

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ПОДРОСТКОВ МУЖСКОГО ПОЛА

Тепленький М.П.¹, Кузнецова Е.И.¹, Чепелева М.В.¹, Спиркина Е.С.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. академика Г.А. Илизарова Минздрава РФ», Курган, e-mail: office@ilizarov.ru

Доказано, что на протяжении всего периода развития детей и подростков происходит адаптация иммунной системы к постоянно меняющимся условиям внешней среды. Следует отметить, что также наблюдается связь между иммунной и нейроэндокринной системами организма. В сравнительном аспекте изучены показатели клеточного иммунитета у подростков мужского пола 13–14 лет и мужчин 30–45 лет с целью определения и выявления региональных диапазонов нормативных параметров клеточного иммунитета. Иммунофенотипирование лимфоцитов осуществлялось методом лазерной проточной цитофлуориметрии на лазерном проточном цитофлуориметре «BECKMAN COULTER epics XL» (США) с использованием моноклональных антител производства «Immunitech» (Франция). В субпопуляционном составе лимфоцитов в обследуемых группах были выявлены статистически значимые отличия, обусловленные анатомо-физиологическими особенностями подросткового возраста. В группе подростков отмечены более высокие значения В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺), более низкие значения Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и лимфоцитов, экспрессирующих активационные маркеры HLA-DR⁺ и CD25⁺. Представленные диапазоны иммунологических значений предлагаются для использования в клинической практике в качестве нормативных параметров клеточного иммунитета у подростков мужского пола.

Ключевые слова: проточная цитометрия, клеточный иммунитет, лимфоциты, подростковый период, нормативные интервалы

CELLULAR IMMUNITY VALUES IN MALE ADOLESCENTS

Teplenyk M.P.¹, Kuznetsova E.I.¹, Chepeleva M.V.¹, Spirkina E.S.¹

¹Federal State Budgetary Institution Russian Ilizarov Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopaedics» of the RF Ministry of Health, Kurgan, e-mail: office@ilizarov.ru

Throughout the development of children and adolescents, it has been proven that the immune system adapts to the constantly changing environmental conditions. It should be noted that coordination is also observed between the immune and neuroendocrine systems of the body. In a comparative aspect, the indices of cellular immunity in adolescents male 13–14 years and men 30–45 years with the purpose of determining and identifying regional ranges of regulatory parameters of cellular immunity were studied. Materials and methods. Immunophenotyping of lymphocytes was carried out by laser flow cytofluorimetry on a laser flow cytofluorimeter «BECKMAN COULTER epics XL» (USA) using monoclonal antibodies manufactured by Immunitech (France). Results. In the subpopulation composition of lymphocytes, the observed groups revealed statistically significant differences due to the anatomical and physiological features of adolescence. In the adolescent group, higher values of B-lymphocytes (CD3-CD19 +), lower values of T-helpers (CD3 + CD4 +) and lymphocytes expressing the activation markers HLA-DR + and CD25 + were noted. Conclusions. The presented ranges of immunological values are proposed for use in clinical practice as regulatory parameters of cellular immunity in adolescent males.

Keywords: flow cytometry, cellular immunity, lymphocytes, adolescence, normative intervals

На протяжении всего периода развития детей и подростков происходят адаптация их иммунной системы к постоянно меняющимся условиям внешней среды, а также координация между иммунной и нейроэндокринной системами организма [1]. На различные процессы, протекающие в организме, иммунные клетки реагируют изменением экспрессии функциональных молекул, что помогает наиболее эффективно выполнять регуляторные или эффекторные функции [2, 3].

По мере роста ребенок проходит несколько критических периодов развития иммунобиологической реактивности, когда на антигенные воздействия иммунная система дает недостаточный или парадоксальный ответ, сопровождающийся дисбалансом в физиологии иммунокомпетентных клеток. Одним из таких периодов является подростковый период [4, 5]. Бурное анатомическое развитие гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы в подростковом возрасте приводит к усилению ее гормональной активности. Резко возрастает андрогенная и глюкокортикоидная функция коры надпочечников. Меняется уровень гормонов стресса – катехоламинов. Под влиянием высоких концентраций глюкокортикоидов происходят гибель лимфоцитов и инволюция лимфоидной ткани, а также переход циркулирующих лимфоцитов из сосудистого русла в костный мозг, лимфоидную ткань или селезенку [6]. Под воздействием тестостерона снижается функциональная активность CD45RO⁺ и CD45RA⁺ [7].

