

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ МЕТОДОМ МНОГОЦВЕТНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Кудрявцев И.В.^{1,2,3}, Борисов А.Г.^{4,5}, Кроби́нец И.И.⁶, Савченко А.А.^{4,5},
Серебрякова М.К.¹

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

³ ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

⁵ ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Минздрава России, г. Красноярск, Россия

⁶ ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России»,
Санкт-Петербург, Россия

Резюме. С использованием многоцветной проточной цитометрии на основании экспрессии CD27, CD28, CD45RA и CD62L цитотоксические Т-лимфоциты периферической крови можно разделить на несколько субпопуляций. В рамках данного исследования проведено сравнение двух основных подходов, направленных на выявление популяций CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов, находящихся на разных стадия дифференцировки. Объектом исследования служила венозная кровь 59 мужчин и 51 женщины в возрасте 18-65 лет. Первый подход основан на первоначальной оценке уровня CD45RA и CD62L, позволяющий выявить «наивные» клетки (CD45RA⁺CD62L⁺, в среднем 30% от всех CD3⁺CD8⁺), клетки центральной (CD45RA⁻CD62L⁺, ~11%) и эффекторной (EM, CD45RA⁻CD62L⁻, ~35%) памяти, а также терминально-дифференцированные эффекторные клетки (TEMRA, CD45RA⁺CD62L⁻, ~24%). На основании экспрессии CD27 и CD28 EM разделяют на отдельные субпопуляции, к числу которых относятся EM1 (CD27⁺CD28⁺, ~19% от CD3⁺CD8⁺), EM2 (CD27⁺CD28⁻, ~5%), EM3 (CD27⁻CD28⁻, ~9%) и EM4 EM2 (CD27⁻CD28⁺, ~2%). В свою очередь TEMRA подразделяются на pE1 (CD27⁺CD28⁺, ~3% от CD3⁺CD8⁺), pE2 (CD27⁺CD28⁻, ~5%) и эффекторные клетки (E, CD27⁻CD28⁻, ~15%). Второй подход основан на первоначальном определении уровня экспрессии CD27 и CD28 с последующим анализом CD45RA и CD62L на популяции с фенотипом CD27⁺CD28⁺. В этом случае выявляют «наивные» цитотоксический Т-клетки фенотипом CD27⁺CD28⁺CD45RA⁺CD62L⁺ (~30% от CD3⁺CD8⁺), клетки центральной памяти – CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁺ (~12%), переходные или «транзиторные» клетки памяти – CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁻ (~12%), а также клетки эффекторной памяти и эффекторные клетки (CD27⁺CD28⁻, ~11% и CD27⁻CD28⁻, ~24% соответственно), оценка CD45RA и CD62L на которых не производится. Сформированы нормативные значения для указанной возрастной группы в относительных и абсолютных величинах. В рамках использования подхода, осно-

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-29-29
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Address for correspondence:

Kudryavtsev Igor' V.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Acad.
Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Кудрявцев, А.Г. Борисов, И.И. Кроби́нец,
А.А. Савченко, М.К. Серебрякова, «Определение основных
субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом
многоцветной проточной цитометрии» // Медицинская
иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 525-538.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-525-538

For citation:

I.V. Kudryavtsev, A.G. Borisov, I.I. Krobínets, A.A. Savchenko,
M.K. Serebryakova, "Multicolor flow cytometric analysis
of cytotoxic T cell subsets", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 525-538.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-525-538

© Кудрявцев И.В. и соавт., 2015

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-6-525-538>

ванного на первоначальной экспрессии CD45RA и CD62L, обнаружена значительная обратная зависимость между возрастом и уровнем «наивных» CD3⁺CD8⁺ клеток (для относительных значений $r = -0,646$ при $p < 0,001$, для абсолютных – $r = -0,562$ при $p < 0,001$). С возрастом увеличивалось содержание клеток субпопуляций EM3 ($r = 0,474$ при $p < 0,001$ и $r = 0,435$ при $p < 0,001$ соответственно) и E ($r = 0,393$ при $p < 0,001$ и $r = 0,375$ при $p < 0,001$ соответственно). В рамках применения подхода, основанного на первоначальной оценке экспрессии CD27 и CD28, обнаружена аналогичная зависимость для «наивных» клеток ($r = -0,638$ при $p < 0,001$ и $r = -0,530$ при $p < 0,001$ соответственно). По мере увеличения возраста наблюдалось возрастание в периферической крови клеток с фенотипом CD27⁺CD28⁻ ($r = 0,495$ при $p < 0,001$ и $r = 0,442$ при $p < 0,001$ соответственно).

Ключевые слова: проточная цитометрия, многоцветный анализ, субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов, CD45RA и CD62L, CD27 и CD28

MULTICOLOR FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF CYTOTOXIC T CELL SUBSETS

Kudryavtsev I.V.^{a, b, c}, Borisov A.G.^{d, e}, Krobinets I.I.^f, Savchenko A.A.^{d, e}, Serebryakova M.K.^b

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

^c N.N. Petrov Research Institute of Oncology, St. Petersburg, Russian Federation

^d Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

^e Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

^f Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Multiparametric flow analysis has offered an ability of simultaneous analysis of multiple molecules at the single-cell level. Peripheral blood cells from 110 healthy subjects aged 18–65 years (59 males and 51 females) were stained with antibodies to CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45, CD45RA and CD62L, and analyzed using different gating strategies. The first one was based on initial analysis of CD45RA and CD62L expression, and CD3⁺CD8⁺ cells were divided into naïve population (CD45RA⁺CD62L⁺) comprising approx. 30% of the CD3⁺CD8⁺ subset; central memory cells (CD45RA⁻CD62L⁺, ~11%), effector memory cells (EM; CD45RA⁻CD62L⁻, ~35%) and «terminally differentiated» effector memory cells (TEMRA, CD45RA⁺CD62L⁻, ~24% of total CD8⁺ subset). As based on expression of CD27 and CD28 in EM and TEMRA, some further populations were distinguished, i.e., CD27⁺CD28⁺ (termed as EM1, about 19% from CD3⁺CD8⁺); CD27⁺CD28⁻ (EM2, ~5%), CD27⁻CD28⁻ (EM3, ~9%) and CD27⁻CD28⁺ (EM4, ~2%). Appropriate subsets were identified within TEMRA population, as follows: CD27⁺CD28⁺ (pE1, ~3%), CD27⁺CD28⁻ (pE2, ~5%) and CD27⁻CD28⁻ (E, ~15%). The second approach was based on initial expression of CD27 and CD28, followed by analysis of CD45RA and CD62L expression on CD27⁺CD28⁺ subset. Total cytotoxic T cell population was divided into naïve – CD27⁺CD28⁺CD45RA⁺CD62L⁺ (~30% from CD3⁺CD8⁺ subset), central memory (CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁺, ca.~12% of total), transitional memory cells (CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁻, approx.~12%), as well as effector memory cells and effector cells (CD27⁺CD28⁻, ~11% и CD27⁻CD28⁻, ~24%, respectively). Expression of CD45RA and CD62L was not analyzed for the latter two populations. Frequencies of all cell populations, identified by means of two different gating strategies, were expressed as percentages of the total CD3⁺CD8⁺ and absolute cell counts. Using the gating strategy based on initial analysis of CD45RA and CD62L, some correlations between naïve CD3⁺CD8⁺ frequencies and donor age were revealed ($r = -0.646$, $p < 0.001$, and $r = -0.562$, $p < 0.001$, respectively). Relative and absolute counts of EM3 ($r = 0.474$, $p < 0.001$ and $r = 0.435$, $p < 0.001$, respectively) and E subsets ($r = 0.393$, $p < 0.001$ and $r = 0.375$, $p < 0.001$, respectively) CD3⁺CD8⁺ subsets showed linear increase with age. Usage of another gating strategy based on CD27 and CD28 expression revealed age-dependent changes in relative and absolute frequencies of naïve CD3⁺CD8⁺ ($r = -0.638$, $p < 0.001$ and $r = -0.530$, $p < 0.001$, respectively). Meanwhile, CD27⁻CD28⁻ subset accumulated linearly with age ($r = 0.495$, $p < 0.001$ and $r = 0.442$, $p < 0.001$, respectively). The results suggest that differences in subset distribution are responsible for age-related changes in CD8⁺ cells.

