

УДК 14. 1.017. 1

**Маслянюк Р.П.**, професор, **Божик Л.Я.**, ст. викладач,  
**Пукало П.Я.**, ст. викладач ©

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та  
біотехнологій імені С.З. Гжицького*

## **ВИЯВЛЕННЯ І РОЛЬ ЦИТОКІНОВОГО ТА Т-КЛІТИННОГО ПРОФІЛЮ В ПАТОЛОГІЇ ТВАРИН**

*В статті розглянуто механізми внутрішньоклітинної продукції  
цитокінів Т-лімфоцитами та їх роль в патології тварин*

**Ключові слова:** Т-клітини, цитокіни, патологія

Цитокіни відносяться до медіаторів запалення білкової природи, які залучаються до імунорегуляції лейкоцитарної відповіді, на інфекційні, аутоімунні, онкологічні та інші захворювання. Для досліджень цитокінів найчастіше використовують сучасні методи, основані на застосуванні специфічних антитіл до цих білкових структур: ELISA, ELISPOT і внутрішньоклітинне забарвлення. Перші два методи дозволяють визначити сумарну секрецію цитокінів популяцією клітин, в цей час як внутрішньоклітинне забарвлення дозволяє визначити продукцію цитокінів на рівні однієї конкретної клітини.

Дослідження внутрішньоклітинних цитокінів за допомогою проточної цитометрії вперше проведено і описано в роботі [5]. Автори показали, що фіксація параформальдегідом і наступна пермеабілізація сапоніном дозволяє виявити внутрішньоклітинні цитокіни за допомогою специфічних моноклональних антитіл. Клітини оброблені таким чином, вдається проаналізувати за допомогою проточного тиск нтоза або тиск нтозами мікроскопа.

Об'єктом досліджень були клітини різного походження, переважно ті, що на думку дослідників, могли бути продуцентами цитокінів. Серед них найчастіше використовувалися лімфоцити – основні імунокомпетентні клітини. Важливою умовою успішного аналізу є життєздатність клітин. Кількість живих клітин у суспензії повинно бути не менше 90%, оскільки внутрішньоклітинний тесті, вимагає стимуляції клітин *in vitro*.

Для виявлення цитокінів у крові антикоагулянт повинен бути лише гепарин у фізіологічних концентраціях, оскільки часто вживаний для цієї мети ЕДТА зв'язує Са, потрібний для процесів активації клітин. Застосування ЕДТА можливо для виділення окремих популяцій клітин (наприклад на градієнті фіколу).

В даний час описано велика кількість комерційних реагентів в якості індукторів продукції цитокінів, блокаторів, умов культивування та фарбування специфічними антитілами [12]. В них застосовується як двоетапна (фіксація з

наступною пермеабілізацією), так і тиск нтоза (фіксація і пермеабілізація одночасно) технологія. В основі фіксуєчого агента найчастіше використовують формальдегід ( 0,5-2% ), в основі пермеабілізуючого агента – сапонін ( 0,5-1,0%). Ці реагенти дозволяють проводити дослідження як з виділеними окремими клітинами, так і з цільною кров'ю.

Було встановлено, що для виділення внутрішньоклітинних цитокінів потрібно дотримуватися стандартних розчинів специфічних антитіл. Для цього рекомендується пряме імуофлюоресцентне забарвлення. Якщо кон'югати антитіл з флюорохромом недоступні, то можна використовувати некон'юговані антитіла з наступним фарбуванням кон'югатом вторинних антитіл з флюорохромом. В якості контролю такого фарбування можна використовувати ізотиповий контроль – надлишок чи некон'юговані антитіла до цитокіна, тиск нтозами з надлишком рекомбінантного цитокіну або нестимульовані клітини.

Що стосується інтервалів норм то їх визначають за результатами досліджень донорської регіональної популяції. Порівняння норм, отриманих різними дослідниками, досить складно, оскільки немає поки що стандартного методу постановки цього важливого тесту.

Окремого розгляду заслуговують питання вікових особливостей експресії внутрішньоклітинних цитокінів. Добре відомо, що наслідок будь-якої інфекційної хвороби залежно від віку може бути різним і, очевидно, значну роль в цьому відіграє цитокіновий фон, властивий різним віковим групам. Найбільш чутливими до інфекції є молодняк раннього віку, а також старі тварини: перші внаслідок незрілості імунної системи, другі в результаті вікової інволюції тимусу та інших імунокомпетентних органів.

