпопуляций Т-хелперов (Th9, Th22, фолликулярных Т-хелперов — T_{FH}), а также фактов, подтверждающих необычайную пластичность Т-хелперных субпопуляций [10], Th1- и Th2-субпопуляции по-прежнему признаются одними из самых стабильных эффекторных Т-клеточных субпопуляций [2]. Согласно современным представлениям координация дифференцировки различных субпопуляций Т-хелперов происходит с участием соответствующих транскрипционных факторов, определяющих экспрессию растворимых медиаторов и поверхностных молекул, обеспечивающих взаимодействие с другими клетками иммунной системы. Статус самостоятельной субпопуляции Т-лимфоцитов, на основании четко установленных условий индукции дифференцировки и транскрипционных маркеров, имеют помимо Th1- и Th2- лимфоцитов Th17-лимфоциты (индукция дифференцировки — IL-6 и TGF- β , специфические транскрипционные факторы — ROR γ t, ROR α). К четвертой основной субпопуляции CD4⁺Т-лимфоцитов принадлежат Treg-клетки, характеризующиеся экспрессией транскрипционного фактора FoxP3 [10].

Подобно Т-хелперам CD8⁺Т-эффекторы также образуют различные функциональные субпопуляции [9], отличающиеся спектром синтезируемых цитокинов. Помимо участия в киллинге клеток-мишеней [12, 14], Tc1 и Tc2 CD8 Т-лимфоциты обладают необходимым потенциалом для осуществления регуляции иммунного ответа. Они участвуют в активации/супрессии макрофагов, эозинофилов и В-лимфоцитов, а также регуляции дифференцировки Th1-, Th2-лимфоцитов [13]. В 2007 году были опубликованы результаты исследований, демонстрирующие существование IL-17-продуцирующей субпопуляции Т-лимфоцитов, не принадлежащей ни к Tc1-, ни к Tc2-лимфоцитам, которая была названа Т-нецитотоксические 17 лимфоциты (Tnc17) [7].

Дифференцировка наивных Т-клеток в функционально полноценные эффекторы сопровождается приобретением характерного профиля цитокиновой продукции, который играет ключевую роль в выполнении различными субпопуляциями Т-лимфоцитов их биологических функций и их классификации. Содержание Т-лимфоцитов, синтезирующих цитокины Th1, Th2, Th17 и т.д. профилей, значительно варьирует в различных возрастных группах [5, 6]. Уже в процессе внутриутробного развития, а тем более с момента рождения ребенка происходит постоянное взаимодействие иммунной системы с антигенами окружения, включая антигены, поступающие в организм при проведении вакцинации. Это способствует постепенному изменению содержания наивных Т-клеток и Т-эффекторов/клеток памяти.

Определение нормального содержания различных эффекторных Т-лимфоцитарных субпопуляций, начиная с периода новорожденности вплоть до взрослого возраста, имеет значение для оценки изменения их уровня в ходе того или иного патологического процесса. Не менее важна эта информация для представления о нормальных иммунологических вариациях в различных возрастных группах и процессе иммунологического созревания. Опубликованные на сегодняшний день данные об уровне нормальной цитокиновой продукции в различных возрастных группах касаются в основном оценки цитокинов в супернатантах мононуклеаров, что не позволяет экстраполировать их на содержание ответственных за их синтез Т-клеточных субпопуляций. Альтернативным методическим подходом для дифференциации Т-клеточных субпопуляций является оценка ко-экспрессии маркерных цитокинов (методом внутриклеточного окрашивания) и поверхностных рецепторов на уровне отдельной клетки с помощью проточной цитометрии [11].

Цель настоящего исследования состояла в оценке нормального содержания Th1, Tc1, Th2, Tc2 Th17, Tnc17 и Treg у детей различных возрастных групп и взрослых методом внутриклеточного окрашивания цитокинов и изучении коррелятивной связи между содержанием различных цитокин-продуцирующих субпопуляций Т-лимфоцитов и количеством CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток памяти.

Материалы и методы

Моноклональные антитела. Для определения внутриклеточных цитокинов использовались следующие моноклональные антитела: фикоэритрин (PE)-конъюгированные 45.15 для определения IFN γ (IO Test, Immunotech, France) – Th1, Tc1; PE-конъюгированные 4D9 для определения IL-4 (IO Test, Immunotech, France) – Th2, Tc2; PE-конъюгированные SCPL1362 для определения IL-17A (BD Pharmingen) – Th17, Tnc17.

Для окрашивания поверхностных рецепторов: фикоэритринцианин 5.1 (PC-5)-конъюгированные UCHT1 CD3 (IO Test, Immunotech, France), флуоресцеинизотиоцианат (FITC)-конъюгированные 13B8.2 CD4 (IO Test, Immunotech, France), FITC-конъюгированные B9.11 CD8 (IO Test, Immunotech, France).

Для определения Treg использовали: FITC-конъюгированные RTA-T4 CD4 (BD Pharmingen); PE-конъюгированные M-A251 CD25 (BD Pharmingen); Alexa Fluor 647-конъюгированные 259 D/C7 FoxP3 (BD Pharmingen).

Для определения CD4⁺ и CD8⁺T-клеток памяти использовали CD45RA FITC/CD62L PE/CD3 PerCP/CD4 APC и CD45RA FITC/CD62L PE/CD3 PerCP/CD8 APC MultiTest (BDIS).