Keywords: flow cytometry, multicolor analysis, cytotoxic T cell subsets, CD45RA/CD62L coexpression, CD27/CD28 phenotype

Введение

Цитотоксические Т-лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD8⁺ играют ведущую роль в специфической защите организма от внутриклеточных патогенов или собственных измененных клеток [14]. Способность проявлять эффекторные свойства, к числу которых относятся синтез специфических цитокинов, секреторная дегрануляция и высвобождение перфорина и гранзимов, определяется уровнем зрелости или стадией дифференцировки клетки. Образование «наивных» цитотоксических Т-клеток происходит в тимусе, где эти клетки последовательно проходят несколько стадий селекции, успешное завершение которых сопровождается формированием Т-клеточного рецептора определенной специфичности и выходом клеток в циркуляцию. Обычно «наивные» CD3⁺CD8⁺ лимфоциты экспрессируют несколько основных поверхностных антигенов — различные изоформы CD45, CD62L и/или CCR7 (CD197), CD27 и CD28, которые позволяют отличить их от более зрелых форм клеток, циркулирующих в периферической крови. Именно на оценке уровней экспрессии этих молекул основаны современные подходы к определению стадий дифференцировки или степени зрелости цитотоксических Т-лимфоцитов, применяемые как в научных, так и клинических иммунологических исследованиях [6, 13].

Из всех указанных выше поверхностных антигенов CD45 имеет самую длительную историю применения. Еще в 1988 году было показано, что CD45R (в настоящее время — CD45RA) может рассматриваться в качестве маркера «наивных» или «не праймированных» Т-клеток, тогда как антитело UCHL1, распознающее CD45R0, выявляет Т-клетки иммунологической памяти [15]. «Наивные» Т-клетки в составе белковой формы молекулы CD45 несут все домены (обозначаемые как А, В и С), но по мере созревания Т-лимфоцитов — уже в ходе антиген-зависимой дифференцировки — происходит сплайсинг участков РНК, кодируемых экзонами А, затем В и С [14]. Продукт, содержащий все названные домены, обозначают как CD45RA (молекулярная масса 220 кДа), а продукт конечной модификации РНК, лишенный всех названных доменов, называют CD45R0 (180 кДа). Функциональная значимость различных изоформ CD45 до настоящего времени остается малоисследованной, чего нельзя сказать об остальных поверхност-

ных антигенах, применяемых для типирования ключевых стадий созревания Т-клеток. Так, впервые о CD62L (L-селектин) как о молекуле, определяющей направление миграции «наивных» Т-лимфоцитов в периферические лимфоидные органы, упоминали Picker и соавторы [31]. В рамках данного исследования было отмечено, что «наивные» Т-лимфоциты (CD45RA^{high}/CD45R0^{low}) преимущественно экспрессируют CD62L, тогда как среди более зрелых клеток — CD45RA^{low}/CD45R0^{high} — можно было выделить как популяцию CD62L⁺, так и CD62L⁻. Причем на поверхности CD62L-негативных Т-клеток были обнаружены адгезионные молекулы, ответственные за миграцию в периферические ткани. В настоящее время считается, что пара CD62L и CCR7 определяет процессы миграции CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ клеток периферической крови. Например, основными лигандами CD197 (CCR7) являются β-хемокины — CCL19, синтезируемый посткапиллярными венулами с высоким эндотелием, и CCL21, секретируемый стромальными и дендритными клетками Т-зависимых зон периферических лимфоидных органов. Столь же существенную роль в миграции Т-клеток в лимфатические узлы и Пейеровы бляшки играет CD62L, лигандами которого на поверхности эндотелия выступают GlyCAM, PSGL-1 и CD34. Наличие на клеточной мембране CCR7 и CD62L позволяет выделить популяции «наивных» Т-клеток и Т-клеток центральной памяти среди общего пула циркулирующих Т-лимфоцитов [35]. Отсутствие этих поверхностных антигенов на популяциях эффекторных клеток — эффекторные клетки памяти и терминально-дифференцированные эффекторы — обусловлено тем, что функции этих клеток реализуются вне лимфоидной ткани.

Одной из важнейших функций молекулы CD27, принадлежащей к семейству TNFR, является защита активированных «наивных» Т-клеток и Т-клеток памяти от апоптоза за счет усиления экспрессии анти-апоптотических белков в ядре клетки посредством сигнальных каскадов, связанных с активацией NF-κB и JNK. Поэтому данный антиген традиционно рассматривается в качестве маркера «не эффекторных» клеток, которым для активации и формирования клона антиген-специфических клеток необходим CD70 [16]. В свою очередь, CD28 относится к иммуноглобулиновому суперсемейству и является трансмембранным гомодимерным гликопротеи-

ном с молекулярной массой каждой цепи около 44 кДа, в составе цитоплазматического домена которых обнаружены четыре остатка тирозина, необходимые для фосфорилирования и проведения сигнала при связывания с белками семейства B7 [37]. В результате взаимодействия B7 с CD28 происходит формирование «второго» сигнала, запуск пролиферации Т-клеток и синтеза цитокинов (в первую очередь, IL-2), а также усиление выживаемости Т-клеток за счет экспрессии анти-апоптотических белков, включая Bcl-X_L [38]. Именно поэтому подавляющее большинство «наивных» Т-клеток и Т-клеток центральной памяти, единственным ответом которых на специфическую активацию Т-клеточного рецептора является пролиферация, несут на своей поверхности CD27 и CD28.

