

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

doi : 10.52485/19986173_2022_4_1

УДК 576.8.097.3

Богомягкова Е.Н., Солпов А.В., Терешков П.П., Витковский Ю.А.

СОДЕРЖАНИЕ НК И NKT- ЛИМФОЦИТОВ И ИХ КОАГРЕГАТОВ
С ТРОМБОЦИТАМИ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ
РАЗНОГО ВОЗРАСТА*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 672000, г. Чита, ул. Горького, 39а*

Цель исследования. Определить содержание натуральных киллеров (НК-лимфоцитов) и натуральных киллеров Т-лимфоцитов (NKT-лимфоцитов) и их коаггрегатов с тромбоцитами PNKcelC (Platelet NK-cells Co-aggregates), PNKTcelC (Platelet NKT-cells Co-aggregates) в периферической крови здоровых детей разного возраста при помощи проточной цитофлуориметрии.

Материалы и методы. Проведено исследование цельной крови 111 здоровых детей в возрасте от 7 месяцев до 14 лет. Периферическую кровь детей забирали в вакуумные пробирки с ЭДТА. Для выявления основных популяций и субпопуляций лимфоцитов, тромбоцитарно-лимфоцитарных коаггрегатов применялись моноклональные антитела, конъюгированные с различными флуорохромами. Определение исследуемых параметров проводили с использованием метода проточной цитофлуориметрии. Для сравнения всех 6 исследуемых групп по одному количественному признаку применялся критерий Краскела–Уоллиса (H). При наличии статистически значимых различий проводилось попарное сравнение с помощью критерия Манна–Уитни (U) с поправкой Бонферрони.

Результаты. Относительное содержание НК-клеток в периферической крови было минимальным у детей первого года жизни и постепенно возрастало к 12 годам. Абсолютное содержание НК-лимфоцитов оставалось неизменным во всех возрастных группах. Абсолютное и относительное содержание NKT-клеток постепенно повышалось с возрастом, достигая максимальных значений у детей 12 лет. Впервые установлено, что абсолютное содержание PNKTcelC было минимальным у детей в возрасте 1-2 года и максимальным у детей в возрасте от 2 до 6 лет. При этом абсолютное содержание PNKcelC оставалось неизменным во всех возрастных группах. Однако относительное содержание PNKcelC находилось на стабильно низком уровне практически во всех обследуемых возрастных группах, кроме детей в возрасте от 1 года до 2 лет, у которых наблюдалось значительное увеличение этого показателя.

Заключение. Содержание НК и NKT-клеток, а также PNKcelC, PNKTcelC зависит от возраста детей.

Ключевые слова: НК-лимфоциты, NKT-лимфоциты, тромбоцитарно-лимфоцитарные коаггрегаты, здоровые дети.

Bogomyagkova E.N., Solpov A.V., Tereshkov P.P., Vitkovsky Yu.A.

CONTENT OF NK AND NKT-LYMPHOCYTES AND THEIR COAGGREGATES
WITH PLATELETS IN THE PERIPHERAL BLOOD OF HEALTHY CHILDREN
OF DIFFERENT AGES*Chita State Medical Academy, 39a Gorky Street, Chita, 672000*

Aim. To determine the content of natural killer cells (NK-lymphocytes) and natural killer T-lymphocytes (NKT-lymphocytes) and their co-aggregates with platelets PNKcelC (Platelet NK-cells Co-aggregates), PNKTcelC (Platelet NKT-cells Co-aggregates) in the peripheral blood of healthy children of different ages by flow cytometry.

Methods. Samples of whole blood of 111 healthy children in age up 7 months to 14 years were studied. Peripheral blood of children was taken into vacuum tubes with EDTA. Monoclonal antibodies to cell markers of platelets and lymphocytes were used to determine the platelet-cells contacts by flow cytometry method. The Kruskal–Wallis test (H), Mann–Whitney (U) test with the Bonferroni correction were applied.

Results. The relative content of NK cells in the peripheral blood was minimal in children of the first year of life and gradually increased by the age of 12. The absolute content of NK-lymphocytes did not change in all

age groups. The absolute and relative content of NKT cells gradually increased in children as they grow older and reach maximum values in 12-year-old. It was established for the first time that the absolute content of PNKTcelC was minimal in 1–2 years old and maximal in 2–6 in children. At the same time, the absolute content of PNKcelC did not change in all groups. However, the relative content of PNKcelC had constant low level in all studied groups, except grope of children 2 years old; in those this indicator was increased.

Conclusions. *The content of NK and NKT cells, as well as PNKcelC, PNKTcelC depend on age.*

Keywords: *NK-lymphocytes, NKT-lymphocytes, platelet-lymphocyte co-aggregates, healthy children.*

Помимо основных субпопуляций лимфоцитов (Т- и В-лимфоцитов), важная роль в иммунологических и инфекционных заболеваниях принадлежит НК и NKT-клеткам. Нормальные референсные диапазоны для этих субпопуляций до сих пор у разных авторов неоднозначны, а содержание коагрегатов тромбоцитов с этими клетками в периферической крови у здоровых детей не изучено вовсе.

Известно, что НК-лимфоциты относятся к представителям врожденного иммунитета. Кроме того, НК-клетки являются связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом, что имеет важное значение для иммунного ответа у детей. Особенность НК-клеток обусловлена их способностью к антиген независимой активации [1,2]. Выявлено, что различный фенотип субпопуляций НК-клеток отражает их различия по функциональной активности. NKT-лимфоциты также являются неотъемлемой частью врожденного иммунитета у человека. NKT-лимфоциты имеют черты как Т-, так и НК-лимфоцитов. NKT-лимфоциты, также, как и НК-клетки обладают гетерогенностью [3-5]. Интересным представляется то, что активация врожденного иммунитета служит обязательным условием развития антиген-специфического адаптивного иммунного ответа, центральную роль в реакциях которого играют субпопуляции Т-лимфоцитов [6,7].