Материал исследования. Образцы гепаринизированной венозной крови были получены от 150 здоровых детей в возрасте от 7 месяцев до 18 лет (1 группа – 7-12 мес., 2 группа – 1-3 года, 3 группа – 4-7 лет, 4 группа – 8-14 лет, 5 группа – 15-18 лет, численность каждой группы – 30 человек) и 45 взрослых (25-45 лет). Мононуклеары периферической крови (МПК) были получены путем выделения на градиенте плотности 5,64% Polysucrose 400, 9,65% Sodium Diatrizoate (1.0770 g/cm³) (Lympholyte®-H, Cedarlane Laboratories Ltd, The Netherlands). Использовали стандартную процедуру отмывки клеток (троекратно) и ресуспендировали отмываемые МПК в концентрации 2 × 10⁶/мл в среде RPMI-1640 с добавлением 10% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки.

Пробоподготовка и иммунофлюоресцентное окрашивание. Оценка внутриклеточной продукции цитокинов проводилась согласно протоколу BDIS [Becton Dickinson Immunocytometry Systems. Intracellular staining procedure. Source Book Section 2.23.1-2.1996. Becton Dickinson, San Jose] с модификациями: активация лимфоцитов осуществлялась 25 нг/мл Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma Catalog N P-8139) с иономицином (1 мкг/мл) (Ionomycin, Sigma, Catalog N I-0634) в присутствии брефелдина А (10 мкг/мл) в течение 4 часов при температуре 37 °С в полистироловых 12 × 75 мм пробирках с пробками (Falcon Catalog N 2058). Нестимулированный контроль инкубировался в тех же условиях в при-

сутствии брефелдина А, без добавления активаторов. Для исключения неспецифического связывания моноклональных антител использовался флюорохром-конъюгированный изотипический контроль. Для контроля эффективности активации одна аликвота МПК инкубировалась с PMA и иономицином без добавления брефелдина А.

Активированные МПК фиксировали с использованием 1 × FACS Lyse Solution в течение 10 мин. Центрифугировали в течение 5 минут при 500 xg и удаляли супернатант. Пермеабиллизацию проводили с использованием 1 × FACS Permeabilizing Solution в течение 10 минут при комнатной температуре в темноте. Добавляли фосфатно-солевой буфер и центрифугировали в течение 5 минут при 500 xg и удаляли супернатант.

Окрашивание моноклональными антителами проводили одновременно для поверхностных и внутриклеточных маркеров в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте. В активационный контроль добавляли CD69PE/CD3 PerCP (BDIS Catalog No.340368).

Протоочноцитометрический анализ. Трехцветный анализ проводили с использованием проточного цитофлуориметра FACS Canto II (BDIS). Данные анализировали с использованием FACS Diva Version 6.1.3 (BDIS), набирая не менее 30000 лейкоцитов в образце. Популяция CD3⁺ PC-5-меченных лимфоцитов гейтировалась с использованием флуоресцентного канала (FL3) и параметра бокового светорассеяния (SSC). Соответственно, двух-параметровые дот-плоты были созданы для оценки процентного содержания CD3⁺CD4⁺IFN γ (Th1), CD3⁺CD4⁺IL-4⁺ (Th2), CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺ (Th17); CD3⁺CD8⁺IFN γ (Tc1), CD3⁺CD8⁺IL-4⁺ (Tc2), CD3⁺CD8⁺IL-17A⁺ (Tnc17). Изотипический контроль использовали для подтверждения специфичности моноклональных антител. Экспрессия CD69 более чем 90% CD3⁺ лимфоцитов считалась удовлетворительным критерием активации. Нестимулированные окрашенные моноклональными антителами образцы использовались для установки квадрантов в двух-параметровых дот-плотах.

Определение относительного содержания Treg-лимфоцитов. Определение процентного содержания Treg-лимфоцитов осуществляли согласно протоколу BD Pharmingen (Human FoxP3 Buffer Set). Для анализа набирали до 25000 CD4⁺ лимфоцитов. Процент Treg (CD25⁺FoxP3⁺) рассчитывали от содержания CD4⁺-позитивных лимфоцитов.

Определение относительного содержания CD4⁺ и CD8⁺T-клеток памяти. Определение процентного содержания CD4⁺ и CD8⁺T-клеток памяти осуществляли согласно протоколу прямого

флюоресцентного окрашивания с лизированием без отмывки (BDIS). Для анализа набирали до 25000 $CD3^+$ лимфоцитов. Процент $CD4^+$ Т-клеток памяти (эффекторные клетки-памяти $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD62L^-$ и центральные клетки-памяти $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD62L^+$) рассчитывали от содержания $CD4$ -позитивных лимфоцитов. Процент $CD8^+$ Т-клеток памяти (эффекторные клетки-памяти $CD3^+CD8^+CD45RA^-CD62L^-$ и центральные клетки-памяти $CD3^+CD8^+CD45RA^+CD62L^+$) рассчитывали от содержания $CD8$ -позитивных лимфоцитов.

Определение абсолютного содержания Т-клеточных субпопуляций. Содержание лейкоцитов и абсолютное содержание лимфоцитов в периферической крови осуществлялось из образца цельной крови, взятой в пробирку с K_3 ЭДТА (Minicollect, 0.5 ml) одновременно с взятием гепаринизированного образца. Анализ параметров проводился с использованием автоматического гематологического анализатора Cobas Micros 60 OT (ABX). Абсолютное содержание рассчитывалось с учетом общего содержания лимфоцитов, % Т-лимфоцитов и % Т-клеточных субпопуляций и выражалось в количестве клеток/мкл.

Статистический анализ. Статистическая обработка материала проводилась с использованием модулей «Descriptive Statistics» ППП «NCCS 2001 and Pass Test», «Nonparametric Statistics» ППП «STATISTICA» (StatSoft Inc.). Описательная статистика заключалась в определении медианы и верхнего и нижнего квартилей для содержания различных популяций Т-клеток. Для сравнения независимых групп по количественным признакам применяли U-критерий Манна–Уитни

(Mann–Whitney U-test). Для исследования связи количественных признаков применяли метод ранговой корреляции по Спирмену.