С развитием приборной базы и появлением широкого спектра флуорохромов широкому кругу исследователей стали доступны проточные цитофлуориметры, которые позволяют одновременно анализировать все указанные выше поверхностные антигены на одной клетке [3]. При этом в нашей стране можно отметить увеличение числа работ, в которых используется многоцветная проточная цитометрия, в том числе и для анализа отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов в клинике различных заболеваний. Так, роль Т-клеток различного уровня дифференцировки активности исследуется при таких аутоиммунных патологиях, как рассеянный склероз [5] и ревматоидный артрит [4]. Столь же существенное внимание уделяется анализу иммунных механизмов защиты, опосредованных цитотоксическими Т-клетками и Т-хелперами, при инфекционных заболеваниях, к числу которых относятся энтеровирусные инфекции [10], инфекции, вызванные вирусом гриппа [11] и хронический гепатит С [12]. Вместе с тем остается нерешенным вопрос о том, каких алгоритмов выявления целевых популяций следует придерживаться при анализе уровня дифференцировки цитотоксических Т-клеток [6]. Именно поэтому **целью данной работы** стало сравнение двух основных тактик «гейтирования», применяемых для анализа CD3⁺CD8⁺ с использованием антител против CD27, CD28, CD45RA и CD62L, а также разработка нормативных показателей по выявляемым субпопуляциям цитотоксических Т-лимфоцитов для дальнейшего применения в клинических исследованиях.

Материалы и методы

Объектом исследования служила венозная кровь, полученная путем пункции периферической вены и собранная в вакуумные пробирки с добавлением K₃ЭДТА. Образцы были получены в отделениях переливания крови ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения России и ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, за что авторы выражают искреннюю благодарность руководству и сотрудникам этих учреждений. Все исследования проводились в день взятия крови. В рамках данного исследования было обследовано 110 условно здоровых доноров (59 мужчин и 51 женщина) в возрасте 18–65 лет, 35 лет (25; 45). Подготовку образцов для проведения цитофлуориметрического учета проводили в соответствии с рекомендациями, приведенными в [1]. Для выявления основных популяций цитотоксических Т-клеток применялась следующая панель моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами (все антитела производства Beckman Coulter, США): CD62L-ECD (клон DREG56, кат. № IM2713U), 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). Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований, изложенных в литературе [9, 26]. Удаление эритроцитов из образцов проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора VersaLyse Lysing Solution (кат. № A09777), к 975 мкл которого *ex tempera* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOtest 3 Fixative Solution (кат. № A07800). Абсолютные значения были получены в одноплатформенной системе с помощью реагента FlowCount™ (Beckman Coulter, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку проводили при помощи программ-

ТАБЛИЦА 1. ОСНОВНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПРИ ПОМОЩИ ПОЭТАПНОГО «ГЕЙТИРОВАНИЯ» НА ОСНОВАНИИ ПЕРВОНАЧАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ CD45RA И CD62L С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ОЦЕНКОЙ ЭКСПРЕССИИ CD27 И CD28 НА КЛЕТКАХ С ФЕНОТИПАМИ CD45RA⁻CD62L⁻ И CD45RA⁺CD62L⁻

Основные популяции цитотоксических Т-клеток периферической крови	Относительное содержание, % от CD3 ⁺ CD8 ⁺		Абсолютное содержание, клетки / μL крови	
	X±s	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)	X±s	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)
CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (N)	30,25±1,49	27,71 (18,43-40,40)	135±8	128 (71-170)
CD45RA ⁻ CD62L ⁺ (CM)	10,96±0,59	9,62 (6,85-13,22)	50±3	39 (29-57)
CD45RA ⁻ CD62L ⁻ (EM):	35,19±1,16	34,24 (25,54-43,49)	166±9	153 (94-206)
CD45RA ⁻ CD62L ⁻ CD27 ⁺ CD28 ⁺ (EM1)	18,90±0,77	17,88 (12,91-23,96)	86±5	70 (53-107)
CD45RA ⁻ CD62L ⁻ CD27 ⁺ CD28 ⁻ (EM2)	4,76±0,22	4,32 (2,99-5,72)	22±1	20 (13-28)
CD45RA ⁻ CD62L ⁻ CD27 ⁻ CD28 ⁻ (EM3)	9,15±0,85	6,22 (2,45-14,73)	47±5	24 (13-68)
CD45RA ⁻ CD62L ⁻ CD27 ⁻ CD28 ⁺ (EM4)	2,37±0,18	1,93 (1,31-2,71)	11±1	8 (6-13)
CD45RA ⁺ CD62L ⁻ (TEMRA):	23,75±1,26	22,96 (12,63-31,09)	114±8	91 (46-164)
CD45RA ⁺ CD62L ⁻ CD27 ⁺ CD28 ⁺ (pE1)	3,31±0,27	2,54 (1,81-3,72)	14±1	11 (8-17)
CD45RA ⁺ CD62L ⁻ CD27 ⁺ CD28 ⁻ (pE2)	4,93±0,37	3,76 (2,82-6,13)	23±2	16 (11-27)
CD45RA ⁺ CD62L ⁻ CD27 ⁻ CD28 ⁻ (E)	15,32±1,10	14,80 (5,54-21,75)	75±6	58 (19-120)

ТАБЛИЦА 2. ОСНОВНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПРИ ПОМОЩИ ПОЭТАПНОГО «ГЕЙТИРОВАНИЯ» НА ОСНОВАНИИ ПЕРВОНАЧАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ CD27 И CD28 С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ОЦЕНКОЙ ЭКСПРЕССИИ CD45RA И CD62L НА КЛЕТКАХ С ФЕНОТИПОМ CD27⁺CD28⁺

Основные популяции цитотоксических Т-клеток периферической крови	Относительное содержание, % от CD3 ⁺ CD8 ⁺		Абсолютное содержание, клетки / μL крови	
	X±s	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)	X±s	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)
CD27 ⁺ CD28 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (N)	29,86±1,47	28,78 (18,88-39,84)	131±7	126 (67-170)
CD27 ⁺ CD28 ⁺ CD45RA ⁻ CD62L ⁺ (CM)	11,88±0,57	11,07 (7,80-14,37)	53±3	45 (33-67)
CD27 ⁺ CD28 ⁺ CD45RA ⁻ CD62L ⁻ (TM)	19,33±0,78	18,73 (13,29-23,43)	87±5	73 (52-110)
CD27 ⁺ CD28 ⁻ (EM):	11,01±0,53	10,07 (7,53-12,55)	52±4	42 (29-57)
CD27 ⁻ CD28 ⁻ (E)	23,86±1,58	23,15 (8,44-35,41)	119±10	88 (28-178)

ного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США). Результаты, полученные в ходе исследования абсолютного и относительного содержания цитотоксических Т-клеток в периферической крови, приводили в таблицах в виде среднего (X) и ошибки среднего (s), а также медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q_{25} и Q_{75}). Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену (r).

