

# ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ ХЕЛПЕРОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ CD45RA- И CD31-МАРКЕРЫ, У ДЕТЕЙ ПОСЛЕ ТИМЭКТОМИИ, ВЫПОЛНЕННОЙ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ВРОЖДЕННОГО ПОРОКА СЕРДЦА

Ровда Ю.И.<sup>1</sup>, Шмелевич С.А.<sup>2</sup>, Шабалдин А.В.<sup>3</sup>, Лукоянычева Е.Б.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, Кемерово, Россия

<sup>2</sup> МБУЗ «Кемеровский кардиологический диспансер», г. Кемерово, Россия

<sup>3</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

<sup>4</sup> ГАУЗ «Кемеровская областная клиническая больница», г. Кемерово, Россия

**Резюме.** Тимэктомия является этапом хирургического лечения некоторых врожденных пороков сердца. Тимус является центральным органом иммунной системы, где идет Т-лимфопоэз и формируется центральная толерантность к аутоантигенам. Пик функциональной активности тимуса приходится на пренатальный и ранний постнатальный периоды. Проведение тимэктомии в неонатальном периоде и в младенчестве может ограничивать эти функции. Подавление Т-лимфопоэза у детей с тимэктомией может быть оценено по субпопуляции тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>). Для выполнения поставленной задачи проведена оценка субпопуляции тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> у детей (n = 40), перенесших тимэктомию при хирургическом лечении врожденного порока сердца в неонатальном или младенческом периодах постнатальной жизни. Сравнение проводилось с детьми, перенесшими в те же возрастные периоды хирургическое лечение врожденного порока сердца без тимэктомии (n = 12), и со здоровыми детьми (n = 23). Выявлено, что тимэктомия при хирургическом лечении врожденного порока сердца приводит к снижению тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> в периферической крови. Ранний возраст проведения этой операции способствует развитию дефицита в периферической крови как тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>, так и Т-лимфоцитов хелперов в целом (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>). Количество в периферической крови тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> отрицательно коррелирует с временем после проведения данной операции у детей с врожденными пороками сердца.

**Ключевые слова:** врожденные пороки сердца, тимэктомия, CD31, CD45RA

## Адрес для переписки:

Шабалдин Андрей Владимирович  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»  
652002, Россия, г. Кемерово, Сосновы бульвар, 6.  
Тел.: 8 (903) 907-51-97.  
E-mail: weit2007@yandex.ru

## Address for correspondence:

Shabalдин Andrey V.  
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases  
652002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy blvd, 6.  
Phone: 7 (903) 907-51-97.  
E-mail: weit2007@yandex.ru

## Образец цитирования:

Ю.И. Ровда, С.А. Шмелевич, А.В. Шабалдин, Е.Б. Лукоянычева, «Особенности субпопуляций т-лимфоцитов хелперов, экспрессирующих CD45RA и CD31 маркеры, у детей после тимэктомии, выполненной при хирургическом лечении врожденного порока сердца» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 2. С. 119–128.  
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-119-128

© Ровда Ю.И. и соавт., 2016

## For citation:

Yu.I. Rovda, S.A. Shmulevich., A.V. Shabalдин, E.B. Lukoyanycheva, "Subpopulation profiles of T helper cells expressing CD45RA and CD31 markers in children after thymectomy performed upon surgical treatment of congenital heart disease", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 2, pp. 119–128.  
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-119-128

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-2-119-128>

## SUBPOPULATION PROFILES OF T HELPER CELLS EXPRESSING CD45RA AND CD31 MARKERS IN CHILDREN AFTER THYMECTOMY PERFORMED UPON SURGICAL TREATMENT OF CONGENITAL HEART DISEASE

Rovda Yu.I.<sup>a</sup>, Shmulevich S.A.<sup>b</sup>, Shabaldin A.V.<sup>c</sup>, Lukoyanycheva E.B.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Kemerovo State Medical Academy, Kemerovo, Russian Federation

<sup>b</sup> Kemerovo Cardiology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

<sup>c</sup> Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

<sup>d</sup> Kemerovo Regional Hospital, Kemerovo, Russian Federation

**Abstract.** Thymectomy is a stage of surgery when treating some congenital heart defects. Thymus gland is the central organ of immune system. This organ is the primary site of T-cell lymphopoiesis and central tolerance to autoantigens during fetal and early postnatal life. If performed neonatally or in infancy, the thymectomy may cause restriction of these immune functions. Suppression of T-cell lymphopoiesis in children with thymectomy can be estimated as a subpopulation of thymic naive T helper cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>). To perform this task, we evaluated subpopulations of thymic naive T helper lymphocytes with CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> phenotype in the children (n = 40) who underwent thymectomy during surgical treatment of congenital heart diseases in neonates, or in early postnatal life. Their data were compared with children who underwent surgical treatment of congenital heart disease without thymectomy at the same age periods (n = 12), and healthy children (n = 23). We have revealed that thymectomy in frames of surgery of congenital heart disease leads to reduced thymic naive T helper lymphocytes with CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> phenotype in peripheral blood. Early execution of thymectomy is associated with deficiency of the thymic naive T helper lymphocytes in the peripheral blood, as well as a decrease in T helper cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>). The number thymic naive T helper lymphocytes in peripheral blood negatively correlated with terms elapsed after the surgery of congenital heart defects in children.

