

10. Bonetti B., Scardoni M., Monaco S. [et. al.] Hepatitis C virus infection of peripheral nerves in type II cryoglobulinaemia // *Virchows Arch.* 1999. Vol. 434. P. 533–535.
11. Lu Yu, J. Hong Cui, Yu Jing Sun [et al.] Hantavirus infection of neurons in newborn mice and primary cultures induces a delayed HSP70 response and results in cell death // *Abstracts of VIII international conference of HFRS, HPS and hantaviruses.* Athens, Greece, 2010. P. 191.
12. Marcotic A. Clinic and laboratory findings of HFRS patients in South-East Europe // *Abstracts of IX international conference of HFRS, HPS and hantaviruses.* Beijing, China, 2013. P. 13.
13. Manigold T., Vial P. Human hantavirus infections: epidemiology, clinical features, pathogenesis and immunology // *Swiss Med. Wkly.* 2014. Vol. 144, No. 13937. P. 1–10.
14. Origgi L., Vanoli M., Carbone A. [et. al.] Central nervous system involvement in patients with HCV-related cryoglobulinemia // *Am. J. Med. Sci.* 1998. Vol. 315. P. 208–210.
15. Thomas H.C., Torok M.E., Forton D.M. [et. al.] Possible mechanisms of action and reasons for failure of antiviral therapy in chronic hepatitis C // *Journal of Hepatology.* 1999. Vol. 31, No. 1. P. 152–159.

Поступила в редакцию 24.11.2014.

Исследование содержания нейрональных маркеров при некоторых инфекционных заболеваниях

И.В. Дюйзен, В.А. Иванис, А.С. Михайлов, Е.С. Менчинская, И.В. Манжуло, О.С. Огурцова

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Резюме. Изучены сывороточные уровни трех нейрональных маркеров: белка S100, фибриллярного кислого гликопротеина и нейронспецифической энолазы у 20 пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом и 29 пациентов с хроническим вирусным гепатитом С. Показано наличие нарушений проницаемости гематоэнцефалического барьера, а также нейропатологии, возможно васкулярного и аутоиммунного генеза, что предполагает участие клеток нейроэндокринной системы в патогенезе энцефалопатий при этих заболеваниях.

Ключевые слова: энцефалопатия, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, хронический вирусный гепатит С.

УДК 612.112.94.017.4-097.3

АНАЛИЗ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ CD56 И CD57 ЦИТОТОКСИЧЕСКИМИ Т-ЛИМФОЦИТАМИ РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

И.В. Кудрявцев^{1,2}, А.Г. Борисов³, А.Е. Волков¹, А.А. Савченко³, М.К. Серебрякова², А.В. Полевщиков^{1,2}

¹ Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8),

² Институт экспериментальной медицины (197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12),

³ НИИ медицинских проблем Севера (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г)

Ключевые слова: кластеры дифференцировки, проточная цитометрия, популяции лимфоцитов, эффекторные клетки.

CD56 AND CD57 EXPRESSION BY DISTINCT POPULATIONS OF HUMAN CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES

I.V. Kudryavtsev^{1,2}, A.G. Borisov³, A.E. Volkov¹, A.A. Savchenko³, M.K. Serebryakova², A.V. Polevshchikov^{1,2}

¹ School of Biomedicine of Far Eastern Federal University (8 Sukhanova St. Vladivostok 690950 Russian Federation), ² Institute of Experimental Medicine (12 Acad. Pavlov St. St. Petersburg 197376 Russian Federation), ³ Scientific Research Institute of Medical Problems of the North (3 Partizana Djelezniaka St. Krasnoyarsk 660022 Russian Federation).

Background. Cytotoxic T cell subsets with distinct homing potentials, phenotype and effector functions play an important part in many chronic viral infections and autoimmune diseases.

Methods. Using 10-color flow cytometry we characterized cytotoxic T cell subsets based on expression of CD45RA, CD62L, CD27, and CD28 and compared the expression of CD56 and CD57 between these subsets.

Results. It was shown that CD56 positive cells were predominantly immature T-cells, expressing CD27 and/or CD28. CD57 was found mainly on the cell membrane of most mature populations, lacking CD27 or both co-stimulation molecules. Co-expression of both antigens was determined exclusively on the most mature populations of T cells, which belonged to effector memory (CD45RA⁺CD62L⁻) and terminally differentiated effectors (CD45RA⁺CD62L⁺) CD3⁺CD8⁺ lymphocytes.

Conclusions. According to our data in peripheral blood we can identify several populations of cytotoxic T cell with similar proper-

ties and phenotype, that due to imperfection of contemporary classifications belong to perfectly different populations.

Keywords: cluster of differentiation, flow cytometry, lymphocyte populations, effector cells.

Pacific Medical Journal, 2015, No. 2. p. 30–35.

В последние годы число работ, посвященных оценке уровня дифференцировки Т-лимфоцитов в периферической крови при различных патологических состояниях, неуклонно растет. Для выявления основных стадий созревания Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток обычно используются антитела против кластеров дифференцировки (Cluster of Differentiation – CD) 45RA или 45RO, а также против молекул, определяющих миграционную способность клеток, – CD62L или CD197 (CCR7) [14]. Такая комбинация антител позволяет выделить четыре популяции Т-лимфоцитов: «наивные» (N), экспрессирующие оба антигена, клетки центральной (CM) и эффекторной (EM) памяти с фенотипами CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁺CD62L⁻, соответственно, и «терминально-дифференцированные CD45RA⁺-клетки эффекторной памяти (TEMRA), позитивные по экспрессии CD45RA и негативные по экспрессии CD62L. Для более детального анализа указанных выше популяций используют дополнительные маркеры, в качестве которых выступают антитела

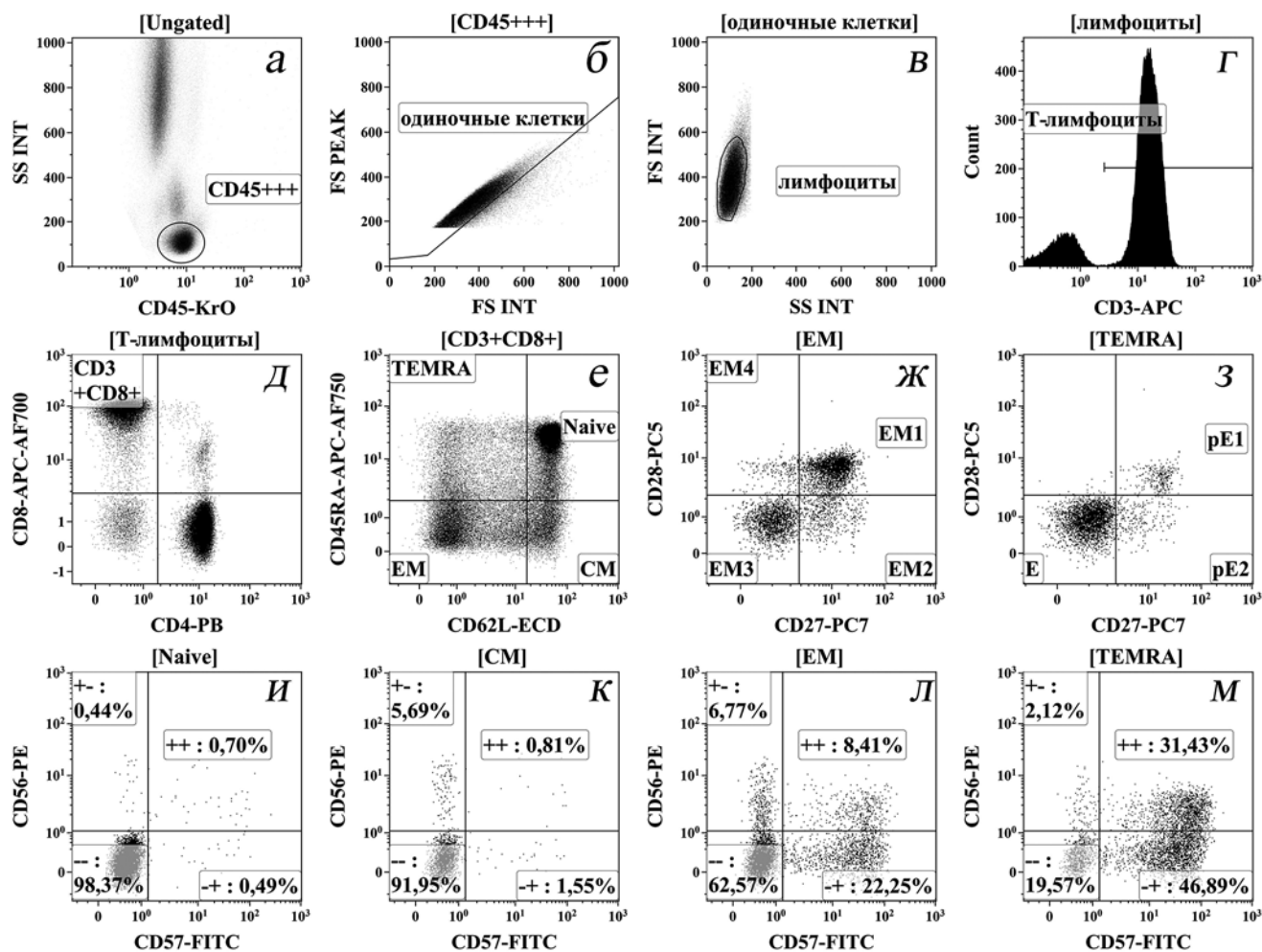


Рис. Тактика гейтирования для выявления основных популяций цитотоксических Т-клеток.

Гистограмма а: по оси абсцисс – уровень экспрессии CD45, по оси ординат – боковое светорассеяние (SS), характеризующее структуру цитоплазмы клеток, в области «CD45+++» находятся клетки с высокой экспрессией CD45 и низкими значениями бокового светорассеяния; гистограмма б: по оси абсцисс – интегральный сигнал прямого светорассеяния, по оси ординат – пиковый сигнал прямого светорассеяния; в области «одиночные клетки» находятся неслившиеся лимфоциты, на гистограмме отображены клетки из области «CD45+++» гистограммы а; гистограмма в: по оси абсцисс – боковое светорассеяние (SS), по оси ординат – прямое светорассеяние (FS), характеризующее размер клеток, в области «лимфоциты» находятся клетки, соответствующие по размерам и структуре популяции лимфоцитам периферической крови (описание последующих этапов выявления популяций Т-лимфоцитов – в тексте).

против ко-стимуляционных молекул – CD27 и CD28. Так, на основании наличия этих двух молекул цитотоксические Т-лимфоциты эффекторной памяти разделяют на EM1, EM2, EM3 и EM4 с фенотипами CD27⁺CD28⁺, CD27⁺CD28⁻, CD27⁻CD28⁻ и CD27⁻CD28⁺, соответственно [12]. Среди «терминально-дифференцированных» клеток эффекторной памяти выделяют, как минимум, три популяции – рЕ1 (пре-эффекторы 1-го типа), рЕ2 (пре-эффекторы 2-го типа) и эффекторные (Е) клетки, фенотипы которых можно представить как CD27⁺CD28⁺, CD27⁺CD28⁻ и CD27⁻CD28⁻, соответственно [13].

В основе описанных выше классификаций цитотоксических Т-лимфоцитов находятся исследования, посвященные поверхностному фенотипу и функциональным свойствам клеток в условиях *in vitro* и/или *in vivo*. Наибольший интерес представляют поверхностные маркеры, позволяющие охарактеризовать эффекторные свойства этих клеток. К их числу можно

отнести адгезионные молекулы и хемокиновые рецепторы, отвечающие за миграцию клеток в периферические ткани, эффекторные цитокины на примере интерферона-γ и фактора некроза опухоли-α, а также цитолитические молекулы – перфорин и различные гранзимы, благодаря которым осуществляется уничтожение клеток-мишеней при помощи контактного цитолиза [1]. Именно поэтому целью данного исследования был анализ экспрессии поверхностных молекул CD56 и CD57, характеризующих эффекторный потенциал цитотоксических Т-клеток различного уровня дифференцировки.

Материал и методы. Объектом исследования служила венозная кровь, полученная путем пункции периферической вены и собранная в вакуумные пробирки с добавлением К₃ЭДТА (рис.). Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения

научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все исследования проводились в день забора крови. В рамках данного исследования было обследовано 56 условно здоровых доноров в возрасте 18–65 лет.

Для выявления основных популяций цитотоксических Т-клеток и оценки уровня экспрессии ими CD56 и CD57 применялась следующая панель моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами (все антитела производства Beckman Coulter, США): CD57-FITC (клон NC1, кат. № IM0466U), CD56-PE (клон N901 (NKH-1), кат. № A07788), CD62L-ECD (клон DREG56, кат. № IM2713U), CD28-PC5 (клон CD28.2, кат. № 6607108), CD27-PC7 (клон 1A4CD27, кат. № A54823), CD3-APC (клон UCNT1, кат. № IM2467), CD8-APC-Alexa Fluor 700 (клон B9.11, кат. № A66332), CD45RA-APC-Alexa Fluor 750 (клон 2H4LDH11LDB9 (2H4), кат. № A86050), CD4-Pacific Blue (клон 13B8.2, кат. № A82789), CD45-Krome Orange (клон J.33, кат. № A96416). Указанным коктейлем в соответствии с рекомендациями производителя антител окрашивали 100 мкл периферической крови. Удаление эритроцитов из образцов проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора VersaLyse (кат. № A09777), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOtest 3 Fixative Solution (кат. № A07800). Анализ образцов делали на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм.

Для выявления основных популяций цитотоксических Т-клеток использовали алгоритм, приведенный на рисунке. Для каждого из образцов анализировали не менее 30 000 одиночных лимфоцитов, выделенных с использованием гистограмм *a–в* рисунка. Затем при помощи гистограммы *г* на основании экспрессии CD3 выделяли Т-клетки в рамках популяции лимфоцитов. Чтобы отличить цитотоксические Т-клетки с фенотипом CD3⁺CD8⁺ от Т-хелперов с фенотипом CD3⁺CD4⁺ использовали гистограмму *д*. Далее при помощи гистограммы *е* цитотоксические Т-лимфоциты разделяли на «наивные» клетки с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺ (обозначено «N»), клетки центральной памяти с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁺ (обозначено «CM»), клетки эффекторной памяти, негативные по обоим маркерам (обозначено «EM») и «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные клетки (обозначено «TEMRA»). Затем на основании уровня экспрессии ко-стимулирующих молекул CD27 и CD28 среди EM клеток выделяли популяции EM1–EM4 (гистограмма *ж*), а среди TEMRA – pE1, pE2 и эффекторные клетки (E), как это показано на гистограмме *з*. Для «наивных» клеток и клеток центральной памяти таких гистограмм не строили, так как более чем 95 % этих клеток несут CD27 и CD28. Далее каждую из

выделенных популяций цитотоксических Т-клеток анализировали при помощи двух параметрических гистограмм распределения по уровням экспрессии CD56 и CD57, как это показано на гистограммах *и–м* рисунка на примере популяций N, CM, EM и TEMRA, соответственно.

Обработку цитофлуориметрических данных выполняли при помощи программ Navios Software 1.2 и Kaluza 1.2 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США). Результаты приводили в виде средней арифметической и ее средней ошибки. Сравнивали уровни экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими Т-клетками различного уровня дифференцировки при помощи t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования. При анализе основных популяций цитотоксических Т-клеток, выявленных при помощи антител против CD45RA и CD62L, отмечено постепенное увеличение количества CD56-позитивных клеток в линии «наивные» – CM – EM – TEMRA, для которых эти величины составили $1,14 \pm 0,34$, $2,64 \pm 0,25$, $10,89 \pm 0,67$ и $18,90 \pm 1,67$ %, соответственно (различия между всеми популяциями достоверны). Более детальный анализ клеток эффекторной памяти, основанный на определении CD27 и CD28, показал, что CD56 чаще всего был представлен на мембране EM3 ($12,82 \pm 1,06$ %) и EM4 ($11,73 \pm 0,74$ %) с фенотипами CD27⁻CD28⁻ и CD27⁺CD28⁻, соответственно. Более того, около 10 % клеток популяции EM1 также экспрессировали данные антигены, хотя какие-либо эффекторные свойства у этой группы клеток, по данным литературы, отсутствуют [1]. При анализе популяции TEMRA было отмечено достоверное увеличение количества CD56⁺-клеток в линии pE1 – pE2 – E ($5,03 \pm 0,99$, $8,51 \pm 0,74$ и $24,74 \pm 2,05$ %, соответственно), что совпадает с данными литературы о постепенном увеличении эффекторных свойств этих клеточных популяций [13].

В целом, сходная с CD56 динамика продемонстрирована и при оценке экспрессии CD57, которая практически отсутствовала на CD3⁺CD8⁺-клетках с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺ ($1,69 \pm 0,25$ %) и достигала максимума на клетках с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻ ($49,95 \pm 2,19$ %), которые несли данный антиген на своей поверхности. Более того, $27,39 \pm 1,69$ % клеток эффекторной памяти экспрессировали CD57, что достоверно превосходило показатели не только «наивных» цитотоксических Т-лимфоцитов, но и клеток центральной памяти, для которых эта величина составляла $4,43 \pm 0,30$ %.

Исследование уровня CD57 на различных популяциях EM и TEMRA показало, что данную молекулу несут более 70 % клеток, лишенных CD27 и CD28 ($72,62 \pm 1,85$ % среди EM3 и $71,90 \pm 1,63$ % среди цитотоксических клеток E). В рамках EM с фенотипами CD27⁺CD28⁺ и CD27⁺CD28⁻ содержалось минимальное

Таблица

Экспрессия CD56 и CD57 цитотоксическими Т-клетками различного уровня дифференцировки

№	Популяции CD3 ⁺ CD8 ⁺	Доля позитивных клеток (комбинации маркеров), %			
		CD56 ⁺ CD57 ⁻	CD56 ⁺ CD57 ⁺	CD56 ⁻ CD57 ⁺	CD56 ⁻ CD57 ⁻
1	N	0,38±0,14	0,76±0,22	0,93±0,12	97,93±0,35
2	CM	1,87±0,22 ¹	0,77±0,07	3,67±0,28 ¹	93,69±0,38 ¹
3	EM:	7,75±0,53 ^{1,2}	3,14±0,38 ^{1,2}	24,25±1,52 ^{1,2}	64,86±1,60 ^{1,2}
4	EM1	9,70±0,66 ^{1,2}	0,12±0,01 ^{1,2}	5,81±0,50 ^{1,2}	84,37±0,76 ^{1,2}
5	EM2	2,61±0,29 ⁴	1,44±0,18 ⁴	31,53±1,47 ^{1,2,4}	64,42±1,45 ^{1,2,4}
6	EM3	2,78±0,30 ^{1,2,4,5}	10,04±0,95 ^{1,2,4,5}	62,59±1,81 ^{1,2,4,5}	24,59±1,73 ^{1,2,4,5}
7	EM4	11,31±0,74 ^{1,2,5,6}	0,42±0,06 ^{5,6}	5,99±0,61 ^{1,2,5,6}	82,28±0,92 ^{1,2,5,6}
8	TEMRA:	4,63±0,46 ¹⁻³	14,27±1,49 ¹⁻³	35,67±1,81 ¹⁻³	45,43±2,12 ¹⁻³
9	pE1	4,52±0,99 ^{1-4,7}	0,44±0,08 ^{3,5,6}	3,08±0,32 ^{1,3-7}	92,00±1,03 ^{1,3-7}
10	pE2	3,22±0,31 ^{1-4,7}	5,45±0,59 ¹⁻⁷	29,32±1,73 ^{1,2,4,6,7}	62,81±1,74 ^{1,2,4,6,7}
11	E	4,22±0,48 ^{1-4,7}	20,85±1,82 ^{1-7,9,10}	51,26±1,92 ^{1-7,9,10}	23,81±1,57 ^{1-7,9,10}

¹⁻¹¹ Различие с популяцией, обозначенной соответствующим номером, статистически значимо.

количество CD57-позитивных Т-лимфоцитов (5,93±0,50 и 6,40±0,63 %, соответственно). Вместе с тем, потеря CD27 при сохранении CD28 сопровождалась почти семикратным увеличением уровня CD57 в рамках данной популяции, тогда как снижение уровня экспрессии второй ко-стимуляционной молекулы – CD27 – приводило к дальнейшему росту количества CD57-позитивных клеток. Аналогичная картина наблюдалась при анализе уровня CD57 на различных популяциях TEMRA. Снижение уровня экспрессии CD27, а потом и CD28 вызывало десяти- и двадцатикратное увеличение (до 34,06±1,77 и 71,90±1,63 %, соответственно) числа CD57⁺-клеток при сравнении с аналогичным показателем клеток pE1 с фенотипом CD27⁺CD28⁺ (3,42±0,32 %).

Однако наибольший интерес представляют данные о совместной экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими Т-клетками различного уровня дифференцировки (табл.). Так, по мере перехода клеток CD3⁺CD8⁺ из популяции «наивных» к популяции TEMRA наблюдалось постепенное снижение доли CD56⁻CD57⁻-лимфоцитов. В пределах популяции клеток эффекторной памяти максимальное число дважды-негативных лимфоцитов выявлено среди популяций EM1 и EM4, тогда как переход в стадию EM3 сопровождается почти четырехкратным снижением данного показателя. Аналогичная тенденция была отмечена и при исследовании экспрессии данных антигенов среди отдельных групп «терминально-дифференцированных» эффекторных клеток, когда переход от pE1 к pE2 приводил к 30 %-ному снижению числа клеток CD56⁻CD57⁻, а переход от pE2 к E – к дополнительному 40 %-ному уменьшению их содержания. Исследование лимфоцитов CD56⁺CD57⁻ показало, что их максимальное количество наблюдалось среди EM-клеток, причем максимальные значения отмечены среди популяций EM1 и EM4, которые, как отмечалось выше,

не обладают эффекторными свойствами. При этом уровень цитотоксических Т-клеток CD56⁺CD57⁻ всегда был относительно низким среди групп лимфоцитов, обладавших выраженной цитолитической активностью (популяции EM3 и E), но достоверно превышал значения, полученные для «наивных» клеток и клеток центральной памяти.

Обратная ситуация наблюдалась при анализе распределения лимфоцитов CD56⁻CD57⁺ по различным популяциям цитотоксических Т-клеток (табл.), когда их содержание возрастало по мере снижения уровня экспрессии CD27 и CD28 и достигало максимумов среди EM3 и E CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов. Однако в рамках EM3 эта величина оказалась больше, что косвенно свидетельствовало о высоком цитолитическом потенциале именно EM3 клеток эффекторной памяти. Минимальные значения были отмечены для всех популяций, экспрессировавших обе ко-стимуляционные молекулы: «наивные» клетки, среди которых они составляли менее 1 %, клетки CM, имевшие сходные значения с pE1, а также с EM1 и EM4. Особого внимания заслуживает тот факт, что заметное количество CD56⁻CD57⁺-лимфоцитов обнаружено в рамках анализа EM2 и pE2 цитотоксических Т-клеток. Согласно результатам проведенных исследований, а также данным литературы [6], эти популяции можно рассматривать в качестве непосредственных предшественников эффекторных клеток, которые перестали экспрессировать пока еще только одну из ко-стимулирующих молекул (CD27), но уже запустили синтез цитолитических молекул в составе цитоплазматического компартмента.

Что же касается клеток, несущих на своей поверхности CD56 и CD57, то нами отмечено постепенное увеличение их содержания в линии «наивные» клетки – клетки центральной памяти – клетки эффекторной памяти – «терминально-дифференцированные» эффекторные клетки (табл.). Отмечено, что среди

лимфоцитов, необладающих, по данным литературы, цитолитической активностью (популяции «наивных» клеток, клеток центральной памяти, а также EM1, EM4 и pE1), CD56⁺CD57⁺-клетки составляли менее 1%, что можно рассматривать в качестве погрешности измерения или неточности гейтирования при анализе результатов. Более того, переход от клеток эффекторной памяти к TEMRA характеризовался более чем четырехкратным увеличением их доли в рамках исследуемых популяций. При сравнении самых «зрелых» цитотоксических Т-клеток – EM3 и E – отмечено, что последняя популяция содержала, как минимум, в два раза больше дважды позитивных Т-лимфоцитов. Причем в ходе предварительных исследований было показано, что содержание EM3 составляет в среднем 30 клеток в 1 мкл периферической крови условно здоровых доноров, тогда как содержание «терминально-дифференцированных» эффекторов здесь примерно в три раза выше [2]. По-видимому, именно на клетки CD3⁺CD8⁺ популяции E приходится основная функциональная нагрузка по уничтожению клеток-мишеней различного происхождения, хотя EM3 тоже могут выполнять сходные функции.

Обсуждение полученных данных. CD56 (или NCAM) является поверхностным гликопротеином с молекулярной массой около 140–220 кДа и принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов. Экспрессия этой молекулы обнаружена в клетках нейронального происхождения, мышечных клетках, а также натуральных киллерах и некоторых популяциях Т-лимфоцитов периферической крови [9]. В клетках нервной системы CD56 отвечает за межклеточные взаимодействия. Аналогичные функции, по-видимому, он выполняет и на клетках периферической крови, когда было показано, что блокада данной молекулы при помощи блокирующих антител сопровождается снижением способности натуральных киллеров к уничтожению клеток-мишеней [11].

Однако имеются и диаметрально противоположные данные, указывающие на тот факт, что CD56 не участвует в процессах распознавания и формирования контактов между цитотоксическими клетками и их мишенями [8]. В случае Т-лимфоцитов экспрессия CD56 обнаруживается практически на всех основных популяциях, в том числе, Т-хелперах и цитотоксических Т-клетках, Т-лимфоцитах, экспрессирующие αβ-, γδ- и Vα24Jα18-Т-клеточные рецепторы [15].

В свою очередь, CD57 (или HNK1) является углеводным эпитопом, представленным на поверхности цитоплазматической мембраны некоторых клеток [5]. В 1981 г. были получены первые моноклональные антитела против данной молекулы [3]. Причем клетки, способные связываться с этими антителами, обладали выраженной цитолитической активностью, что послужило причиной для рассмотрения данного поверхностного антигена в качестве маркера натуральных киллеров. В настоящее время особое внимание уделяется исследованию экспрессии CD57

на натуральных киллерах и цитотоксических Т-лимфоцитах как маркера «зрелости», дифференцировки или «старения» клеток. Следует упомянуть о том, что уровень экспрессии CD57 на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов коррелирует со способностью этих клеток накапливать в цитоплазматических гранулах перфорин и гранзимы [4]. Так, цитотоксические Т-клетки, ярко экспрессирующие CD57, имели высокий уровень перфорина, что позволяет рассматривать их в качестве зрелых эффекторных клеток. Первой эффекторной молекулой, появляющейся в цитоплазме Т-клеток, является гранзим А, экспрессия которого может быть не связана со всеми остальными белками данного семейства, и CD57 на этих клетках не будет определяться. Клетки, способные к синтезу гранзима В, всегда содержат гранзим А, так как наличие этой пары молекул служит предпосылкой для начала накопления перфорина, появление которого в составе гранул сопровождается экспрессией CD57. Перфорин обнаруживается только в составе популяции CD57bright, тогда как CD57dim-Т-клетки его еще не содержат. Эти результаты подтверждаются данными молекулярно-биологических исследований [10]. Так, цитотоксические Т-лимфоциты CD57⁺ активно экспрессировали гранзим В, гранулизин и перфорин при сравнении с CD57-негативными клетками. Таким образом, использование CD57 в качестве «суррогатного» маркера позволяет без трудоемких методов окраски на внутриклеточные антигены выявить эффекторные цитотоксические клетки, содержащие в цитоплазме необходимый набор цитолитических молекул. Кроме того, применение данной молекулы позволяет оценить уровень дифференцировки цитотоксических Т-лимфоцитов, как это было сделано нами в ходе проведенного исследования.

Однако полученные результаты, а также анализ литературных данных дают возможность ставить вопрос о корректности выбора антигенных детерминант, на основе которых строится ключевая классификация цитотоксических Т-клеток, применяемая более чем в 90% научных и клинических исследований. Во-первых, анализ уровня экспрессии CD56 и CD57 наводит на мысль о существовании, как минимум, двух независимых популяций – EM3- и E-цитотоксических Т-лимфоцитов, обладающих выраженным эффекторным фенотипом. Во-вторых, это наличие среди EM и TEMRA, рассматриваемых в качестве короткоживущих высоко дифференцированных цитотоксических Т-клеток, популяций незрелых лимфоцитов CD3⁺CD8⁺, способных к пролиферации и лишенных эффекторных свойств (в первую очередь, популяции EM1 и pE1), в том числе, перфорина и гранзимов в составе литических гранул [12] и основных поверхностных маркеров зрелых цитотоксических клеток (табл.). Таким образом, классификация, основанная на оценке сначала уровня CD45RA (или CD45R0) и CD62L (или CCR7), а потом еще и CD27 и CD28, подразумевает наличие нескольких независимых

популяций лимфоцитов, фактически дублирующих функции друг друга. В 2008 г. была предложена схема дифференцировки и «созревания» цитотоксических Т-клеток в рамках описываемого подхода, в соответствии с которой считается, что в периферической крови человека происходят следующие переходы клеток из популяции в популяцию по мере их созревания: $N \rightarrow CM \rightarrow EM1 \rightarrow EM2 \rightarrow pE1 \rightarrow pE2 \rightarrow EM4 \rightarrow EM3 \rightarrow E$ [7]. Но даже только полученные нами результаты предоставляют возможность усомниться в такой схеме, предполагающей, в том числе, несколько раундов появления и исчезновения с поверхности клетки некоторых антигенов (CD45RA, например). В настоящее время существует, как минимум, четыре независимых и отчасти противоречащих друг другу модели формирования различных популяций эффекторных клеток и клеток памяти, каждая из которых опирается на обширный экспериментальный и/или клинический материал [6]. Таким образом, требуются дальнейшие поиски фенотипических и функциональных особенностей цитотоксических Т-клеток с целью выработки адекватных подходов к их классификации для дальнейшего использования в научных исследованиях и клинико-диагностической практике. Так, увеличение уровня экспрессии CD57 на Т-лимфоцитах связано с риском отторжения трансплантатов и неблагоприятным прогнозом у пациентов с солидными опухолями. Данный показатель рассматривается в качестве одного из ключевых признаков обострения при различных аутоиммунных заболеваниях. Примерно аналогичный спектр заболеваний сопровождается еще и увеличением экспрессии CD56 CD3⁺CD8⁻-лимфоцитами периферической крови. Тогда как уменьшение числа цитотоксических Т-клеток, несущих на своей поверхности CD56, связывается с наличием хронических вирусных инфекций (ВИЧ, гепатит С) или инфекционных заболеваний, вызванных, например, *Plasmodium falciparum* и *Plasmodium vivax*.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 1326), гранта 14-08-06-25_и Дальневосточного федерального университета и гранта РФФИ № 15-04-05093а.

Литература

1. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 947–964.
2. Кудрявцев И.В., Елезов Д.С. Выявление основных популяций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови на основании уровня экспрессии CD27, CD28, CD45R0 и CD62L // Рос. иммунол. журнал. 2013. Т. 7 (16), № 2–3 (1). С. 57–61.
3. Abo T., Balch C.M. A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1) // J. Immunol. 1981. Vol. 127, No. 3. P. 1024–1029.
4. Chattopadhyay P.K., Betts M.R., Price D.A. [et al.] The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression // J. Leukoc. Biol. 2009. Vol. 85, No. 1. P. 88–97.
5. Focosi D., Bestagno M., Burrone O. [et al.] CD57⁺ T lymphocytes and functional immune deficiency // J. Leukoc. Biol. 2010. Vol. 87, No. 1. P. 107–116.
6. Kaech S.M., Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation // Nat. Rev. Immunol. 2012. Vol. 12. P. 749–761.
7. Koch S., Larbi A., Derhovanessian E. [et al.] Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people // Immun. Ageing. 2008. Vol. 5. P. 6.
8. Lanier L.L., Chang C., Azuma M. [et al.] Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56) // J. Immunol. 1991. Vol. 146, No. 12. P. 4421–4426.
9. Lanier L.L., Testi R., Bindl J. [et al.] Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule // J. Exp. Med. 1989. Vol. 169, No. 6. P. 2233–2238.
10. Le Priol Y., Puthier D., Lecureuil C. [et al.] High cytotoxic and specific migratory potencies of senescent CD8⁺ CD57⁺ cells in HIV-infected and uninfected individuals // J. Immunol. 2006. Vol. 177, No. 8. P. 5145–5154.
11. Nitta T., Yagita H., Sato K. [et al.] Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction // J. Exp. Med. 1989. Vol. 170, No. 5. P. 1757–1761.
12. Romero P., Zippelius A., Kurth I. [et al.] Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8⁺ T lymphocytes // J. Immunol. 2007. Vol. 178, No. 7. P. 4112–4119.
13. Rufer N., Zippelius A., Batard P. [et al.] Ex vivo characterization of human CD8⁺ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions // Blood. 2003. Vol. 102, No. 5. P. 1779–1787.
14. Sallusto F., Lenig D., Forster R. [et al.] Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions // Nature. 1999. Vol. 401, No. 6754. P. 708–712.
15. Van Bijnen S.T., Withaar M., Preijers F. [et al.] T cells expressing the activating NK-cell receptors KIR2DS4, NKG2C and NKG2D are elevated in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and cytotoxic toward hematopoietic progenitor cell lines // Exp. Hematol. 2011. Vol. 39, No. 7. P. 751–762.

Поступила в редакцию 25.02.2015.

Анализ уровня экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами различного уровня дифференцировки

И.В. Кудрявцев^{1,2}, А.Г. Борисов³, А.Е. Волков¹, А.А. Савченко³, М.К. Серебрякова², А.В. Полевщиков^{1,2}

¹ Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8), ² Институт экспериментальной медицины (197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12), ³ НИИ медицинских проблем Севера (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г)

Резюме. С использованием десятицветного цитометрического анализа охарактеризован уровень экспрессии кластеров дифференцировки (Cluster of Differentiation – CD) 56, 57, 3 и 8 цитотоксическими лимфоцитами периферической крови здоровых доноров. Субпопуляции лимфоцитов CD3⁺CD8⁺ были выделены на основании экспрессии CD45RA, CD62L, CD27 и CD28. Показано, что высокой плотностью CD56 обладают незрелые типы клеток, экспрессирующие CD27 и/или CD28, а наличие CD57 характерно для дифференцированных эффекторных клеток, не несущих CD27 или лишенных обеих молекул. Ко-экспрессия CD56 и CD57 может являться отличительной особенностью исключительно зрелых эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов, относящихся к клеткам эффекторной памяти и «терминально-дифференцированным» CD45RA⁺-эффекторным клеткам. Полученные данные указывают на наличие в периферической крови человека нескольких групп CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов, обладающих сходными свойствами и фенотипом, но из-за несовершенства современных классификаций относящихся к принципиально разным клеточным типам, что актуально в диагностике аутоиммунных и инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: кластеры дифференцировки, проточная цитометрия, популяции лимфоцитов, эффекторные клетки.