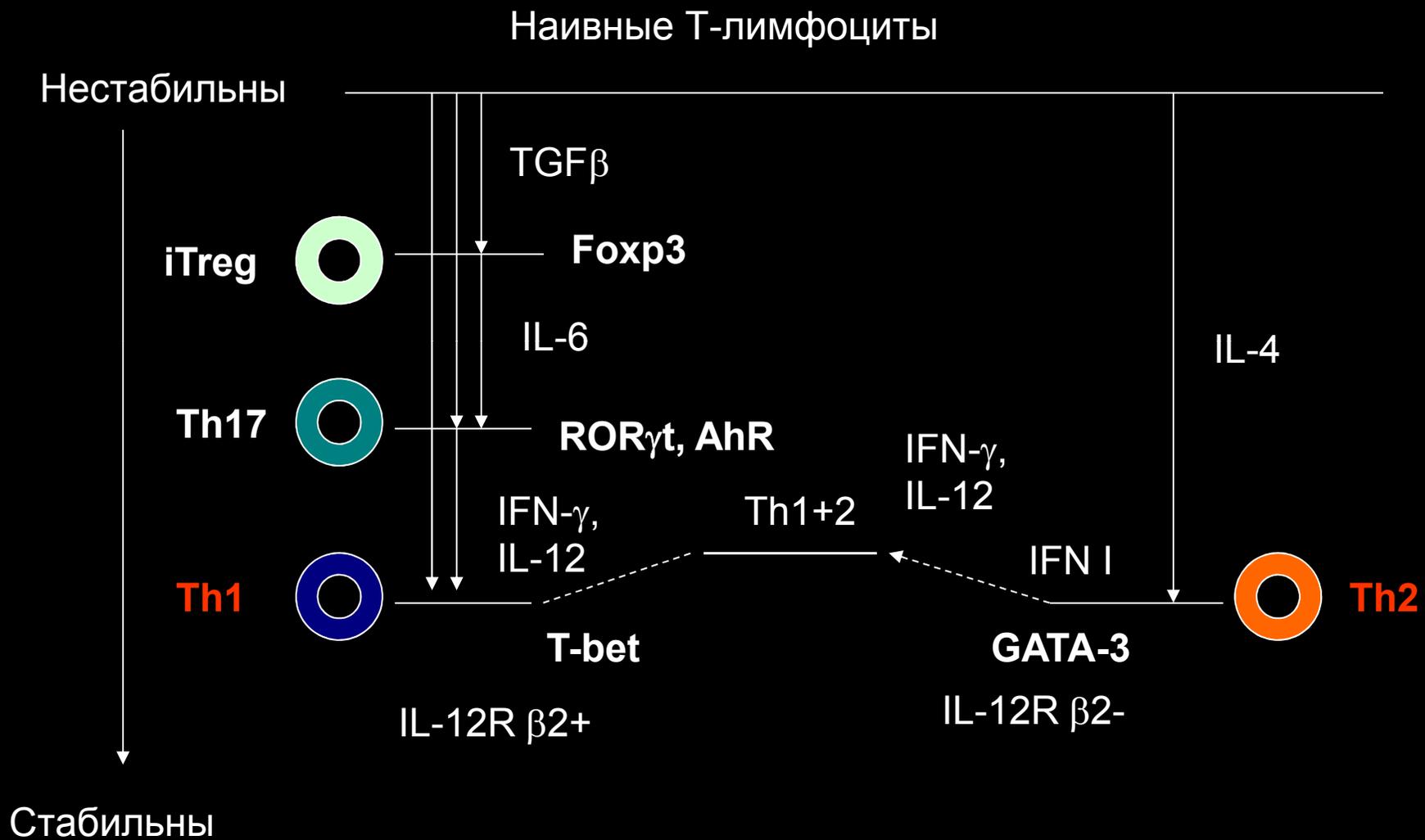


**«Использование метода
внутриклеточного
окрашивания цитокинов для
определения содержания
эффекторных субпопуляций
Т-лимфоцитов »**

**МУ «Клинико-диагностический центр»
Институт иммунологии и физиологии УрО РАН
г.Екатеринбург**

Трансформации CD4+лимфоцитарных субпопуляций

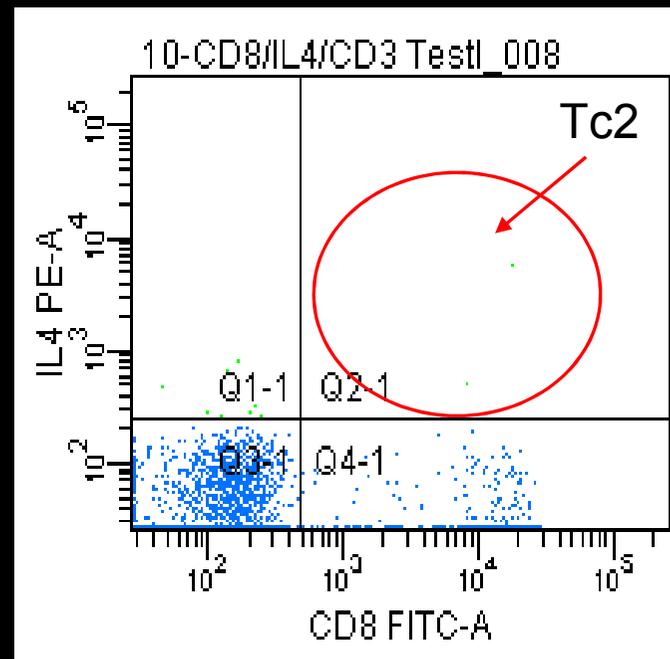
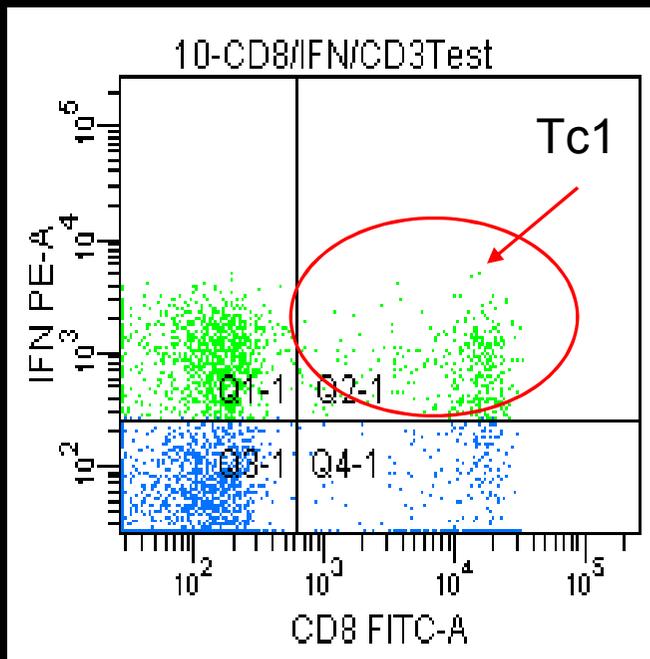


Murphy KM et al. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. Nature Immunology, 2010,11(8): 674-679

Характеристика отдельных CD4 эффекторных Т-клеточных субпопуляций

Субпопуляции CD4 Т-эффекторов	Поляризационные факторы	Транскрипционные факторы	Маркерные цитокины
Th1	IL-12, IFN- γ	T-bet	IFN- γ , TNF, IL-2
Th2	IL-4	GATA-3	IL-4, IL-5, IL-13
Th17	TGF β , IL-6,	ROR- γ t	IL-17, IL-21, IL-22

Тс1/Тс2-лимфоциты



	Маркерные молекулы	Цитокины-индукторы	Участие в иммунном ответе	Участие в иммунопатологических реакциях
Тс1	IL2, IFN γ	IFN γ , IL12	Вирусные инфекции, противоопухолевый иммунитет	
Тс2	IL4, IL5, IL6, IL10	IL4	Вирусные инфекции, противоопухолевый иммунитет	Аутоиммунные заболевания

Актуальность изучения возрастных особенностей баланса Th1, Tc1 и Th2, Tc2, Th17 и Tnc17 лимфоцитов

Определение содержания различных эффекторных Т-лимфоцитарных субпопуляций, начиная с периода новорожденности вплоть до взрослого возраста, имеет важнейшее значение:

- для оценки колебания их уровня в ходе того или иного патологического процесса
- для представления о нормальных иммунологических вариациях в различных возрастных группах
- для исследования процессов иммунологического созревания

Объект исследования

Образцы гепаринизированной венозной крови

150 здоровых детей и 45 взрослых:

7-12 месяцев – 30 детей

1-3 года-30 детей

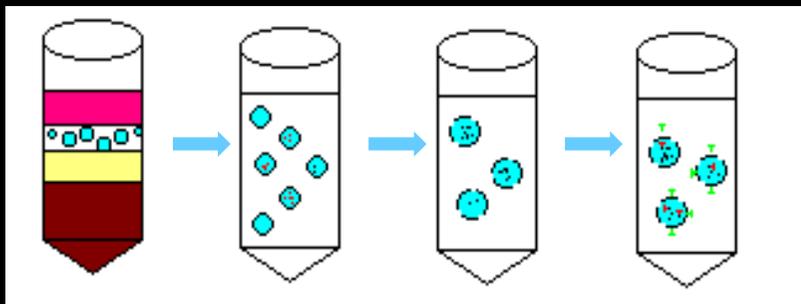
4-7 лет – 30 детей

8-14 лет – 30 детей

15-18 лет – 30 подростков

25-45 лет – 45 взрослых

Метод внутриклеточного окрашивания цитокинов в стимулированных лимфоцитах периферической крови:

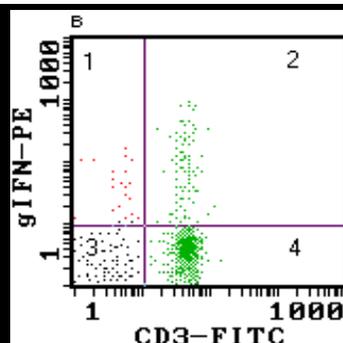
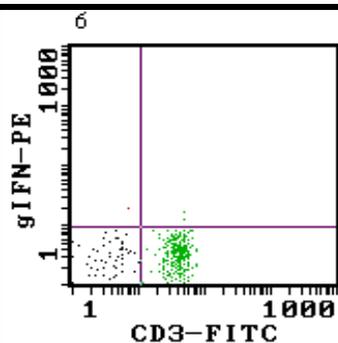


Активация РМА (50 нг/мл) с иономицином (1 мкг/мл) в присутствии Brefeldина А, 4 часа

Фиксация , 10 мин

Пермеабелизация сапонин-содержащим раствором , 10 мин

Одновременное окрашивание поверхностных рецепторов и внутриклеточное окрашивание антицитокиновыми mAb, 30 мин



Анализ

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, Tc17**

Для окрашивания поверхностных рецепторов:

Фикоэритринцианин 5.1 (PC-5)-конъюгированные UCHL1 **CD3** (IO Test, Immunotech, France)

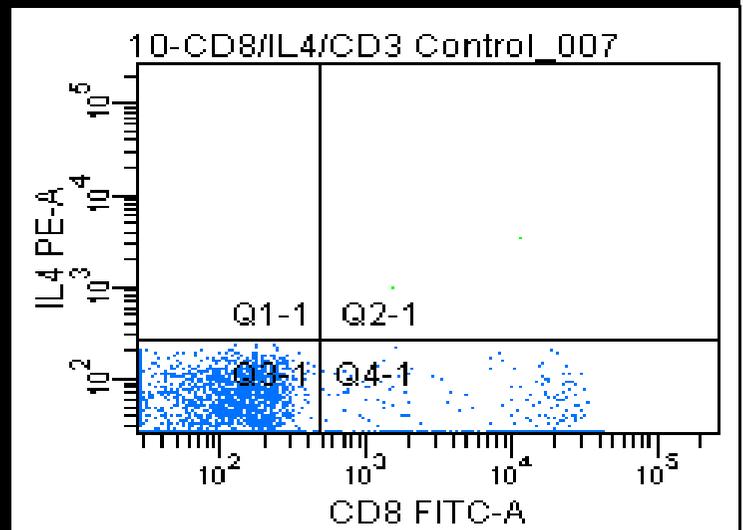
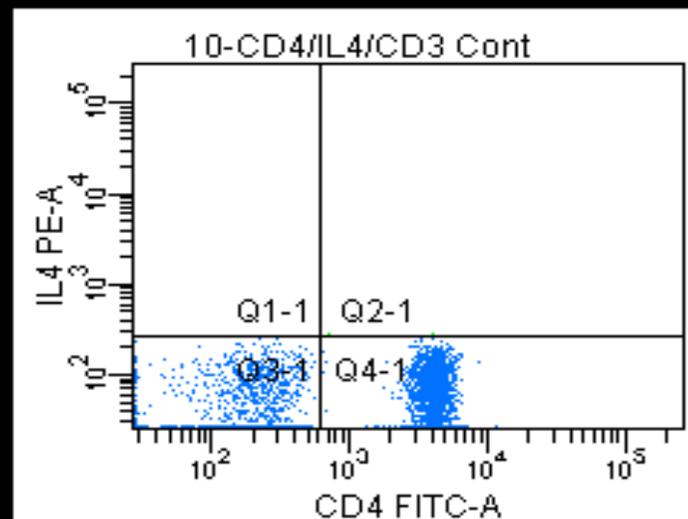
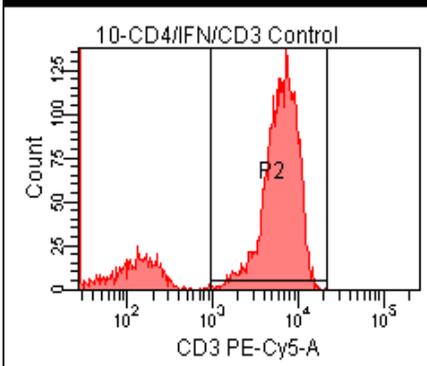
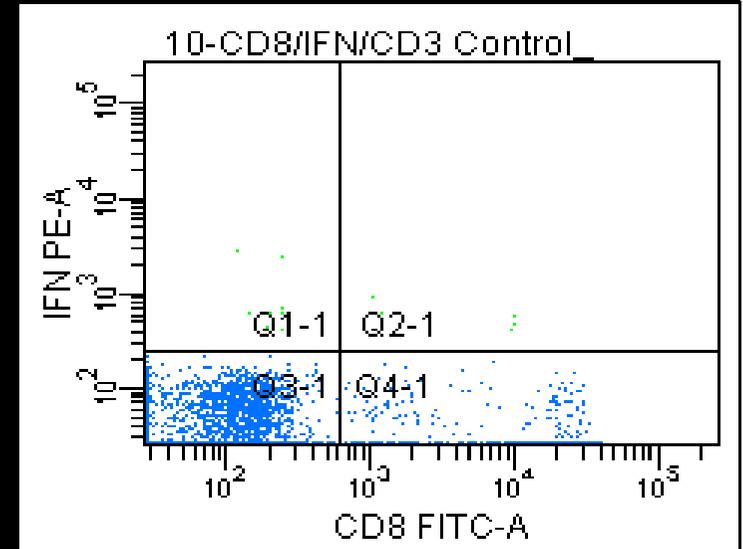
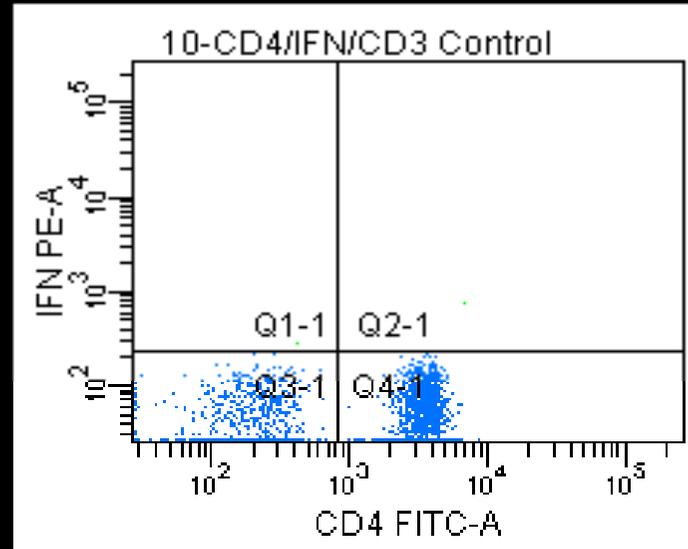
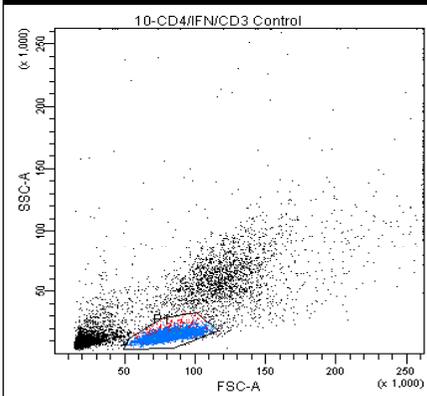
Флюоресцеин изотиоцианат (FITC)-конъюгированные 13B8.2 **CD4** (IO Test, Immunotech, France)