**Keywords:** Congenital heart anomalies, thymectomy, CD31, CD45RA

### Введение

Эпидемиологические исследования показали, что врожденные пороки сердца (ВПС) имеют доминирующее значение в структуре врожденных пороков и аномалий развития плода и новорожденного ребенка и определяют процент перинатальной и младенческой смертности во многих регионах мира [16]. Проведение хирургического лечения ВПС связано с выполнением тимэктомии для улучшения визуализации структур сердца. Известно, что тимус является центральным органом иммунной системы, где происходят процессы созревания Т-лимфоцитов и формирования центральной толерантности [12]. Кроме того, в тимусе синтезируются пептиды, обладающие активирующим действием на Т-лимфоциты периферических органов иммунной системы. С этих позиций удаление тимуса, особенно в периоды новорожденности или младенчества, должно быть критичным для формирования и адаптации Т-клеточного звена иммунной системы в постнатальном периоде. Различные исследования, посвященные развитию иммунодефицитных состо-

яний у детей с ВПС и с тимэктомией, показали противоречивые результаты [2, 14]. Оценка отдаленного иммунологического катамнеза пациентов, перенесших в раннем возрасте тимэктомию при хирургическом лечении ВПС, осложняется клиническими проявлениями основного заболевания либо смертью пациента.

В конце прошлого и начале нынешнего века были охарактеризованы несколько поверхностных молекул на Т-лимфоцитах, указывающих на их «недавнее» покидание тимуса. В литературных источниках эти клетки обозначаются как наивные Т-лимфоциты тимического происхождения [11, 15].

Деление Т-лимфоцитов на наивные и зрелые стало возможным при обнаружении особенностей экспрессии на лимфоцитах изоформ поверхностной молекулы CD45. Молекула CD45 — трансмембранный белок, обладающий тирозин-фосфотазной активностью, с молекулярной массой около 220 кДа [15]. За счет альтернативного сплайсинга с гена CD45 может синтезироваться несколько изоформ конечной молекулы. Наиболее извест-

ными их них являются CD45RA (наиболее полная форма молекулы) и CD45RO (низкомолекулярная форма). Эксперименты *in vitro* показали, что в ходе культивирования моноклеонов фенотип CD45RO-CD45RA<sup>bright</sup> постепенно заменяется на CD45RO<sup>bright</sup>CD45RA<sup>-</sup>, причем последняя популяция способна отвечать пролиферацией на внесение антигена значительно быстрее и эффективнее первой [15]. Дополнительное исследование (наличие или отсутствие экспрессии) других поверхностных маркеров, в частности рецепторов к хемокинам (CCR1, CCR3, CCR5, CCR7) и молекулы селектина (CD62L), на субпопуляции Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> показало правомочность выделения наивных Т-лимфоцитов хелперов. Так, наличие на наивных Т-хелперных лимфоцитах молекулы CD62L и CCR7 позволяет им эффективно проникать из крови в тимус-зависимые зоны периферических органов иммунной системы через вены с высоким эндотелием [1].

В настоящее время в наивных Т-хелперных лимфоцитах принято выделять две субпопуляции: тимические (вышедшие из тимуса) и центральные (прошедшие несколько раундов деления в периферических органах иммунной системы). На тимических наивных Т-лимфоцитах экспрессируется поверхностная адгезивная молекула CD31, а на центральных — нет [10]. CD31, или PECAM-1, относится к суперсемейству иммуноглобулинов, содержит 6 иммуноглобулиновых доменов C2-типа. Она представлена на весьма широком спектре клеток, к которым относятся лимфоциты (Т-, В- и НК-клетки), гранулоциты, макрофаги, дендритные клетки эндотелия сосудов, а также тромбоциты [8]. Лигандами для нее являются как сами CD31 других типов клеток (гомотипическое взаимодействие), так и другие молекулы — CD38, CD177,  $\alpha\text{v}\beta 3$ -интегрин и т.д. (гетеротипическое взаимодействие) [1]. Основное доказательство, что Т-лимфоциты, экспрессирующие CD31, являются клетками, «недавно» покинувшими тимус, базируется на связи между экспрессией CD31 на Т-лимфоцитах и на наличии в них молекулярных маркеров реаранжировки Т-клеточного рецептора (T-cell receptor excision circles — TREC) [6, 7, 8]. Именно за счет реаранжировки Т-клеточного рецептора тимоцитов формируется центральная толерантность и иммунная компетентность. В периферических органах иммунной системы для накопления пула лимфоцитов происходит несколько этапов их деления без реаранжировки вариационной области Т-клеточного рецептора [12]. В ходе этих делений Т-лимфоциты теряют TREC, и на этих клетках уже не экспрессируется молекула CD31 [7].

В настоящее время фенотипом наивного тимического Т-лимфоцита принято считать следующий состав поверхностных молекул: CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD45RO-CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>. Оценка именно этой субпопуляции лимфоцитов может дать информацию о значимости тимэктомии в формировании иммунной компетентности у детей, перенесших эту операцию.