Результаты

Абсолютное содержание хелперной субпопуляции Т-лимфоцитов у детей до года и в возрасте 1–3 лет значительно превышало их количество у детей старшего возраста и взрослых (по сравнению со взрослыми превышение составляло: в 3,2 и 2,3 раза соответственно). У детей 4–7 лет абсолютное содержание Т-хелперов значимо не отличалось от их количества у взрослых. Что касается относительного содержания Т-хелперных клеток, то процент $CD4^+$ Т-лимфоцитов был значимо повышен только у детей 7–12 месяцев. К первому году жизни процентное содержание Т-хелперов достигало значений, которые сохранялись у детей старшего возраста и взрослых (рис. 1). Относительное содержание Т-цитотоксических лимфоцитов у детей до года было значимо ниже, чем в остальных возрастных группах (рис. 1). Их абсолютное содержание, напротив, у детей в возрасте 7–12 мес. и 1–3 лет превышало показатели у старших детей и взрослых, снижаясь к 4–7 годам.

Относительное содержание Т-хелперных лимфоцитов, способных под действием неспецифической стимуляции синтезировать $IFN\gamma$ (Th1), постепенно повышалось с возрастом, достигая максимальных значений у взрослых (рис. 2). Медиана процентного содержания Th1-лимфоцитов у детей старше 8 лет не отличалась достоверно от показателя взрослых и была значимо выше значений процентного содержания Т-хелперов

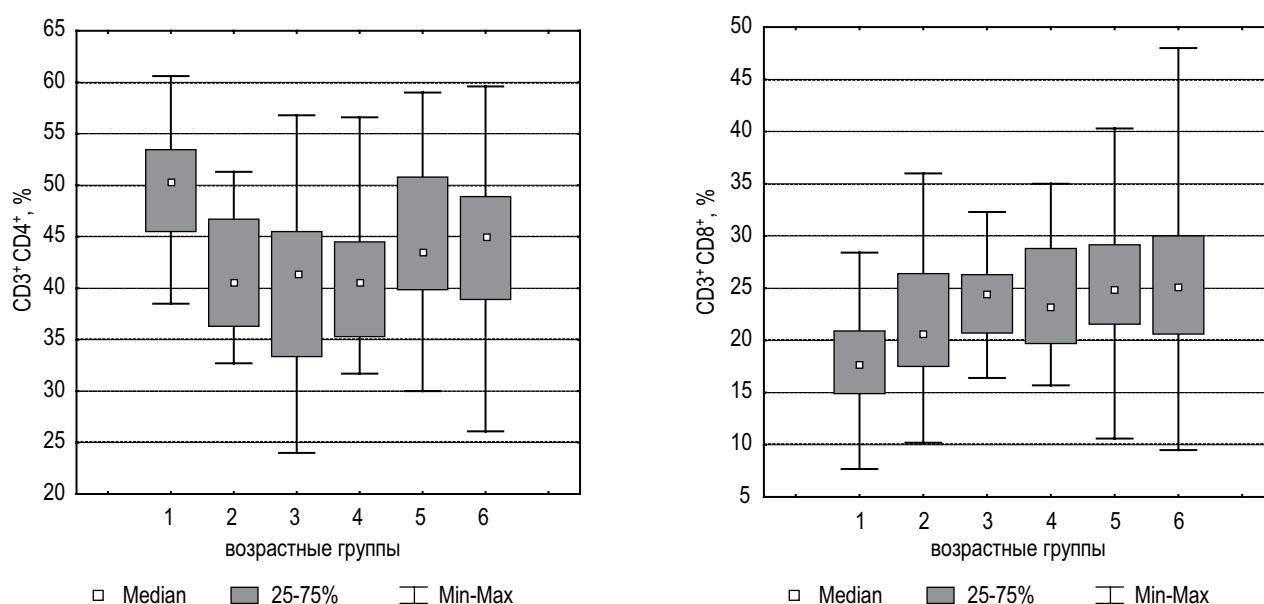


Рисунок 1. Относительное содержание Th- и Тс-лимфоцитов в разных возрастных группах