Несмотря на достижения в изучении НК и NKT-клеток, развивающийся иммунитет у детей недостаточно изучен в этой области. Мы предполагаем, что в результате фенотипических различий субпопуляций НК-клеток, абсолютное и относительное их содержание не является постоянным от рождения до подросткового возраста у детей. Возможно такая изменчивость в содержании наблюдается не только между детьми и взрослыми, но и между детьми разного возраста.

Таким образом, изменение содержания Т-лимфоцитов, НК и NKT-лимфоцитов в периферической крови может являться прогностическим и клиническим признаком при различных заболеваниях.

Образование контактов между тромбоцитами и лимфоцитами – важное звено среди механизмов, обеспечивающих миграцию лимфоцитов в зону повреждения и развития там иммунных и репаративных процессов. Известно, что в условиях циркуляции тромбоциты высокоафинно адгезируют на поверхности НК и NKT-клеток, формируя коагрегаты тромбоцитов с этими лимфоцитами (PNKcelC и PNKTcelC) [8, 9].

На базе Читинской государственной медицинской академии изучено взаимодействие тромбоцитов с лейкоцитами, лимфоцитами и их субпопуляциями у взрослых, а также при обследовании ограниченных возрастных групп здоровых детей, которые служили группами сравнения при исследовании некоторых заболеваний [10-17]. В нашем исследовании впервые изучено содержание PNKcelC и PNKTcelC в периферической крови у здоровых детей разного возраста.

Целью исследования явилось изучение содержания НК и NKT-клеток, PNKcelC, PNKTcelC в периферической крови здоровых детей разного возраста.

Материал и методы исследования. Исследование проводили согласно протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. и Хельсинкской декларации ВМА 2000 г. Объектом исследования служили образцы венозной крови практически здоровых детей, полученные путем пункции периферической вены и собранные в вакуумные пробирки с ЭДТА. Все исследования проводили в рамках диспансерной программы для своевременного выявления скрытых вариантов обменной патологии. Признаки воспалительной реакции в исследуемых группах детей по состоянию

периферической крови (показатели общего анализа крови, содержание белков острой фазы воспаления) отсутствовали.

Для подтверждения отсутствия острых и хронических воспалительных заболеваний у детей изучали уровень С-реактивного белка и ИЛ-6. В обследование были включены дети, у которых эти показатели находились в пределах референсных значений здоровых детей. Содержание С-реактивного белка оценивали на биохимическом анализаторе Thermo Fisher Scientific с Indiko (Финляндия) с помощью оригинальных наборов этой же фирмы. Исследования уровня ИЛ-6 проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Учет результатов выполняли с использованием программы расчета концентраций по многоточечной калибровке на микропланшетном фотометре Expert 96 (ASYS HITECH, Австрия) при длине волны 450 нм.

В общей сложности обследованы 111 практически здоровых ребенка в возрасте от 7 месяцев до 14 лет. Все дети были разделены на 6 обследуемых групп: 1-я группа – дети до 1 года, 2-я группа – от 1 года до 2 лет, 3-я группа – от 2 до 6 лет, 4-я группа – от 6 до 8 лет, 5-я группа – от 8 до 12, 6-я группа – дети старше 12 лет. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными С.В. Хайдуковым и соавт. [18]. *Критерии включения в исследование:* информированное добровольное согласие родителей детей на участие в исследовании; здоровые дети в возрасте от 7 месяцев до 14 лет, после осмотра врачом-педиатром, без клинических признаков и отсутствия в анамнезе аллергии, инфекционных, воспалительных и хронических заболеваний, не принимающие лекарственных средств во время исследования и в течение 2 недель до проведения исследования; имеющие в периферической крови уровни белков острой фазы воспаления и ИЛ-6 не превышающих нормальных значений. *Критерии исключения из исследования:* дети старше 14 лет; с инфекционными и воспалительными заболеваниями, с аллергическими заболеваниями в анамнезе; принимающие лекарственные средства.

Цитометрический анализ. Применялись моноклональные антитела, конъюгированные с различными флуорохромами для выявления: общего пула лимфоцитов, Т- лимфоцитов, NK и NKT-лимфоцитов, PNKcelC, PNKTcelC. Подсчет относительного содержания NK, NKT-клеток и коаггрегатов тромбоцитов с NK-лимфоцитами (Platelet NK cells Co-aggregates, PNKcelC) и NKT-лимфоцитами (Platelet NKT-cells C-aggregates, PNKTcelC), проводили от общего пула лимфоцитов к их субпопуляциям в соответствии с их общепринятой иерархической последовательностью.