Исходя из этого, целью настоящей работы была оценка субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови по особенностям экспрессии CD45RA и CD31 у детей, перенесших тимэктомию при хирургическом лечении ВПС.

## Материалы и методы

Для выполнения поставленной задачи провели обследование 52 детей с ВПС, находившихся на стационарном лечении в детском отделении Кемеровского кардиологического диспансера и имеющих в анамнезе этап хирургического лечения ВПС. Среди детей были выделены те, у которых во время хирургического лечения была выполнена тимэктомия. Эти пациенты составили основную группу (n = 40). Дети, которым во время хирургического этапа лечения ВПС тимэктомия не проводилась, сформировали группу сравнения (n = 12). Распределение детей по диагнозам международной классификации болезней 10 пересмотра (МКБ 10) в основной группе и группе сравнения представлено в таблице 1. Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ. У всех родителей взято информированное согласие об участии их детей в научном исследовании по теме «Разработка перспективных моделей оказания медицинской помощи при болезнях системы кровообращения (ОКС, периферический атеросклероз, ВПС, ППС), в том числе разработка медицинских информационных систем прогнозирования и управления рисками сердечно-сосудистых заболеваний на основании эндогенных (генетических и биохимических) и экзогенных (аэрополлютанты) показателей».

Контрольная группа была представлена 23 условно здоровыми детьми (не имеющих ВПС в анамнезе), сопоставимыми по полу и возрасту с детьми основной группы и группы сравнения. Контрольная группа формировалась на базе детских поликлиник г. Кемерово. У всех родителей в контрольной группе также было взято информированное согласие об участии их и их детей в научном исследовании по заданной теме. Средний возраст детей основной группы, группы сравнения и в контроле, а также гендерный состав групп представлен в таблице 2.

**ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ВПС СОГЛАСНО МКБ 10 В ОСНОВНОЙ ГРУППЕ И ГРУППЕ СРАВНЕНИЯ**

Основная группа			Группа сравнения		
Диагноз ВПС по МКБ 10	Абсолютное число	Удельный вес, %	Диагноз ВПС по МКБ 10	Абсолютное число	Удельный вес, %
Q20.3	4	10,00	Q22.1	3	25,00
Q21.0	16	40,00	Q24.8	1	8,33
Q21.1	4	10,00	Q25.0	6	50,00
Q21.2	8	20,00	Q25.1	2	16,67
Q21.3	4	10,00	Всего	12	100,00
Q22.0	3	7,50			
Q25.1	1	2,50			
Всего	40	100,00			

**ТАБЛИЦА 2. ВОЗРАСТНЫЕ И ГЕНДЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОБСЛЕДОВАННЫХ ДЕТЕЙ**

Показатель	1. Контрольная группа, n = 23			2. Группа сравнения, n = 12			3. Основная группа, n = 40		
	Me	LQ	UQ	Me	LQ	UQ	Me	LQ	UQ
Возраст на момент обследования, в месяцах	32,10	45,34	18,87	31,00	37,36	24,64	31,21	51,99	10,42
Срок после операции, в месяцах	нет	нет	нет	18,70	32,66	4,74	19,24	36,52	1,96
Возраст на момент операции, в месяцах	нет	нет	нет	8,30	18,56	0,06	7,93	19,57	0,05
Объем тимуса, см <sup>3</sup>	24,25	29,14	19,36	23,65	29,51	17,79	0,53*	2,17	0,05
Девочки, в %	30,43	нет	нет	33,33	нет	нет	37,50	нет	нет
Мальчики, в %	69,57	нет	нет	66,67	нет	нет	62,50	нет	нет

**Примечание.** Me – медиана, LQ – верхняя граница межквартильного интервала, UQ – нижняя граница межквартильного интервала. Все сравнения  $p_{1,2}$ ,  $p_{1,3}$  и  $p_{2,3} > 0,05$ , кроме объема тимуса \* –  $p_{1,3} < 0,001$  и  $p_{2,3} < 0,001$ .

Всем детям проведено ультразвуковое исследование тимуса. На основе этих данных был рассчитан объем тимуса в см<sup>3</sup>. В основной группе у 33 детей (82,5%) тимус не лоцировался, у 6 детей (15,0%) объем тимуса находился в пределах 1-2 см<sup>3</sup> и у 1 ребенка (2,5%) был равен 8,62 см<sup>3</sup>. В таблице 2 показаны достоверно значимые различия по объему тимуса между основной группой, группой сравнения и контролем.