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 приведены два основных подхода к анализу уровня дифференцировки цитотоксических Т-клеток периферической крови при помощи многоцветной проточной цитофлуориметрии. Оба способа базируются на использовании антител против CD27, CD28, CD45RA и CD62L, но существенное различие между ними заключается в поэтапном выделении целевых субпопуляций или «тактике гейтирования» клеток. Первый подход (рис. 1А-В) исходит из того, что основными маркерами или поверхностными антигенами, характеризующими уровень зрелости клеток, являются CD45RA и CD62L, тогда как экспрессия костимулирующих молекул CD27 и CD28 применяется лишь для более детального анализа клеток эффекторной памяти (ЕМ) и «терминально-дифференцированных» CD45RA-позитивных эффекторов (TEMRA). Второй подход основан на определении сначала уровня CD27 и CD28, тогда как наличие CD45RA и/или CD62L является «вторичным» и применяется для выявления «не эффекторных» субпопуляций цитотоксических Т-клеток, к числу которых относятся «наивные» клетки, клетки центральной памяти (СМ) и «промежуточные» или «транзиторные» клетки памяти (ТМ).

При сравнении двух приведенных на рисунке 1 «тактик» определения основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов различного уровня дифференцировки можно отметить, что выявляемые при помощи этих двух разных подходов «наивные» клетки и клетки центральной памяти соответствуют друг другу примерно на 98-99%, о чем свидетельствуют результаты, приведенные в таблицах 1 и 2. Что же касается клеток эффекторной памяти с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁻, то при использовании «тактики», основанной на экспрессии CD27 и CD28, они распределяются в зависимости

от экспрессии этих последних антигенов. Так, популяция ЕМ1 целиком входит в состав клеток памяти ТМ, а популяция ЕМ2 будет находиться в составе клеток ЕМ (ЕМ, фенотип CD27⁺CD28⁻, рис.1Г), тогда как ЕМ3 будет являться частью популяции «терминально-дифференцированных» клеток (ТД, фенотип CD27⁻CD28⁻, рис. 1Д). Однако клетки ЕМ4 с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁻CD27⁻CD28⁺ вообще не учитываются в рамках второго описываемого подхода. Лимфоциты субпопуляции TEMRA будут распределяться примерно аналогичным образом, исходя из уровней экспрессии CD27 и CD28. Клетки с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻CD27⁺CD28⁺ или «пре-эффекторы 1 типа» не будут учитываться в рамках второго подхода, так как в популяции CD27⁺CD28⁺ фенотип CD45RA⁺CD62L⁻ просто не предусмотрен. «Пре-эффекторы 2 типа» на основании экспрессии CD27 при отсутствии CD28 будут полностью входить в состав клеток эффекторной памяти ЕМ (ЕМ с фенотипом CD27⁺CD28⁻, рис.1Г), тогда как зрелые эффекторные клетки будут находиться в составе популяции ТД.

При проведении обратного сравнения было показано, что «наивные» клетки и клетки центральной памяти, выявленные на основании экспрессии сначала CD27 и CD28, а потом еще и CD45RA и CD62L, будут полностью соответствовать аналогичным популяциям клеток, выявленным только на основании CD45RA и CD62L. Это связано с тем, что подавляющее большинство CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁺Т-лимфоцитов экспрессируют обе костимуляционные молекулы [33]. «Переходные» клетки памяти ТМ с фенотипом CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁻ соответствовали субпопуляции ЕМ1. Цитотоксические Т-клетки эффекторной памяти, выявленные только на основании экспрессии CD27 (при отсутствии CD28), представляли из себя весьма гетерогенную популяцию. Они формировались из клеток ЕМ2 и «пре-эффекторов 2 типа», входивших в состав ЕМ и TEMRA, выделенных при помощи антител против CD45RA и CD62L. Это также подтверждается результатами суммирования значений относительного или абсолютного содержания ЕМ2 и рЕ2, приведенных в таблицах 1 и 2. Что же касается субпопуляции зрелых эффекторных или ТД клеток, то полученные для них значения соответствуют таковым субпопуляций ЕМ3 и Е, выявляемых в рамках клеток эффекторной памяти и TEMRA.

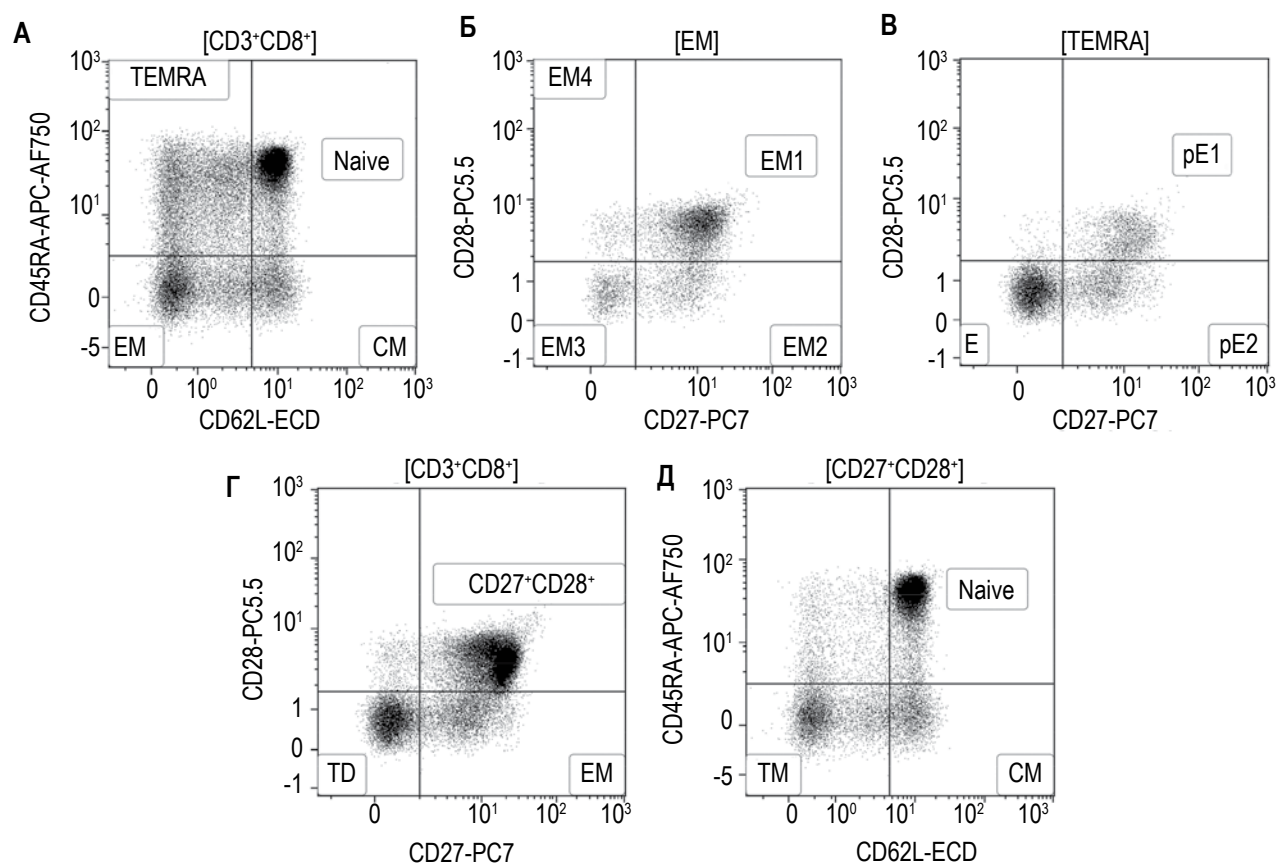


Рисунок 1. Выявление основных популяций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови с использованием антител против CD27, CD28, CD45RA и CD62L