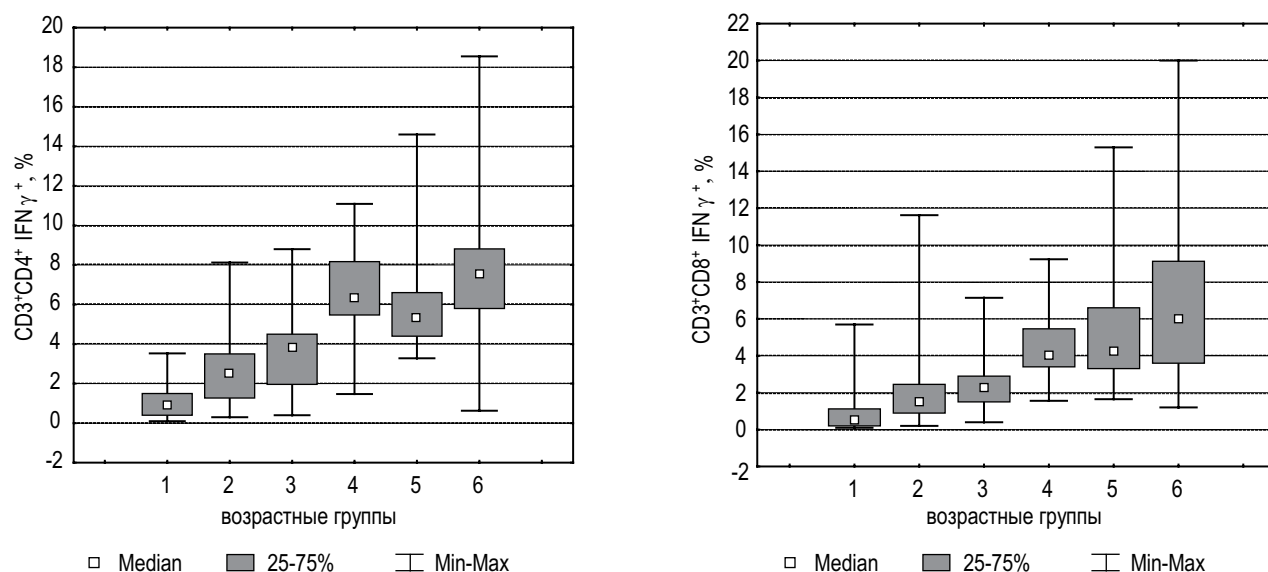


Рисунок 2. Относительное содержание Th1- и Tc1-лимфоцитов в разных возрастных группах

первого порядка у детей младшего возраста. Абсолютное содержание этой субпопуляции лимфоцитов также увеличивалось, но в меньшей степени отличалось у детей и взрослых, за исключением детей до года, у которых содержание Th1-лимфоцитов было минимальным. Процентное содержание Tc1-лимфоцитов также постепенно увеличивалось с возрастом, достигая максимальных значений у взрослых (рис. 2). Абсолютное содержание этой субпопуляции Т-лимфоцитов достоверно отличалось у детей до года от показателей групп подростков и взрослых (в 3,6 и 4,7 раза соответственно).

Относительное содержание Th2-субпопуляции было значимо повышено только у взрослых по сравнению с детьми всех без исключения возрастных групп. Что касается абсолютного количества этих клеток, то их минимальное содержание характеризовало группу 15-18-летних подростков.

При стабильно низком относительном содержании Т-цитотоксических лимфоцитов второго порядка, их абсолютное число значимо было повышено у детей до года по сравнению со всеми остальными возрастными группами.

Для того чтобы охарактеризовать баланс цитокин-продуцирующих лимфоцитов первого и второго порядка, было определено соотношение Th1-/Th2- и Tc1-/Tc2-лимфоцитов. Для этого соотношение процентного содержания CD3⁺CD4⁺IFNγ⁺/CD3⁺CD4⁺IL-4⁺, а также CD3⁺CD8⁺IFNγ⁺/CD3⁺CD8⁺IL-4⁺ было рассчитано для каждого представителя возрастной группы, а затем определена медиана этого показателя в группе. У детей 7-12 мес. уровень Th1-лимфоцитов незначительно превышал содержание Th2-клеток. В этом возрасте наблюдалось минимальное соот-

ношение Th1-/Th2-лимфоцитов. Максимальный коэффициент, характеризующий соотношение Th1-/Th2-клеток, был отмечен в группе 8-14-летних детей.

Соотношение Т-цитотоксических лимфоцитов первого и второго порядка (Tc1/Tc2) также было минимальным у детей до года, достоверно отличаясь от показателей у детей старших возрастных групп и взрослых (табл. 1).

Относительное содержание Т-хелперов, способных под действием неспецифической стимуляции синтезировать IL-17A (Th17), находилось на стабильно низком уровне во всех исследуемых возрастных группах. Медиана их абсолютного количества была значимо повышена у детей 7-12-месячного возраста. Та же динамика характеризовала изменение содержания нецитотоксического аналога Tnc17. Следует отметить увеличение относительного содержания Tnc17 в подростковом возрасте, которому соответствовало уже упомянутое снижение содержания Th2-лимфоцитов.

Относительное содержание Treg-лимфоцитов было минимальным у детей до года, но достоверно повышалось лишь у подростков 15-18 лет. Абсолютное содержание регуляторных Т-лимфоцитов, напротив, было максимальным у детей 7-12 месяцев, достоверно отличаясь от показателей в группе 8-14-летних детей и взрослых (рис. 3).

Относительное содержание центральных CD4⁺Т-лимфоцитов памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD62L⁺) постепенно увеличивалось с возрастом, достоверно отличаясь в группе подростков 15-18 лет и взрослых от детей младших возрастных групп. Относительное содержание эффекторных CD4⁺Т-лимфоцитов памяти было минималь-

ТАБЛИЦА 1. АБСОЛЮТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ЭФФЕКТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТАРНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ: МЕДИАНА И КВАРТИЛЬНЫЙ РАЗМАХ