Оценку субпопуляций Т-лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 с программным обеспечением CXP (Beckman Coulter, USA) с помощью определения экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов (CD): CD3, CD4, CD45RA, CD31<sup>+</sup>, которые выделяли из периферической крови. Для проведения иммунофенотипирования Т-лимфоцитов

применяли четырехцветную комбинацию конъюгированных моноклональных антител в реакции прямой иммунофлуоресценции, используя антиCD3-PC7, антиCD4-PC5, антиCD45RA-PE, антиCD31-FITC (Beckman Coulter, USA). Соотношение объема антител к количеству лимфоцитов, время и температура инкубаций соответствовали прилагаемым инструкциям к каждому конъюгированному моноклональному антителу. Для снятия результатов был разработан протокол проточной цитофлуориметрии, отраженный на рисунке 1-4. Подготавливали 4 окна (соответствуют рисункам 1 [см. 3-ю стр. обложки], 2, 3, 4). На рисунке 1 показано гейтирование облака лимфоцитов (V область), выделенных по их размеру (прямое [малоугловое] светорассеяние – forward

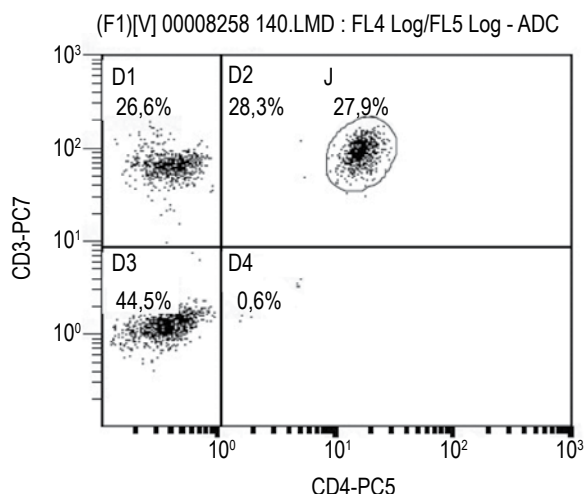


Рисунок 2. Субпопуляции лимфоцитов, экспрессирующие CD3- и CD4-маркеры дифференцировки

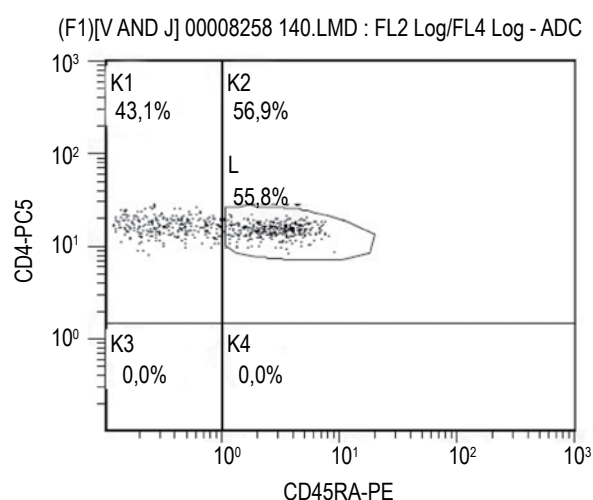


Рисунок 3. Субпопуляции Т-лимфоцитов хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), экспрессирующие CD4- и CD45RA-маркеры дифференцировки

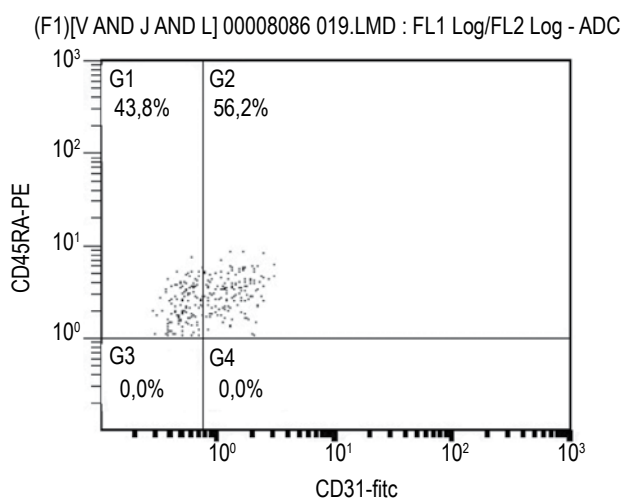


Рисунок 4. Субпопуляции наивных Т-лимфоцитов хелперов (CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), экспрессирующие CD45RA- и CD31-маркеры дифференцировки

scatter — FS) и по внутриклеточной организации (боковое светорассеяние — side scatter — SS).

Следующее окно (рис. 2) было связано с выделенной областью V (первичное гейтирование лимфоцитов) и отражало распределения лимфоцитов по особенностям экспрессии CD3 (CD3-PC7) и CD4 (CD4-PC5). Для дальнейшего исследования были гейтированы лимфоциты CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (область J). В этом окне отражалось относительное содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов (указан процент), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> (указан процент), CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup> (указан процент) и CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> (указан процент). Последняя субпопуляция является моноцитами, попавшими в гейт V. Как видно из рисунка 2, этих клеток было менее 1%, что указывает на чистоту первичного выделения лимфоцитов по их размеру и внутриклеточной организации.

В третьем окне (рис. 3) показано распределение Т-лимфоцитов с маркерами дифференцировки CD4 и CD45RA. Это окно связано с гейтом J (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), и поэтому указанное в нем процентное содержание клеток с фенотипами CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> и CD4<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> отражает содержание этих субпопуляций относительно CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов. Интересующей субпопуляцией являлась CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, которая в этом окне также выделялась в отдельный гейт L.