Примечание. Гистограммы А-В – тактика поэтапного «гейтирования», основанная на первоначальной оценке экспрессии CD45RA и CD62L (гистограмма А), с последующей оценкой уровня экспрессии CD27 и CD28 клетками популяций EM (CD45RA⁺CD62L⁻) и TEMRA (CD45RA⁺CD62L⁻), гистограммы Б и В соответственно. Гистограмма А (приведены все цитотоксические Т-клетки с фенотипом CD3⁺CD8⁺) – выделены «наивные» клетки (naïve), клетки центральной (CM) и эффекторной (EM) памяти, а также «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные клетки (TEMRA). Гистограмма Б (приведены только клетки субпопуляции EM гистограммы А) – распределение цитотоксических Т-клеток эффекторной памяти по популяциям EM1, EM2, EM3 и EM4. Гистограмма В (приведены только клетки субпопуляции TEMRA гистограммы А) – распределение клеток TEMRA по популяциям «пре-эффекторов» 1 типа (pE1), «пре-эффекторов» 2 типа (pE2) и эффекторных (E) клеток.

Гистограммы Г-Д – тактика поэтапного «гейтирования», основанная на первоначальной оценке экспрессии CD27 и CD28 (гистограмма Г), с последующей оценкой уровня экспрессии CD45RA и CD62L цитотоксическими Т-клетками популяций CD27⁺CD28⁺ (гистограммы Д). Гистограмма Г (приведены все цитотоксические Т-клетки с фенотипом CD3⁺CD8⁺) – выделены субпопуляции CD27⁺CD28⁺ клеток, клеток эффекторной памяти (EM) и «терминально-дифференцированных» эффекторных клеток (TD). Гистограмма Д (приведены только клетки субпопуляции CD27⁺CD28⁺ гистограммы Г) – выделены «наивные» клетки (naïve), клетки центральной памяти (CM) и «промежуточные» или «транзитные» (TM) клетки памяти. Видно, что клетки с фенотипом CD27⁺CD28⁺ гистограммы Г и CD27⁺CD28⁺CD45RA⁺CD62L⁻ гистограммы Д обнаруживаются в периферической крови, но не имеют собственных наименований в рамках данного способа определения основных стадий дифференцировки цитотоксических Т-клеток.

В основе первого подхода к выявлению ключевых стадий дифференцировки цитотоксических Т-клеток периферической крови находится оценка уровня экспрессии CD45RA и CD62L (CCR7), предложенная Sallusto и соавторами в 1999 году [35]. В том случае, если Т-клетка несет оба поверхностных антигена, то она является «наивной». Эти клетки экспрессируют обе стимуляционные молекулы CD27 и CD28, способны

к пролиферации *in vitro* в ответ на различные митогены, а спектр синтезируемых молекул сводится, в первую очередь, к продукции ИЛ-2. Более того, «наивные» CD3⁺CD8⁺ клетки лучше отвечали на стимуляцию TNFα и ИЛ-6, а клетки эффекторной памяти – на стимуляцию ИЛ-10 и ИЛ-12 в условиях *in vitro* [20]. Вместе с тем другой группой исследователей была показана способность «наивных» цитотоксических Т-клеток не толь-

ко отвечать пролиферацией на внесение в среду ИЛ-15, но и дифференцироваться в эффекторные клетки [17].

Для Т-клеток центральной памяти характерно наличие на поверхностной мембране CD45R0 (вместо CD45RA), CD62L, CD27, CD28 и некоторых других. Принципиальным отличием этих клеток от «наивных» является то, что они уже прошли антиген-зависимую дифференцировку во вторичных лимфоидных органах. Наличие же CD62L позволяет отличить данную популяцию от клеток эффекторной памяти с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁻. Данная особенность клеток CM позволяет им длительное время циркулировать по организму и определяет их преимущественную локализацию во вторичных лимфоидных органах. Высокий уровень экспрессии CD27 и CD28 позволяет им (при наличии повторной стимуляции специфическим антигеном и лигандов для указанных выше молекул на мембране АПК) им быстро активироваться и сформировать клон антиген-специфических цитотоксических Т-клеток [22]. Кроме того, клетки центральной памяти более эффективно секретируют ИЛ-2, тогда как клетки эффекторной памяти – эффекторные цитокины [29].

Было показано (табл. 1), что в периферической крови условно здоровых доноров среди цитотоксических Т-лимфоцитов доминируют клетки с фенотипами CD45RA⁺CD62L⁺ (в среднем около 30% от общего числа CD3⁺CD8⁺ клеток) и CD45RA⁻CD62L⁻ (в среднем около 35%). Клетки TEMRA составляют около одной четверти от всех цитотоксических Т-лимфоцитов, тогда как на субпопуляцию CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов центральной памяти приходится около 10% от общего числа циркулирующих цитотоксических Т-клеток. Полученные нами значения для условно здоровых доноров в целом соответствуют как ранее полученным собственным результатам [8], так и данным, приводимым в литературе [36, 40]. Проведение корреляционного анализа выявило зависимость между возрастом обследованных доноров и содержанием некоторых субпопуляций CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов в периферической крови. Следует отметить, что нами не было обнаружено взаимосвязи между возрастом и абсолютным содержанием цитотоксических Т-клеток ($r = 0,057$ при $p = 0,561$). Вместе с тем обнаружена значительная обратная зависимость между возрастом и уровнем «наивных» CD3⁺CD8⁺ клеток в периферической крови (для относительных

значений $r = -0,646$ при $p < 0,001$, а для абсолютных – $r = -0,562$ при $p < 0,001$). По мере связанного с возрастом уменьшения в циркуляции клеток с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺ наблюдалось увеличение относительного содержания цитотоксических Т-клеток центральной памяти ($r = 0,376$ при $p < 0,001$). Также умеренная положительная взаимосвязь наблюдалась между возрастом обследованных лиц и содержанием TEMRA цитотоксических Т-клеток, когда коэффициенты корреляции составили 0,357 при $p < 0,001$ и 0,338 при $p < 0,001$ для относительного и абсолютного содержания соответственно.

