

Содержание Т-лимфоцитов первого и второго порядка у детей разных возрастных групп

Лагерева Ю.Г., Богданова Л.В., Дружинина А.Ю., Меньшиков С.В., Бейкин Я.Б.

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН

Диагностический Центр (лабораторной диагностики ВИЧ, инфекционной патологии и болезней матери и ребенка)

Резюме. Клиническая оценка регуляторной роли Т-хелперов 1 и 2 порядка и их аналогов - Т-цитотоксических лимфоцитов 1 и 2 порядка в развитии иммунного ответа при различных заболеваниях невозможна в отсутствие данных о нормальном цитокиновом профиле Т-клеточных субпопуляций в различных возрастных группах. В результате проведенных исследований установлено, что основными продуцентами IL2, TNF α и IL4 являются CD4⁺ Т-лимфоциты (соответственно, Th1, Th2 и подобные им субпопуляции). IFN γ продуцируется CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами (Th1 и Tc1), приблизительно в равном соотношении. Снижение индекса T1/T2 свидетельствует о возрастающей роли Т хелперов и цитотоксических лимфоцитов второго порядка и синтезируемых ими цитокинов в процессе становления иммунной системы ребенка. Значительный вклад (сопоставимый с CD8⁺ Т-лимфоцитами) в синтез IFN γ и TNF α вносит популяция естественных киллеров.

Ключевые слова: Т-хелперы первого и второго порядка (Th1, Th2), Т-цитотоксические лимфоциты первого и второго порядка (Tc1, Tc2), цитокины

Введение

Центральными регуляторными клетками иммунной системы являются Т-лимфоциты, большинство функций которых опосредуется секрецией цитокинов. В многочисленных публикациях приводятся данные о значительном дисбалансе цитокиновой продукции различными Т-клеточными субпопуляциями при той или иной патологии [1]. Примером тому может служить доминирование Th2 лимфоцитов у детей с атопией и астмой, Th1 - при

патологической беременности, острой реакции трансплантат-против-хозяина, значительное изменение цитокиновой продукции во время инфекционных заболеваний, таких как ВИЧ-инфекция и Th1-поляризация при аутоиммунной патологии [2-7]. Т-хелперы первого и второго порядка были первоначально описаны среди мышинных CD4⁺ Т-клеточных клонов, а позднее - и человеческих Т-лимфоцитов. Мышиные Th1 лимфоциты идентифицируются как клетки-продуценты интерлейкина 2 (IL2), интерферона λ (IFN λ) и лимфотоксина (LT), в то время как Th2 клетки продуцируют IL4, IL5, IL6, IL9, IL10 и IL13 [8]. Т-хелперы первого и второго порядка у человека синтезируют такие же наборы цитокинов, хотя синтез IL2, IL6, IL10 и IL13 не столь строго рестриктирован для человеческих Th1 и Th2 субпопуляций. Обеими субпопуляциями Т-хелперов продуцируются также такие протеины, как IL3, TNF α , GM-CSF и различные представители семейства хемокинов. Поскольку, несмотря на многочисленные исследования, полный перечень цитокинов, синтезируемых Th1 и Th2 лимфоцитами, не определен, термин "Т-хелперы первого и второго порядка" используется либо при анализе полного цитокинового профиля, характерного для мышинных субпопуляций,

Лагерева Юлия Геннадьевна - руководитель отдела "Иммунный статус" лаборатории клинической иммунологии ДЦЛД;

Богданова Людмила Витальевна - доцент кафедры семейной медицины УГМА;

Дружинина Алена Юрьевна - младший научный сотрудник лаборатории иммунологического скрининга Института иммунологии и физиологии УрО РАН;

Меньшиков Сергей Владимирович - младший научный сотрудник лаборатории иммунологического скрининга Института иммунологии и физиологии УрО РАН;

Бейкин Яков Борисович - докт. мед. наук, профессор, главный врач ДЦЛД

либо для обозначения доминирующей роли IFN γ и IL4, соответственно.