В конечном четвертом окне (рис. 4) представлены субпопуляции наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, так как это окно было связано с гейтом L. Субпопуляционный состав этих клеток был определен по экспрессии CD45RA и CD31. Как видно из рисунка, в области G2 были представлены лимфоциты, экспрессирующие CD31 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>) — тимические наивные Т-лимфоциты хелперы, а в области G1 — не экспрессирующие этот маркер (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>) — центральные наивные Т-лимфоциты хелперы. Также из рисунка видно, что в областях G3 и G4 клеток не обнаружено. Это указывает на чистоту первично выделенных лимфоцитов и на правомочность полученных результатов.

Всем пациентам был выполнен общий анализ крови с подсчетом общих лейкоцитов и их популяций (лейкоцитарная формула), что позволило рассчитать субпопуляционный состав Т-лимфоцитов хелперов в абсолютных значениях (тысяч клеток на мкл).

Анализ данных проводили с помощью стандартных медико-статистических методов, используя пакет прикладных программ Statistica for Windows, 6.0 (StatSoft, USA, 1999). Непараметрические количественные показатели сравнивали с помощью критерия Манна—Уитни, а для выявления ассоциативных связей проводили корре-

ляцию по Спирмену. Результаты считали статистически значимыми при ошибке менее 5%, что соответствует медико-биологическим исследованиям.

## Результаты

Проведенное исследование показало (табл. 3), что популяционный состав лейкоцитов периферической крови у детей основной группы был сопоставим с контролем, и достоверно значимых отличий по относительному и абсолютному содержанию основных популяций лейкоцитов между этими группами не выявлено ( $p > 0,05$ ). У детей с ВПС, но без тимэктомии (группа сравнения) отмечено повышение относительного содержания лимфоцитов периферической крови. По этому показателю группа сравнения достоверно отличалась как от контрольной ( $p < 0,05$ ), так и от основной группы ( $p < 0,05$ ). В то же время абсолютное количество лимфоцитов в трех группах было сопоставимо ( $p > 0,05$ ).

Исследование субпопуляционного состава Т-лимфоцитов хелперов ( $CD3^+CD4^+$ ) в периферической крови у обследованных детей показало следующее (табл. 4). В основной группе (дети с ВПС и тимэктомией) относительное и абсолютное количество Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом  $CD3^+CD4^+$  было достоверно ниже, чем в контрольной группе и в группе сравнения ( $p < 0,001$ ). Удельный вес наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом  $CD3^+CD4^+CD45RA^+$  и их абсолютное количество в периферической крови были также достоверно ниже, чем в контрольной группе и группе сравнения ( $p < 0,01$  для относи-

тельных показателей и  $p < 0,05$  для абсолютных). Аналогичная ситуация выявлена для субпопуляции тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом  $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^+$ . Относительное и абсолютное количество этих клеток было достоверно ниже в основной группе по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,01$  для относительных показателей и  $p < 0,05$  для абсолютных).

Группа сравнения (дети с ВПС, но без тимэктомии) имела достоверно значимые отличия по субпопуляционному составу Т-лимфоцитов хелперов от группы контроля. Достоверно значимые отличия по этим показателям от основной группы представлены в таблице 4. Относительное и абсолютное количество Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом  $CD3^+CD4^+$  достоверно не отличалось от контрольной группы ( $p > 0,05$ ). Удельный вес и абсолютное количество наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом  $CD3^+CD4^+CD45RA^+$  были достоверно выше, чем в контрольной группе ( $p < 0,01$  для относительного показателя и  $p < 0,05$  для абсолютного). Сравнимая ситуация была получена и для субпопуляции тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом  $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^+$ , абсолютное и относительное количество которых было достоверно выше в группе сравнения, чем в контроле ( $p < 0,01$  для относительного показателя и  $p < 0,05$  для абсолютного).

Таким образом, исследование показало, что тимэктомия приводит к уменьшению абсолютного числа тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов в периферической крови. Из литера-

ТАБЛИЦА 3. ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ЛЕЙКОЦИТОВ У ОБСЛЕДОВАННЫХ ДЕТЕЙ

Показатель	1. Контрольная группа, n = 23			2. Группа сравнения, n = 12			3. Основная группа, n = 40		
	Me	LQ	UQ	Me	LQ	UQ	Me	LQ	UQ
Лейкоциты, тыс/мкл	6,95	8,02	5,88	7,62	8,98	6,26	7,13	9,66	4,59
Эозинофильные гранулоциты, %	3,51	5,61	1,42	4,10	5,40	2,80	3,40	5,64	1,16
Палочкоядерные гранулоциты, %	1,07	1,90	0,24	1,03	1,78	0,28	0,78	2,12	-0,57
Сегментоядерные гранулоциты, %	36,21	48,02	24,41	35,40	48,08	22,72	36,53	51,85	21,20
Лимфоциты, %	50,14	61,79	38,50	52,2*	66,16	38,24	50,88**	63,71	38,04
Лимфоциты, тыс./мкл	3,25	4,01	2,49	3,47	4,41	2,50	3,43	4,96	2,36
Моноциты, %	8,86	10,32	7,40	8,20	10,59	5,81	8,83	12,47	5,18

**Примечание.** Me – медиана, LQ – верхняя граница межквартильного интервала, UQ – нижняя граница межквартильного интервала. Все сравнения  $p_{1,2}$ ,  $p_{1,3}$  и  $p_{2,3} > 0,05$ , кроме относительного содержания лимфоцитов в периферической крови \* –  $p_{1,2} < 0,05$  и  $p_{2,3} < 0,05$ .