Субпопул. Т-лимф.	Возрастные группы					
	7-12 мес. 1	1-3 года 2	4-7 лет 3	8-14 лет 4	15-18 лет 5	25-45 лет 6
Абсолютное содержание/мкл						
Th	2762 (2, 3, 4, 5, 6) 2286-3625	1975 (1, 3, 4, 5, 6) 1751-2518	1132 (1, 2) 853-1488	856 (1, 2) 698-1082	978 (1, 2) 858-1276	855 (1, 2) 692-1026
Th1	49,76 (2, 4, 5, 6) 26,44-74,32	108,08 (1) 65,91-153,05	82,16 53,57-143,54	125,50 (1) 98,54-169,78	115,34 (1) 96,13-161,26	147,98 (1) 100,22-176,35
Th2	3,72 (5) 0,00-6,84	3,82 1,00-5,83	2,22 1,12-3,60	2,61 0,81-3,90	1,88 (1, 6) 0,00-3,78	5,73 (5) 2,20-10,50
Th17	7,75 (2, 3, 4, 5, 6) 4,19-14,47	4,26 (1) 1,53-11,02	2,76 (1) 0,84-5,59	2,93 (1) 1,87-6,03	3,33 (1) 1,47-6,92	4,59 (1) 2,40-5,83
Tc	949 (3, 4, 5, 6) 678-1359	1089 (3, 4, 5, 6) 685-1313	688 (1, 2) 506-925	529 (1, 2) 350-677	541 (1, 2) 420-718	478 (1, 2) 374-598
Tc1	24,66 (5, 6) 15,33-64,20	59,06 36,92-116,60	55,84 43,74-85,75	97,47 58,71-118,65	89,97 (1) 68,57-156,32	116,26 (1) 74,50-171,85
Tc2	5,18 (2, 3, 4, 5, 6) 2,46-7,86	2,76 (1) 0,00-4,27	1,12 (1) 0,00-2,56	1,30 (1) 0,81-2,84	1,66 (1) 0,00-3,28	1,81 (1) 0,88-3,23
Tnc17	5,69 (3, 4, 6) 3,45-11,73	3,75 2,18-7,54	2,21 (1) 0,74-5,13	1,87 (1) 0,96-3,43	4,73 2,89-7,39	1,48 (1) 1,11-2,80
Treg	34,74 (4, 6) 13,78-55,42	26,78 (6) 16,03-55,08	20,68 12,12-34,98	12,68 (1) 8,68-26,35	20,09 14,50-33,80	13,01 (2, 1) 8,51-25,99
Th1/Th2	6,94 (3, 4, 5, 6) 4,09-13,66	24,46 16,45-38,27	41,75 (1) 27,07-58,06	55,05 (1) 24,20-75,19	43,11 (1) 31,20-58,09	18,72 (1) 12,95-41,12
Tc1/Tc2	3,97 (4, 5, 6) 1,40-7,32	27,07 9,62-30,33	32,30 15,77-49,73	47,09 (1) 27,69-82,21	31,53 (1) 22,69-56,43	56,82 (1) 39,73-75,62

Примечание. Значения в скобках указывают на значимые различия в группах, $p < 0,05$.

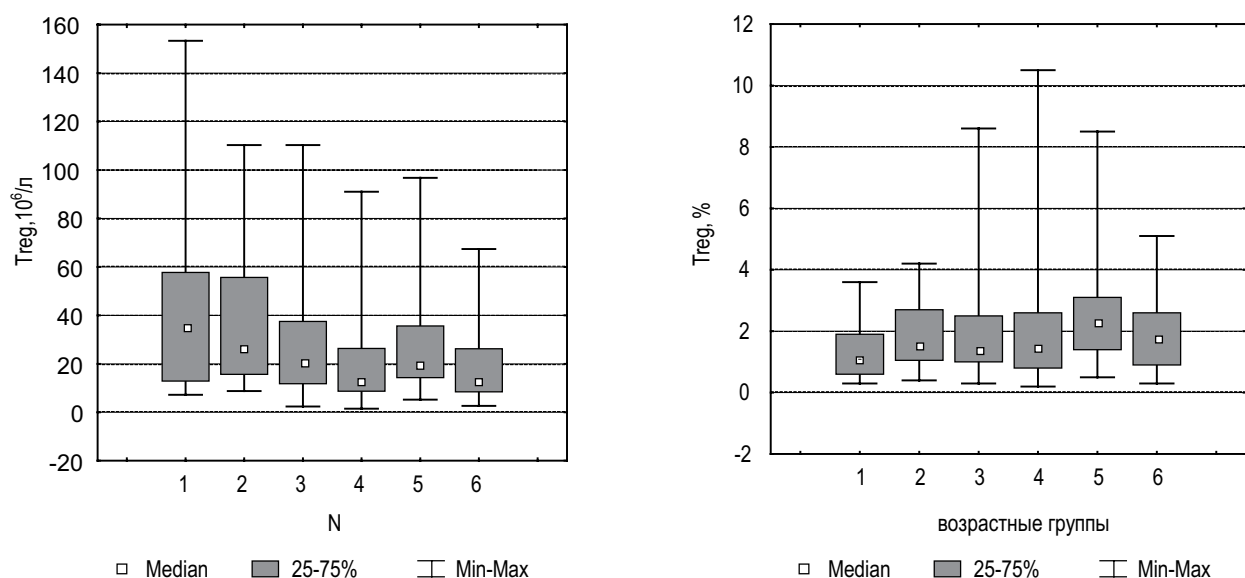


Рисунок 3. Относительное и абсолютное содержание Treg-лимфоцитов в разных возрастных группах

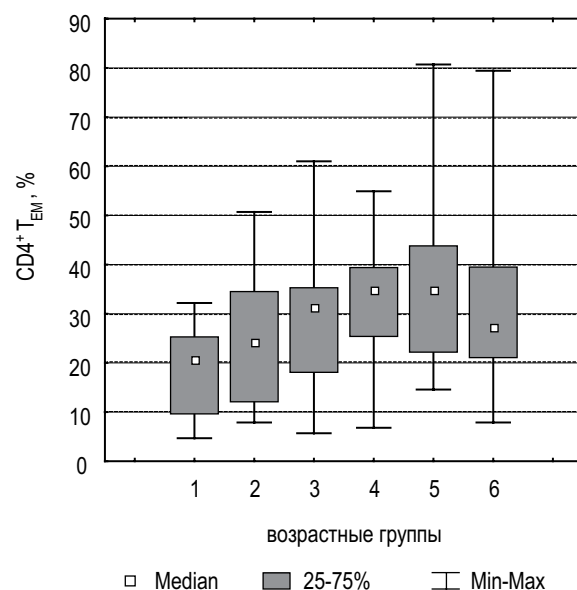
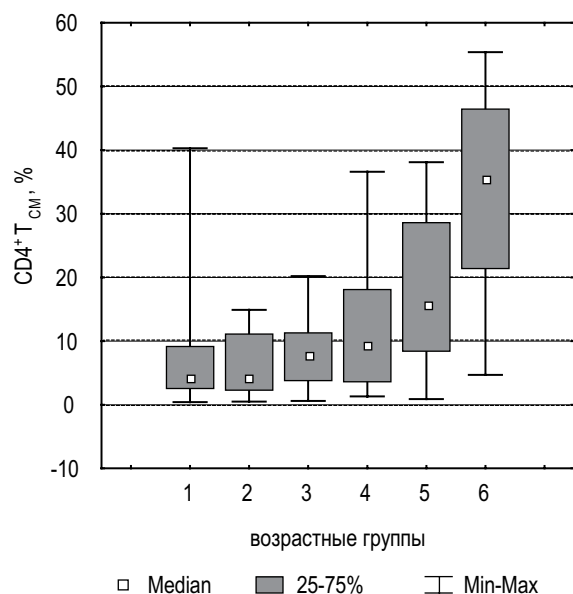


