

# Характеристика субпопуляционного состава Т-лимфоцитов у жителей Московского региона в возрасте старше 80 лет

И.В.Мирошниченко, В.Н.Столпникова, Т.В.Левашова, Е.А.Сорокина, С.Г.Топорова

*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова,  
Российский геронтологический научно-клинический центр,  
лаборатория клинической возрастной иммунологии и аллергологии, Москва  
(зав. лабораторией — проф. В.Ф.Семенов)*

Цель исследования — определить маркеры и стадии иммуностарения. Анализировали данные проточной полихромной цитометрии 155 пациентов в возрасте 80–89 лет (1-я группа) и 276 долгожителей в возрасте 90–104 лет (2-я группа). Были подобраны иммунограммы с однотипными количественными изменениями хелперных CD4<sup>+</sup>, цитотоксических CD8<sup>+</sup> и активированных CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Т-клеток. Средние абсолютные значения показателей с аналогичным типом отклонений от нормы не зависели от возраста. Однако во 2-й группе чаще выявлялись лица с иммунодефицитом (80 ± 5%) и реже — с активацией иммунитета (20 ± 5%), чем в 1-й группе (33,5 ± 7,5% и 66,5 ± 7,5% соответственно). Можно полагать, что выделенные типы отклонений от нормы отражают последовательные стадии естественного иммуностарения, связанные с количественным дефицитом CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup>. Возможно, иммунное воспаление на этом фоне стимулирует ускоренное старение.

*Ключевые слова: долгожители, иммунологические маркеры воспаления и старения, кластерный анализ, стадии физиологического иммуностарения, старческий иммунодефицит*

## Characteristics of T-Lymphocyte Sub-Types in the Moscow Region Residents over the Age of 80 Years

I.V.Miroshnichenko, V.N.Stolpnikova, T.V.Levashova, E.A.Sorokina, S.G.Toporova

*Pirogov Russian National Research Medical University,  
Russian Gerontological Scientific Clinical Center,  
Laboratory of Clinical Age Immunology and Allergology, Moscow  
(Head of the Laboratory — Prof. V.F.Semenkov)*

The aim of the study was to determine the markers and the stages of the immunosenescence. The data of flowing polychrome cytometry of 155 patients at the age of 80–89 years (group 1) and 276 patients at the age of 90–104 years (group 2) were analyzed. Immunograms were picked with homogeneous quantitative changes helper CD4<sup>+</sup>, cytotoxic CD8<sup>+</sup> and activated CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> T-cells. The average absolute values of indices with the analogous type of deviations from the standard did not depend on the age. However in the 2<sup>nd</sup> group persons with immunodeficiency were identified more often (80 ± 5%) and less with activation of immunity (20 ± 5%), than in the 1<sup>st</sup> group (33.5 ± 7.5% and 66.5 ± 7.5%, accordingly). It was assumed that the change of types of deviations from the standard reflects the sequential stages of natural immunosenescence, associated with quantitative CD4<sup>+</sup> and/or CD8<sup>+</sup> deficiency. Possibly the immune inflammation stimulates the accelerated aging against this background.

*Keywords: centenarians, immunological markers of inflammation and senescence, cluster analysis, stages of physiological immunosenescence, senile immunodeficiency*

Основной причиной старения человека считают хронические воспалительные процессы, ассоциированные с возрастзависимыми патологиями [1, 2]. Такие заболевания воспалительного генеза, как хронические неспецифические заболевания легких, атеросклероз, сахарный диабет 2 типа полагают причиной ускоренного старения, в

процесс которого вовлекается иммунная система и, в первую очередь, Т-лимфоциты [3–13]. Напротив, долгожители могут служить моделью «успешного» (физиологического) старения. Состояние их иммунитета, обеспечившего им столь долгое проживание, может быть принято в качестве дополнения к эталону долгожительства.