Что же касается клеток эффекторной памяти, то в последнее время на основании экспрессии CD27 и CD28 их принято разделять на четыре подтипа – EM1, EM2, EM3 и EM4, с фенотипами CD27⁺CD28⁺, CD27⁺CD28⁻, CD27⁻CD28⁻ и CD27⁻CD28⁺ соответственно [33]. В целом по мере утраты костимулирующих молекул снижается способность клеток к пролиферации, уменьшается длина теломеров и уровень продукции анти-апоптотических белков, но повышается уровень синтеза эффекторных цитокинов, идет накопление цитолитических молекул в цитоплазматических гранулах [6]. При анализе субпопуляционного состава цитотоксических Т-лимфоцитов эффекторной памяти было показано, что около половины клеток данной популяции экспрессируют CD27 и CD28 (примерно 20% от общего числа циркулирующих CD3⁺CD8⁺), что позволяет их рассматривать в качестве самой «незрелой» популяции среди EM. Примерно в два раза меньше клеток приходится на популяцию EM3, не несущих на своей поверхности обеих костимуляционных молекул и являющихся самой «зрелой» или «эффекторной» группой клеток в рамках EM. На «промежуточные» формы – экспрессирующие либо CD27, либо CD28 – приходится около 5% и 2,5% клеток от общего пула циркулирующих CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов периферической крови соответственно. Также было отмечено, что с возрастом постепенно увеличивается содержание клеток эффекторной памяти «зрелого» эффекторного фенотипа ($r = 0,474$ при $p < 0,001$ для относительного и $r = 0,435$ при $p < 0,001$ для абсолютного содержания EM3). Таким образом, возрастные изменения в рамках общего пула CD3⁺CD8⁺ клеток эффекторной памяти могут быть связаны в первую очередь именно с накоплением EM3. Причем влияния возраст на динамику относительного и абсолют-

ного содержания клеток EM1 отмечено не было ($r = 0,018$ при $p = 0,852$ и $r = 0,008$ при $p = 0,934$ соответственно).

Одна из первых попыток разделить TEMRA цитотоксические Т-клетки на отдельные субпопуляции и изучить их функциональную активность в условиях *in vitro* была предпринята в 2003 году Rufeg и соавторами [34]. По результатам проведенного исследования клетки с фенотипом $CD3^+CD8^+CD45RA^+CCR7^-$ были разделены на три субпопуляции, исходя из уровня экспрессии CD27 и CD28: «пре-эффекторы» 1 типа (pE1), ко-экспрессирующие CD27 и CD28, «пре-эффекторы» 2 типа (pE2), экспрессирующие только CD27, и «зрелые» эффекторы (E), не несущие обеих молекул на своей поверхности. При этом увеличение эффекторного потенциала (наличие перфорина, гранзимы В, экспрессия CD94) и чувствительности к действию проапоптотических факторов, а также снижение пролиферативной активности наблюдалось при переходе клеток $pE1 \rightarrow pE2 \rightarrow E$. Большая часть цитотоксических Т-клеток субпопуляции TEMRA условно здоровых доноров (более 60% от TEMRA или 15% от всех $CD3^+CD8^+$) находится на финальных стадиях дифференцировки, для которых характерно отсутствие CD27 и CD28 на плазматической мембране. Тогда как на менее зрелые клетки субпопуляций pE1 и pE2 приходится менее 20% от TEMRA или 3-4% от общего количества цитотоксических Т-клеток, обнаруженных в периферической крови. При этом на фоне увеличения возраста обследованных доноров наблюдалось возрастание как относительного ($r = 0,393$ при $p < 0,001$), так и абсолютного ($r = 0,375$ при $p < 0,001$) содержания эффекторных клеток в периферической крови.

В основе второй классификации находится определение уровня экспрессии двух костимуляционных молекул – CD27 и CD28, которые были впервые использованы для этих целей в 2002 году [16]. Исходно данный подход применялся для разделения вирус-специфических цитотоксических Т-клеток на отдельные субпопуляции в зависимости от их эффекторных свойств. Так, $CD27^+CD28^+$ цитотоксические Т-клетки практически не экспрессировали лигандов для рецепторов семейства Fas, а в их цитоплазматических гранулах не обнаруживались основные эффекторные цитолитические молекулы перфорин и гранзимы, что и послужило основанием для рассмотрения этих клеток в качестве самых «незрелых»

$CD3^+CD8^+$ лимфоцитов, находящихся на ранних стадиях дифференцировки [17]. По мере снижения экспрессии CD27 и CD28 эффекторный потенциал клеток постепенно возрастал. На основании проведенных авторами исследований $CD27^+CD28^-$ клетки получили название «промежуточных», тогда как $CD27^-CD28^-$ цитотоксические Т-клетки стали рассматриваться в качестве самых зрелых или находящихся на «поздних» стадиях созревания. Однако последняя из упомянутых выше популяций $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов тоже оказалась весьма гетерогенной, поэтому для выявления эффекторных клеток было предложено использовать еще один поверхностный антиген – CD45RA, экспрессия которого обнаруживается как на «наивных», так и «терминально-дифференцированных» клетках. Использование CD45RA в качестве дополнительного маркера эффекторных или «терминально-дифференцированных» цитотоксических клеток базируется на исследованиях Наманн и соавторов, которыми была обнаружена способность $CD8^+CD45RA^+CD27^-$ клеток проявлять цитолитические свойства без дополнительной предварительной стимуляции *in vitro* [21]. В рамках этой работы было показано, что клетки с фенотипом $CD45RA^+CD27^+$ и $CD45RA^+CD27^-$ различаются по уровню экспрессии нескольких важнейших антигенов, определяющих миграционную способность клеток. Так, CD62L был ярко представлен только на первой из упомянутых популяций, что указывало на способность этих клеток к миграции в лимфоидную ткань, тогда как CD49d, CD49e, CD29, CD11a/CD18 и CD58 – отвечающие за миграцию на периферию – экспрессировались в основном $CD45RA^+CD27^-$. С другой стороны, среди популяций $CD27^+CD28^+$ цитотоксических Т-клеток были обнаружены лимфоциты, способные к специфическому распознаванию вируса гриппа А, некоторых антигенных эпитопов цитомегаловируса и т.д. [39]. Накопление этих данных явилось предпосылкой для более детального разделения цитотоксических Т-клеток с фенотипом $CD27^+CD28^+$ на отдельные субпопуляции на основании не только экспрессии CD45RA, но и CD62L и/или CD62L, что было предложено Sallusto и соавторами в 1999 году [35]. Таким образом, в единое целое объединились две группы общепринятых маркеров, но уже в рамках второй классификации. Причем применение CD45RA/CD45R0 и CD62L/CCR7 носило «подчиненный» характер по отношению к костимуляционным

молекулам CD27 и CD28. Такое слияние привело к описанию фенотипа «наивных» клеток как CD27⁺CD28⁺CD45RA⁺CD62L⁺, а клеток центральной памяти — как CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁺. Более того, появилась еще одна дополнительная субпопуляция клеток, получившая название «переходных» или «транзиторных» клеток памяти (ТМ), которые не несли на своей поверхности CD45RA и CD62L, но все еще экспрессировали обе костимуляционные молекулы [19]. По своим функциональным характеристикам, проявляемым в условиях *in vitro*, и фенотипу эти клетки занимали промежуточное положение между клетками центральной и эффекторной памяти [30]. Несмотря на то, что эта популяция была исходно описана среди Т-хелперов, определение уровня цитотоксических Т-клеток с фенотипом CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁻ происходит абсолютно аналогичным образом [18]. Более того, особый интерес к CD3⁺CD8⁺ лимфоцитам данной популяции появился в настоящее время, когда было показано, что цитотоксические Т-клетки именно этой стадии дифференцировки обладают наиболее выраженной супрессорной активностью в отношении репликации вируса иммунодефицита человека [23].