Все лабораторные исследования проводили в день взятия крови. Удаление эритроцитов из образцов осуществляли при помощи коммерческого лизирующего раствора BD FACSTM Lysing Solution (кат. № 349202, Becton Dickinson, США). По завершении инкубации образцы однократно отмывали от несвязавшихся антител избытком забуференного фосфатами физиологического раствора (7 мин при 300 g), а полученный клеточный осадок ресуспендировали в 300 мкл забуференного фосфатами физиологического раствора, содержащего 1 % нейтрального параформальдегида (кат. № HT5011, Sigma-Aldrich, США). Абсолютные значения были получены в одноплатформенной системе с помощью реагента FlowCount™ (BeckmanCoulter, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX LX (BeckmanCoulter, США), оснащенном четырьмя диодными лазерами 355, 405, 488 и 561 нм. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ CytExpertsoftware v.2.0 и Kaluza™ v.2.1.1 (Beckman Coulter, США). В каждом образце анализировали не менее 50 000 лимфоцитов периферической крови (рис. 1). Статистическая обработка. При проведении статистического анализа руководствовались принципами Международного комитета редакторов медицинских журналов (ICMJE) и рекомендациями «Статистический анализ и методы в публикуемой литературе» (SAMPL). Нормальность распределения признаков оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Учитывая негауссово распределение, количественные признаки представлены в виде медианы и 95 % доверительного интервала: Me [95 % доверительный интервал (ДИ)]. Для сравнения всех

6 обследуемых групп по одному количественному признаку применялся критерий Краскела-Уоллиса (H). При наличии статистически значимых различий проводили попарное сравнение с помощью критерия Манна-Уитни (U) с поправкой Бонферрони. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics Version 25.0 (International Business Machines Corporation, license No. Z125-3301-14, США).

Результаты исследования. Подсчет содержания НК и НКТ-клеток, PNKcelC, PNKTcelC проводили от общего пула лимфоцитов к их субпопуляциям в соответствии с их общепринятой иерархической последовательностью (рис.1).

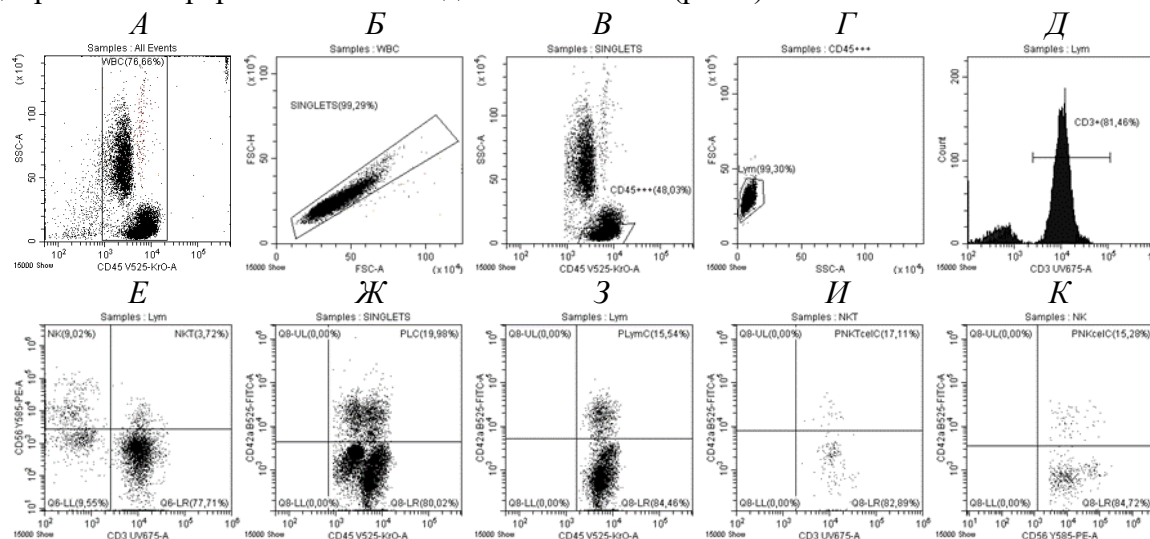


Рис. 1. Алгоритм пошагового выявления (тактика гейтирования) различных популяций лейкоцитов, субпопуляций лимфоцитов и тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексов периферической крови на основании экспрессии поверхностных антигенов

Примечание: А – выделение лейкоцитов (WBC) периферической крови на основании экспрессии «панлейкоцитарного» маркера CD45 и структуры (боковое светорассеяние, SS) клеток. Б – удаление из зоны анализа слипшихся клеток на основании анализа интегрального и пикового сигналов малоуглового светорассеяния (относительный размер клеток, FS). В – выделение популяции лимфоцитов периферической крови на основании экспрессии «панлейкоцитарного» маркера CD45 и структуры (боковое светорассеяние, SS) клеток. Г – удаление из зоны анализа лимфоцитов (Lym) разрушенных клеток и моноцитов на основании параметров малоуглового (FS) и бокового (SS) светорассеяния. Гистограмма Д – выявление популяции Т-лимфоцитов на основании экспрессии CD3. Гистограмма Е – выделение натуральных киллеров (НК-клеток) и НКТ-лимфоцитов на основании экспрессии CD56. Ж-К выделение тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексов по экспрессии CD42a и антигенов клеток периферической крови относительно соответствующих гейтов.

Наше исследование показало, что абсолютное содержание общего пула лимфоцитов (Lym) в группах у детей до года, а также от 1-2 лет значительно выше абсолютного содержания лимфоцитов у детей 12 лет (по сравнению с подростками превышение составляло: в 1,7 ($U = 12,0$, $p < 0,05$) и в 1,9 раза ($U = 12,0$, $p < 0,05$) соответственно) (табл.1). У детей 8-12 лет абсолютное содержание общего пула лимфоцитов значимо не отличалось от их количества у детей подростков 6 исследуемой группы. Что касается относительного содержания общего пула лимфоцитов, то их процент был значимо повышен у детей до года, от 1-2 лет и от 2-6 лет и превышал показатели у старших детей (по сравнению с подростками превышение составляло: в 1,6 раза ($U = 21,0$, $p < 0,05$), в 1,4 раза ($U = 33,0$, $p < 0,05$) и в 1,3 раза ($U = 60,0$, $p < 0,05$) соответственно) (табл. 2). У детей от 6-8 и от 8-12 лет относительное содержание общего пула лимфоцитов значимо не отличалось от содержания их у детей 6 исследуемой группы (дети старше 12 лет).

Установлено, что абсолютное содержание общего пула Т-лимфоцитов (T-lym) постепенно снижалось с возрастом, достоверно отличаясь в группах детей до года, от 1 года

до 2 лет, от 2 до 6 лет, от 6 до 8 лет от детей старшей возрастной группы. Так у детей до 12 мес., от 1-2 лет, от 2-6 и от 6-8 лет число Т-лимфоцитов было значимо выше значений подростков старше 12 лет (по сравнению с подростками превышение составляло: в 1,5 раза ($U = 12,0$, $p < 0,05$), в 1,7 раза ($U = 12,0$, $p < 0,05$), в 1,5 раза ($U = 53,0$, $p < 0,05$) и в 1,2 раза ($U = 60,0$, $p < 0,05$) соответственно) (табл. 1). При этом относительное содержание в общем пуле Т-лимфоцитов оставалось неизменным у детей всех возрастных групп.

Таблица 1

Абсолютное содержание общего пула лимфоцитов,
Т-лимфоцитов, NKT-лимфоцитов и PNKTcelC у детей, лимф/мкл

Изучаемые субпопуляции	Исследуемые группы						Сравни- ваемые группы	Статистическая значимость для сравниваемых групп	
	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа	6 группа		Манна- Уитни	Краскела- Уоллиса
	n = 22 (дети до 1 года)	n = 20 (дети от 1 до 2 лет)	n = 22 (дети от 2 до 6 лет)	n = 18 (дети от 6 до 8 лет)	n = 17 (дети от 8 до 12 лет)	n = 12 (дети старше 12 лет)			
Lym	7965,62 (7726,77- 10733,37)	8943,03 (8021,84- 11578,05)	8669,79 (7092,05- 11555,21)	6307,03 (5132,43- 6963,26)	5099,64 (4063,14- 6086,94)	4775,68 (3823,97- 5493,33)	гр.1/гр.6	$U=12$ $p=0,001$	$H=40,37$ $p=0,001$
T-lym	5633,37 (5327,05- 7711,02)	6146,77 (5677,72- 8349,96)	5663,88 (5134,3- 8584,12)	4409,37 (3785,14- 5112,62)	3214,17 (2944- 4414,94)	3665,81 (2906,16- 4041,57)	гр.1/гр.6	$U=12$ $p=0,001$	$H=37,79$ $p=0,001$
NKT	60,23 (42,71- 121,73)	15,13 (8,52- 36,49)	86,33 (76,34- 160,67)	61,17 (46,94- 116,12)	50,22 (40,78- 105,65)	43,86 (33,6- 105,21)	гр.2/гр.6	$U=39$ $p=0,002$	$H=22,87$ $p=0,001$
PNKTcelC	1,86 (1,25- 10,76)	0,56 (0,14- 2,46)	2,14 (1,82- 7,55)	1,49 (0,97-3,5)	1,2 (0,44- 3,71)	1,61 (0,95- 6,35)	гр.3/гр.5	$U=102,5$ $p=0,044$	$H=11,27$ $p=0,046$

Показано, что абсолютное содержание НК-лимфоцитов оставалось неизменным во всех возрастных группах. Выявлено, что относительное содержание НК-лимфоцитов было минимальным у детей первого года жизни, но достоверно повышалось у подростков 12 лет в 1,8 раза ($U=43,0$, $p=0,001$) (табл. 2). При этом кривая относительного содержания НК-клеток волнообразно изменялась с возрастом, достигая плато у детей в группах от 6 до 8 лет, от 8 до 12 лет и старше 12 лет. Относительное содержание NKT-лимфоцитов постепенно увеличивалось с возрастом, достоверно отличаясь в группе подростков 12 лет по сравнению с детьми младшей возрастной группы от 1 до 2 лет. Таким образом, относительное содержание NKT-лимфоцитов в 9,2 раза выше у детей 12 лет по сравнению с детьми от года до 2 лет ($U = 13,0$; $p = 0,001$) (табл. 2). Обращает на себя внимание, что кривая относительного содержания NKT-клеток также волнообразно изменялась с возрастом, у детей во 2 исследуемой группе (от года до 2 лет) относительное содержание NKT-клеток снижалось в 4,9 раз по сравнению с 1 исследуемой группой (дети до года) ($U = 104,0$; $p = 0,001$), затем в 3 исследуемой группе (дети от 2 до 6 лет) относительное содержание NKT-лимфоцитов снова возрастало в 8,7 раз по сравнению с детьми 2 исследуемой группы (дети от года до 2 лет) ($U = 36,0$; $p = 0,001$) (табл. 2).

Таблица 2

Относительное содержание общего пула лимфоцитов,
NK, NKT-лимфоцитов и PNKcelC у детей, %

Изучаемые субпопуляци и	Исследуемые группы						Сравни- ваемые группы	Статистическая значимость для сравниваемых	
	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа	6 группа		Манна- Уитни	Краскела- Уоллиса
	n = 22 (дети до 1 года)	n = 20 (дети от 1 до 2 лет)	n = 22 (дети от 2 до 6 лет)	n = 18 (дети от 6 до 8 лет)	n = 17 (дети от 8 до 12 лет)	n = 12 (дети старше 12 лет)			
Lym	65,06 (59,3- 70,23)	59,4 (53,67- 65,8)	54,94 (47,91- 56,78)	44,29 (37,06- 47,29)	40,88 (36- 45,04)	41,45 (36,03- 48,46)	гр.1/гр.6	U=21 p=0,001	H=48,9 p=0,001
NK	6,88 (5,34- 10,07)	5,78 (4,97- 9,02)	9,33 (8,95- 14,55)	12,01 (10,56- 15,01)	12,09 (10,17- 19,65)	12,07 (10,19- 16,94)	гр.1/гр.6	U=43 p=0,001	H=30,59 p=0,001
NKT	0,64 (0,51- 1,3)	0,13 (0,09- 0,41)	1,14 (0,93- 2,13)	1,05 (0,37- 4,13)	0,99 (0,89- 2,13)	1,2 (0,78- 2,32)	гр.2/гр.6	U=13 p=0,001	H=31,31 p=0,001
PNKcelC	0,95 (0,51- 16,51)	16,14 (9- 18,83)	0,87 (0,24- 6,9)	1,28 (0,04- 7,64)	0,99 (0,79- 1,45)	0,81 (0,61- 1,08)	гр.2/гр.6	U=54,5 p=0,011	H=12,14 p=0,033

Установлено что количество NKT-клеток находилось на минимальных значениях у детей в возрасте 1-2 года и максимальных – у детей в возрасте 12 лет. Кривая абсолютного содержания NKT-лимфоцитов волнообразно изменялась, аналогично кривой относительного содержания. Так, у детей в возрасте от года до 2 лет количество NKT-клеток снижалось в 4 раза по сравнению с 1 исследуемой группой детей (дети до года) ($U = 112,0$; $p = 0,018$), затем у детей в возрасте от 2 до 6 лет число NKT-лимфоцитов снова повышалось в 5,7 раза по сравнению с детьми 2 исследуемой группы (дети от года до 2 лет) ($U = 50,0$; $p = 0,001$) (табл. 1).

Относительное содержание PNKcelC (Platelet NK cells Coaggregates) находилось на стабильно низком уровне практически во всех обследуемых возрастных группах. Исключение составила 2-я обследуемая группа детей (от 1 до 2 лет). Относительное содержание PNKcelC в этой группе было значительно увеличено в сравнении практически со всеми другими группами детей. Так, содержание по сравнению с 3-й (дети от 2 до 6 лет), 5-й (дети от 8 до 12 лет) и 6-й (дети старше 12 лет) группами отличалось в 18,7 раз ($U = 113,5$; $p = 0,007$), в 16,3 раза ($U = 80,5$; $p = 0,011$) и в 19,9 раз ($U = 54,5$; $p = 0,011$) соответственно (табл. 2). Что касается относительного содержания PNKTcelC (Platelet NKT-cells Co-aggregates), оно оставалось неизменным во всех возрастных группах, тогда как абсолютное содержание характеризовалось подъемом в возрасте 2-6 лет с последующим снижением (табл. 1).

Обсуждение. В современной научной литературе данные о содержании NK и NKT-лимфоцитов в периферической крови здоровых детей являются достаточно противоречивыми у разных исследователей. Возможно, это связано с половыми, этническими и возрастными факторами. Однако, по результатам исследований некоторых авторов, именно возраст оказывает наибольшее влияние на содержание субпопуляций лимфоцитов в периферической крови у детей [19, 20].

В рамках нашей работы было выявлено, что динамические изменения содержания NK и NKT-лимфоцитов, а также коагребатов тромбоцитов с этими клетками наблюдались у здоровых детей от младенчества до подросткового возраста. Интересно, что содержание NK, NKT-клеток и коагребатов тромбоцитов с ними значительно увеличивалось с возрастом, особенно после первых двух лет жизни. Полученные результаты содержания NK и NKT-клеток согласуются с данными исследований ряда авторов [20-22]. С другой стороны, Tosato и соавт. показано, что абсолютное содержание NK клеток остается стабильным в течении первого года жизни ребенка, затем снижается вдвое, в то время как их относительное

содержание не изменяется [23]. Подобные результаты получены Shearer W.T. и соавт.: так, у детей в периферической крови относительное содержание NK-лимфоцитов оставалось стабильным от рождения до подросткового возраста [24].

Описано, что NK-лимфоциты играют важную роль в иммунной защите от вирусных инфекций, благодаря своей цитолитической активности и продукции цитокинов [25, 26]. А, как известно, второй год жизни ребенка характеризуется повышением антигенной нагрузки и активизацией специфического звена противовирусной защиты [27]. Возможно, это повлияло на рост содержания NK, NKT-лимфоцитов у обследованных детей в возрасте от года до 2 лет. Кроме того, кровяные пластинки способствуют прикреплению натуральных киллеров через Р-селектин-PSGL-1 мосты, и «катящиеся» лимфоциты в присутствии ИЛ-2 и лейкотриена В₄ (LTB₄) сразу же с помощью β₂-интегрина адгезируют к поверхности эндотелия [28]. Приоритетные сведения о лейкоцитарно-тромбоцитарных взаимодействиях у детей получены нашим коллективом [29, 30]. Таким образом, выявленное нами увеличение способности NK и NKT-лимфоцитов образовывать межклеточные контакты с тромбоцитами, имеет большое значение для миграции натуральных киллеров в зону воспаления.

Выводы:

1. Содержание NK и NKT-клеток, а также PNKcelC, PNKTcelC зависит от возраста.
2. Относительное содержание NK-клеток в периферической крови минимальное у детей первого года жизни и постепенно возрастает к 12 годам. Абсолютное содержание NK-лимфоцитов остается неизменным во всех возрастных группах. Абсолютное и относительное содержание NKT-клеток постепенно повышается с возрастом, достигая максимальных значений у детей 12 лет.
3. Абсолютное содержание PNKTcelC находится на минимальных значениях у детей в возрасте 1-2 года и максимальных – у детей в возрасте от 2 до 6 лет. При этом абсолютное содержание PNKcelC остается неизменным во всех возрастных группах. Относительное содержание PNKcelC находится на стабильно низком уровне практически во всех обследуемых возрастных группах, кроме детей в возрасте от 1 года до 2 лет, у которых этот показатель существенно повышался.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование не имело финансовой поддержки.