Целью исследования было выявить иммунологические маркеры и их изменения в процессе физиологического старения. Для решения этого вопроса были отобраны иммунограммы первичного скринингового исследования пациентов в возрасте от 80 до 104 лет с основным диагнозом ИБС и со схожим спектром возрастзависимых хронических соматических заболеваний вне стадии обострения. Учитывая роль воспаления в процессе старения,

### Для корреспонденции:

Мирошниченко Ирина Вадимовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической возрастной иммунологии и аллергологии Российского геронтологического научно-клинического центра

Адрес: 129226, Москва, 1-я ул. Леонова, 16

Телефон: (499) 187-8652

E-mail: ivmirosh@mail.ru

Статья поступила 30.05.2014, принята к печати 17.09.2014

исследования были дополнены определением активированных CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Т-клеток (Т<sub>акт</sub>) и концентрации С-реактивного белка (С-РБ). Мы полагали, что выбранная модель может выявить динамику естественных количественных изменений показателей иммунитета на последних этапах жизни человека, когда процессы разрушения и отмирания клеток организма становятся необратимыми.

### Пациенты и методы

Материалом для исследования были клетки крови пациентов Российского геронтологического научно-клинического центра. Были обследованы 155 человек в возрасте 80–89 лет (1-я группа) и 276 долгожителей в возрасте 90–104 лет (2-я группа). Структура полиморбидности в обеих группах была аналогичной, из исследования были исключены лица с обострениями хронических процессов и с заболеваниями воспалительного и аутоиммунного генеза. Все исследования проводили на основе информированного согласия пациентов и их родственников в соответствии с международными этическими требованиями ВОЗ (Женева, 1993). Методом полихромной проточной цитометрии (прибор FACSCalibur и моноклональные антитела фирмы Becton Dickinson, США) определяли лимфоциты (Лф) с поверхностным рецептором CD3 и их субпопуляции с фенотипом хелперных CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>), цитотоксических CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>) и активированных CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Т-клеток. Концентрацию С-РБ для дифференциации хронического и острого воспаления определяли методом иммуноферментного ана-

лиза (прибор Expert plus фирмы ASYS Hitech, Австрия, и реагенты фирмы «Вектор-Бест», Россия). Полученные данные сравнивали с нормами, рекомендуемыми фирмами-производителями реактивов. Были рассчитаны средние арифметические (*M*) и частота отклонений от нормы (*E*, %) с доверительным интервалом (*I*<sub>95</sub>) при уровне вероятности *p* < 0,05. Для сравнения средних показателей применяли *t*-критерий Стьюдента.

### Результаты исследования и их обсуждение

На основе предварительно проведенной стандартной статистической обработки данных иммунограмм выделили кластер показателей CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Т<sub>акт</sub> и С-РБ, отклонения которых от нормы были наиболее частотными. Стандартный статистический анализ этих показателей без учета их индивидуальных отклонений от нормы представлен в табл. 1, 2.

В обеих возрастных группах средние значения CD8<sup>+</sup> были одинаковыми и достоверно ниже нормы, а среднее количество Т<sub>акт</sub> и С-РБ достоверно превышало норму. Процент CD4<sup>+</sup> с численностью, превышающей норму, у пациентов 1-й группы был выше, чем во 2-й (28 и 13% соответственно). Напротив, у лиц старше 90 лет возрастал процент CD4<sup>+</sup>, величина которых была ниже нормы (44 против 15%). Достоверно с возрастом увеличивался дефицит CD8<sup>+</sup> (58 и 73%). Во 2-й группе частота выявления Т<sub>акт</sub> была достоверно ниже, чем в 1-й (68 и 85%). Примерно у половины пациентов наблюдали повышенную концентрацию С-РБ, несмотря на отбор пациентов без обострений хронических заболеваний на момент исследования.

Таблица 1. Возрастные изменения отдельных показателей иммунограммы, *M* (*I*<sub>95</sub>)

Показатель	Норма	1-я группа	2-я группа
Лф, кл/мкл	2100 (1200–3000)	2100 (1970–2230)	1610* (1330–1890)
CD4 <sup>+</sup> , кл/мкл	850 (600–1100)	870 (340–1300)	720 (300–1140)
CD8 <sup>+</sup> , кл/мкл	600 (400–800)	240* (200–280)	235* (195–275)
Т <sub>акт</sub> , кл/мкл	≤100	240* (210–270)	255* (185–325)
С-РБ, мг/л	≤8,0	13* (9–17)	16* (11–21)

\* — достоверные различия с нормой (*p* < 0,05)

Таблица 2. Возрастные изменения частоты отклонений показателей иммунограммы от нормы в сравниваемых группах, *E* (*I*<sub>95</sub>), %