В условиях гормональной перестройки неадекватное функционирование клеточного иммунитета у подростков может способствовать возрастной подверженности к развитию иммунопатологических реакций, клинические проявления которых разнообразны. В связи с анатомо-физиологическими особенностями показатели клеточного иммунитета подростков имеют отличия как от показателей взрослых людей, так и от показателей детей других возрастных периодов.

В нашем Центре мы столкнулись с необходимостью анализа иммунологических параметров у подростков с ортопедо-травматологической патологией, так как хирургические вмешательства на суставах оказывают значительное влияние на иммунную систему больного. У взрослых пациентов на поздних стадиях остеоартроза приоритетным методом лечения является эндопротезирование. Однако данный вид хирургического вмешательства не может быть операцией выбора у ведущих активный образ жизни молодых больных, включая подростков. Необходимо учитывать, что у этих пациентов высока вероятность повторного хирургического вмешательства, являющегося более сложным, нежели первичное эндопротезирование. Кроме того, ревизионное вмешательство нередко заканчивается неудовлетворительными результатами. Снижение пластичности костей и их способности к ремоделированию, характерное для данной возрастной категории, увеличивает риск декомпенсации сустава и развития необратимых изменений его компонентов. Риск ревизионного эндопротезирования может быть снижен путем применения различных вариантов реконструктивных вмешательств, так как оптимально подобранная реконструкция суставных компонентов замедляет прогрессирование деформирующего артроза. Возможно, выявление дополнительных факторов риска, в том числе и по данным иммунологических исследований, будет способствовать более дифференцированному подходу к выбору метода

хирургического лечения. Анализ иммунограммы у подростков с остеоартрозом тазобедренного сустава потребовал знания границ физиологической нормы исследуемых параметров. Выяснилось, что имеющиеся в доступной литературе нормативные данные в отношении популяций и субпопуляций лимфоцитов в этой возрастной группе характеризуются большим размахом референсных значений, не учитывают половую принадлежность (табл. 1) [8–11]. В связи с тем, что конкретных рекомендаций по исследованию клеточного иммунитета с четко очерченными границами физиологической нормы у подростков не существует, интерпретация показателей клеточного иммунитета в данном возрастном периоде затруднена.

Таблица 1

Популяции и субпопуляции лимфоцитов в подростковом возрасте
(сведения из литературных источников)

Показатели	[8] Me (5; 95)	[9] Me (5; 95)	[10] Диапазон значений	[11] Диапазон значений
CD3 ⁺ CD19 ⁻ (%)	67,0 (52,0–78,0)	70,0 (58,0–72,0)	52,0–80,0	49,0–83,0
CD3 ⁺ CD19 ⁻ (10 ⁹ /л)	1,5 (0,8–3,5)	1,8 (1,1–4,3)	0,47–2,24	0,94–2,96
CD3 ⁻ CD19 ⁺ (%)	16,0 (8,0–24,0)	15,0 (10,0–30,0)	6,0–19,0	8,0–31,0
CD3 ⁻ CD19 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,3 (0,2–0,6)	0,4 (0,2–1,4)	–	0,17–1,3
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	39,0 (25,0–48,0)	39,0 (26,0–48,0)	23,0–47,0	27,0–53,0
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,8 (0,4–2,1)	0,9 (0,6–2,4)	0,18–1,29	0,47–1,56
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	23,0 (9,0–35,0)	24,0 (16,0–32,0)	17,0–37,0	16,0–40,0
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,4 (0,2–1,2)	0,6 (0,4–1,5)	0,2–0,89	0,26–1,26
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ (%)	15,0 (6,0–27,0)	15,0 (8,0–30,0)	–	3,0–30,0
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,3 (0,07–1,2)	0,4 (0,2–1,0)	–	0,059–1,18
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (%)	4,0 (1,0–8,0)	21,0 (16,0–35,0)	–	–
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (10 ⁹ /л)	0,06 (0,02–0,2)	0,5 (0,3–1,6)	–	–

Цель исследования

В сравнительном аспекте изучить показатели клеточного иммунитета у подростков

мужского пола 13–14 лет и взрослых мужчин.

Материалы и методы

Проведено обследование 10 подростков мужского пола в возрасте 13–14 лет и 12 мужчин в возрасте 30–45 лет. Все лица, принявшие участие в исследовании, не состояли на диспансерном учете по поводу хронических заболеваний. В выборку не включались подростки и взрослые с отягощенным аллергологическим анамнезом, носители HCV, HIV, HBsAg.