**ТАБЛИЦА 4. ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ ХЕЛПЕРОВ У ОБСЛЕДОВАННЫХ ДЕТЕЙ**

Показатель	1. Контрольная группа, n = 23			2. Группа сравнения, n = 12			3. Основная группа, n = 40		
	Me	LQ	UQ	Me	LQ	UQ	Me	LQ	UQ
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , %	39,64	46,41	32,88	39,80*	41,44	38,16	31,88	40,90	22,85
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , абс	1,87	2,12	1,62	1,88*	2,24	1,53	0,86	1,17	0,55
CD45RA <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , % от CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	54,43	63,44	45,42	63,40	68,23	58,57	43,38	59,53	27,22
CD45RA <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , тыс./мкл	0,58	0,75	0,41	1,18	1,35	1,02	0,28	0,42	0,15
CD45RA <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> , % от CD45RA <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	81,64	88,51	74,77	85,80	89,15	82,45	70,93	86,30	55,55
CD45RA <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> , тыс./мкл	0,52	0,66	0,37	1,02	1,17	0,86	0,23	0,36	0,10

**Примечание.** Me – медиана, LQ – верхняя граница межквартильного интервала, UQ – нижняя граница межквартильного интервала. Все сравнения имеют достоверно значимые различия  $p_{1,2}$ ,  $p_{1,3}$  и  $p_{2,3} < 0,05$ , кроме относительного и абсолютного содержания в периферической крови Т-лимфоцитов хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) в контроле и в группе сравнения \* –  $p_{1,2} > 0,05$ .

турных данных известно, что после тимэктомии количество этих клеток постепенно снижается в периферической крови. Для подтверждения этого факта провели корреляционное исследование между сроком после проведенной тимэктомии и временем самой тимэктомии с одной стороны и субпопуляционным составом Т-лимфоцитов хелперов периферической крови с другой (табл. 5).

Из таблицы 5 видно, что между уровнями субпопуляций Т-лимфоцитов хелперов с одной стороны и сроком тимэктомии и временем после нее с другой имеются достоверно значимые

корреляции. Достоверно значимая положительная корреляция достигнута для пары «относительное содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> – возраст на момент тимэктомии» ( $R = 0,37$ ;  $p < 0,05$ ). Эти данные указывают, что чем раньше проведена тимэктомия, тем меньше в периферической крови субпопуляции (относительно других субпопуляций) Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. В то же время для абсолютного числа Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> достоверно значимой корреляции с возрастом проведения тимэктомии не выявлено. Достоверно значимая положительная корреляция по-

**ТАБЛИЦА 5. КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПО СПИРМЕНУ МЕЖДУ СРОКОМ ТИМЭКТОМИИ И ВРЕМЕНЕМ ПОСЛЕ НЕЁ С ОДНОЙ СТОРОНЫ И СУБПОПУЛЯЦИОННЫМ СОСТАВОМ Т-ЛИМФОЦИТОВ ХЕЛПЕРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ С ДРУГОЙ**

Показатель	Срок после тимэктомии, в месяцах			Возраст на момент тимэктомии, в месяцах		
	Spearman R	t(N-2)	p-level	Spearman R	t(N-2)	p-level
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , %	0,2447	1,5560	0,1280	0,3741	2,4867	0,0174
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , абс	0,0059	0,0362	0,9713	0,0741	0,0403	0,9681
CD45RA <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , % от CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	-0,4199	-2,8518	0,0070	0,0168	0,1038	0,9179
CD45RA <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , тыс./мкл	-0,3543	-2,3357	0,0249	0,0337	0,2081	0,8363
CD45RA <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> , % от CD45RA <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	-0,3416	-1,9450	0,0591	0,4603	3,1965	0,0028
CD45RA <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> , тыс./мкл	-0,3816	-1,9850	0,0471	0,1229	0,7635	0,4499

**Примечание.** Выделены достоверно значимые уровни корреляций.

лучена и для пары «относительное содержание  $CD4^+CD45RA^+CD31^+$  — возраст на момент тимэктомии» ( $R = 0,46$ ;  $p < 0,05$ ). Этот результат указывает на тот факт, что чем раньше проведена тимэктомия, тем меньше в периферической крови субпопуляции (относительно других субпопуляций) тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом  $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^+$ . Для абсолютного количества лимфоцитов с таким фенотипом достоверно значимой корреляции с возрастом тимэктомии не получено. Абсолютное количество лимфоцитов с различными фенотипами зависит от общего количества лейкоцитов и их популяционного состава, но эти показатели достаточно лабильны. Именно этим можно объяснить отсутствие корреляций между абсолютным количеством Т-лимфоцитов хелперов и тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с возрастом проведения тимэктомии.