FITC-конъюгированные B9.11 **CD8** (IO Test, Immunotech, France)

Для определения содержания Т-клеток-памяти:

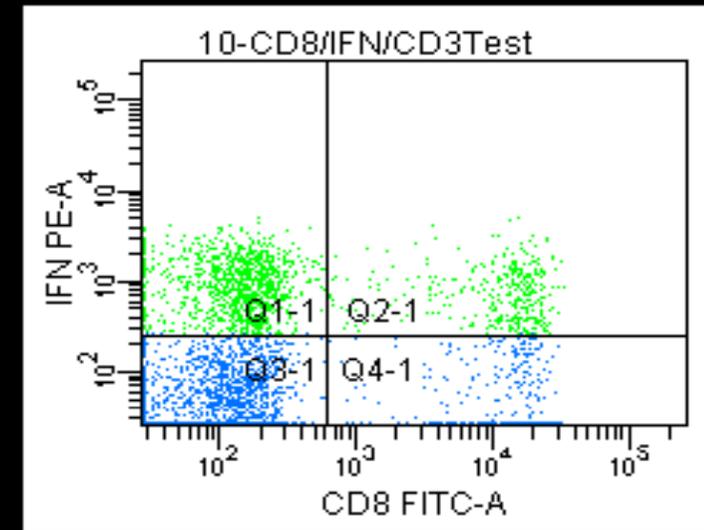
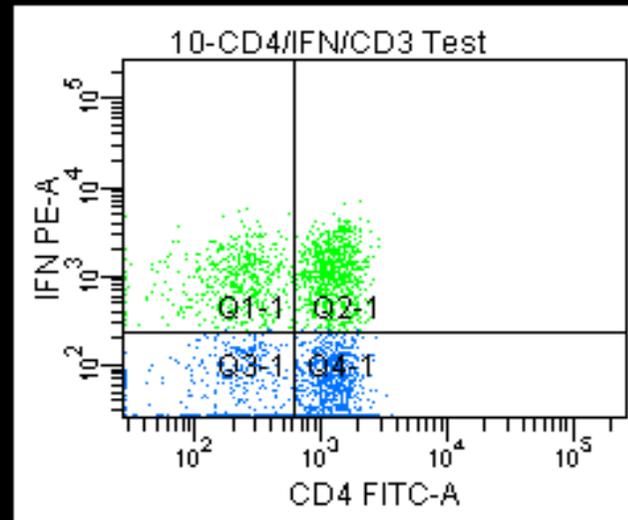
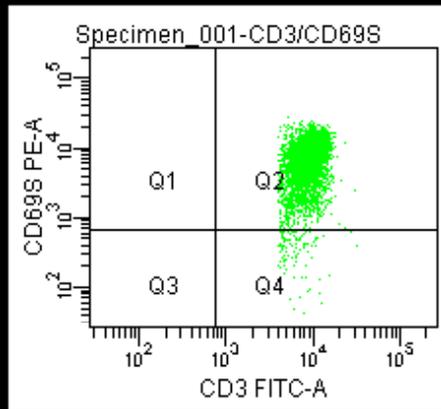
CD45RA FITC/CD62L PE/CD3 PerCP/CD4 APC и CD45RA FITC/CD62L PE/CD3 PerCP/CD8 APC MultiTest (BDIS).

Спонтанная экспрессия цитокинов лимфоцитами периферической крови (4 часа в присутствии брефелдина А)

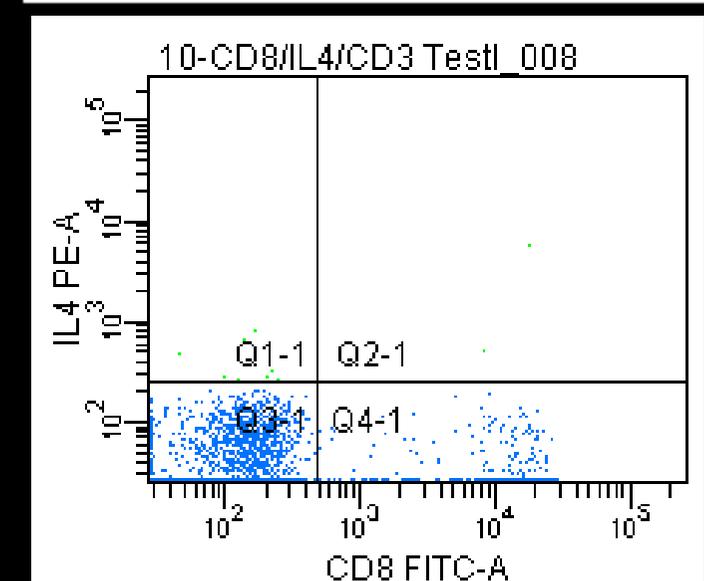
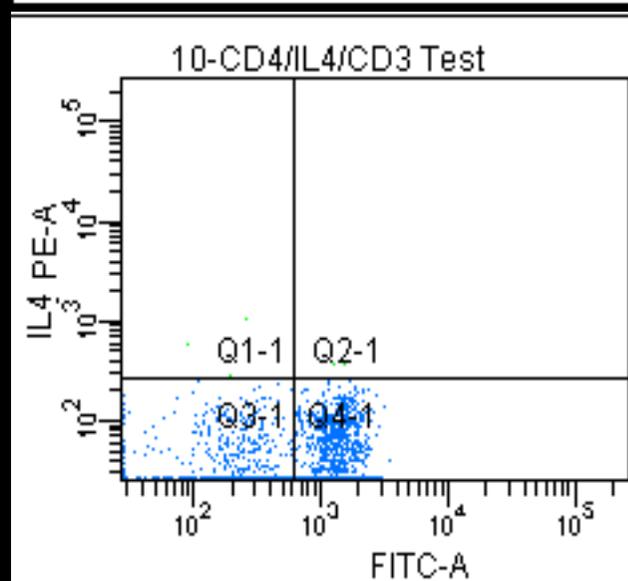
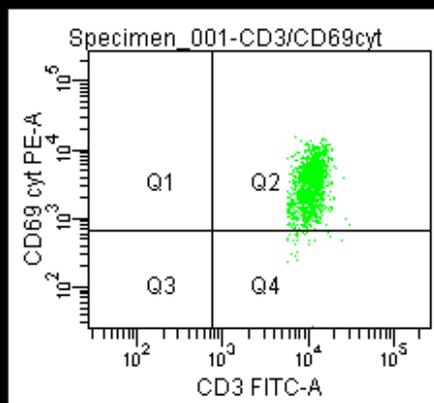


Стимулированная экспрессия цитокинов лимфоцитами периферической крови (ФМА и иономицин, 4 часа в присутствии брефелдина А)