Функционирование Th1 и Th2 клеток определяется синтезируемыми ими цитокинами. Th1 лимфоциты вовлечены в клеточно-опосредуемые воспалительные реакции: Th1-цитокины активируют цитотоксические и воспалительные функции, индуцируют реакции гиперчувствительности замедленного типа. Некоторые вспомогательные реакции в отношении В-лимфоцитов также индуцируются Th1 лимфоцитами, однако высокие концентрации Th1 клеток могут стать причиной иммуносупрессии. Th2 цитокины регулируют антителообразование, особенно IgE-ответ, стимулируют эозинофильную пролиферацию и функциональную активность. Таким образом, Th2 цитокины находятся в тесной ассоциации с мощным гуморальным и аллергическим ответом. Синтез характерных для Th1 и Th2 лимфоцитов цитокинов оказывает взаимоингибирующее действие на дифференцировку противоположных клонов. IFN γ селективно подавляет пролиферацию Th2 лимфоцитов, а IL10 ингибирует синтез цитокинов Th1 клонами. Кросс-регуляция объясняет существование строгой дихотомии Th1 и Th2 ответов при большинстве изученных инфекций у мышей и людей. В некоторых случаях нарушение цитокиновой регуляции или использование антицитокиновых препаратов может регулировать резистентность или чувствительность к инфекционному агенту.

Подобно CD4⁺ Т-лимфоцитам CD8⁺ Т-лимфоциты являются продуцентами цитокинов Th1- и Th2-типа [9-13]. CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляции дифференцируются в одинаковых условиях: IL12 и IFN γ способствуют дифференцировке предшественников в Th1 и Tc1 клетки, в то время как IL4 индуцирует образование Th2 или Tc2 лимфоцитов. Т-цитотоксические лимфоциты первого порядка были идентифицированы раньше Tc2, возможно, из-за преимущественной дифференцировки CD8⁺ Т-лимфоцитов в IFN γ -продуценты. При первичном примировании для образования Tc2 лимфоцитов требуются гораздо более высокие дозы IL4, нежели чем для дифференцировки Th2 [14]. Tc2 лимфоциты обладают цитотоксической активностью, также как Tc1 субпопуляция, но далеко не во всех системах, что определяется окружающим цитокиновым фоном [12]. Цитотоксичность и в том и в другом случае осуществляется путем Ca²⁺/перфорин-зависимых механизмов, и в меньшей степени Fas-опосредована. Tc2 лимфоциты, по-видимому, обладают желперной активностью *in vivo*, поскольку экспрессируют

CD40L и секретируют цитокины второго типа, действующие на В-лимфоциты, активированные CD4⁺ Th2 клетками [15]. Кроме того, получены данные о роли Tc2 в супрессии CD8⁺ Т-опосредованной цитотоксичности и продукции IFN γ [16].

Определение нормального содержания Т-лимфоцитарных субпопуляций первого и второго порядка имеет значение для оценки колебания 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. Для идентификации функциональных субпопуляций Т-лимфоцитов с полярной цитокиновой секрецией используются различные методические подходы, в том числе ELISA сыворотки крови или супернатантов клеточных культур, позволяющий определить общее содержание секретированного белка. По сравнению с ELISA бесспорным преимуществом метода внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICCS) является возможность оценки моно- или коэкспрессии различных цитокинов и поверхностных маркеров каждой клетки, что, в свою очередь, является основанием для дифференциации Т-клеточных субпопуляций на основании цитокинового синтеза одновременно с иммунофенотипированием [17].

Целью настоящего исследования являлась оценка нормального цитокинового профиля Т-лимфоцитов у детей различных возрастных групп.

Материалы и методы

Обследовано 70 практически здоровых детей в возрасте от 3 до 14 лет. Содержание лейкоцитов, абсолютного и относительного количества лимфоцитов определяли с помощью гематологического анализатора Cobas Micros 60 ("ABX"). Для оценки внутриклеточного синтеза цитокинов мононуклеары периферической крови получали путем выделения на градиенте плотности фиколл-верографина (1,077 г/см³). Спонтанную продукцию IL2, IL4, IFN γ и TNF α CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD16⁺ лимфоцитами оценивали по истечении 4 часов инкубации в присутствии брэфельдина А при 37°C, в атмосфере 5% CO₂. В качестве активатора для стимуляции внутриклеточного синтеза использовали комбинацию PMA ("Sigma", 50 ng/ml) с иономицином ("Sigma", 1 mg/ml). Иммунофенотипирование проводили с использованием FITC-меченных CD3, CD4, CD8, CD16 моноклональных антител ("Caltag") и PE-контъюгированных анти-IL2, IL4, IFN γ и TNF α -

Таблица 1. Содержание IFNg-, TNF α -, IL2-, IL4-продуцирующих Т-лимфоцитов у детей 3-14 лет (M \pm m)

Показатели	Возрастные группы				
	3 года n=15 3	4 года n=15 4	5 лет n=15 5	6 лет n=15 6	7-14 лет n=10 7
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	4,24 \pm 0,51 ^{5,6,7}	3,8 \pm 0,47 ^{5,7}	3,23 \pm 0,31 ^{3,4,7}	3,45 \pm 0,33 ^{3,7}	1,99 \pm 0,46 ^{3,4,5,6}
CD3 ⁺ / γ IFN ⁺ , %	14,82 \pm 3,05	13,09 \pm 1,89	13,53 \pm 2,72	16,36 \pm 3,84	15,79 \pm 3,52
CD3 ⁺ / γ IFN ⁺ , 10 ⁹ /л	0,62 \pm 0,13 ⁷	0,49 \pm 0,09	0,45 \pm 0,10	0,57 \pm 0,15	0,331 \pm 0,150 ³
CD3 ⁺ /TNF α ⁺ , %	15,50 \pm 2,90 ⁷	14,85 \pm 2,41 ⁷	17,57 \pm 2,57	18,98 \pm 2,06	20,93 \pm 2,48 ^{3,4}
CD3 ⁺ /TNF α ⁺ , 10 ⁹ /л	0,61 \pm 0,11	0,55 \pm 0,10	0,58 \pm 0,09	0,65 \pm 0,07	0,437 \pm 0,144
CD3 ⁺ /IL2 ⁺ , %	12,96 \pm 2,52	12,65 \pm 3,30	15,78 \pm 3,18 ⁷	14,7 \pm 2,52 ⁷	9,35 \pm 2,79 ^{5,6}
CD3 ⁺ /IL2 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,54 \pm 0,08 ⁷	0,46 \pm 0,12 ⁷	0,51 \pm 0,09 ⁷	0,50 \pm 0,08 ⁷	0,154 \pm 0,038 ^{3,4,5,6}
CD3 ⁺ /IL4 ⁺ , %	0,86 \pm 0,28 ⁷	0,79 \pm 0,21 ^{6,7}	1,16 \pm 0,38 ⁷	1,57 \pm 0,55 ^{4,7}	2,64 \pm 0,87 ^{3,4,5,6}
CD3 ⁺ /IL4 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,04 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02	0,051 \pm 0,019
Th1/Th2	24,45	19,89	17,69	13,12	6,98

Таблица 2. Цитокиновый профиль Т-лимфоцитов и CD16+клеток (M \pm m)

Цитокиновый профиль	Дети 7-14 лет (n=10)				
	CD3+ Т-клетки	CD4+ Т-клетки	CD8+ Т-клетки		
IFN γ , %	15,79 \pm 3,52	IFN, %	8,31 \pm 2,03	IFN γ , %	6,31 \pm 1,95
TNF α , %	20,93 \pm 2,48	TNF, %	11,22 \pm 2,60	TNF α , %	6,10 \pm 1,52
IL2, %	9,35 \pm 2,79	IL2, %	8,73 \pm 1,96	IL2, %	2,62 \pm 0,99
IL4, %	2,64 \pm 0,87	IL4, %	2,23 \pm 0,52	IL4, %	0,84 \pm 0,39
CD16+ клетки					
IFN γ , %	5,74 \pm 2,16				
TNF α , %	7,38 \pm 2,09				

антител ("Caltag") на проточном цитофлуориметре "FacsCan" ("Becton Dickinson"). Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием модуля "Descriptive Statistics" ППП "NCCS 2001 and Pass Test".

Результаты и обсуждение

Содержание IFNg-синтезирующих CD3⁺ Т-лимфоцитов отражает совокупность нескольких Т-клеточных субпопуляций: Т-хелперов 1 порядка (IL2⁺/IFNg⁺/IL4⁻), Th1-подобных лимфоцитов (IL2⁻/IFNg⁺/IL4⁻), Т-цитотоксических лимфоцитов 1 порядка (IL2⁺/IFNg⁺/IL4⁻) и Тс1-подобных клеток (IL2⁻/IFNg⁺/IL4⁻) (Рис. 1).

Та же ситуация характерна TNF α -продуцирующих лимфоцитов за исключением того, что для CD8⁺ лимфоцитов синтез TNF α менее характерен, чем для CD4⁺ (Рис. 2, Табл. 2). На следующем рисунке (Рис. 3) представлена

спонтанная и стимулированная экспрессия IL2 лимфоцитами периферической крови. В меньшей степени, чем Th1- IL2 продуцируется В-лимфоцитами, лимфокин-активированными киллерами (ЛК) и естественными киллерами (ЕК). Точное представление о содержании классических Th1- и Th2-лимфоцитов дает оценка одновременной экспрессии IL2 и IFNg.

IL4 продуцируется в основном Th2 субпопуляцией активированных Т лимфоцитов, секретирующих также IL5 и IL6. Данные, характеризующие цитокин-синтезирующую активность Т-лимфоцитов периферической крови у детей 3-14 лет, представлены в таблице 1.

К 7-14 годам у детей на фоне снижения общего содержания лимфоцитов происходит снижение абсолютного количества IL2- и IFNg-синтезирующих Т-лимфоцитов (Th1). С увеличением возраста повышается процент IL4-

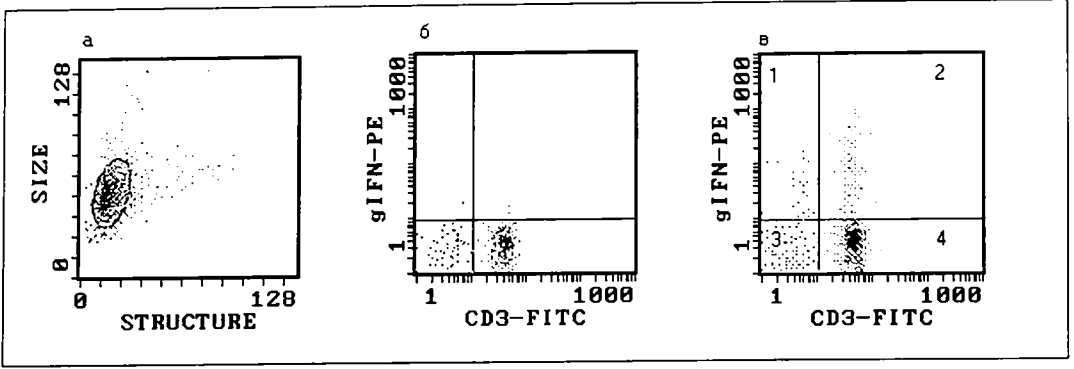


Рисунок 1. Спонтанная и стимулированная экспрессия IFN γ лимфоцитами периферической крови: а) анализируемый гейт мононуклеаров; б) спонтанная продукция IFN γ CD3 $^+$ T-лимфоцитами; в) стимулированный синтез IFN γ (1) ЕК-клетки; (2) Th1, Tc1 и Th1- и Tc1-подобные лимфоциты

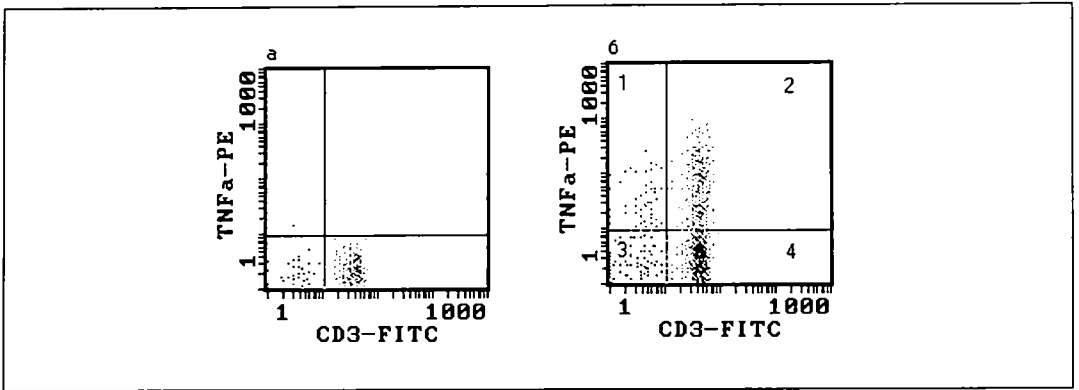


Рисунок 2. Спонтанная и стимулированная экспрессия TNF α лимфоцитами периферической крови: а) спонтанная продукция TNF α CD3 $^+$ T-лимфоцитами; б) стимулированный синтез TNF α (1) ЕК-клетки, попавшие в анализируемый гейт моноциты и нейтрофилы; (2) Th1, Tc1, Th2 и Tc2-лимфоциты, другие Т-субпопуляции, синтезирующие TNF α

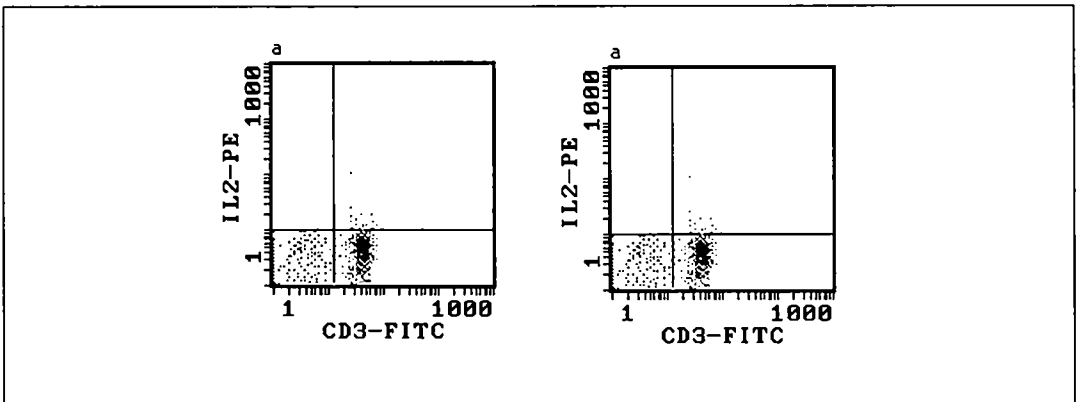


Рисунок 3. Спонтанная и стимулированная экспрессия IL2 лимфоцитами периферической крови: а) спонтанная продукция IL2 CD3 $^+$ T-лимфоцитами; б) стимулированный синтез IL2 (1) В-лимфоциты, ЕК; (2) Th1, Tc1 и другие Т-лимфоциты

продуцирующих CD3⁺ лимфоцитов, что приводит к изменению соотношения T1/T2, которое мы определяли как отношение CD3⁺/gIFN⁺ к CD3⁺/IL4⁺ лимфоцитов. Уменьшение индекса T1/T2 свидетельствует о возрастающей роли Т хелперов и цитотоксических лимфоцитов второго порядка и синтезируемых ими цитокинов в процессе становления иммунной системы ребенка.

Для того, чтобы оценить вклад Th- и Tc-лимфоцитарных субпопуляций в синтез цитокинов первого и второго типов, было определено содержание соответствующих CD4⁺ и CD8⁺ цитокин-синтезирующих лимфоцитов в группе 7-14-летних детей (Табл. 2). Анализ полученных данных показал, что основными продуцентами таких цитокинов, как IL2, TNFα и IL4 являются CD4⁺ Т-лимфоциты (соответственно, Th1 и Th2 и подобные им субпопуляции). В то время как IFNγ продуцируется CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами (Th1 и Tc1) приблизительно в равном соотношении.

Значительный вклад в синтез IFNγ и TNFα вносит популяция естественных киллеров. Содержание CD16⁺ TNFα⁺ и CD16⁺ IFNγ⁺ лимфоцитов у детей 7-14 лет составило

соответственно 7,38±2,09% и 5,74±2,16%, что сопоставимо с содержанием IFNγ- и TNFα-синтезирующих CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Таким образом, несмотря на то, что Th1 и Th2 клетки являются основными продуцентами соответствующих цитокинов, необходимо учитывать вклад естественных киллеров (Th1-профиль), а также таких типов клеток, как тучные клетки, В-лимфоциты, базофилы и CD3⁺CD4⁺NK1.1⁺ клетки (Th2-профиль) и других продуцентов цитокинов Th1 и Th2-типа.

Выводы

1. По мере взросления ребенка происходит снижение индекса T1/T2, свидетельствующее о возрастающей роли Т хелперов и цитотоксических лимфоцитов второго порядка и синтезируемых ими цитокинов.

2. Основными продуцентами IL2, TNFα и IL4 у детей 7-14 лет являются CD4⁺ Т-лимфоциты, в то время как IFNγ продуцируется CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами (Th1 и Tc1) приблизительно в равном соотношении.

3. Значительный вклад (сопоставимый с CD8⁺ Т-лимфоцитами) в синтез IFNγ и TNFα вносит популяция естественных киллеров.

Литература

- Paul W.E., Seder R.A. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 1994; 76: 241.
- Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12: 227.
- Romagnani S. Th1 and Th2 in human diseases. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1996; 80: 225.
- Umetsu D. T., Dekruyff R. H. Th1 and Th2 CD4⁺ cells in the pathogenesis of allergic diseases. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1997; 215: 11.
- Grange J.M., Stanford J.L., Rook G.A. Tuberculosis and cancer: parallels in host responses and therapeutic approaches? *Lancet*. 1995; 345: 1350.
- Krenger W., Ferrara J.L. Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Res.* 1996; 15: 50.
- Bruserud O., Halstensen A., Peen E., Solberg C.O. Serum levels of adhesion molecules and cytokines in patients with acute leukaemia. *Leukemia Lymphoma*. 1996; 23: 423.
- Del Prete G.F., De Carli M., Ricci M., Romagnani S. Helper activity for immunoglobulin synthesis of T helper type 1 (Th1) and Th2 human T cell clones: the help of Th1 clones is limited by their cytolytic capacity. *Exp. Med.* 1991; 174: 809-13.
- Salgame P., Abrams J.S., Clauberger C. et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*. 1991; 254: 279-82.
- Romagnani S., Maggi E., Del Prete G. An alternative view of the Th1/Th2 switch hypothesis in HIV infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1994; 10: iii-ix.
- Croft M., Carter L., Swain S.L., Dutton R.W. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *Exp. Med.* 1994; 180: 1715-28.
- Sad S., Mosmann T.R. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8⁺ T cells into cytotoxic CD8⁺ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity*. 1995; 2: 271-9.
- Coyle A.J., Erard F., Bertrand C., Walti S., Pircher H., Le Gros G. Virus-specific CD8⁺ cells can switch to interleukin 5 production and induce airway eosinophilia. *J. Exp. Med.* 1995; 181: 1229-33.
- Mosmann T.R., Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today*. 1996; 17(3): 138-45.
- Cronin D.C., Stack R., Fith F.W. IL-4-producing CD8⁺ T cell clones can provide B cell help. *Immunol.* 1995; 154: 3118-27.
- Seder R.A., Le Gros G.G. The functional role of CD8⁺ T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.* 1995; 181: 5-7.
- Pala P., Hüssel T., Openshaw P.J.M. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *JIM*. 2000; 243: 107-24.
- Scott P., Kaufmann S.H.E. The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunology Today*. 1991; 12(10): 346-8.
- Chipeta J., Komada Y., Zhang X. et al. CD4⁺ and CD8⁺ cell cytokine profiles in neonates, older children, and adults: increasing T helper type 1 and T cytotoxic type 1 cell populations with age. *Cel. Immunology*. 1998; 183: 149-56.
- Pearce E.J., Reiner S.L. Induction of Th2 responses in infectious diseases. *Cur. Op. Immunol.* 1995; 7: 497-504.
- Jung T., Schaur U., Heusser C., Neumann C., Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J. Immunol. Methods*. 1993; 159: 197.