Срок после тимэктомии отрицательно достоверно коррелировал с абсолютным и относительным количеством в периферической крови наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом  $CD3^+CD4^+CD45RA^+$  ( $R = 0,42$ ;  $p < 0,01$  — для относительного содержания и  $R = 0,35$ ;  $p < 0,05$  — для абсолютного содержания). Эти данные указывают на тот факт, что чем больше времени прошло после тимэктомии, тем меньше в периферической крови обнаруживалось наивных Т-лимфоцитов хелперов, причем как относительно других субпопуляций, так и в абсолютных значениях. Кроме того, получена отрицательная достоверно значимая корреляция между абсолютным содержанием в периферической крови тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом  $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^+$  и сроком после тимэктомии ( $R = 0,38$ ,  $p < 0,05$ ). Эти данные подтверждают сформулированный выше посыл о том, что чем больше времени прошло после тимэктомии, тем меньше в периферической крови остается тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов.

Таким образом, основным результатом проведенного исследования стало доказательство связи между тимэктомией и временем после ее проведения и уменьшением в периферической крови тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов.

## Обсуждение

Тимус является основным местом Т-клеточного лимфопоэза в пренатальный и ранний постнатальный периоды. Основная функция тимуса связана с формированием центральной толерантности к аутоантигенам [12]. Этот процесс обеспечивается индуктивным

микроокружением, пролиферацией тимоцитов, а на молекулярном уровне — V(D)J рекомбинациями в  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепях Т-клеточного рецептора (ТКР) [13]. При этих рекомбинациях формируются иссеченные из генов ТКР внехромосомные ДНК кольца, обозначаемые как Т-cell receptor excision circles — TREC. Высокий уровень sjTREC (signal joint) в тимоцитах связан с рекомбинациями в D-локусе  $\alpha$ -цепи ТКР [8]. В субпопуляции лимфоцитов периферической крови с фенотипом  $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^+$  уровень sjTREC незначительно ниже, чем в тимоцитах [8]. Длина теломеров и уровень активности теломеразы были значительно больше у субпопуляции  $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^+$  по сравнению с лимфоцитами  $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^-$  [1, 6]. Приведенные результаты исследований указывают на то, что  $CD31^+$  наивные Т-хелперы можно рассматривать в качестве одной из самых слабо дифференцированных популяций, сравнительно недавно покинувших тимус Т-клеток [1]. С этих позиций проведенный анализ субпопуляции  $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^+$  у детей после тимэктомии можно сопоставить с ранее выполненными работами по анализу уровней TREC в лимфоцитах периферической крови у детей после тимэктомии.

Надо отметить, что вопрос о формировании Т-клеточного иммунодефицита у детей с ранней тимэктомией остается открытым [13]. Однако тимэктомия в период новорожденности или в первые месяцы жизни может прерывать еще сохраняющийся процесс формирования центральной толерантности на аутоантигены. Более того, ряд исследователей показали полноценное функционирование тимуса в зрелом возрасте [3, 5]. Соответственно, встает вопрос о риске развития аутоиммунных заболеваний у этих детей.

Исследования показали, что у пациентов, перенесших тимэктомию в раннем возрасте, уровень TREC и наивных  $CD4^+$ Т-клеток был заметно снижен через много лет после операции [4]. Сравнение уровней TREC у детей с ВПС до тимэктомии и после нее через 12 дней и 6 лет показало их значительное снижение, как в ближайшем послеоперационном периоде, так и в отдаленном времени. Также было показано, что у детей после оперативного лечения ВПС, но без тимэктомии, уровень TREC был значительно выше, чем у детей с тимэктомией [9]. Авторы делают заключение, о том что пролонгированное снижение TREC (через 6 лет после операции) связано с ограничением тимопоэза [9]. Было показано, что у пациентов без остаточного тимуса (полная тимэктомия) отмечено достоверное снижение TREC по отношению к пациентам с частичной тимэктомией [4]. Приведет ли снижение

TREC при полном удалении тимуса к дефициту регуляторных Т-лимфоцитов тимического происхождения и разовьются ли у этих пациентов аутоиммунные заболевания — остается неизвестным [9].

Настоящее исследование показало, что основной тренд субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> лимфоцитов периферической крови после проведенной тимэктомии схож с динамикой TREC после этой операции. Более того, показано, что чем раньше к моменту рождения ребенка удаляется тимус, тем меньше в периферической крови становится не только субпопуляция тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>), но и Т-хелперов в целом (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), что может негативно влиять на формирование иммунной компетентности у этих детей.

Можно согласиться с рекомендациями ряда авторов о необходимости проведения частичной тимэктомии при оперативном лечении ВПС, так как эта операция в младенчестве, хотя и приводит к снижению TREC, но не оказывает выраженного негативного влияния на иммунную функцию [9]. Доказано, что минимальной остаточной ткани тимуса достаточно для осуществления иммунной функции [9].

Выполненная работа показала правомочность исследования субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> для оценки эффективности тимопоеза после тимэктомии у детей, подвергшихся оперативному лечению ВПС, и в качестве альтернативы измерению уровня TREC в лимфоцитах периферической крови у этих пациентов.