Показатель	Выше нормы		Ниже нормы	
	1-я группа	2-я группа	1-я группа	2-я группа
Лф	12 (7–17)	6 (3–9)	10 (5–15)	20* (15–25)
CD4 <sup>+</sup>	28 (21–35)	13* (9–17)	15 (9–21)	44* (38–50)
CD8 <sup>+</sup>	7 (3–11)	5 (2–8)	58 (50–66)	73* (68–78)
Т <sub>акт</sub>	85 (78–92)	68* (62–74)	-	-
С-РБ	43 (30–56)	58* (52–64)	-	-

\* — достоверные различия с 1-й группой (*p* < 0,05)

На основе кластерного анализа в соответствии с индивидуальными отклонениями от нормы численности субпопуляций CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> в каждой возрастной группе были отображены иммунограммы пациентов с однотипными изменениями: N/N, ↑/N, ↑/↑, N/↑, ↓/↑, ↑/↓, N/↓, ↓/N, ↓/↓, где N — значение показателя, соответствующее норме, ↑ — превышающее норму и ↓ — ниже нормы.

При вариантах, включающих увеличение численности CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> (↑/N, ↑/↑ и N/↑), в 100% случаев количество T<sub>акт</sub> превышало норму, что позволило объединить их в группу с иммунитетом в состоянии активации. В эту же категорию был отнесен вариант N/N, при котором частота T<sub>акт</sub> составила 100% в 1-й группе, и также только у трех из 36 долгожителей 2-й группы этот показатель соответствовал норме. Типы отклонений ↓/↑, ↑/↓, N/↓, ↓/N, и ↓/↓ характеризовались количественным дефицитом CD8<sup>+</sup> и/или CD4<sup>+</sup>, у большинства из них количество T<sub>акт</sub> было выше нормы, причем во 2-й группе процент таких пациентов был ниже (59%), чем в 1-й (70%) (табл. 3).

В табл. 4 представлены средние значения T-субпопуляций, входящих в кластер с различными векторами отклонений от нормы. Сравнивая варианты с аналогичными изменениями показателей CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> в двух возрастных группах, мы не обнаружили разницы в средних величинах. Увеличение средних значений количества T<sub>акт</sub> было отмечено при всех вариантах отклонений от нормы, кроме ↓/↓. Вариант ↓/↑ был отмечен только у трех долгожителей, поэтому при дальнейшей статистической обработке его исключили.

Среди долгожителей было достоверно больше лиц с иммунодефицитом (80 ± 5%), чем в 1-й группе (66,5 ± 7,5%), и достоверно меньше тех, чей иммунитет находился в состоянии активации (20 ± 5% и 33,5 ± 7,5% соответственно).

Таким образом, изменения численности субпопуляций CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> и T<sub>акт</sub> можно рассматривать в качестве наиболее доступных маркеров стадий иммуностарения. Для повышения информативности первичного скринингового исследования лиц старших возрастных групп рационально дополнить его определением T<sub>акт</sub> и С-РБ в качестве маркеров иммуновоспаления. Отметим, что варианты изменений численности и вектора этих показателей были такими же, как у ранее обследованных нами пациентов с сахарным диабетом 2 типа в возрасте от 50 до 89 лет. Исключением были 3 долгожителя с вариантом ↓/N, который отсутствовал у обследованных пациентов с сахарным диабетом 2 типа в возрасте 50–89 лет [13].

На основании полученных результатов можно предположить связь между изменениями величины и вектора компонентов кластера и последовательными изменениями в иммунитете от начальных этапов активации по типу иммунного ответа до развития хронического иммунного воспаления (высокие значения M для T<sub>акт</sub>), сопровождающегося аутоиммунными реакциями и формированием вторичного иммунодефицита.

Маркером долгожительства для лиц старше 80 лет, по-видимому, могут быть варианты CD4<sup>+</sup>N/CD8<sup>+</sup>N и CD4<sup>+</sup>↓/CD8<sup>+</sup>↓, при которых сохраняется соотношение этих субпо-

Таблица 3. Варианты количественных изменений показателей CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, характеризующих состояние иммунитета как активацию или дефицит, и частота их выявления у пациентов с T<sub>акт</sub> выше нормы