У новонароджених тварин кількість потенціальних клітин – продуцентів цитокінів є значно більшою, ніж у дорослих, однак ця кількісна перевага супроводжується недостатньою функціональною активністю клітин і, відповідно низьким рівнем продукції цитокінів. Що стосується поділу основних імунокомпетентних клітин Т-гелперів на Т-гелпери 1-го та 2-го типів (відповідно на Тг1 і Тг2), тут також спостерігається загальна тенденція: навіть у стимульованих культурах лімфоцитів кількість ІФН- $\gamma$  – містимих клітин вкрай мало[7]. При цьому у новонароджених число ІЛ-2 експресуючих СД4 – лімфоцитів більше (мабуть за рахунок Т-г О), а вміст СД4<sup>+</sup>ІЛ-4 менше, ніж у дорослих [11].

З віком кількість ІФН- $\gamma$  ІЛ-4 містимих клітин поступово збільшується. В популяції людей спостерігається позитивна кореляція відносної кількості Тг 1 цитотоксичних лімфоцитів 1-го типу Тц1 і Тг2 та абсолютної кількості Тг 1 і Тц 1 з віком [14].

Баланс Тг1 Тг2 типів.

Головне клінічне значення в оцінці імунологічного захисту в організмі тварин має оцінка співвідношення Тг1 до Тг2. На сьогоднішній день внутрішньоклітинна експресія ІФН- $\gamma$  і ІЛ-4 є найбільш достовірним маркером відповідно Тг1 і Тг2. Власне, діагностичного значення цей тест не має ні при

одній із відомих патологій, однак може представляти цінність для визначення загального стану пацієнта та динаміки розвитку хвороби.

Концепція балансу Тг1/Тг2 з'явилася в 1980- роках. В перше наявність таких клітин було показано на мишах [18 ], а потім адаптовано на модель інших тварин і людини [19]. У відповідності з цією концепцією Тгі беруть участь у захисті проти внутрішньоклітинних патогенів, у протипухлинному імунитеті та реакції гіперчутливості сповільненого типу. Тг2 задіяні в імунній відповіді проти багатоклітинних паразитів. На пізніших етапах досліджень було показано, що формування цих двох типів клітин із “наївних” неактивних СД4 лімфоцитів (ТгО), очевидно, залежить від поєднання декількох факторів. До них відноситься тип і доза АГ, природа антигенпредставляючих клітин, контактні взаємодії, розчинні фактори (цитокіни, гормони) [3]. Найбільш значну роль у диференціації Т-гелперів СД4 надають цитокінам. Вважається, що ІЛ-12, який продукується антигенпрезентуючими клітинами при контакті з інфекційними агентами, спрямовує диференціацію в бік Тг 1. Подібну, але менш виражену дію виявляє ІФН- $\gamma$ . Стосовно Тг2, то його розвиток стимулюється завдяки присутності ІЛ-4.

Останнім часом виділяють також цитотоксичні лімфоцити першого і другого типів (Тц1 і Тц2), для яких характерні фенотип СД3, СД8 та продукція цитокінів, які продукуються Тг 1 і Тг 2. Недавно був виявлений ще один тип Т-гелперів – Тh17, який продукує ІЛ-17[11]. Цим клітинам надають великого значення у розвитку аутоімунних процесів.

У випадку порушень співвідношень Тг1/Тг2 і переважання одного з них розвиваються різні патологічні стани. Переважання Тг1 виражається підвищеною тиск нтозами ст організму з формуванням органоспецифічних аутоімунних захворювань [3].

Зрушення рівноваги в бік Тг2-клітин лежить в основі формування алергічних реакцій і системних аутоімунних симптомів [13].

До захворювань пов'язаних з порушенням Тг1 відносяться туберкульоз. Т-гелпери 1-го типу відіграють важливу роль у боротьбі з мікобактеріями [15]. Порушення продукції факторів чи дефект структур, які впливають на формування Тг1 можуть виражатися на розвитку підвищеної сприйнятливості до збудників туберкульозу. Так, за даними [15] заміна Т на А в першому тиск н гена ІФН- $\gamma$  призводить до зниження продукції ІФН- $\gamma$  і підвищує ризик розвитку туберкульозу майже в 4 рази. Продукція ІФН- $\gamma$  у хворих туберкульозом АА-гомозигот значно нижча, ніж у ТА та ТТ-пацієнтів, а клінічно хвороба протікає значно тяжче. Із клінічних спостережень відомо, що при гострому перебігу хвороби кількість ІФН- $\gamma$ -містимих СД3<sup>+</sup>-лімфоцитів (головна частина яких складає Тг1 – клітини) у хворих на туберкульоз значно зменшена. В період ремісії їх число наближається до нормальних величин [1]. Це саме показано для хворих з іншими мікобактеріальними інфекціями [4].