Рисунок 4. Относительное содержание центральных и эффекторных CD4⁺Т-лимфоцитов памяти в разных возрастных группах

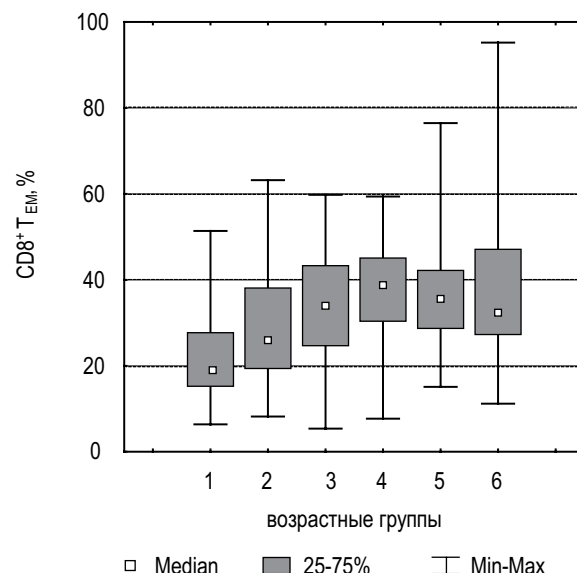
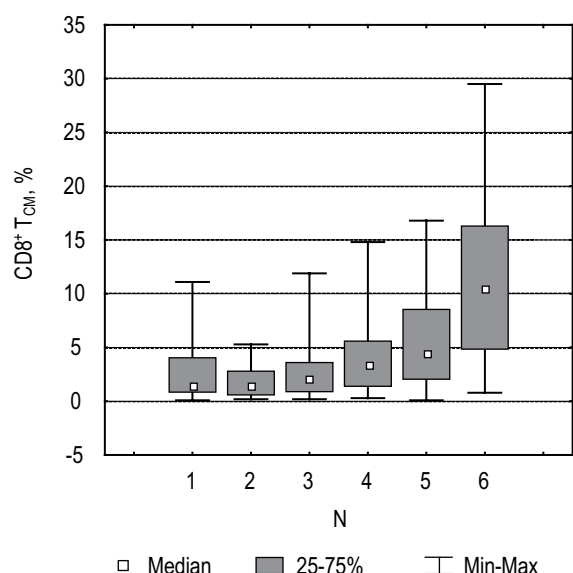


Рисунок 5. Относительное содержание центральных и эффекторных CD8⁺Т-лимфоцитов памяти в разных возрастных группах

ным у детей 7-12 месяцев, достоверно отличаясь от показателей всех остальных возрастных групп. Максимального значения относительное содержание эффекторных CD4⁺Т-лимфоцитов памяти достигало у подростков 15-18-летнего возраста (рис. 4).

Относительное содержание центральных CD8⁺Т-лимфоцитов памяти постепенно увеличивалось с возрастом, достигая статистически значимой разницы только у взрослых.

Доля эффекторных CD8⁺Т-лимфоцитов памяти была минимальной у детей 7-12 месяцев, достигая к 1-3 годам жизни значений, не отлича-

ющихся достоверно от медианы этого показателя во взрослой группе (рис. 5).

В целом общая тенденция увеличения относительного содержания с возрастом была характерна и для CD4⁺, и для CD8⁺Т-лимфоцитов памяти (рис. 6).

Что касается абсолютного содержания общего пула CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов памяти, то абсолютное количество Т-хелперов-памяти было максимальным у детей 7-12 месяцев, в остальных возрастных группах оно было достоверно ниже, чем у детей первого года жизни. Минимальное значение характеризовало содержание Т-хелперов-памяти у 8-14-летних детей. Абсо-