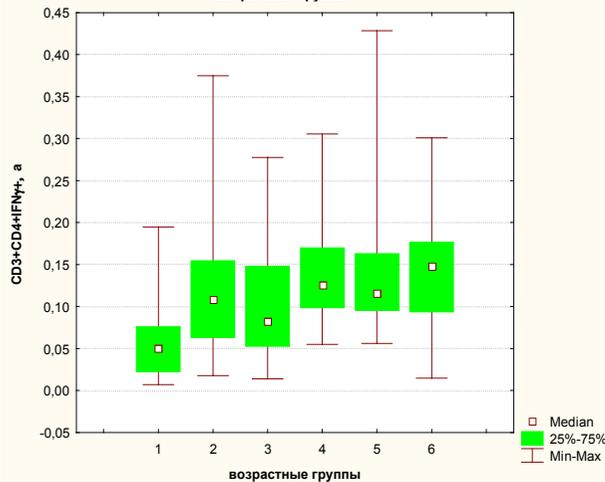
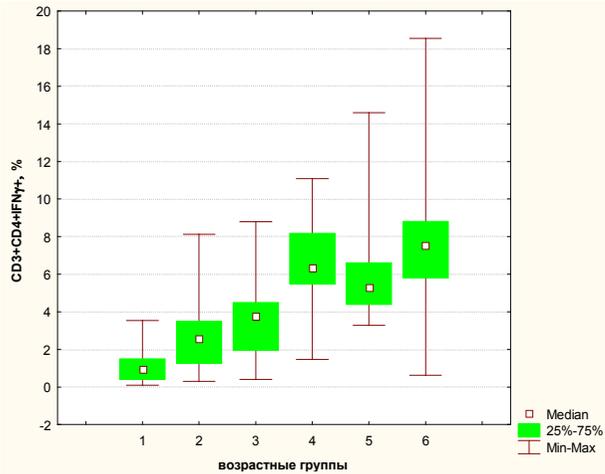
CD69s=96%



CD69cyt=98%

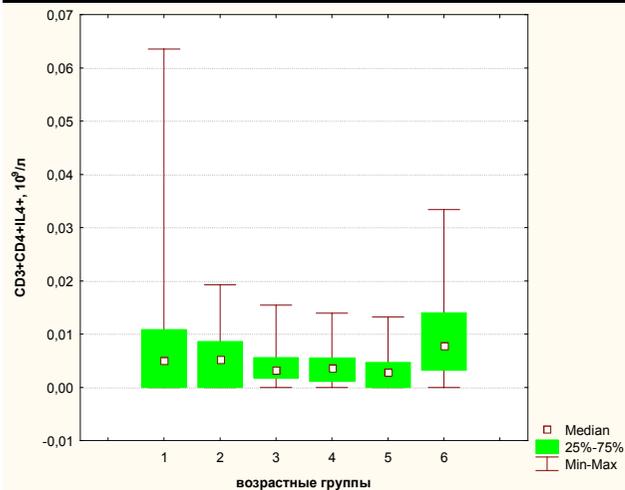
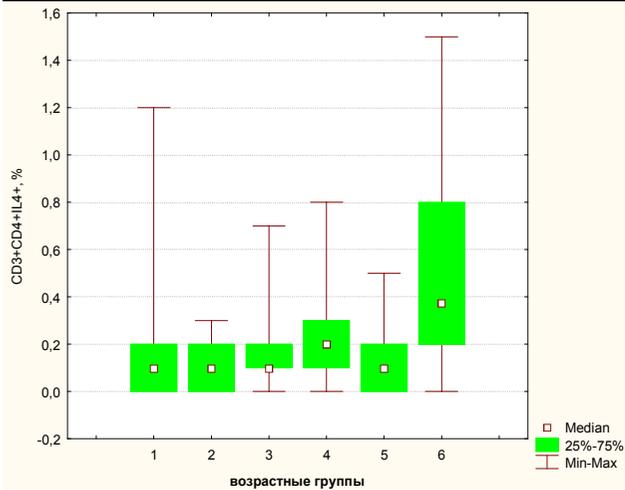


Содержание Th1-лимфоцитов в разных возрастных группах



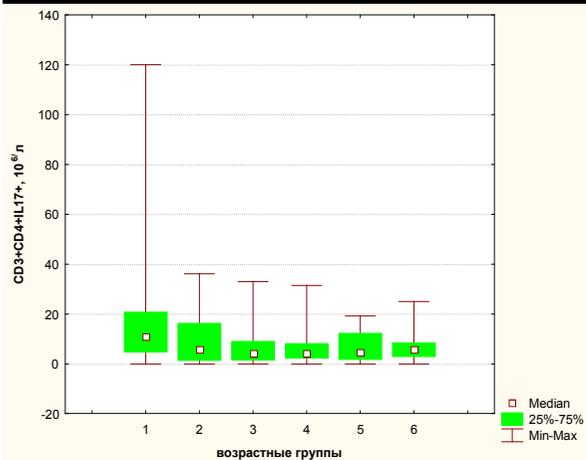
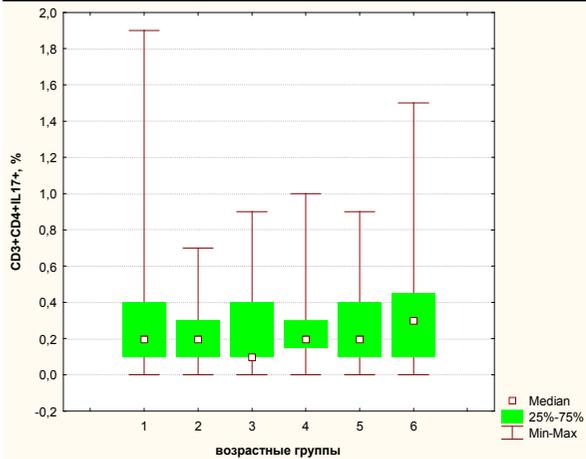
Т-эффекторы /клетки памяти	7-12 мес Медиана Нижний и верхний квартили 1	1-3 года Медиана Нижний и верхний квартили 2	4-7 лет Медиана Нижний и верхний квартили 3	8-14 лет Медиана Нижний и верхний квартили 4	15-18 лет Медиана Нижний и верхний квартили 5	25-45 лет Медиана Нижний и верхний квартили 6
Th1 %	0,95 0,40 1,45 3,4,5,6	2,55 1,34 3,39 4,5,6	3,80 1,96 4,50 1,4,5,6	6,34 5,47 8,17 1,2,3	5,30 4,43 6,40 1,2,3	7,55 5,90 8,74 1,2,3
Th1 Абс./мк л	49,76 26,44 74,32 2,4,5,6	108,08 65,91 153,05 1	82,16 53,57 143,54	125,50 98,54 169,78 1	115,34 96,13 161,26 1	147,98 100,22 176,35 1

Содержание Th2-лимфоцитов в разных возрастных группах



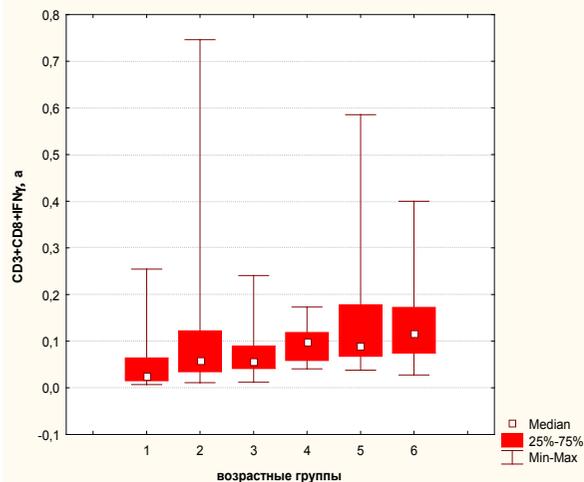
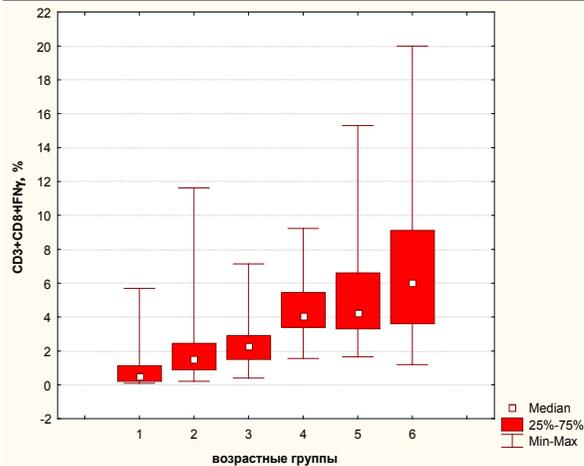
Т-эффекторы /клетки памяти	7-12 мес Медиана Нижний и верхний квартили 1	1-3 года Медиана Нижний и верхний квартили 2	4-7 лет Медиана Нижний и верхний квартили 3	8-14 лет Медиана Нижний и верхний квартили 4	15-18 лет Медиана Нижний и верхний квартили 5	25-45 лет Медиана Нижний и верхний квартили 6
Th2 %	0,10 0,00 0,18 6	0,10 0,05 0,20 6	0,10 0,10 0,20 6	0,20 0,10 0,30 6	0,10 0,00 0,20 6	0,38 0,20 0,80 1,2,3,4,5
Th2 Абс./мл л	4,98 0,00 10,16 5	5,24 1,40 8,50	3,24 1,82 5,41	3,74 1,15 5,56	2,88 0,00 4,60 1,6	7,80 3,38 13,96 5