Вклад авторов:

Богомягкова Е.Н. – 40% (разработка концепции и дизайна исследования, работа с документацией, анализ и интерпретация данных, анализ литературы по теме исследования, написание текста статьи, научное редактирование).

Солпов А.В. – 20% (разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, научное редактирование, утверждение окончательного текста статьи).

Терешков П.П. – 20% (сбор данных, анализ и интерпретация данных, техническое редактирование).

Витковский Ю.А. – 20% (техническое редактирование, утверждение окончательного текста статьи).

Список литературы:

1. Zahran, A.M., Saad, K., Elsayh, K.I. et al. Upregulation of Cytotoxic T-cells in pediatric patients with Gaucher disease. SciRep. 2022. 12. 4977. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08843-4>
2. Freud, AG; Mundy-Bosse, B.L.; Yu, J.; Caligiuri, M.A. Broad spectrum of human natural killer cell diversity. Immunity. 2017. 47. 820–833.
3. Chen, Yu.; Lu, D.; Churov, A.; Fu, R. Progress in research on NK cell receptors and their signaling pathways. Mediat. Inflammation. 2020. 6437057.
4. Schwane, W.; Hyun-Tran, V.H.; Vollmers, S.; Yakup, V.M.; Sauter, J.; Schmidt, A.H.; Payne, S.; Altfeld, M.; Richert, L.; Koerner, K. Distinguishing features in the receptor repertoire

- Distinguish between CD56bright and CD56dim natural killer cells. *Front. Immunol.* 2020. 11. 568927.
5. Zahran AM, Abdel-Rahim MH, Elsayh KI, Hassanien MM, Mahran SA, Hetta HF. Natural Killer and Natural Killer T Cells in Juvenile Systemic Lupus Erythematosus: Relation to Disease Activity and Progression. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2019. 67(3). 161-169. doi: 10.1007/s00005-019-00537-6.
 6. Zhou, J.; Tian, Z.; Peng, H. Tissue-resident NK cells and other innate lymphoid cells. *Add. Immunol.* 2020. 145. 37–53.
 7. Hashemi, E.; Malarkannan, S. Tissue-resident NK cells: development, maturation, and clinical relevance. *Cancers*. 2020. 12. 1553.
 8. Mezger M., Nording H., Sauter R. et al. Platelets and immune responses during thromboinflammation. *Front Immunol.* 2019. 10. 1731. DOI: <https://www.doi.org/10.3389/fimmu.2019.01731>.
 9. Lukasik Z.M., Makowski M., Makowska J.S. From blood coagulation to innate and adaptive immunity: the role of platelets in the physiology and pathology of autoimmune disorders. *Rheumatol. Int.* 2018. 38 (6). 959–74. DOI: <https://www.doi.org/10.1007/s00296-018-4001-9>.
 10. Кузник Б.И., Батожаргалова Б.Ц., Витковский Ю.А. Состояние иммунитета и лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии у детей с хроническим деформирующим бронхитом. *Медицинская иммунология*. 2008. 10 (6). 583–588.
 11. Долина А.Б., Кузник Б.И., Розенберг В.Я., Вишнякова Т.М., Витковский Ю.А. Влияние тималина на состояние иммунитета и лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию у детей с вторичным инфекционным эндокардитом. *Медицинская иммунология*. 2010. 12(4-5). 381-386. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2010-4-5-381-386>.
 12. Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В. Феномен лимфоцитарно-тромбоцитарного розеткообразования. *Иммунология*. 1999. (4). 35–7.
 13. Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В. Патогенетическое значение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии. *Медицинская иммунология*. 2006. 8(5–6). 745–3.
 14. Solpov A., Shenkman B., Vitkovsky Y., Brill G., Koltakov A., Farzam N., Varon D., Bank I., Savion N. Platelets enhance CD4+ lymphocyte adhesion to extracellular matrix under flow conditions: role of platelet aggregation, integrins, and non-integrin receptors. *Thromb. Haemost.* 2006. 95 (5). 815–21.
 15. Кузник Б.И., Витковский Ю.А., Солпов А.В. Адгезивные молекулы и лейкоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия. *Вестник гематологии*. 2006. 2 (2). 42–55.
 16. Shenkman B., Brill G., Solpov A., Vitkovsky Y., Kuznik B., Koltakov A., Kotev-Emeth S., Savion N., Bank I. CD4+ lymphocytes require platelets for adhesion to immobilized fibronectin in flow: role of beta (1) (CD29)-, beta(2) (CD18)-related integrins and non-integrin receptors. *Cell. Immunol.* 2006. 242 (1). 52–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2006.09.005>.
 17. Солпова О.А., Аветисян М.А., Терешков П.П., Солпов А.В., Витковский Ю.А. Участие TCRαβ- и γδ-Т-лимфоцитов, Р-селектина в формировании клеточно-тромбоцитарных коагратов. *Забайкальский медицинский вестник*. 2016. 2. 71–9.
 18. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» (ПРОЕКТ). *Медицинская иммунология*. 2012. 14 (3). 255–68.
 19. Ding Y., Zhou L., Xia Yu., Song H., Yang J., Zhao X. Reference values for peripheral blood lymphocyte subsets of healthy children in China. *Journal of allergology and clinical immunology*. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.04.022>
 20. Lerkvaleekul B., Apiwattanakul N., Klinmalai C., Hongeng S., Vilaiyuk S. Age-related changes in lymphocyte subpopulations in healthy Thai children. *J. Clin. Lab. Anal.* 2020. 34(5). e23156. DOI: <https://www.doi.org/10.1002/jcla.23156>.
 21. Valiathan R., Ashman M., Asthana D. Effects of Ageing on the Immune System: Infants to Elderly. *Scand J Immunol.* 2016. 83 (4). 255–66. DOI: <https://doi.org/10.1111/sji.12413>.

22. Розенберг В.Я., Бутыльский А.Н., Кузник Б.И. Возрастная динамика показателей гемограммы и иммунного статуса у детей различного возраста. Медицинская иммунология. 2011. 13(2-3). 261-266. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2011-2-3-261-266>.
23. Tosato F., Bucciol G., Pantano G., Putti M.C., Sanzari M.C., Basso G., Plebani M. Lymphocytes subsets reference values in childhood. Cytometry A. 2015. 87 (1). 81–5. DOI: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22520>.
24. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, Oyomopito R, Plaeger S, Stiehm ER, Wara DW, Douglas SD, Luzuriaga K, McFarland EJ, Yogev R, Rathore MH, Levy W, Graham BL, Spector SA; Pediatric AIDS Clinical Trials Group. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. J AllergyClinImmunol. 2003. 112(5). 973-80. doi: 10.1016/j.jaci.2003.07.003.
25. De Sanctis, J.B.; Garmendia, J.V.; Hajdúch, M. Overview of Memory NK Cells in Viral Infections: Possible Role in SARS-CoV-2 Infection. Immunol. 2022. 2. 52-67. <https://doi.org/10.3390/immuno2010005>.
26. Duygu B, Olieslagers TI, Groeneweg M, Voorter CEM, Wieten L. HLA Class I Molecules as Immune Checkpoints for NK Cell Alloreactivity and Anti-Viral Immunity in Kidney Transplantation. FrontImmunol. 2021. 12. 680480. doi: 10.3389/fimmu.2021.680480.
27. Кузник Б.И., Максимова О.Г. Общая гематология. Гематология детского возраста. Учебное пособие. Ростов н/ Д. Феникс 2007. 573.
28. Ali R.A., Wuescher L.M., Worth R.G. Platelets: essential components of the immune system. CurrTrendsImmunol. 2015. 16. 65-78.
29. Богомягкова Е.Н., Солпов А.В., Терешков П.П., Трушина Н.П., Витковский Ю.А. Возрастные изменения содержания $\alpha\beta$ -, $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов и их некоторых минорных субпопуляций у здоровых детей. Иммунология. 2021. 42(5). 526-535. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-4-526-535
30. Богомягкова Е.Н., Солпов А.В., Витковский Ю.А., Терешков П.П. Содержание коагратов тромбоцитов с $\alpha\beta$ -, $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитами и их некоторыми минорными субпопуляциями в крови у здоровых детей. Иммунология. 2022. 43(1). 78-88. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-6-78-81/8

References

1. Zahran, A.M., Saad, K., Elsayh, K.I. et al. Upregulation of Cytotoxic T-cells in pediatric patients with Gaucher disease. SciRep. 2022. 2. 4977. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08843-4>.
2. Freud, AG; Mundy-Bosse, B.L.; Yu, J.; Caligiuri, M.A. Broad spectrum of human natural killer cell diversity. Immunity. 2017. 47. 820–833.
3. Chen, Yu.; Lu, D.; Churov, A.; Fu, R. Progress in research on NK cell receptors and their signaling pathways. Mediat. Inflammation. 2020. 6437057.
4. Schwane, W.; Hyun-Tran, V.H.; Vollmers, S.; Yakup, V.M.; Sauter, J.; Schmidt, A.H.; Payne, S.; Altfeld, M.; Richert, L.; Koerner, K. Distinguishing features in the receptor repertoire Distinguish between CD56bright and CD56dim natural killer cells. Front. Immunol. 2020. 11. 568927.
5. Zahran AM, Abdel-Rahim MH, Elsayh KI, Hassanien MM, Mahran SA, Hetta HF. Natural Killer and Natural Killer T Cells in Juvenile Systemic Lupus Erythematosus: Relation to Disease Activity and Progression. Arch ImmunolTherExp (Warsz). 2019. 67(3). 161-169. doi: 10.1007/s00005-019-00537-6.
6. Zhou, J.; Tian, Z.; Peng, H. Tissue-resident NK cells and other innate lymphoid cells. Add. Immunol. 2020. 145. 37–53.
7. Hashemi, E.; Malarkannan, S. Tissue-resident NK cells: development, maturation, and clinical relevance. Cancers. 2020. 12. 1553.
8. Mezger M., Nording H., Sauter R. et al. Platelets and immune responses during thromboinflammation. Front Immunol. 2019. 10. 1731. DOI: <https://www.doi.org/10.3389/fimmu.2019.01731>

9. Lukasik Z.M., Makowski M., Makowska J.S. From blood coagulation to innate and adaptive immunity: the role of platelets in the physiology and pathology of autoimmune disorders. *Rheumatol. Int.* 2018. 38 (6). 959–74. DOI: <https://www.doi.org/10.1007/s00296-018-4001-9>.
10. Kuznik B.I., Batozhargalova B.Ts., Vitkovsky Yu.A. The state of immunity and lymphocytic-platelet adhesion in children with chronic deforming bronchitis. *Medical immunology*. 2008. 10(6). 583–588. in Russian.
11. Dolina A.B., Kuznik B.I., Rozenberg V.Ya., Vishnyakova T.M., Vitkovsky Yu.A. Influence of thymalin on the state of immunity and lymphocytic-platelet adhesion in children with secondary infective endocarditis. *Medical immunology*. 2010. 12(4-5). 381-386. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2010-4-5-381-386>.
12. Vitkovsky Yu.A., Kuznik B.I., Solpov A.V. Phenomenon of lymphocytic-platelet rosette formation. *Immunology*. 1999. (4). 35–7. in Russian.
13. Vitkovsky Yu.A., Kuznik B.I., Solpov A.V. Pathogenetic significance of lymphocytic-platelet adhesion. *Medical immunology*. 2006. 8(5–6). 745–3. in Russian.
14. Solpov A., Shenkman B., Vitkovsky Y., Brill G., Koltakov A., Farzam N., Varon D., Bank I., Savion N. Platelets enhance CD4+ lymphocyte adhesion to extracellular matrix under flow conditions: role of platelet aggregation, integrins, and non-integrin receptors. *Thromb. Haemost.* 2006. 95 (5). 815–21.
15. Kuznik B.I., Vitkovsky Yu.A., Solpov A.V. Adhesive molecules and leukocyte-platelet interactions. *Bulletin of hematology*. 2006. 2(2). 42–55. in Russian.
16. Shenkman B., Brill G., Solpov A., Vitkovsky Y., Kuznik B., Koltakov A., Kotev-Emeth S., Savion N., Bank I. CD4+ lymphocytes require platelets for adhesion to immobilized fibronectin in flow: role of beta (1) (CD29)-, beta(2) (CD18)-related integrins and non-integrin receptors. *Cell. Immunol.* 2006. 242(1). 52–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2006.09.005>
17. Solpova O.A., Avetisyan M.A., Tereshkov P.P., Solpov A.V., Vitkovsky Yu.A. Participation of TCR $\alpha\beta$ - and $\gamma\delta$ -T-lymphocytes, P-selectin in the formation of cell-platelet coaggregates. *Transbaikal Medical Bulletin*. 2016. (2). 71–9. in Russian.
18. Khaidukov S.V., Baidun L.A., Zurochka A.V., Totolyan A.A. Standardized technology "study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytometer-analyzers" (PROJECT). *Medical immunology*. 2012. 14(3). 255–68. in Russian.
19. Ding Y., Zhou L., Xia Yu., Song H., Yang J., Zhao X. Reference values for peripheral blood lymphocyte subsets of healthy children in China. *Journal of allergology and clinical immunology*. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.04.022>
20. Lerkvaleekul B., Apiwattanakul N., Klinmalai C., Hongeng S., Vilaiyuk S. Age-related changes in lymphocyte subpopulations in healthy Thai children. *J. Clin. Lab. Anal.* 2020. 34 (5). e23156. DOI: <https://www.doi.org/10.1002/jcla.23156>
21. Valiathan R., Ashman M., Asthana D. Effects of Ageing on the Immune System: Infants to Elderly. *Scand J Immunol.* 2016. 83 (4). 255–66. DOI: <https://doi.org/10.1111/sji.12413>
22. Rosenberg V.Ya., Butyl'skii A.N., Kuznik B.I. Age dynamics of hemogram and immune status in children of different ages. *Medical immunology*. 2011. 13(2-3). 261-266. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2011-2-3-261-266>. in Russian.
23. Tosato F., Bucciol G., Pantano G., Putti M.C., Sanzari M.C., Basso G., Plebani M. Lymphocytes subsets reference values in childhood. *Cytometry A*. 2015. 87 (1). 81–5. DOI: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22520>
24. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, Oyomopito R, Plaeger S, Stiehm ER, Wara DW, Douglas SD, Luzuriaga K, McFarland EJ, Yogev R, Rathore MH, Levy W, Graham BL, Spector SA; Pediatric AIDS Clinical Trials Group. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol.* 2003. 112(5). 973-80. doi: 10.1016/j.jaci.2003.07.003.
25. De Sanctis, J.B.; Garmendia, J.V.; Hajdúch, M. Overview of Memory NK Cells in Viral Infections: Possible Role in SARS-CoV-2 Infection. *Immunol.* 2022. 2. 52-67. <https://doi.org/10.3390/immuno2010005>.

26. Duygu B, Olieslagers TI, Groeneweg M, Voorter CEM, Wieten L. HLA Class I Molecules as Immune Checkpoints for NK Cell Alloreactivity and Anti-Viral Immunity in Kidney Transplantation. *FrontImmunol.* 2021. 12. 680480. doi: 10.3389/fimmu.2021.680480.
27. Kuznik B.I., Maksimova O.G. General hematology. Hematology of childhood. Tutorial. Rostov n / D. Phoenix 2007. 573.
28. Ali R.A., Wuescher L.M., Worth R.G. Platelets: essential components of the immune system. *CurrTrendsImmunol.* 2015. 16. 65-78.
29. Bogomyagkova E.N., Solpov A.V., Tereshkov P.P., Trushina N.G., Vitkovsky Yu.A. Age-related changes in the content of $\alpha\beta$ -, $\gamma\delta$ -T-lymphocytes and some its minor subpopulations in healthy children. *Immunologia.* 2021. 42(5). 526-535. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-4-526-535. in Russian.
30. Bogomyagkova E.N., Solpov A.V., Tereshkov P.P., Vitkovsky Yu.A. The content of platelet co-aggregates with $\alpha\beta$ -, $\gamma\delta$ -T-lymphocytes and their some minor subpopulations in the blood of healthy children. *Immunologia.* 2022. 43(1). 78-88. DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-6-78-88. in Russian.