Другим, широко розповсюдженим серед людей захворюванням є синдром імунодефіциту (СНІД). Головним імунним порушенням у ВІЛ-інфікованих пацієнтів, є значне зниження кількості СД4<sup>+</sup> Т-гелперів, серед яких

знаходяться ІФН- $\gamma$ -продукуючі клітини. ІФН- $\gamma$  відіграє важливу роль у противірусному захисті. Внутрішньоклітинний аналіз продукції ІФН- $\gamma$  і ІЛ-4 показує, що зниження співвідношень Тг1/Тг2 відбувається за рахунок зменшення кількості Тг1 [17]. В інших роботах показано, що у ВІЛ-інфікованих дітей після курсу антиретровірусної терапії спостерігалось часткове відновлення продукції ІФН- $\gamma$  без збільшення загального числа СД4-Т-клітин [21]. Подібні наслідки наведені у дітей з помірним ступенем імунодепресії при інфікуванні ВІЛ типу Е і підвищеним вмістом СД4 ІФН- $\gamma$  та СД4 ІЛ-4<sup>+</sup> порівняно з неінфікованими дітьми [24].

При алергічних захворюваннях atopічних дерматитах відмічається порушення формування Тг1 або переважання Тг2 в системі клітинного захисту. При вказаних групах хвороб, як правило, спостерігається зрушення балансу Тг1/Тг2 в бік Тг2, тому, очевидно, дослідженням внутрішньоклітинних цитокінів при названих хворобах присвячено значна кількість робіт.

При стимуляції клітин периферичної крові хворих з atopічним дерматитом або алергічним синдромом неспецифічними індукторами дослідники спостерігали зростання кількості СД4<sup>+</sup> ІЛ-4<sup>+</sup>-лімфоцитів на фоні нормальних величин СД4 ІФН- $\gamma$  [14]. В окремих випадках не відмічено порушень співвідношення Тг1/Тг2 [16], однак виявлено інші зміни цитокінового профілю. Дисбаланс в бік Тг2 при атонії не означає зниження продукції ІФН- $\gamma$ .

Відмічено також зміни співвідношень Тг1/Тг2 при травмах, запальних процесах на шкірі та хірургічних втручань. Ушкодження шкіри створює додаткові входні ворота для інфекції та мобілізує систему імунітету. Швидкість загоєння пошкоджень залежить від ефективності антимікробного захисту та процесів репарації. Важкі пошкодження, як і оперативні втручання, супроводжуються зрушеннями співвідношення Тг1/Тг2 в бік Тг2, або за рахунок збільшення кількості Тг2 [20], або за рахунок зниження рівня Тг1, або за рахунок одночасного зниження вмісту Тг1 і підвищення рівня Тг2 [20]. При цьому характер зрушення залежить від величини оперативного втручання. Так, в роботі [19] показано, що вже на 3-й день після складної операції з приводу пухлини шлунка підвищується вміст Тг1 з периферичної крові на відміну від звичайної відкритої лапаротомії. У післяопераційний період спостерігається також зниження рівня ІЛ-2 та значне зростання кількості СД8<sup>+</sup>-клітин.

Таким чином, в перші дні після важких травм або оперативних втручань відбуваються зрушення співвідношення Тг1/Тг2 в бік Тг2, очевидно, внаслідок перерозподілу клітин імунної системи у вогнищі ураження. Надалі, при сприятливому перебігу реабілітаційного періоду співвідношення повинно відновлюватися. Відмічена залежність зниження кількості Тг1 чи факторів диференціації цих клітин або підвищення рівня Тг2 з частотою інфекційних ускладнень, що може бути використаною в якості прогноуючого фактора в клінічній практиці.

На підставі проведеного аналізу літератури можна прийти до висновку, що зміни цитокінів на рівні однієї клітини – перспективний функціональний

тест, який дозволяє одночасно вивчати цитокиновий профіль і субпопуляційний клітинний склад дослідного матеріалу. Цей метод може бути використаний як для наукових, так і для клінічних досліджень і може стати цінним доповненням до стандартних методів досліджень імунної системи в клінічній імунології.

#### Література

1. Комогорова З.Э. Уровень СДЗ<sup>+</sup>-лимфоцитов, содержащих интерферон- $\gamma$ , у больных туберкулезом легких и его изменение после включения в комплексную терапию полиоксидония / З.Э. Комогорова // Имунология. – 2004. – №4. – С.210-212.
2. Маслянюк Р. Основи імунобіології / Р. Маслянюк – Львів, Вериткаль. – 1999. – 472 с.
3. Останик А.А. Цитокиновий профіль семенної плазми / А.А. Останик, Б.И. Айзикович, Е.Р. Черных // Пробл. Репрод. – 2006. – №6 – С.65-74.
4. Пичугина Л.В. Внутриклеточные цитокины: проблемы детекции и клиническое значение / Л.В. Пичугина, Б.В. Пинегин // Имунология. — 2008. – №1. — С.55-63.
5. Andersson U. Enumeration of IFA-gamma producing cells by flow cytometry. Comparison with fluorescence microscopy / U. Andersson, G. Hallden, U. Persson et.al. // J. Immunol. Dreth. – 1988. – V. 112. – P. 139-142.
6. Bellardelli F. Cytokines as a link between innate and tick nt antitumor immunity / F. Bellardelli // Trends Immunol. – 2002. – V.23. – P. 201-208.
7. Buck R.H. Londitudinal study of intracellular Teell cytokine production in infants compared to adults / R.H. Buck, C.T. Cordle, D.J. Thomas et al. // Clin. Exp. Immunol. – 2002. – V. 128 – P.490-497.
8. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and caner therepy / G. Dranoff // Cancer. – 2004. – V. 4. – P. 112-122.
9. Boshyam H. IL-12: a master regulator / H. Boshyam // J. Exp. Med. – 2007. – V.204. – P. 969- 971.
10. Fuju K. T-lymphocyte subsets and Th1/Th2 balance affer laparoscopy-assisted distal gastroectomy / K. Fuju, K. Sonoda, K. Izumi et.al. // Surg. Endose. – 2003. – V. 17. – P. 1440-1444.
11. Hartel C. Cytokine responses correlate differentially with age in infancy / C. Hartel, N. Adam // Clin. Exp. Immunol. – 2005. – V. 142. – P. 446-453.
12. Hedger M.P. Cytokines and the immune – testicular axis / M.P. Hedger, A. Meinhardt // Reprad. Immunol. – 2003. – V. 58. – P. 1-26.
13. Kidd P. Th1/Th2 balance: the tick нтоз? Its limitations for health and disease / P. Kidd // Altorn Med. Rev. – 2009. – V. 8. – P. 223-246.
14. Kawamoto N. Age – related changes in intracellular cytokine profiles and Th2 dominance in allergic children / N. Kawamoto, H. Kaneko, M. Takemura et al. // Pediatr. Allergy Immunol. – 2006. – V. 17. – P.125-133/
15. Lopez-Moderuelo D. Interferon- $\gamma$ , IL-10 gene tick нтозам in pulmonary tuberculosis / D. Lopez-Moderuelo, F. Arnalich, R. Serantes et al. // Am. J. Respir. Care Med. – 2003. – V. 167. – P. 970-975.
16. Machura E. Intracellulace production of IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  by peripheral

blood CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells in children with atopic dermatitis / E. Machura // *Enr. J. Pediatr.* – 2007. – V. 166. – P. 789-795.

17. Meyard L. Single cell analysis of IL-4 and IFN-gamma production by T cells from HIV – infected individuals: decreased IFN-gamma in the presence of preversed IL-4 production / L. Meyard // *J. Immunol.* – 1996. – V.157. – P. 2712-2718.

18. Mosmann T.R. Two types of murine helper T cells clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities secreted proteins / T.R. Mosmann, H. Cherwinski, M. Bond et al. // *J. Immunol.* – 1986. – V. 136. – P. 2348-2357.

19. Mosmann T.R. Th1 and Th2 cells: different pattoms of lymphokine secretion lead to different functional properties /T.R. Mosmann, R.L. Coffman // *Annu. Rev. Immunol.* – 1989. – V.7 – P.145-173.

20. Potter K.J. Th1 and Th2 subsets in orthopedic surgery by single – cell cytokine analysis / K.J. Potter // *Clin. Lab.* – 2003. – V.49. – P.197-202.

21. Reuben J.M. Mognitude of 1FN – $\gamma$  production in HIV-1 infected children is associated with virus suppression / J.M. Reuben, B.N. Lee, M. Paul // *J. Allegy Clin. Immunol.* – 2002. – V. 110. – P. 255-261.

22. Santa S. Cytokine network at the feto-maternal interface / S. Santa // *Repr. Biol.* – 2006. – V. 125. – P. 171-176.

23. Sehluns K.S. Cytokine control of memory T cell development and survival / K.S. Sehluns, L. Lefrancicis // *Nat. Rev. Immunol.* – 2003. – V.3. – P. 269-279.

24. Sukwit S. Flow cytometric detection of intracellular cytokines in peripheral blood of HIV-1 infected Thai children / S. Sukwit, T. Chuenchitra, R. Samakoses et al. // *Arian Pac. J. Allergy Immunol.* – 2001. – v. 19. – P.107-113.

### Summary

**Maslianko R.P., Bozhyk L.Ya., Pukalo P.Ya.**

*Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology  
namedof S.Z.Gzickyj*

*The article contains data of study of intracellular T cell production cytokines, and its role in animal pathology.*

Рецензент – д. б. н., професор Куртяк Б.М.