Содержание Th17-лимфоцитов в разных возрастных группах



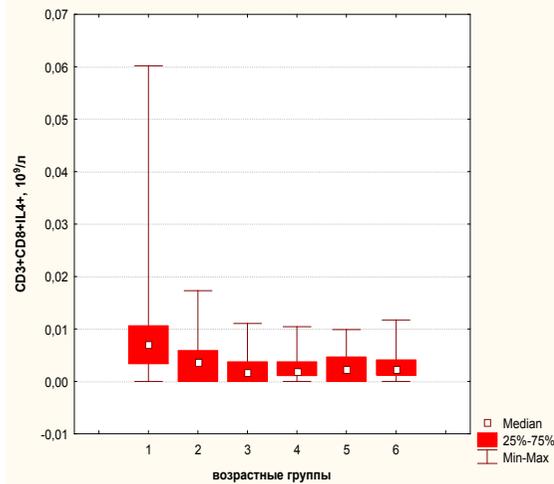
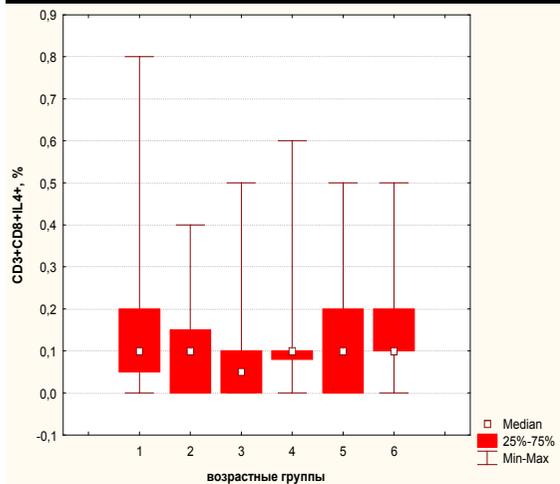
Т-эффекторы /клетки памяти	7-12 мес Медиана Нижний и верхний квартили 1	1-3 года Медиана Нижний и верхний квартили 2	4-7 лет Медиана Нижний и верхний квартили 3	8-14 лет Медиана Нижний и верхний квартили 4	15-18 лет Медиана Нижний и верхний квартили 5	25-45 лет Медиана Нижний и верхний квартили 6
Th17 %	0,20 0,10 0,40	0,20 0,10 0,25	0,10 0,10 0,40	0,20 0,15 0,30	0,20 0,10 0,40	0,30 0,12 0,45
Th17 Абс./мл	11,01 5,59 20,29 2,3,4,5,6	5,62 2,25 15,90 1	4,10 1,65 8,83 1	4,21 2,42 8,03 1	4,49 1,91 9,68 1	5,90 2,97 8,33 1

Содержание Тс1-лимфоцитов в разных возрастных группах



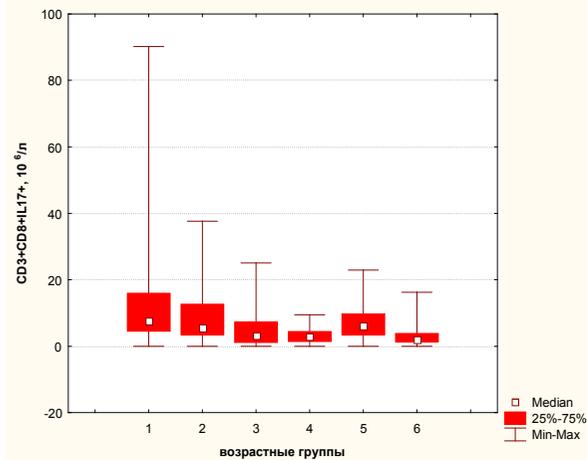
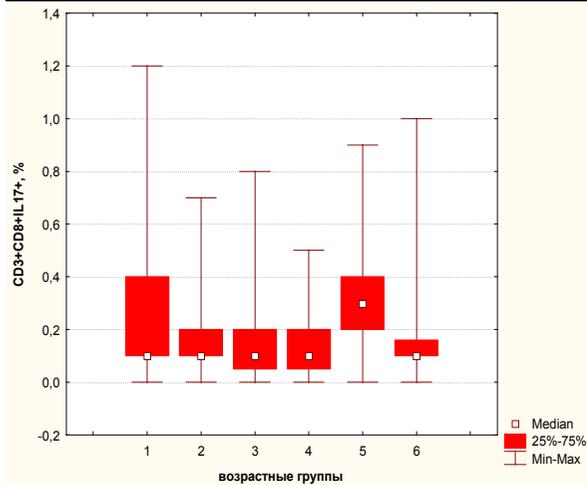
Т-эффекторы /клетки памяти	7-12 мес Медиана Нижний и верхний квартили 1	1-3 года Медиана Нижний и верхний квартили 2	4-7 лет Медиана Нижний и верхний квартили 3	8-14 лет Медиана Нижний и верхний квартили 4	15-18 лет Медиана Нижний и верхний квартили 5	25-45 лет Медиана Нижний и верхний квартили 6
Тс1 %	0,50 0,20 1,12 4,5,6	1,50 0,93 2,39 5,6	2,30 1,50 2,90 5,6	4,05 3,40 5,46 1	4,22 3,36 6,55 1,2,3	6,00 3,73 8,87 1,2,3
Тс1 Абс./мк л	84,68 56,62 160,55 5,6	204,65 126,68 312,77	150,56 104,65 249,74	236,76 174,87 280,06	232,83 191,45 309,08 1	276,88 185,33 377,41 1

Содержание Тс2-лимфоцитов в разных возрастных группах



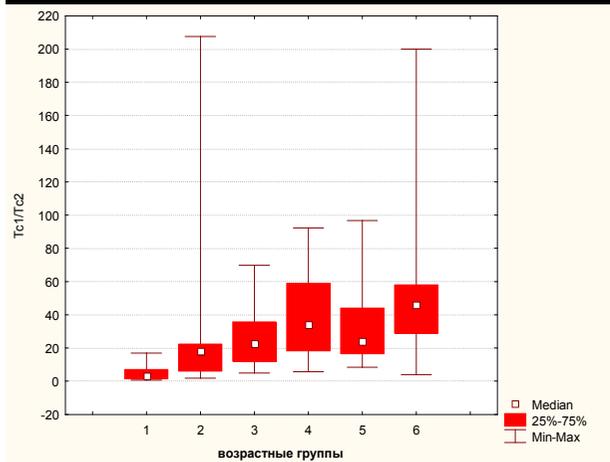
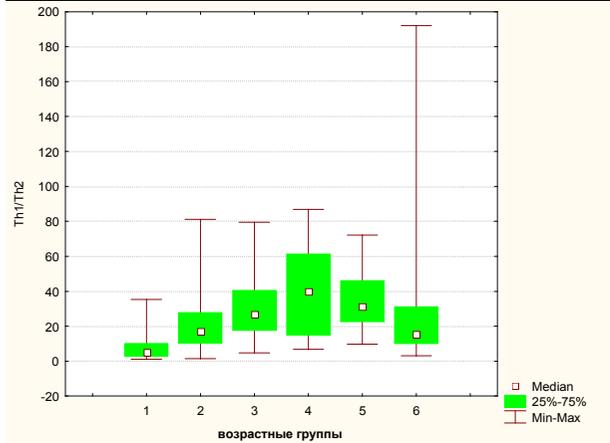
Т-эффекторы /клетки памяти	7-12 мес Медиана Нижний и верхний квартили 1	1-3 года Медиана Нижний и верхний квартили 2	4-7 лет Медиана Нижний и верхний квартили 3	8-14 лет Медиана Нижний и верхний квартили 4	15-18 лет Медиана Нижний и верхний квартили 5	25-45 лет Медиана Нижний и верхний квартили 6
Тс2 %	0,10 0,07 0,18	0,10 0,00 0,13	0,05 0,00 0,10	0,10 0,08 0,10	0,10 0,00 0,20	0,10 0,10 0,20
Тс2 Абс./мк л	6,99 3,39 10,46 2,3,4,5,6	3,66 0,00 5,88 1	1,68 0,00 3,69 1	1,90 1,11 3,74 1	2,25 0,00 4,35 1	2,24 1,25 4,04 1