Полученные нами результаты указывают на то, что в периферической крови условно здоровых доноров «наивные» и зрелые эффекторные клетки представлены на примерно одинаковом уровне и составляют около одной трети и одной четверти от CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов соответственно (табл. 2). На клетки центральной памяти с фенотипом CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁺ и клетки эффекторной памяти с фенотипом CD27⁺CD28⁻ приходится примерно по 11% от общего пула цитотоксических Т-клеток. Оставшиеся примерно 20% составляют так называемые «переходные» и «транзиторные» CD3⁺CD8⁺ лимфоциты с фенотипом CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁻. Анализ изменений, связанных с возрастом обследованных условно здоровых доноров, затрагивал в первую очередь «наивные» клетки. Была выявлена значительная обратная взаимосвязь между относительным ($r = -0,638$ при $p < 0,001$) и абсолютным ($r = -0,530$ при $p < 0,001$) содержанием цитотоксических Т-лимфоцитов этой субпопуляции и возрастом обследованных лиц. Более того, по мере увеличения возраста наблюдалось возрастание в периферической крови клеток с фенотипом CD27⁻CD28⁻, причем как в относительных ($r = 0,495$ при $p < 0,001$), так и в абсолютных величинах ($r = 0,442$ при $p < 0,001$).

Оба подхода к анализу цитотоксических Т-клеток выявили корреляционную взаимосвязь между возрастом обследованных доноров и снижением в циркуляции лимфоцитов незрелых фенотипов при накоплении клеток с признаками зрелых эффекторных клеток. Ключевые различия преимущественно касаются популяций самых «наивных» и эффекторных клеток, тогда как уровень «промежуточных» стадий созревания CD3⁺CD8⁺ клеток в циркуляции изменяется незначительно, о чем свидетельствуют как собственные результаты, так и данные литературы [40]. Следует также отметить, что в случае отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов EM и TEMRA, полученных при помощи последовательного «гейтирования» на основании экспрессии сначала CD45RA и CD62L, а потом CD27 и CD28, также наблюдалось возрастание относительного и абсолютного содержания эффекторных клеток по мере увеличения возраста доноров. С другой стороны, эти изменения не были отмечены для субпопуляций EM1 и pE1, которые являются малодифференцированными клетками, сохранившими способность к пролиферации среди этих эффекторных субпопуляций. Можно предполагать, что именно эти клетки являются основными источниками для поддержания численности более зрелых эффекторных цитотоксических Т-клеток в условиях периферических лимфоидных органов, тогда как численность «наивных» CD3⁺CD8⁺ с возрастом неуклонно сокращается. Обычно этот процесс связывается с изменениями, протекающими в тимусе — возрастная инволюция — как центральном органе иммунной системы [27]. Еще одним подтверждением этому является снижение в периферической крови доноров старших возрастных групп уровня циркулирующих «ранних тимических мигрантов» с фенотипом CD31⁺CD45R0⁻CD62L⁺ [24]. Также было показано, что по мере увеличения возраста пациентов уменьшалось разнообразие V β -цепей Т-клеточного рецептора на этих «наивных» CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ клетках, что существенно снижало спектр распознаваемых Т-клетками патогенов. Все это может негативно сказываться на эффективности функционирования всей системы иммунного надзора в целом, что выражается в увеличении развития онкологических и аутоиммунных патологий у лиц этой возрастной группы [32]. Более того, рост относительного и абсолютного содержания Т-клеток эффекторных субпопуляций никак не компенсирует этот

процесс, так как эти группы клеток отличаются олигоклональностью и весьма небольшим набором V β -цепей вне зависимости от возраста пациентов [28]. Столь выраженная возрастная динамика относительного и абсолютного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови, а также остальные изменения, связанные с возрастом пациентов, должны учитываться при анализе нарушений функционирования иммунной системы, проводимом в диагностических целях [2].

Как свидетельствуют приведенные результаты, оба методических подхода к анализу цитотоксических Т-клеток различного уровня дифференцировки весьма похожи, но в некоторых отношениях существенно различаются, однако выбор того или иного способа обработки полученных результатов всегда остается на усмотрение авторского коллектива. При этом следует отметить, что применение подхода, основанного на первоначальном определении уровня экспрессии CD45RA и CD62L, предполагает наличие среди популяций EM и TEMRA – «эффекторных», короткоживущих и высокодифференцированных – весьма гетерогенных групп клеток. На основании результатов собственных исследований [7] и данных литературы [33, 34] можно утверждать, что в рамках указанных выше субпопуляций CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов обнаруживаются как минимум две независимые субпопуляции – EM3 и E-клеток, обладающие выраженным эффекторным фенотипом, а также две независимые

субпопуляции – EM1 и pE1, характеризующиеся полным отсутствием эффекторных свойств, но способных к пролиферации. В рамках другого подхода, в основе которого лежит анализ уровня экспрессии CD27 и CD28, отдельные клеточные популяции выстроены, на первый взгляд, вполне логично и оправданно, прослеживаются четкие переходы между всеми клеточными типами. Однако, часть цитотоксических Т-клеток (с фенотипами CD45RA⁻CD62L⁻CD27⁻CD28⁺ и CD45RA⁺CD62L⁻CD27⁻CD28⁺), составляющих около 6% от общего числа CD3⁺CD8⁺ клеток, во все не учитываются. Тогда как ряд эффекторных популяций – EM и TD – представляется гетерогенным даже на основании использованных нами маркеров в рамках этого исследования. Более того, следует упомянуть и о том, что 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, 17, 25]. 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.

Список литературы / References

1. Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 255-268. [Baidun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standard technology «Flow cytometric immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes» (draft version). *Meditsinskaya immunologia = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3. pp. 255-268. doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268 (In Russ.)]
2. Борисов А.Г., Савченко А.А., Смирнова С.В. К вопросу о классификации нарушений функционального состояния иммунной системы // Сибирский медицинский журнал, 2008. Т. 23, № 3-1. С. 13-18. [Borisov A.G., Savchenko A.A., Smirnova S.V. On classification of immune system functional status injuries. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = The Siberian Medical Journal*, 2008, Vol. 23, no. 1-3, pp. 13-18. (In Russ.)]
3. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2013. 552 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshevnev V.A. Flow cytometry in medicine and biology]. Ekaterinburg: RIO UrO RAN, 2013. 552 p.
4. Иванова И.П., Селедцов В.И., Мамаев С.В., Козлов В.А. Содержание отдельных субпопуляций Т-клеток памяти у больных ревматоидным артритом в процессе лечения Т-клеточной вакциной // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2011. № 2-2 (35). С. 25-26. [Ivanova I.P., Seledtsov V.I., Mamaev S.V., Kozlov V.A. Memory T-cells distinct subpopulations levels in rheumatoid arthritis patients during

T-cell vaccination. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Science*, 2011, no. 2-2 (35), pp. 25-26. (In Russ.)]