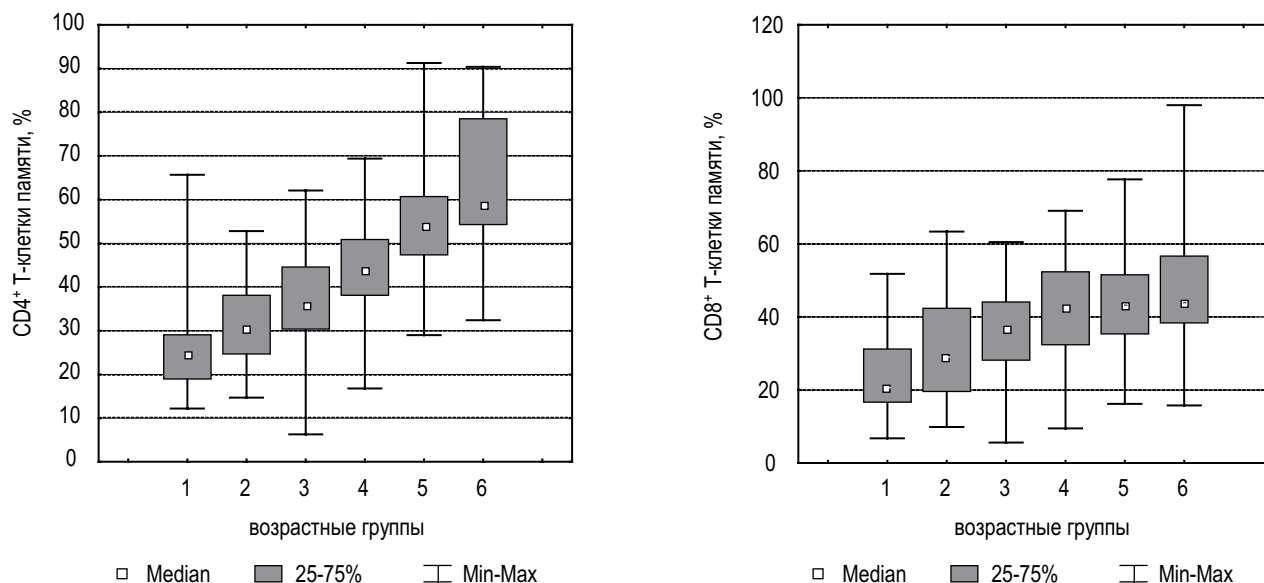
Рисунок 6. Относительное содержание CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов памяти в разных возрастных группах

ТАБЛИЦА 2. АБСОЛЮТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ: МЕДИАНА И КВАРТИЛЬНЫЙ РАЗМАХ

Т-клетки памяти	Возрастные группы					
	7-12 мес. 1	1-3 года 2	4-7 лет 3	8-14 лет 4	15-18 лет 5	25-45 лет 6
Т-клеточные субпопуляции	Абсолютное содержание/мкл					
CD4 ⁺ центральные Т-клетки памяти	119 (3) 60-309	97 (6) 41-213	84 (1, 6) 34-121	80 (6) 32-151	155 (6) 86-264	290 (2, 3, 4, 5) 193-356
CD4 ⁺ эффекторные Т-клетки памяти	456 354-709	370 276-643	308 179-487	254 186-343	320 199-467	221 165-339
CD4 ⁺ Т-клетки памяти	640 (3, 4, 5, 6) 493-766	573 (4) 435-732	387 (1) 310-560	363 (1, 2) 314-445	508 (1) 413-649	530 (1) 435-648
CD8 ⁺ центральные Т-клетки памяти	13,68 (6) 7,82-28,38	14,86 (6) 5,25-31,76	11,62 (6) 5,52-27,15	14,65 (6) 6,60-23,70	24,08 (6) 16,50-38,77	53,41 (1, 2, 3, 4, 5) 27,65-75,22
CD8 ⁺ эффекторные Т-клетки памяти	190 133-288	262 (6) 155-337	215 159-335	183 134-244	197 139-277	154 (2) 115-235
CD8 ⁺ Т-клетки памяти	224 150-326	298 180-346	235 174-360	198 136-265	246 166-292	213 163-310

Примечание. Значения в скобках указывают на значимые различия в группах, $p < 0,05$.

лютное содержание общих CD8⁺Т-лимфоцитов памяти оставалось стабильным во всех возрастных группах (табл. 2).

Обсуждение

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что определение внутриклеточной продукции цитокинов методом проточной цитометрии представляет собой бы-

стрый, чувствительный и точный метод, позволяющий оценить те изменения, которые претерпевает система Т-лимфоцитов. В течение первых 12 месяцев жизни у детей описано увеличение абсолютного и относительного содержания цитокин-секретирующих лимфоцитов [3], связанное с экспозицией множества антигенов окружения и проводимой у детей первого года жизни вакцинацией. Антиген-специфическая активация

приводит к дифференцировке Т-лимфоцитов, имеющих фенотип наивных Т-лимфоцитов ($CD45RA^+$, $IL-2^+$) в Т-лимфоцитарные эффекторные/клетки-памяти субпопуляции ($CD45RA^-CD45RO^+$; Th1, Th2, Th17, Tc1, Tc2, Tnc17 и т.д.) [4, 8]. Поскольку наивные Т-лимфоциты в основном не продуцируют $IFN\gamma$, или $IL-4$, или $IL-17A$, проточно-цитометрический анализ внутриклеточной продукции цитокинов, позволяющий оценить уровень $IFN\gamma^+$, $IL-4^+$ или $IL-17A^+$ позитивных Т-лимфоцитов, отражает в целом уровень предшествовавшей антиген-опосредованной дифференцировки Т-лимфоцитов, а, следовательно, уровень зрелости иммунной системы [3].

Результаты настоящего исследования показали, что в 7-12-месячном возрасте у детей относительное содержание Th1-лимфоцитов снижено в 8 раз, их абсолютное содержание практически в 3 раза ниже показателя взрослой группы. Еще более выраженное «отставание» характеризовало содержание Tc1-лимфоцитов (снижение в 12 и 4,7 раза соответственно для относительного и абсолютного содержания). На фоне редуцированного Th1 и Tc1-иммунитета количество Th2-лимфоцитов у 7-12-месячных детей соответствовало возрастной норме взрослых людей, а абсолютное содержание Tc2-лимфоцитов было даже выше, чем во всех остальных возрастных группах. В связи с чем индекс соотношения Th1/Th2 и Tc1/Tc2 у детей в возрасте 7-12 месяцев был минимальным. Абсолютное содержание Th17-, Tnc17-лимфоцитов и Treg у детей 7-12 месяцев превышало их содержание у взрослых. Таким образом, на 7-12 месяце жизни у ребенка наблюдается преимущественная поляризация дифференцировки Т-лимфоцитов по пути Th2 (Tc2) и Th17 (Tnc17), что, по мнению ряда авторов, способствует манифестации Th2-опосредованных аллергических заболеваний у детей первого года жизни [1, 3].