Группа	Число пациентов	Активация CD4 <sup>+</sup> и/или CD8 <sup>+</sup>					Дефицит CD4 <sup>+</sup> и/или CD8 <sup>+</sup>			
		N/N	↑/N	↑/↑	N/↑	↓/↑	↑/↓	N/↓	↓/N	↓/↓
1-я	всего	25	16	5	6	0	10	56	13	24
	с T <sub>акт</sub> > N	25	16	5	6	0	10	41	9	12
		<b>100</b>					<b>70 (62,5–77,5)</b>			
2-я	всего	36	7	5	7	3	24	75	17	102
	с T <sub>акт</sub> > N	33	7	5	7	3	20	50	11	47
		<b>94,5 (91,5–97,5)</b>					<b>59* (52–66)</b>			

Жирным шрифтом указана E (I<sub>95</sub>) для пациентов с T<sub>акт</sub> выше нормы.

\* — достоверные различия с 1-й группой (p < 0,05)

Таблица 4. Характеристика субпопуляционного состава T-лимфоцитов при разных вариантах количественных изменений CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> в сравниваемых группах, M (I<sub>95</sub>), кл/мкл

Показатель	Группа	N/N	↑/N	↑/↑	N/↑	↑/↓	N/↓	↓/N	↓/↓
CD4 <sup>+</sup>	1-я	830 (810–850)	1600 (1350–1850)	1530 (1230–1830)	920 (830–1010)	1520 (1300–1710)	810 (750–870)	480 (420–540)	410 (380–440)
	2-я	815 (765–865)	1430 (1220–1640)	1480 (1300–1660)	880 (750–910)	1420 (1280–1560)	820 (780–860)	450 (360–540)	400 (380–420)
CD8 <sup>+</sup>	1-я	510 (480–540)	540 (470–610)	920 (790–1050)	1015 (805–1255)	230 (190–270)	200 (180–220)	540 (400–680)	160 (130–190)
	2-я	540 (500–580)	635 (435–735)	1010 (880–1140)	1300 (740–1860)	200 (160–240)	210 (190–230)	600 (530–670)	170 (140–200)
T <sub>акт</sub>	1-я	340 (260–420)	345 (205–485)	400 (300–500)	450 (350–650)	300 (160–440)	200 (160–240)	170 (100–240)	170 (90–250)
	2-я	380 (270–490)	440 (250–630)	1240 (500–1980)	490 (400–580)	250 (160–340)	200 (190–210)	190 (140–240)	160 (50–270)

Таблица 5. Частота выявления пациентов с разными вариантами количественных изменений CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, характеризующими состояние иммунитета как активацию или иммунодефицит, E (I<sub>95</sub>), %

Группа	Активация CD4 <sup>+</sup> и/или CD8 <sup>+</sup>					Иммунодефицит CD4 <sup>+</sup> и/или CD8 <sup>+</sup>			
	N/N	↑/N	↑/↑	N/↑	↓/↑	↑/↓	N/↓	↓/N	↓/↓
1-я	16 (10–22)	10 (1–19)	3 (0–6)	4 (1–7)	0	6 (2–10)	36 (38–44)	8 (4–12)	15 (9–21)
		33,5 (26–41)					66,5 (59–74)		
2-я	14 (10–18)	2,5 (0,5–4,5)	1 (0–2)	2,5 (0,5–4,5)	1 (0–2)	9 (6–12)	27* (22–32)	6 (3–9)	37* (31–43)
		20* (15–25)					80* (75–85)		

\* — достоверные различия с 1-й группой (p < 0,05)

пуляций 2:1, а количество T<sub>акт</sub> и концентрация С-РБ соответствуют норме. Нарастание количественного дефицита CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> на фоне хронического иммунного воспаления является угрозой «успешному» старению.

Полагаем, что динамика иммуностарения будет подтверждена данными последующего анализа лонгитудинального исследования, которое проводили на протяжении 2–5 лет.

### Выводы

1. На основе первичного скринингового иммунологического анализа Т-лимфоцитов крови 431 пациента в возрасте от 80 до 104 лет выделен кластер показателей CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/T<sub>акт</sub>, количественные варианты компонентов которого характеризуют изменения в Т-клеточном звене иммунитета в процессе старения и могут расцениваться как маркеры последнего.

2. Однотипные изменения компонентов кластера отмечены как в возрастной группе 80–89 лет, так и у долгожителей, и характеризовались одинаковыми средними величинами.

3. Среди долгожителей был выше процент лиц с иммунодефицитом (80 ± 5%) и ниже — с иммунитетом в состоянии активации (20 ± 5%), чем у лиц 80–89 лет (66,5 ± 7,5% и 33,5 ± 7,5% соответственно).

4. С процессом «успешного» старения ассоциировались варианты CD4<sup>+</sup>N/CD8<sup>+</sup>N и CD4<sup>+</sup>↓/CD8<sup>+</sup>↓, при которых количество T<sub>акт</sub> и концентрация С-РБ соответствовали норме. Угрозой «успешному» старению, по-видимому, может быть длительное иммунное воспаление на фоне иммунодефицита и хронических возрастзависимых заболеваний.

5. Для повышения информативности первичного скринингового исследования лиц старших возрастных групп рационально дополнить его определением T<sub>акт</sub>.

### Литература

1. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А., Журавлева Ю.А. и др. Варианты развития хронического системного воспаления // Мед. иммунол. 2009. Т.11. №2–3. С.131–140.
2. Howcroft T.K., Campisi J., Louis G.B. et al. The role of inflammation in age-related disease // Aging (Albany NY). 2013. V.5 (1). P.84–93.
3. Miller R.A. Aging and immune function // Int Rev Cytol. 1991. V.124. P.187–215.

4. Симонова А.В. Фенотип лимфоцитов крови при воспалительных заболеваниях человека. М.: Изд-во «ИНТО», 2001. 228 с.
5. Ярилин А.А. Старение иммунной системы и тимус // Клини. геронтол. 2003. Т.9. №3. С.8–17.
6. Асташкин Е.И. Изменение процессов сигнализации при старении Т-лимфоцитов человека // Клини. геронтол. 2003. Т.9. №3. С.18–26.
7. Linton P.J., Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function // Nat Immunol. 2004. V.5 (2). P.133–139.
8. Столпникова В.Н., Кочергина Н.И., Карленко О.М., Мирошниченко И.В. Количественные изменения показателей иммунитета у долгожителей // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. 2006. №6. С.50–53.
9. Gruver A.L., Hudson L.L., Sempowsky G.D. Immunosenescence of ageing // J Pathol. 2007. V.211 (2). P.144–156.
10. Larbi A., Fülöp T., Pawelec G. Immune receptor signaling, aging and autoimmunity // Adv Exp Med Biol. 2008. V.640. P.312–324.
11. Lugli E., Troiano L., Pinti M. et al. Lymphocytes Sub-Types and Functions in Centenarians as Models for Successful Ageing // Handbook on Immunosenescence / Ed. by T.Fulop, C.Franceschi, K.Hirokawa, G.Pawelec. Berlin: Springer Science-Business Media B.V., 2009. P.29–62.
12. Caruso C., Buffa S., Candore G. et al. Mechanisms of immunosenescence // Immun Ageing. 2009. V.6. P.10–18.
13. Мирошниченко И.В., Левашова Т.В., Столпникова В.Н., Сорокина Е.А. Возрастные изменения субпопуляционного состава Т-лимфоцитов у пациентов с сахарным диабетом 2 типа // Вестн. РГМУ. 2014. №1. С.5–9.

### Информация об авторах:

Левашова Татьяна Вячеславовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической возрастной иммунологии и аллергологии Российского геронтологического научно-клинического центра  
Адрес: 129226, Москва, 1-я ул. Леонова, 16  
Телефон: (499) 187-8652  
E-mail: tvlevashova@gmail.com

Столпникова Вера Николаевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической возрастной иммунологии и аллергологии Российского геронтологического научно-клинического центра  
Адрес: 129226, Москва, 1-я ул. Леонова, 16  
Телефон: (499) 187-8652  
E-mail: lab\_immunol@mail.ru

Сорокина Елена Александровна, научный сотрудник лаборатории клинической возрастной иммунологии и аллергологии Российского геронтологического научно-клинического центра  
Адрес: 129226, Москва, 1-я ул. Леонова, 16  
Телефон: (499) 187-8652  
E-mail: lab\_immunol@mail.ru

Топорова Светлана Геннадьевна, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической возрастной иммунологии и аллергологии Российского геронтологического научно-клинического центра  
Адрес: 129226, Москва, 1-я ул. Леонова, 16  
Телефон: (499) 187-8652  
E-mail: toporovasg@mail.ru