5. Иванова И.П., Савкин И.В., Селедцова Г.В., Шишков А.А., Селедцов В.И. Фенотипические характеристики и внутриклеточные цитокины Т-клеток памяти у больных рассеянным склерозом после Т-клеточной вакцинации // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН, 2012. № 3-2. С. 79-82. [Ivanova I.P., Savkin I.V., Seledtsova G.V., Shishkov A.A., Seledtsov V.I. Phenotypic characterization and intracellular cytokines of memory T-cells in multiple sclerosis patients after T-cell vaccination. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra SO RAMN = Bulletin of the East Siberian Scientific Center SB RAMS*, 2012, no. 3-2, pp. 79-82. (In Russ.)]

6. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 947-964. [Kudryavtsev I.V. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 4, pp. 947-964. (In Russ.)]

7. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Волков А.Е., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Полевщиков А.В. Анализ уровня экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами различного уровня дифференцировки // Тихоокеанский медицинский журнал, 2015. № 2. С. 30-35. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Volkov A.E., Savchenko A.A., Serebryakova M.K., Polevshnikov A.V. CD56 and CD57 expression by distinct populations of human cytotoxic CD8⁺T-lymphocytes. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2015, no. 2, pp. 30-35. (In Russ.)]

8. Кудрявцев И.В., Елезов Д.С. Анализ основных популяций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови на основании уровня экспрессии CD27, CD28, CD45R0 и CD62L // Российский иммунологический журнал, 2013. Т. 7 (16), № 2-3 (1). С. 57-61. [Kudryavtsev I.V., Elezov D.S. Analysis of the main populations of cytotoxic T lymphocytes of peripheral blood on the basis level or the expression of CD27, CD28, CD45R0 and CD62L. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2013, Vol. 7 (16), no. 2-3 (1), pp. 57-61. (In Russ.)]

9. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шести-цветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26 (In Russ.)]

10. Лагерева Ю.Г., Черешнев В.А., Еременко А.Ю., Бейкин Я.Б. Содержание CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти, наивных и терминально-дифференцированных Т-эффекторов в цереброспинальной жидкости при менингеальной форме энтеровирусной инфекции у детей // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17). № 3. С. 823-825. [Lagereva J.G., Chereshnev V.A., Eremenko A.J., Beykin J.B. CD4⁺ and CD8⁺ memory T-cells, naive and terminally differentiated T lymphocytes in cerebrospinal fluid during acute stage of enteroviral meningitis in children. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 3, pp. 823-825. (In Russ.)]

11. Петухова Г.Д., Лосев И.В., Донина С.А., Найхин А.Н. Формирование CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток иммунологической памяти у волонтеров после вакцинации живыми аттенуированными гриппозными вакцинами А (H5N2) и А (H1N1)PDM2009 // Инфекция и иммунитет, 2014. Т. 4, № 1. С. 84-85. [Petukhova G.D., Losev I.V., Donina S.A., Na'khin A.N. The formation of CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells in volunteers blood after immunization with modified-live vaccine against flu virus A (H5N2) and A (H1N1)PDM2009. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, Vol. 4, no. 1, pp. 84-85. doi: 10.15789/2220-7619-2014-1-49-99 (In Russ.)]

12. Семенов А.В., Арсентьева Н.А., Елезов Д.С., Кудрявцев И.В., Эсауленко Е.В., Тотолян А.А. Особенности популяционного состава CXCR3-положительных лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2013. № 6. С. 69-76. [Semenov A.V., Arsentieva N.A., Elezov D.S., Kudryavtsev I.V., Esaulenko E.V., Totolyan A.A. Features of population composition of peripheral blood CXCR3-positive lymphocytes in chronic viral hepatitis C patients. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 6, pp. 69-76. (In Russ.)]

13. Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Шуплетова В.В., Литвинова Л.С. Фенотипическая характеристика и функциональные особенности Т- и В-клеток иммунной памяти // Цитология, 2015. Т. 57, № 5. С. 311-318. [Sokhonevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Shupletsova V.V., Litvinova L.S. Phenotypic characterization and functional features of memory T- and B-cells. *Tsitologiya = Cytology*, 2015, Vol. 57, no. 5, pp. 311-318. (In Russ.)]

14. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
15. Akbar A.N., Terry L., Timms A., Beverley P.C., Janossy G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J. Immunol.*, 1988, Vol. 140, no. 7, pp. 2171-2178.
16. Appay V., Dunbar P.R., Callan M., Klenerman P., Gillespie G.M., Papagno L., Ogg G.S., King A., Lechner F., Spina C.A., Little S., Havlir D.V., Richman D.D., Gruener N., Pape G., Waters A., Easterbrook P., Salio M., Cerundolo V., McMichael A.J., Rowland-Jones S.L. Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.*, 2002, Vol. 8, no. 4, pp. 379-385.
17. Appay V., van Lier R.A., Sallusto F., Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*, 2008, Vol. 73, no. 11, pp. 975-983.
18. Badr G., Bedard N., Abdel-Hakeem M.S., Trautmann L., Willems B., Villeneuve J.P., Haddad E.K., Sekaly R.P., Bruneau J., Shoukry N.H. Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8⁺ memory T cells. *J. Virol.*, 2008, Vol. 82, no. 20, pp. 10017-10031.
19. Fritsch R.D., Shen X., Sims G.P., Hathcock K.S., Hodes R.J., Lipsky P.E. Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 10, pp. 6489-6497.
20. Geginat J., Lanzavecchia A., Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8⁺ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*, 2003, Vol. 101, no. 11, pp. 4260-4266.
21. Hamann D., Baars P.A., Rep M.H., Hooibrink B., Kerkhof-Garde S.R., Klein M.R., van Lier R.A. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.*, 1997, Vol. 186, no. 9, pp. 1407-1418.
22. Kambayashi T., Assarsson E., Lukacher A.E., Ljunggren H.G., Jensen P.E. Memory CD8⁺ T cells provide an early source of IFN-gamma. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 170, no. 5, pp. 2399-2408.
23. Killian M.S., Johnson C., Teque F., Fujimura S., Levy J.A. Natural suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication is mediated by transitional memory CD8⁺ T cells. *J. Virol.*, 2011, Vol. 85, no. 4, pp. 1696-1705.
24. Kohler S., Wagner U., Pierer M., Kimmig S., Oppmann B., Möwes B., Julke K., Romagnani C., Thiel A. Post-thymic *in vivo* proliferation of naive CD4⁺ T cells constrains the TCR repertoire in healthy human adults. *Eur. J. Immunol.*, 2005, Vol. 35, no. 6, pp. 1987-1994.
25. Larbi A., Fulop T. From «truly naïve» to «exhausted senescent» T cells: when markers predict functionality. *Cytometry A*, 2014, