

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<sup>1,2</sup>, А.Г. Борисов<sup>3</sup>, А.Е. Волков<sup>1</sup>, А.А. Савченко<sup>3</sup>, М.К. Серебрякова<sup>2</sup>, А.В. Полевщиков<sup>1,2</sup>*

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

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

<sup>3</sup> 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<sup>1,2</sup>, A.G. Borisov<sup>3</sup>, A.E. Volkov<sup>1</sup>, A.A. Savchenko<sup>3</sup>, M.K. Serebryakova<sup>2</sup>, A.V. Polevshchikov<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> School of Biomedicine of Far Eastern Federal University (8 Sukhanova St. Vladivostok 690950 Russian Federation), <sup>2</sup> Institute of Experimental Medicine (12 Acad. Pavlov St. St. Petersburg 197376 Russian Federation), <sup>3</sup> 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<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) and terminally differentiated effectors (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 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<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> и CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>, соответственно, и «терминально-дифференцированные CD45RA<sup>+</sup>-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

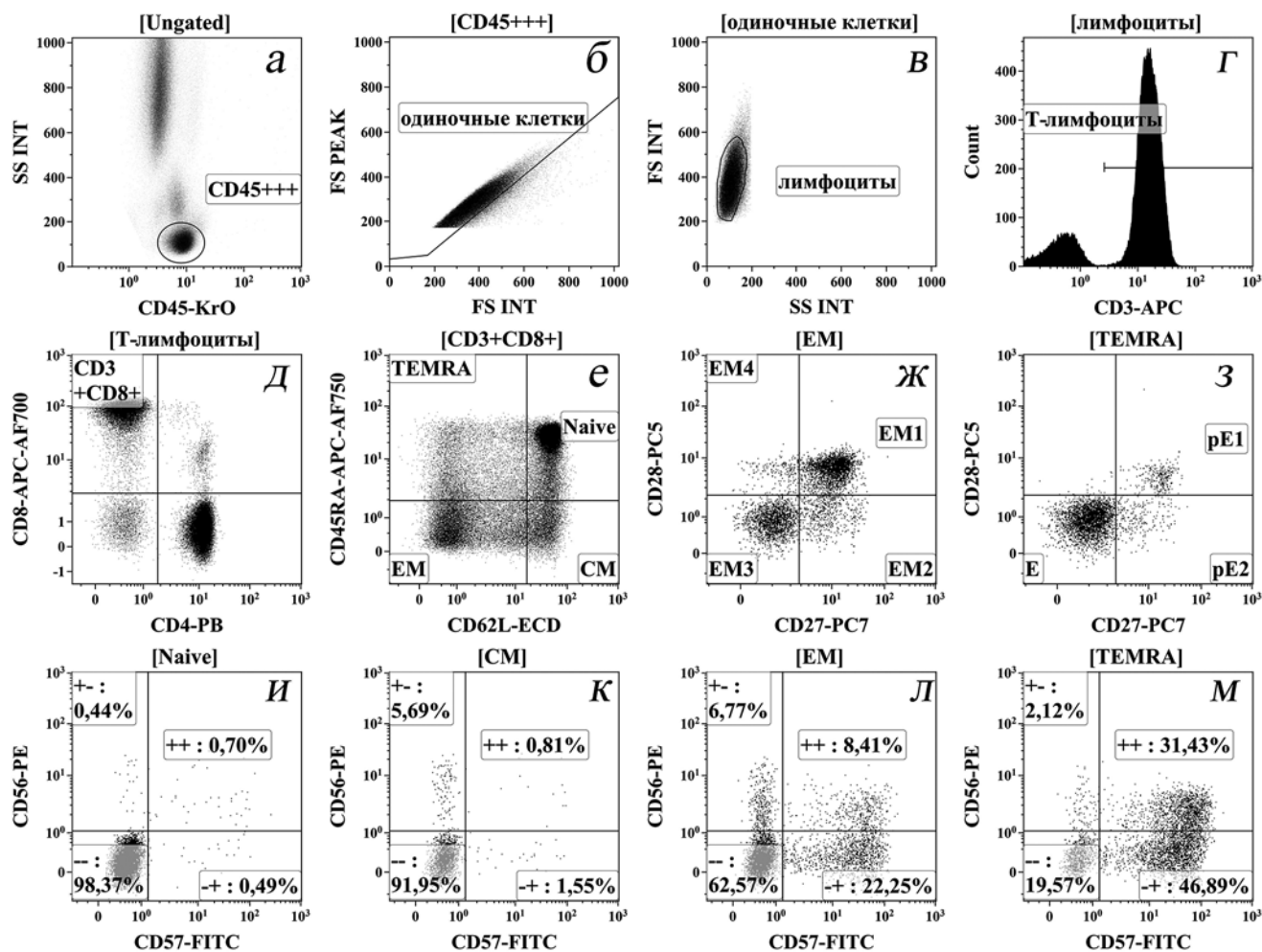


Рис. Тактика гейтирования для выявления основных популяций цитотоксических Т-клеток.

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<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup> и CD27<sup>-</sup>CD28<sup>+</sup>, соответственно [12]. Среди «терминально-дифференцированных» клеток эффекторной памяти выделяют, как минимум, три популяции – pE1 (пре-эффекторы 1-го типа), pE2 (пре-эффекторы 2-го типа) и эффекторные (E) клетки, фенотипы которых можно представить как CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> и CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>, 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 K<sub>3</sub>ЭДТА (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 UCST1, 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<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> от Т-хелперов с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> использовали гистограмму *д*. Далее при помощи гистограммы *е* цитотоксические Т-лимфоциты разделяли на «наивные» клетки с фенотипом CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (обозначено «N»), клетки центральной памяти с фенотипом CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> (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<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup> и CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, 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<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-клетках с фенотипом CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> ( $1,69 \pm 0,25$  %) и достигала максимума на клетках с фенотипом CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> ( $49,95 \pm 2,19$  %), 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<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> и CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> содержалось минимальное

Таблица

Экспрессия CD56 и CD57 цитотоксическими Т-клетками различного уровня дифференцировки

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

<sup>1-11</sup> 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<sup>+</sup>-клеток при сравнении с аналогичным показателем клеток pE1 с фенотипом CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> (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<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> из популяции «наивных» к популяции TEMRA наблюдалось постепенное снижение доли CD56<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup>-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<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup>, а переход от pE2 к E – к дополнительному 40 %-ному уменьшению их содержания. Исследование лимфоцитов CD56<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> 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<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-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<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, 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<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>1,2</sup>, А.Г. Борисов<sup>3</sup>, А.Е. Волков<sup>1</sup>, А.А. Савченко<sup>3</sup>, М.К. Серебрякова<sup>2</sup>, А.В. Полевщиков<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8), <sup>2</sup> Институт экспериментальной медицины (197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12), <sup>3</sup> 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<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>-эффекторным клеткам. Полученные данные указывают на наличие в периферической крови человека нескольких групп CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-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.