Содержание Тnc17-лимфоцитов в разных возрастных группах



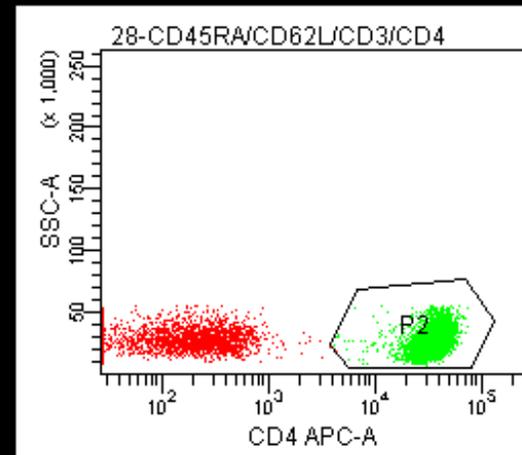
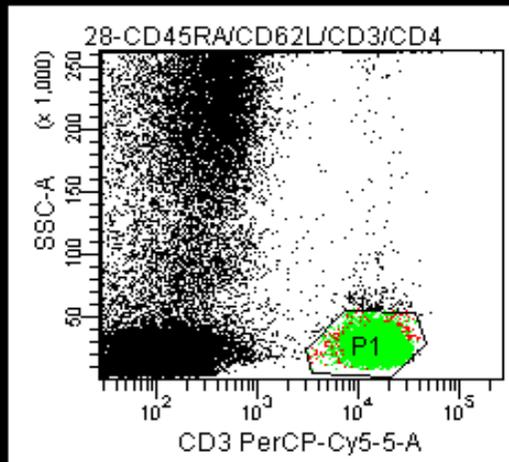
Т-эффекторы /клетки памяти	7-12 мес Медиана Нижний и верхний квартили 1	1-3 года Медиана Нижний и верхний квартили 2	4-7 лет Медиана Нижний и верхний квартили 3	8-14 лет Медиана Нижний и верхний квартили 4	15-18 лет Медиана Нижний и верхний квартили 5	25-45 лет Медиана Нижний и верхний квартили 6
Тnc17 %	0,10 0,10 0,30	0,10 0,10 0,20	0,10 0,05 0,20	0,10 0,05 0,20	0,30 0,20 0,40	0,10 0,10 0,16
Тnc17 Абс./мк л	7,53 4,63 15,62 3,4,5,6	5,62 3,58 12,04	3,19 1,19 7,35 1	2,78 1,40 4,46 1	6,15 3,81 9,58 1	2,01 1,39 3,79 1

Соотношение Th1/Th2, Tc1/Tc2 лимфоцитов в разных возрастных группах



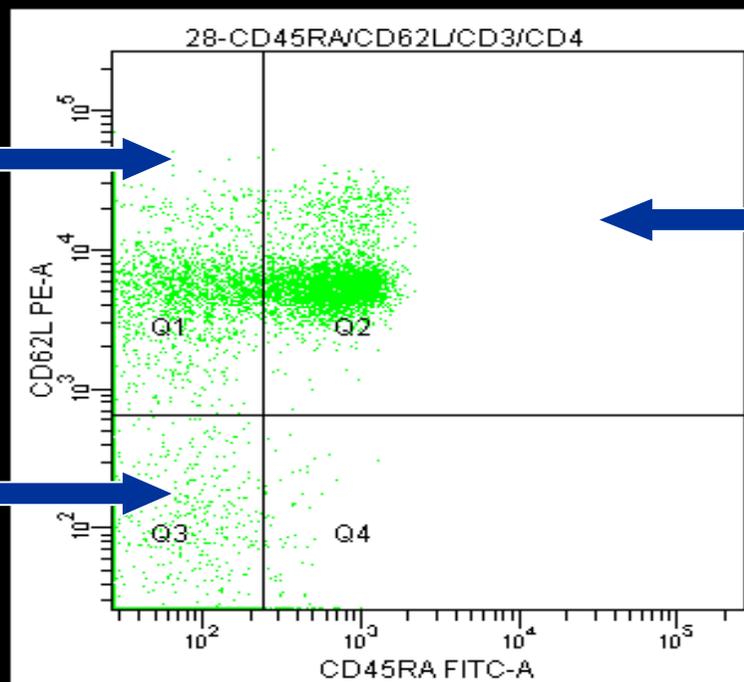
Т-эффекторы /клетки памяти	7-12 мес Медиана Нижний и верхний квартили 1	1-3 года Медиана Нижний и верхний квартили 2	4-7 лет Медиана Нижний и верхний квартили 3	8-14 лет Медиана Нижний и верхний квартили 4	15-18 лет Медиана Нижний и верхний квартили 5	25-45 лет Медиана Нижний и верхний квартили 6
Th1/ Th2	5,00 3,00 9,75 3,4,5,6	17,32 10,38 27,60	26,80 17,97 39,90 1	39,70 17,33 52,50 1	31,08 23,00 45,50 1	15,25 10,11 31,00 1
Tc1/ Tc2	3,00 1,75 6,30 4,5,6	18,20 7,10 22,03	22,55 12,57 34,88	34,00 19,75 58,35 1	23,85 16,58 43,55 1	46,00 29,00 58,00 1

T-лимфоциты памяти



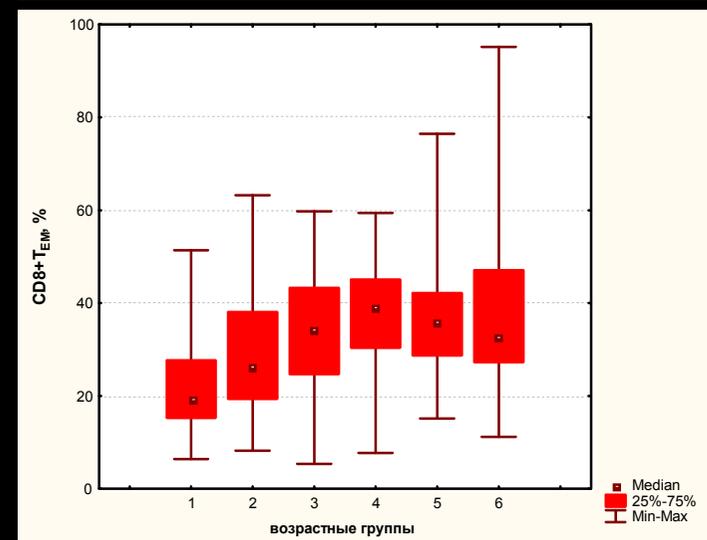
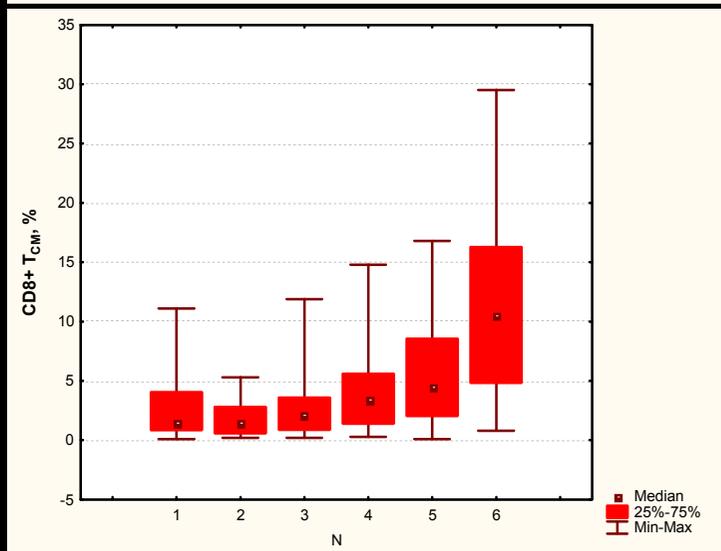
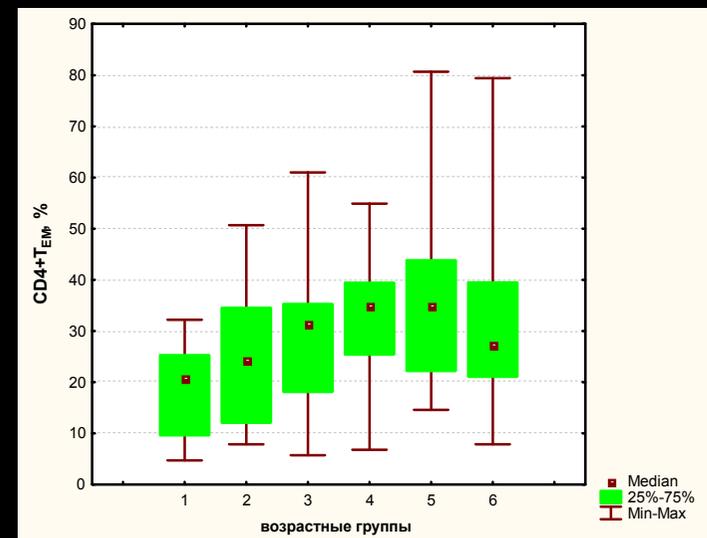
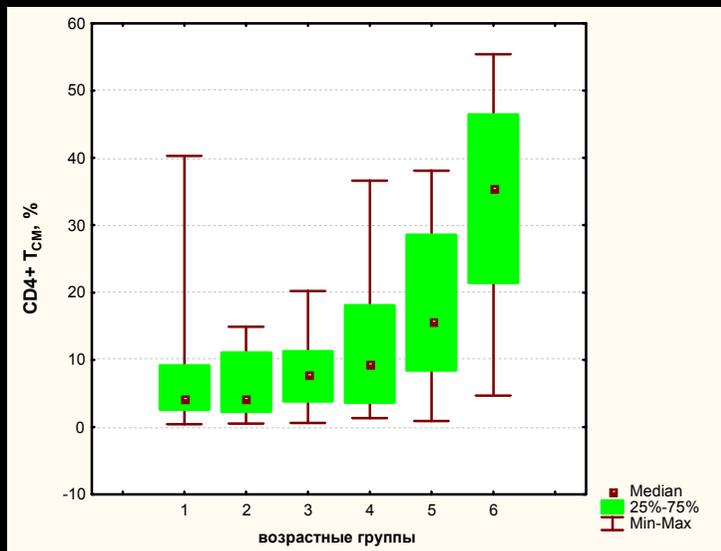
Центральные
CD4+Т-клетки-
памяти

Эффекторные
CD4+Т-клетки-
памяти

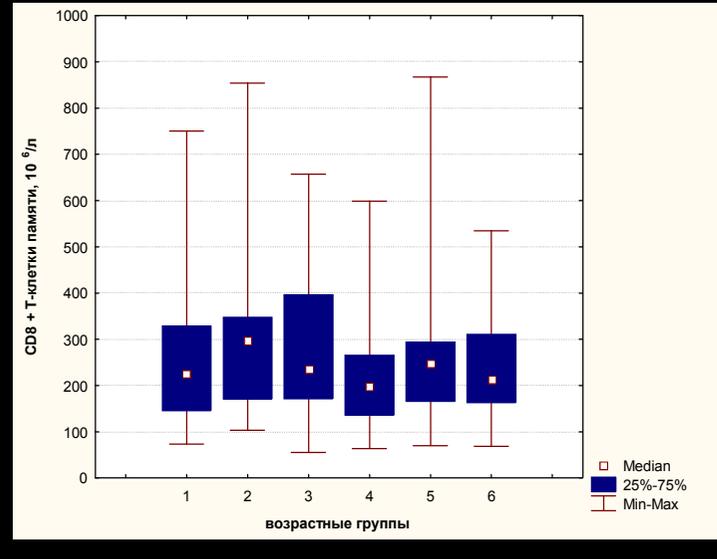
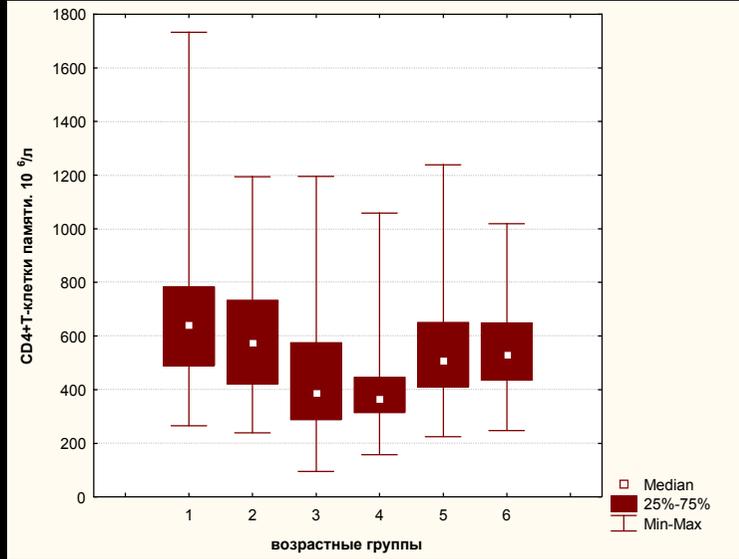
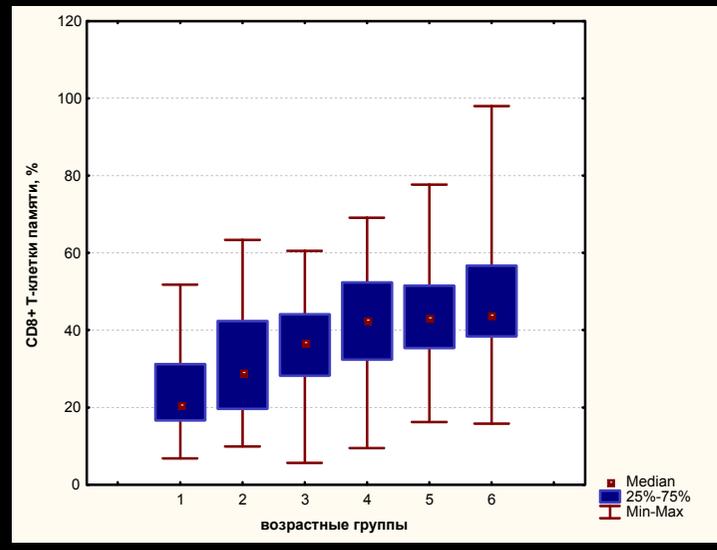
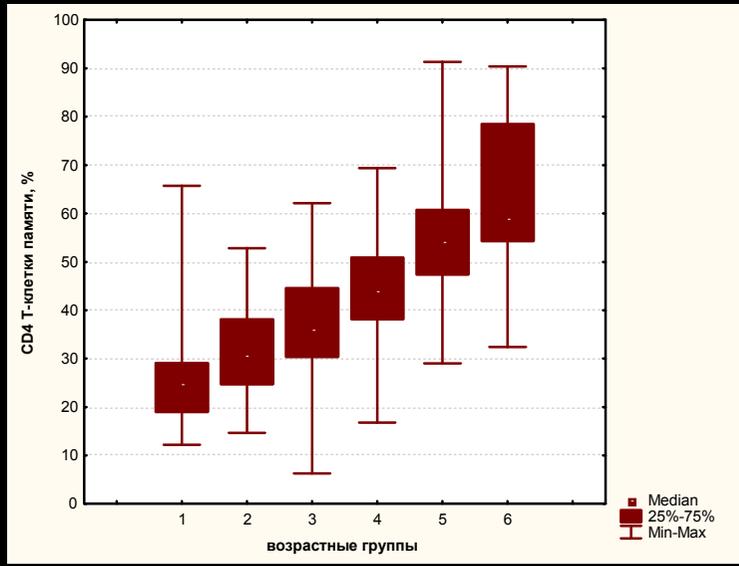