Иммунофенотипирование лимфоцитов проводилось методом проточной цитометрии на цитофлуориметре «BECKMAN COULTER epics XL» (США) с применением МКАТ (моноклональных антител) компании «Immunitest» производства Франции.

Иммунологическое обследование осуществлялось в соответствии с этическими стандартами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками.

При проведении статистической обработки материала использовалось программное обеспечение AtteStat, являющееся надстройкой к «Microsoft Excel» продукта «Microsoft Office». Результаты исследования обрабатывались с помощью методов непараметрической статистики с использованием критерия Манна–Уитни и были представлены в виде медиан (МЕ) (25 и 75 перцентилей). Критической величиной уровня значимости различий считали $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Количество лимфоцитов (относительное и абсолютное) в группе подростков достоверно превышало значения группы мужчин, при этом содержание лейкоцитов не имело статистически значимых отличий (табл. 2).

Таблица 2

Содержание лейкоцитов и лимфоцитов у подростков и мужчин

Показатель	13–14 лет		30–45 лет		p
	Me (25; 75)	Диапазон значений	Me (25; 75)	Диапазон значений	
Лейкоциты ($10^9/л$)	5,6 (5,3–6,6)	4,7–8,0	6,3 (5,6–7,2)	4,8–8,5	p=0,579
Лимфоциты (%)	36,0 (31,5–39,0)	28,7–44,0	32,0 (28,0–36,0)	24,5–39,0	p=0,0483
Лимфоциты ($10^9/л$)	2,1 (1,9–2,3)	1,77–2,5	1,77 (1,6–2,05)	1,5–2,2	p=0,032

В практике иммунологических лабораторий наиболее широко распространена оценка

Т-лимфоцитов и их субпопуляций. Эти показатели являются диагностически значимыми при первичных и вторичных иммунодефицитах и могут использоваться для контроля за проведением фармакологической терапии и прогнозированием течения заболевания. Согласно результатам наших исследований относительное содержание CD3⁺CD19⁻ у подростков было достоверно ниже, чем в группе мужчин (табл. 3).

Таблица 3

Популяции и субпопуляции лимфоцитов

Показатель	13–14 лет		30–45 лет		p
	Me (25; 75)	Диапазон значений	Me (25; 75)	Диапазон значений	
CD3 ⁺ CD19 ⁻ (%)	69,2 (68,3–73,2)	63,0–76,2	76,0 (73,4–78,7)	69,5–82,1	p=0,039
CD3 ⁺ CD19 ⁻ (10 ⁹ /л)	1,4 (1,3–1,54)	1,15–1,64	1,41 (1,21–1,7)	1,1–1,85	p=0,768
CD3 ⁻ CD19 ⁺ (%)	14,2 (12,2–17,1)	11,5– 18,2	10,3 (8,1–12,0)	7,5–14,8	p=0,04
CD3 ⁻ CD19 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,3 (0,26–0,31)	0,24–0,32	0,2 (0,15–0,24)	0,1–0,26	p=0,032
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	41,6 (38,2–45,5)	39,0–47,2	47,6 (44,0–52,4)	42,9–54,3	p = 0,03
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,85 (0,6–1,0)	0,49–1,15	0,97 (0,8–1,4)	0,7–1,53	p=0,048
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	26,0 (24,9–29,0)	23,0–31,0	28,0 (24,5–29,6)	23,5–32,5	p=0,544
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,57 (0,45–0,66)	0,4–0,71	0,57 (0,38–0,61)	0,34–0,7	p=0,342
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ (%)	13,5 (11,8–15,5)	9,5–16,4	13,7 (11,4–15,5)	9,0–16,9	p=0,189
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,27 (0,23–0,35)	0,18–0,42	0,26 (0,18–0,37)	0,1–0,5	p=0,544
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ (%)	1,65 (1,3–2,32)	1,15–2,4	2,3 (2,1–2,9)	1,9–3,5	p=0,022
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,04 (0,02–0,06)	0,015–0,072	0,062 (0,05–0,072)	0,025–0,08	p=0,004

Снижение показателя происходило за счет популяции Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺). В отношении цитотоксических Т-лимфоцитов статистически значимых изменений отмечено не было. Выявленные различия можно объяснить изменениями, вызванными всплеском гормональной активности в подростковом возрасте. Известно, что глюкокортикоиды подавляют преимущественно реакцию Th1-лимфоцитов, при этом сохраняя, а иногда даже стимулируя функцию Th2-лимфоцитов, обуславливая преобладание гуморальных иммунных

реакций [6].

Как относительные, так и абсолютные значения В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺), являющихся основным клеточным субстратом гуморального иммунитета, в группе подростков достоверно превышали аналогичные показатели группы мужчин. Процентное и абсолютное содержание натуральных киллеров в обеих группах было приблизительно одинаковым.

Статистически значимые межгрупповые отличия были выявлены в отношении TNK-лимфоцитов, имеющих фенотип CD3⁺CD16⁺CD56⁺ и проявляющих сочетанные свойства Т-лимфоцитов и натуральных киллеров [12]. В группе подростков данный показатель был достоверно ниже, чем в группе взрослых.

На современном этапе интерпретация иммунограммы не ограничивается анализом количественных показателей. Не менее важной является оценка функциональной активности клеток иммунной системы, лежащей в основе формирования противоинфекционного и противоопухолевого иммунитета, развития аутоиммунных процессов. Одним из основных стимулов для развития активационных процессов в иммунокомпетентных клетках является формирование комплекса рецептора лимфоцита (TCR-CD3) с антигенными пептидами и молекулой главного комплекса гистосовместимости (HLA-DR). С ранней активацией связана экспрессия рецепторов интерлейкина-2 (CD25), а также рецептора С-лектина II типа (CD69). Недавние исследования доказали, что CD69 играет важную роль в модуляции иммунного ответа и воспалительных процессах, является участником воспаления аллергического генеза. Экспрессии CD69 требует поддержания иммунной толерантности посредством регуляторных Т-клеток Foxp3 + [13-15]. В обеих группах выявлялись невысокие значения лимфоцитов, несущих маркеры активации (табл. 4).

Таблица 4

Содержание активированных лимфоцитов

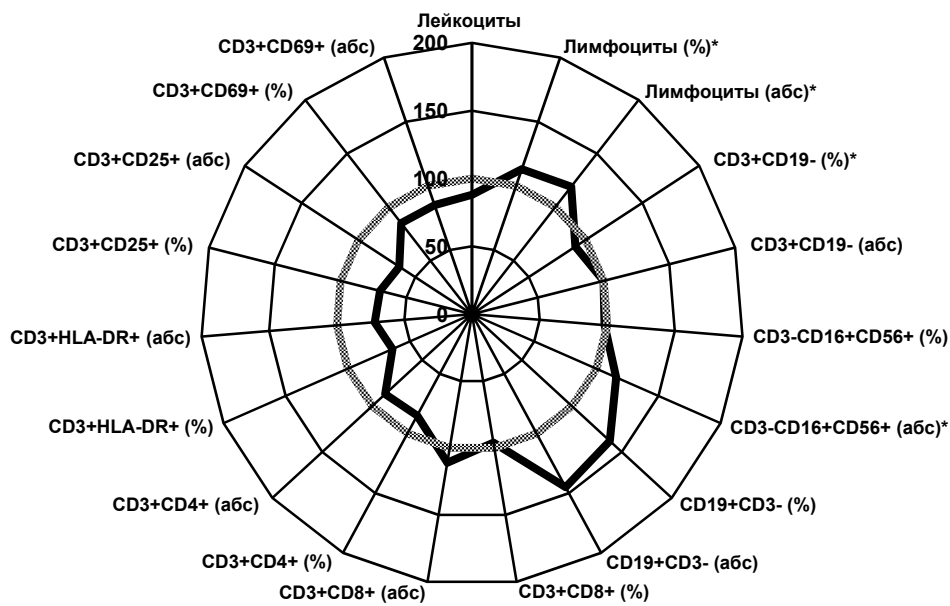
Показатель	13–14 лет		30–45 лет		p
	Me (25; 75)	Диапазон значений	Me (25; 75)	Диапазон значений	
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (%)	1,85 (1,38–2,2)	1,26–2,4	3,0 (1,9–3,8)	1,73–4,9	p=0,011
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (10 ⁹ /л)	0,036 (0,034–0,042)	0,026–0,057	0,05 (0,04–0,06)	0,033–0,08	p=0,038
CD3 ⁺ CD25 ⁺ (%)	1,4 (0,8–2,08)	0,5–2,9	2,0 (1,0–3,2)	0,8–3,9	p=0,009
CD3 ⁺ CD25 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,027 (0,013–0,045)	0,009–0,06	0,042 (0,03–0,055)	0,019–0,08	p=0,004
CD3 ⁺ CD69 ⁺ (%)	1,7 (1,3–3,5)	1,5–4,5	2,0 (1,2–4,0)	1,7–4,3	p=0,534
CD3 ⁺ CD69 ⁺	0,034	0,015–1,0	0,04	0,01–1,1	p=0,352

(10 ⁹ /л)	(0,021–0,15)		(0,017–0,2)		
----------------------	--------------	--	-------------	--	--

У подростков количество лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR⁺ и CD25⁺, было ниже, чем в группе мужчин, а содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD69, было аналогично показателям взрослых мужчин.

Заключение

Представленные результаты продемонстрировали отличия показателей клеточного иммунитета подростков и взрослых людей, выражающиеся в более высоких значениях В-лимфоцитов (CD3⁻CD19⁺), более низких значениях Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и активированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD25⁺ и HLA-DR⁺, обусловленные, по нашему мнению, анатомо-физиологическими особенностями подросткового периода (рисунок).



Показатели клеточного иммунитета.

Значения иммунологических показателей в группе подростков представлены в виде относительной величины от среднего (Me) уровня группы мужчин (30–45 лет), принятого за 100%

Данный вопрос требует дальнейшего изучения в связи с ограниченным числом

наблюдений. Расширенное количество исследований позволит в перспективе определить диапазоны иммунологических значений, которые могут быть использованы в клинической практике в качестве нормативных параметров клеточного иммунитета у подростков мужского пола.

Список литературы

1. Valiathan R., Ashman M., Asthana D. Effects of Ageing on the Immune System: Infants to Elderly. *Immunobiology*. 2014. Vol. 219. no. 7. P. 487-496.
2. Пичугина Л.В. Изменение фенотипа лимфоцитов при неиммунодефицитных патологиях // *Лабораторная Медицина*. 2008. №9. С.39-44.
3. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тотолян А.А., Черешнев В.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (метод многоцветного цитометрического анализа) // *Медицинская иммунология*. 2009. Т.11. № 2-3. С.227-238.
4. Ахваткина Н.В., Махалова А.А. Особенности иммунитета детского возраста // *Вестник КазНМУ*. 2012. №3. С.117.
5. Стефани Д.В., Вельтищев Ю.Е. *Клиническая иммунология детского возраста*. М.: Медицина, 1977. 276 с.
6. Ярилин А.А. *Иммунология: учебник*. М.: ГОЭТАР – Медия. 2010. 752 с.
7. Шуплецова В.В., Хазиахматова О.Г., Гуцол А.А., Гончаров А.Г., Сохоневич Н.А., Юрова К.А., Литвинова Л.С. Влияние половых стероидных гормонов (тестостерона и β -эстрадиола) на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов активированными Т-лимфоцитами разной степени дифференцировки // *Цитокины и воспаление*. 2015. Т.14. №1. С.57-62.
8. Ykincioqually A., Kendirli T., Dogu F., et al. Peripheral blood lymphocyte subsets in healthy Turkish children. *The Turkish Journal of Pediatrics*. 2004. Vol. 46. P. 125-130.
9. Comans-Bitter W.M., de Grat R., Van den Beemd R., et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J. Pediatr*. 1997. Vol. 130. no. 3. P. 388-393.
10. Valiathan R., Deeb K., Diamante M., Ashman M., Sachdeva N., Asthana D. Reference ranges of lymphocyte subsets in healthy adults and adolescents with special mention of T cell maturation subsets in adults of South Florida. *Scand. J. Immunol*. 2016. Vol. 83. no. 4. P. 255-266.
11. Сорокин О.В., Маркова Е.В., Кожевников В.С., Абрамов В.В., Козлов В.А. Региональные нормативные интервалы иммунологических параметров у подростков //

Бюллетень СО РАМН. 2005. Т.116. №2. С.38-41.

12. Сепиашвили Р.И. Физиология естественных киллеров М.: Медицина-Здоровье, 2005. 456 с.

13. Kimura M.Y., Hayashizaki K., Tokoyoda K., Takamura S., Motohashi S., Nakayama T. Crucial role for CD69 in allergic inflammatory responses: CD69-Myl9 system in the pathogenesis of airway inflammation. *Immunol. Rev.* 2017. Vol. 278. no. 1. P. 87-100.

14. Cibrian D., Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol.* 2017. Vol. 47. no. 6. P. 946-953.

15. José R. Cortés, Raquel Sánchez-Díaz, Elena R. Bovolenta, Olga Barreiro, Sandra Lasarte, Adela Matesanz-Marín, María L. Toribio, Francisco Sánchez-Madrid, Pilar Martín. Maintenance of immune tolerance by Foxp3⁺ regulatory T cells requires CD69 expression. *J. Autoimmun.* 2014. Vol.55. P. 51-62.