У детей старше одного года абсолютное количество Th1- и Tc1-лимфоцитов значимо не отличалось от содержания этих субпопуляций у взрослых. Абсолютное содержание Th2 и Tc2 (за исключением группы подростков) также не отличалось от значений этих показателей у взрослых. Максимальное соотношение Th1-/Th2-лимфоцитов наблюдалось у детей 8-14 лет.

В возрасте 15-18 лет на фоне снижения содержания Th2-субпопуляции увеличивалось содержание $IL-17A$ -позитивных лимфоцитов, что может способствовать предрасположенности к индукции различных аутоиммунных заболеваний в подростковом возрасте.

У взрослых людей 25-45-летнего возраста содержание Th1-субпопуляции преобладало над содержанием Th2 в 18,7 раз, Tc1 над Tc2 — в 56,8 раз.

Изучение коррелятивных связей между содержанием различных эффекторных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов и $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов памяти показало, что наибольший коэффициент корреляции связывает показатели содержания $CD4^+$ Т-клеток-памяти и Th1-субпопуляции лимфоцитов ($r = 0,646$, $p = 0,000000$). В меньшей степени количество $CD4^+$ Т-лимфоцитов памяти коррелирует с числом Th2-лимфоцитов ($r = 0,267$, $p = 0,000258$). Еще меньше ассоциация между $CD4^+$ Т-клетками памяти и Th17 —лимфоцитами ($r = 0,082$, $p = 0,0269843$). Достаточно выраженная связь присутствует также между содержанием $CD8^+$ Т-лимфоцитов-памяти и Tc1-лимфоцитами ($r = 0,499$, $p = 0,000000$). Отсутствует коррелятивная связь между содержанием $CD8^+$ Т-лимфоцитов-памяти и Tc2/Tnc17 субпопуляциями Т-клеток.

Таким образом, увеличение по мере взросления ребенка относительного содержания Th1- и Tc1-субпопуляций лимфоцитов непосредственно связано с формированием пула Т-лимфоцитов памяти.

Список литературы

1. Иммунология детского возраста / Под ред. проф. Щербины А.Ю. и проф. Пашанова Е.Д. — М.: ИД Медпрактика, 2006. — 431 с.
2. Annunziato F., Romagnani S. Heterogeneity of human effector $CD4^+$ T cells // *Arthritis Res Ther.* — 2009. — 11 (6). — P. 257.
3. Buck R.H., Cordle C.T., Thomas D.J., Winship T.R., Schaller J.P., Dugle J.E. Longitudinal study of intracellular T cell cytokine production in infants compared to adults // *Clin. Exp. Immunol.* — 2002. — 128 (3). — P. 490-7.
4. Caruso A., Licenziati S., Morelli D., Fiorentini S., Ricotta D., Malacarne F., Sfondrini L., Balsari A. Segregation of type 1 cytokine production in human peripheral blood lymphocytes: phenotypic differences between IFN -gamma and $IL-2$ -producing cells in the $CD8^+$ T cell subset // *Eur. J. Immunol.* — 1998. — 28 (11). — P. 3630-8.
5. Gardner E.M., Murasko D.M. Age-related changes in Type 1 and Type 2 cytokine production in humans // *Biogerontology.* — 2002. — 3 (5). — P. 271-90.
6. Gasparoni A., Ciardelli L., Avanzini A., Castellazzi A.M., Carini R., Rondini G., Chirico G. Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults // *Biol Neonate.* — 2003. — 84 (4). — P. 297-303.
7. Liu S.J., Tsai J.P., Shen C.R., Sher Y.P., Hsieh C.L., Yeh Y.C., Chou A.H., Chang S.R., Hsiao K.N., Yu F.W., Chen H.W. Induction of a

distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor-beta and interleukin-6 // J. Leukoc Biol. – 2007. – 82 (2). – P. 354-60.

8. Mosmann T.R., Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more // Immunol. Today. – 1996. – 17 (3). – P. 138-46.

9. Mosmann T.R., Li L., Sad S. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns // Semin. Immunol. – 1997. – 9 (2). – P. 87-92.

10. Murphy K.M., Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances // Nat. Immunol. – 2010. – 11 (8). – P. 674-80.

11. Pala P., Hussell T., Openshaw P.J. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines // J. Immunol Methods. 2000 Sep 21; 243 (1-2):107-24.

12. Prezzi C., Casciaro M.A., Francavilla V., Schiaffella E., Finocchi L., Chircu L.V., Bruno G., Sette A., Abrignani S., Barnaba V. Virus-specific

CD8(+) T cells with type 1 or type 2 cytokine profile are related to different disease activity in chronic hepatitis C virus infection // Eur. J. Immunol. – 2001. – 31 (3). – P. 894-906.

13. Vukmanovic-Stejic M., Vyas B., Gorak-Stolinska P., Noble A., Kemeny D.M. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes // Blood. – 2000. – 1; 95 (1). – P. 231-40.

14. Ye Z., Tang C., Xu S., Zhang B., Zhang X., Moyana T., Yang J., Xiang J. Type 1 CD8+ T cells are superior to type 2 CD8+ T cells in tumor immunotherapy due to their efficient cytotoxicity, prolonged survival and type 1 immune modulation // Cell Mol Immunol. – 2007. – 4 (4). – P. 277-85.

поступила в редакцию 10.12.2011

отправлена на доработку 06.01.2012

принята к печати 12.01.2012