Наивные Т-
хелперы

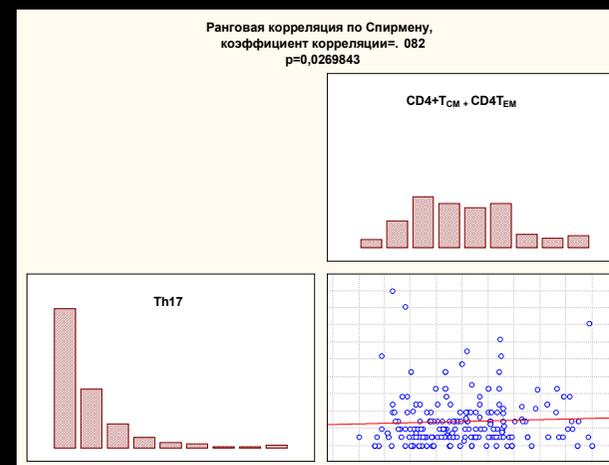
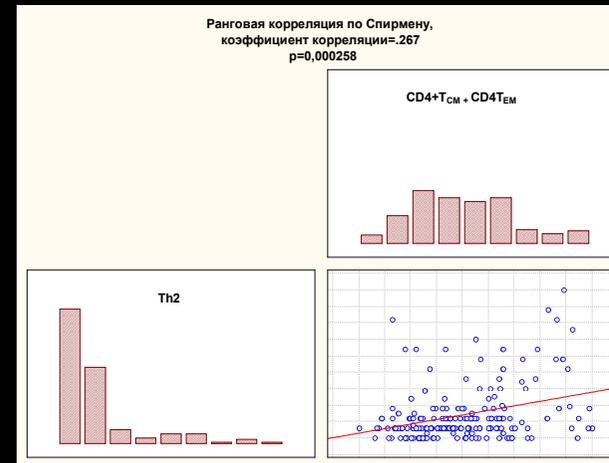
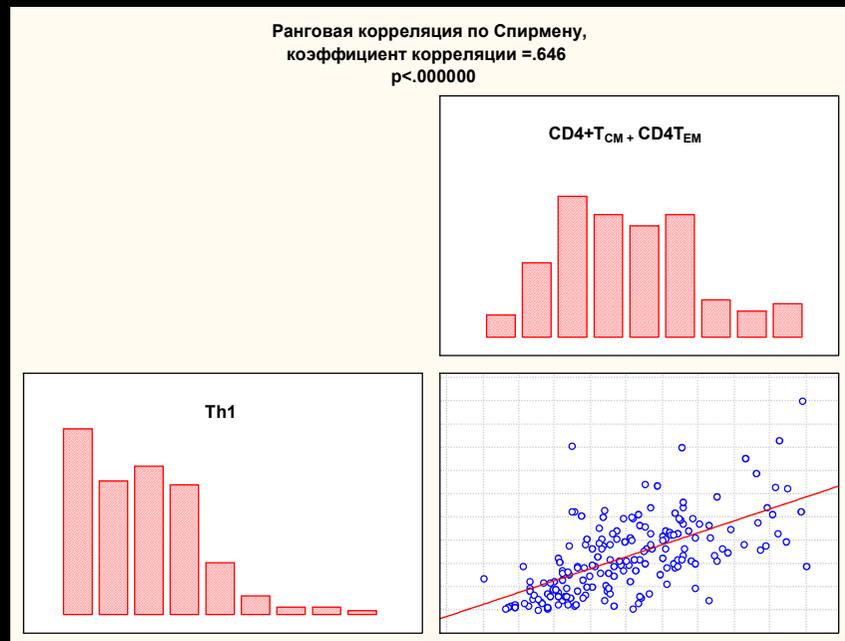
Относительное содержание центральных и эффекторных CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов памяти



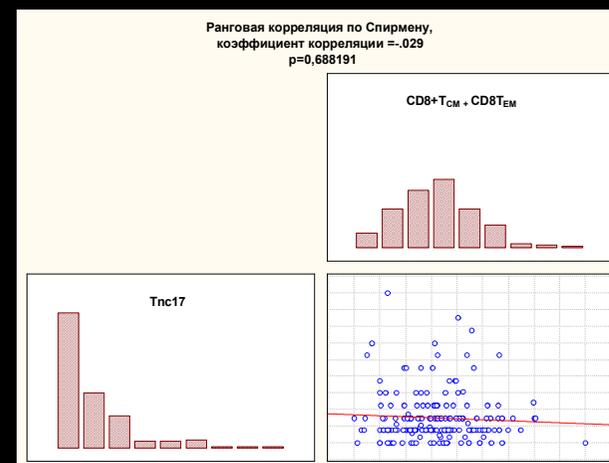
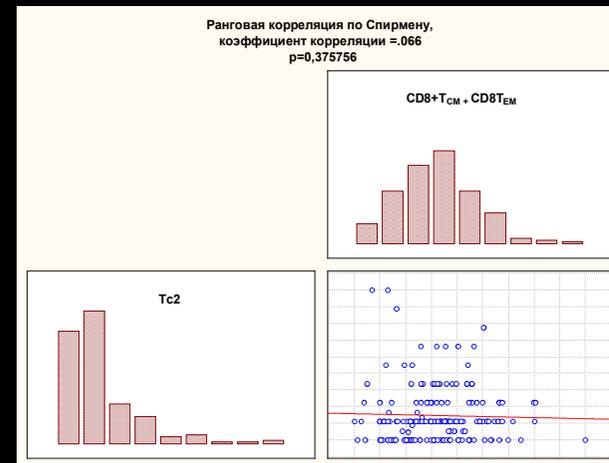
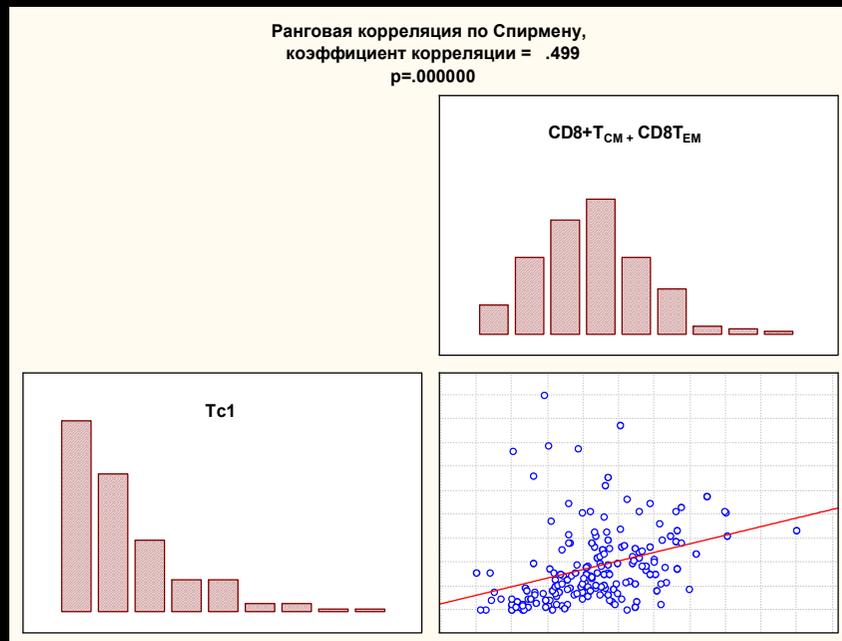
Содержание CD4+ и CD8+Т-лимфоцитов памяти в разных возрастных группах



Коррелятивные связи между содержанием Th1, Th2, Th17-субпопуляций и CD4+Т-лимфоцитами памяти



Коррелятивные связи между содержанием Тс1, Тс2, Тс17-субпопуляций и CD8+Т-лимфоцитами памяти



Заключение:

- На фоне редуцированного Th1 и Tc1-иммунитета на 7-12 месяце жизни у ребенка наблюдается преимущественная поляризация дифференцировки T-лимфоцитов по пути Th2 (Tc2) и Th17 (Tnc17), что, по всей видимости, способствует манифестации Th2-опосредованных аллергических заболеваний у детей с предрасположенностью к атопии.

Заключение:

- У детей старше одного года количество Th1 и Tc1, Th2 и Tc2 лимфоцитов значимо не отличалось от содержания этих субпопуляций у взрослых.

Заключение:

- В подростковом возрасте увеличение индекса Th1/Th2 связано со снижением содержания Th2-субпопуляции. В этой же группе наблюдалась тенденция к нарастанию содержания IL17A-позитивных лимфоцитов, что может способствовать предрасположенности к индукции различных аутоиммунных заболеваний в подростковом возрасте.

Заключение:

- У взрослых людей 25-45 летнего возраста содержание Th1-субпопуляции преобладало над содержанием Th2 в 15 раз, Tc1 над Tc2 – в 46 раз. Увеличение с возрастом относительного содержания Th1 и Tc1-субпопуляций лимфоцитов непосредственно связано с формированием пула T-лимфоцитов памяти.

Спасибо за внимание