## Выводы

1. Тимэктомия при оперативном лечении ВПС приводит к снижению тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> в периферической крови.

2. Ранний возраст проведения полной тимэктомии при оперативном лечении ВПС ассоциирован с дефицитом в периферической крови как тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>, так и Т-лимфоцитов хелперов в целом (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>).

3. Количество в периферической крови тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> отрицательно коррелирует с временем после проведенной у детей тимэктомии при оперативном лечении ВПС.

## Список литературы / References

1. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8, № 17. С. 947-964. [Kudryavtsev I.V. T-memory cells: basic population and stage of differentiation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 17, pp. 947-964. (In Russ.)]
2. Brearley S., Gentle T.A., Baynham M.I., Roberts K.D., Abrams L.D., Thompson R.A. Immunodeficiency following neonatal thymectomy in man. *Clin. Exp. Immunol.*, 1997, Vol. 70, pp. 322-327.
3. Fry T.J., Mackall C.L. Current concepts of thymic aging. *Springer Semin. Immunopathol.*, 2002, Vol. 24, pp. 7-22.
4. Halnon N.J., Jamieson B., Plunkett M., Kitchen C.M., Pham T., Krogstad P. Thymic function and impaired maintenance of peripheral T-cell populations in children with congenital heart disease and surgical thymectomy. *Pediatr. Res.*, 2005, Vol. 57, pp. 42-48.
5. Jamieson B.D. Generation of functional thymocytes in the human adult. *Immunity*, 1999, Vol. 10, pp. 569-575.
6. Junge S., Kloeckener-Gruissem B., Zufferey R., Keisker A., Salgo B. Correlation between recent thymic emigrants and CD31<sup>+</sup> (PECAM-1) CD4<sup>+</sup> T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *Eur. J. Immunol.*, 2007, Vol. 37, pp. 3270-3280.
7. Kimmig S., Przybylski G.K., Schmidt C.A., Laurisch K., Mowes B. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 195, pp. 789-794.
8. Kohler S., Thiel A. Life after the thymus: CD31<sup>+</sup> and CD31<sup>-</sup> human naive CD4<sup>+</sup> T-cell subsets. *Blood*, 2009, Vol. 113, pp. 769-774.
9. Madhok A.B., Chandrasekaran A., Parnell V., Gandhi M., Chowdhury D., Pahwa S. Levels of Recent Thymic Emigrant Cells Decrease in Children Undergoing Partial Thymectomy during Cardiac Surgery. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2005, Vol. 12, no. 5, pp. 563-565.
10. Marelli-Berg F.M., Clement M., Mauro C., Caligiuri G. An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. *J. Cell Sci.*, 2013, Vol. 126, pp. 2343-2352.
11. Merckenschlager M., Terry L., Edwards R., Beverley P.C. Limiting dilution analysis of proliferative responses in human lymphocyte populations defined by the monoclonal antibody UCHL1: implications for differential CD45 expression in T cell memory formation. *Eur. J. Immunol.*, 1988, Vol. 18, pp. 1653-1661.

12. Peterson P., Tönis Org, Rebane A. Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance. *Nature Reviews Immunology*, 2008, Vol. 8, pp. 948-957.
13. Roifman C.M. Studies of patients' thymic aid in the discovery and characterization of immunodeficiency in humans. *Immunol. Rev.*, 2005, Vol. 203, pp. 143-155.
14. Wells P.R., Smogorzewska E., Barr M. Neonatal thymectomy: does it affect immune function? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1998, Vol. 115, pp. 1041-1046.
15. Young J.L., Ramage J.M., Gaston J.S., Beverley P.C. *In vitro* responses of human CD45R0<sup>bright</sup>RA<sup>-</sup> and CD45R0<sup>-</sup>RA<sup>bright</sup> T cell subsets and their relationship to memory and naive T cells. *Eur. J. Immunol.* 1997, Vol. 27, pp. 2383-2390.
16. <http://www.eurocat-network.eu> (дата обращения: 03.09.2015).

---

**Авторы:**

**Ровда Ю.И.** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой педиатрии и неонатологии ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

**Шмелевич С.А.** — заведующая отделением детской кардиологии МБУЗ «Кемеровский кардиологический диспансер», г. Кемерово, Россия

**Шабалдин А.В.** — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Лукоянычева Е.Б.** — заведующая иммунологической лабораторией ГАУЗ «Кемеровская областная клиническая больница», г. Кемерово, Россия

---

**Authors:**

**Rovda Yu.I.**, PhD, MD (Medicine), Head, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical Academy, Kemerovo, Russian Federation

**Shmulevich S.A.**, Head, Department of Pediatric Cardiology, Kemerovo Cardiology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

**Shabaldin A.V.**, PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Lukoyanycheva E.B.**, Head, Immunology Laboratory, Kemerovo Regional Hospital, Kemerovo, Russian Federation

---

Поступила 15.10.2015  
Принята к печати 04.12.2015

---

Received 15.10.2015  
Accepted 04.12.2015