



У δ Т-ЛИМФОЦИТЫ У ПАЦИЕНТОВ СТАРШИХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

И.В. МИРОШНИЧЕНКО
В.Н. СТОЛПНИКОВА
Т.В. ЛЕВАШОВА
Е.А. СОРОКИНА

*Российский государственный
медицинский университет,
г. Москва*

e-mail: lab_immunol@mail.ru

Изучали возрастные изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови пожилых людей. Обследовано 408 пациентов в возрасте от 60 до 96 лет. В работе использовали метод проточной цитофлуорометрии и специально подобранные комбинации моноклональных антител для выявления минорных субпопуляций лимфоцитов. При старении отмечено снижение численности CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺ Т- и CD19⁺ В-лимфоцитов и увеличение CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Т-лимфоцитов. Установлено, что последние имеют фенотип CD3⁺CD4⁻CD8⁻CD16^{+/-}TCR $\gamma\delta$ ⁺ и выявляются при заболеваниях желудочно-кишечного, бронхо-легочного и урогенитального трактов. Определение $\gamma\delta$ Т-клеток может быть использовано в качестве дополнительной диагностики хронических воспалительных процессов, локализующихся на слизистых оболочках.

Ключевые слова: субпопуляционный состав лимфоцитов, $\gamma\delta$ Т-клетки, возрастные особенности.

Введение. Главной структурой поверхности Т-лимфоцитов, от которой зависит выполнение основных иммунологических функций этой клеткой, является Т-клеточный рецептор (T-cell receptor, TCR). Большинство Т-лимфоцитов крови и периферических лимфоидных органов являются $\alpha\beta$ TCR-клетками, происходят из плюрипотентной гемопоэтической стволовой клетки и дифференцируются в зрелые CD4⁺ и CD8⁺ лимфоциты. Кроме $\alpha\beta$ TCR-клеток существует малочисленная или минорная субпопуляция Т-лимфоцитов, экспрессирующих $\gamma\delta$ -тип TCR (1-10% от числа всех циркулирующих лимфоцитов).

В отличие от $\alpha\beta$ TCR-клеток $\gamma\delta$ TCR-клетки покидают тимус на ранних этапах эмбрионального развития для того чтобы завершить процесс созревания вне тимуса. Местами обитания этих клеток являются, как правило, эпителиальные ткани: кожа, эпителий кишечника, легких, мочеполовой системы [10, 14, 15].

Т-лимфоциты, экспрессирующие $\gamma\delta$ TCR, могут распознавать уникальный тип малых молекул и стимулироваться ими к олигоклональной пролиферации без участия антигенпрезентирующих клеток [7]. Также есть предположение, что $\gamma\delta$ TCR распознает антиген подобно иммуноглобулинам [4]. Многие авторы склонны к тому, что $\gamma\delta$ -клетки имеют характеристики антигенпрезентирующих клеток, что немаловажно для оценки их участия в формировании адаптивного антимикробного иммунитета [5, 8, 9].

Распределение $\gamma\delta$ -клеток в тканях человека происходит в зависимости от строения V-области γ - и δ -цепей. Так, в периферической крови преобладают клетки с фенотипом V γ 9⁺V δ 2⁺, в кишечнике V γ 8⁺V δ 2⁺ [13]. На большинстве $\gamma\delta$ -клеток отсутствуют субпопуляционные маркеры CD4 и CD8 [11]. Хотя некоторые исследования указывают на наличие маркера CD8 на клетках, локализующихся в эпителии кишечника [6, 12].

В проведенных нами ранее исследованиях было показано, что в периферической крови пациентов старших возрастных групп появляется необычная и малочисленная субпопуляция с фенотипом CD3⁺CD4⁻CD8⁻, названная условно двойными негативными Т-клетками [3].

Мы предполагаем, что ДНТ могут относиться к одной из минорных субпопуляций $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, которые первыми способны отреагировать на внедрение возбудителя и местом обитания которых являются слизистые оболочки внутренних органов [1, 2].

Целью настоящего исследования было определить, действительно ли ДНТ являются $\gamma\delta$ Т-клетками и выявить, при каких заболеваниях старческого возраста отмечается увеличение их численности.



Материалы и объекты исследования. Определение субпопуляций лимфоцитов периферической крови осуществляли на приборе FacScan фирмы Becton Dickinson (США), используя панели моноклональных антител (МкАТ) фирм ООО Сорбент (Россия) и Beckman Coulter (Франция).

Стандартные комбинации МкАТ (CD3FITC/CD4PE, CD3FITC/CD8PE, CD3FITC/CD16PE и CD19FITC) применяли для фенотипирования Т-клеток (Т-кл), естественных киллерных клеток (ЕКК) и В-клеток (В-кл). Количество ДНТ-лимфоцитов определяли путем вычитания из общего числа Т-кл суммы субпопуляций с фенотипом CD3⁺CD4⁺ (Т4) и CD3⁺CD8⁺ (Т8). В дальнейших исследованиях для фенотипирования ДНТ нами была разработана комбинация МкАТ (CD4+CD8)FITC/TCRγδPE/CD3PC5. Для определения фенотипического разнообразия γδТ-клеток (γδТ-кл), выявленных у пациентов, использовали комбинации CD8FITC/TCRγδPE, CD4FITC/TCRγδPE и CD16FITC/TCRγδPE.

Объектом исследования служила периферическая кровь 408 пациентов клиники филиала РГМУ «НКЦ геронтологии» пожилого, старческого возраста и долгожителей.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA (версия 6.0).

Результаты и обсуждение. Для решения вопроса о возрастных изменениях структуры и численности субпопуляционного состава лимфоцитов ретроспективно были проанализированы иммунограммы 230 пациентов пожилого, старческого возраста и долгожителей. В этих исследованиях количество ДНТ вычисляли по разнице между Т-кл и суммой Т4 и Т8.

Полученные данные сопоставляли с общепринятой нормой для здорового человека в возрасте 20-50 лет. Выбор такого сравнения был обусловлен тем, что среди обследованных пациентов невозможно было подобрать соответствующую группу контроля. Средние значения относительных и абсолютных показателей в разных возрастных группах представлены в табл. 1 и 2.

Как видно из таблицы 1, у лиц всех старших возрастных групп процент Т8 и В-кл был статистически значимо ниже нормы, а ДНТ-лимфоцитов – выше нормы. У пациентов в возрасте 60-74 лет был увеличен, по сравнению с нормой, процент Т-кл и Т4. Возможно, это связано с еще не утраченным потенциалом иммунной системы к активному ответу на воспалительные процессы, которые учащаются в данном возрасте и приобретают в дальнейшем хроническое течение.

Таблица 1

Возрастные изменения относительных значений показателей субпопуляционного состава лимфоцитов по сравнению с нормой

Субпопуляции лимфоцитов	Среднее арифметическое (М), границы доверительного интервала с уровнем вероятности 95% (I ₉₅), кл/мкл, для: возрастных групп:			
	Референсные Значения	60-74 лет (n=95)	75-89 лет (n=75)	90 лет и старше (n=60)
1	2	3	4	5
Т-кл	72,5 65-80	74,6* 72,6-76,5	71,9 69,2-74,6	71,4 68,1-74,6
Т4	40 30-50	44,2* 42,3-46,2	42,8* 40,1-45,6	41 37,4-44,6
1	2	3	4	5
Т8	29 20-38	22,7* 20,9-24,6	20,6* 18,5-22,7	23,1* 19,1-27,1
ЕКК	15 10-20	13,5 11,9-15,0	17,1 14,8-19,5	16,2 13,8-18,6
ДНТ	2,5 0-5	7,9* 6,3-9,5	8,5* 7,1-9,8	7,4* 5,8-8,9
В-кл	11,5 7-167	7,9* 7,2-8,7	7,9* 6,7-9,1	7,5* 6,1-8,9

Примечание: * – статистически значимое отклонение от нормы (p<0,05).

У лиц пожилого возраста среднее абсолютное количество Т-кл и Т4, так же как и их процент (табл.1), достоверно превышали норму. В группе старческого возраста и у



долгожителей отмечено существенное снижение количества Т8-лимфоцитов. В группе долгожителей средний показатель Т4, Т8 и В-кл был статистически достоверно ниже нормы.

Таблица 2

Возрастные изменения абсолютных значений показателей субпопуляционного состава лимфоцитов по сравнению с нормой

Субпопуляции лимфоцитов	М и I ₉₅ , кл/мкл, для возрастных групп:			
	Референсные значения	60-74 лет (n=95)	75-89 лет (n=75)	90 лет и старше (n=60)
Т-кл	1450 1100-1800	1808* 1655-1962	1598 1420-1776	1348 1178-1518
Т4	850 600-1100	1082* 974-1189	957 841-1072	753* 657-849
Т8	600 400-800	552 485-620	464* 383-544	455* 360-551
ЕКК	300 200-400	335 286-385	384* 314-454	327 245-408
ДНТ	35 0-70	180* 141-219	180* 145-215	145* 107-182
В-кл	200 100-300	183 163-203	168 138-197	140* 107-172

Примечание: * – статистически значимое отклонение от нормы ($p < 0,05$)

Численность ДНТ-клеток в каждой возрастной группе статистически отличалась от нормы и превышала ее верхний предел.

Для характеристики ДНТ и сравнения их с $\gamma\delta$ Т-кл было обследовано 93 пациента. Использовали заранее отработанную комбинацию МкАТ (CD4+CD8)FITC/TCR $\gamma\delta$ PE/CD3PC5, с помощью которой можно одновременно определить как ДНТ, так и $\gamma\delta$ Т-кл. Дополнительно определяли экспрессию поверхностных молекул CD8, CD4 и CD16 на $\gamma\delta$ Т-кл.

Было показано, что клетки с фенотипом CD3⁺CD4⁻CD8⁻ и CD3⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ имели одинаковую интенсивность свечения рецептора CD3 и аналогичное расположение на гистограмме.

У некоторых пациентов как ДНТ так и $\gamma\delta$ Т-кл включали в свой состав CD16⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ Т-лимфоциты. В ряде случаев численность $\gamma\delta$ Т-кл была выше ДНТ за счет наличия CD8⁺TCR γ ⁺ клеток. Однако процент $\gamma\delta$ Т-кл, несущих рецепторы CD8 и CD16, был незначителен и поэтому количество сравниваемых фенотипических типов клеток, как правило, совпадало.

В табл. 3 представлены средние значения для CD3⁺CD4⁻CD8⁻CD16^{+/-} ДНТ и $\gamma\delta$ Т-кл и степень корреляции между ними.

Таблица 3

Оценка степени корреляции между количеством ДНТ и TCR $\gamma\delta$ ⁺ клеток у пациентов старших возрастных групп

Возрастная группа	Кол-во пациентов (n)	М, I ₉₅ клеток минорных субпопуляций, кл/мкл		Достоверность различий (p)	Степень корреляции (r)
		ДНТ	$\gamma\delta$ Т-кл		
60-74 лет	36	90 64-116	105 71-140	0,09	0,87
75-89 лет	25	77 49-106	90 57-123	0,24	0,76
90 лет и старше	32	71 38-104	81 42-120	0,1	0,97

Во всех возрастных группах пациентов на фоне полиморбидности среднее количество ДНТ превышало норму, но было ниже у долгожителей. Степень корреляции между CD3⁺CD4⁻CD8⁻CD16^{+/-} ДНТ и $\gamma\delta$ Т-кл составила 0,87; 0,76 и 0,97, соответственно возрастной группе, и интерпретировалась как сильная.

Мы предположили, что увеличение численности $\gamma\delta$ T-кл (ДНТ) лимфоцитов у пациентов старше 60 лет могло быть связано с конкретными заболеваниями, при которых с большой степенью вероятности развиваются иммунные воспалительные процессы инфекционной природы на слизистых внутренних органов.

С этой целью было обследовано 85 пациентов в возрасте 60 лет и старше с одинаковым основным диагнозом (заболевания сердечно-сосудистой системы). Проведенный анализ историй болезни показал, что у 38 пациентов (45%) были отмечены сопутствующие заболевания, связанные с хроническими воспалительными процессами желудочно-кишечного, бронхолегочного или урогенитального трактов. Среди них у 90% были выявлены ДНТ в количествах, превышающих норму (Рис.1).

Степень корреляции (использовали непараметрический метод Кендалла) между перечисленными сопутствующими заболеваниями и увеличением ДНТ или $\gamma\delta$ T-кл в периферической крови таких пациентов составила 0,37 при $p < 0,05$, что подтвердило наличие прямой связи между сравниваемыми признаками.

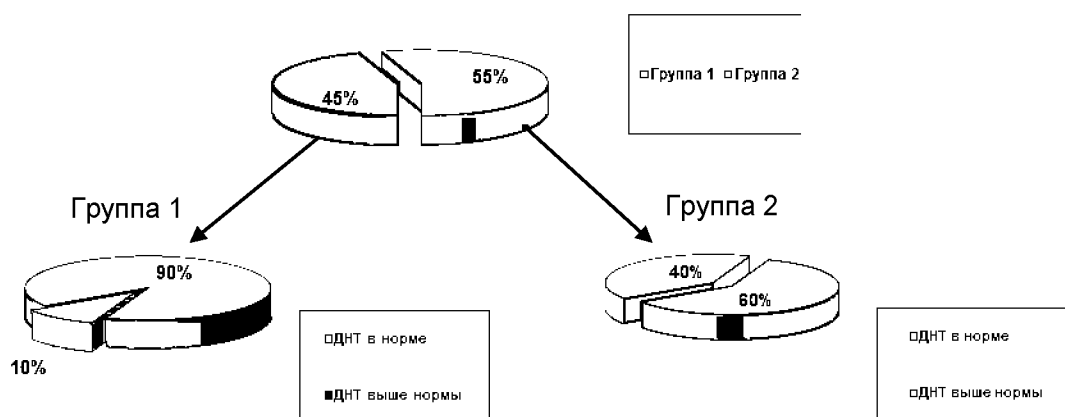


Рис. 1. Частота встречаемости повышенных и нормальных значений ДНТ у пациентов старше 60 лет

Примечание: группа 1 – пациенты с заболеванием сердечно-сосудистой системы и сопутствующими хроническими заболеваниями ЖКТ, бронхо-легочного и урогенитального трактов, группа 2 – пациенты с заболеваниями сердечно-сосудистой системы без сопутствующих хронических заболеваний ЖКТ, бронхо-легочного и урогенитального трактов.

Заключение. Таким образом, у пациентов старших возрастных групп по мере старения отмечалась общая тенденция снижения абсолютных и относительных значений Т-кл, Т4, Т8 и В-кл, что свидетельствовало о развитии вторичной иммунологической недостаточности (ВИН). На этом фоне отмечалось увеличение количества ДНТ клеток.

С высокой степенью корреляции показана идентичность $CD3^+CD4^+CD8^-CD16^{+/-}$ (ДНТ) и $\gamma\delta$ T-кл, а также связь их с заболеваниями, при которых существенную роль играют хронические воспалительные процессы, локализующиеся на слизистых оболочках организма и имеющих иммунную природу. Поэтому выявление этих клеток у лиц старше 60 лет может быть использовано в качестве дополнительной диагностики сопутствующих хронических заболеваний с вялотекущими воспалительными процессами, особенно при отсутствии симптоматики.

Для выявления в периферической крови $CD3^+CD4^+CD8^-CD16^{+/-}$ и $\gamma\delta$ T-кл рекомендуются комбинации МкАТ $(CD4+CD8)FITC/TCR\gamma\delta PE/CD3PC5$ и $(CD4+CD8)FITC/CD3PE$. Допустим также ориентировочный расчет этой минорной субпопуляции по результатам стандартного скринингового иммунологического исследования с использованием двухцветной цитометрии.

Предполагаем, что появление $\gamma\delta$ T-кл при заболеваниях желудочно-кишечного, бронхолегочного и урогенитального трактов, по-видимому, может расцениваться как благоприятный прогноз течения заболевания на фоне ВИН у пациентов старших возрастных групп.



Литература

1. Гамма/дельта Т-клетки как маркер иммунного воспаления при заболеваниях желудочно-кишечного тракта/Т.В. Левашова [и др.]//Клиническая геронтология.-2008.-№9.-С.93-94.
2. Гамма/дельта Т-лимфоциты как маркеры воспалительных процессов у пациентов старше 60 лет/И.В. Мирошниченко [и др.]//Клиническая геронтология.-2009.-№ 8-9.-С.118-119.
3. Количественные изменения показателей иммунитета у долгожителей/В.Н. Столпникова [и др.]//Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.-2006.-№5.-С.50-53.
4. Aljurf, M. Emerging role of $\gamma\delta$ T-cells in health and disease/ M. Aljurf, A. Ezzat, O. M. Musa //Bliid Reviews.-2002.-№ 16.-P. 203-206.
5. Flexible migration program regulates gamma delta T-cell involvement in humoral immunity/ M. Brandes [et al.] //Blood.-2003.-102.-P.3693-3701.
6. Epithelia: lymphocyte interactions in the gut/ S. Dahan [et al.]//Immunological Reviews.-2007.-215.-P.243-253.
7. Ontogeny of gamma delta T cells in humans/ S.C. De Rosa [et al.] //J. Immunol.-2004.-172.-P.1637-1645.
8. Moser, B. Gamma/delta T-cells: an alternative type of professional APC/ B. Moser, M. Brandes //Trends. Immunol.-2006.-27.-P.112-118.
9. Moser, B. $\gamma\delta$ T cells: novel initiators of adaptive immunity/ B. Moser, M. Eberl //Immunol. Rev.-2007.-215.-P.89-102.
10. $\gamma\delta$ T cells: firefighters or fire boosters in the front lines of inflammatory responses/ M. Nanno [et al.] //Immunological Reviews.-2007.-215.-P.103-113.
11. Re, F. . Induction of $\gamma\delta$ - and $\alpha\beta$ -mediated T cell responses in healthy elderly subjects after influenza vaccination/ F. Re, A. Donnini, M. Provinciali //Biogerontology.-2006.-№ 7.-P.249-259.
12. Rocha, B. The extrathymic T-cell differentiation in the murine gut/ B. Rocha //Immunological Reviews.-2007.-215.-P.166-177.
13. High expression of V γ 8 is a shared feature of human $\gamma\delta$ T cells in the epithelium of the gut and in the inflamed synovial tissue/ Soderstrom K. [et al.] //J. Immunol.-1994.-152.-P.6017-6027.
14. Self/non-self discrimination by human $\gamma\delta$ T cells: simple solutions for a complex issue?/ A. Thedréz [et al.]//Immunol. Rev.-2007.-215.-P.123-135.
15. Xiong, N. Development and selection of $\gamma\delta$ T cells/ N. Xiong, D.N. Raulet //Immunol.Rev.-2007.-215.-P.15-31.

$\gamma\delta$ T-LYMPHOCYTES IN ELDERLY PATIENTS

I.V. MIROSHNICHENKO
V.N. STOLPNIKOVA
T.V. LEVASHOVA
E.A. SOROKINA

*Russian State Medical University,
Moscow*

e-mail: lab_immunol@mail.ru

Age-specific change on elderly people's peripheral blood lymphocyte subpopulation was studied. 408 patients aged from 60 to 96 were inspected. In this research we used the method of flow cytometry and specially selected combinations of monoclonal antibodies for revealing minor subpopulations of lymphocytes. Under ageing process the numbers of CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺ T- and CD19⁺ B-lymphocytes were found to decrease while the numbers of CD3⁺CD4⁺CD8⁻ T-lymphocytes increase. The latter had CD3⁺CD4⁻CD8⁻CD16⁺/TCR $\gamma\delta$ ⁺ phenotype and emerged at diseases of gastrointestinal, bronchopulmonary and urogenital tracts. Determination of $\gamma\delta$ T-cells may be used as additional diagnostics of chronic inflammatory diseases on mucosal tunics.

Key words: subpopulation structure of lymphocytes, $\gamma\delta$ T-cells, ageing characteristics.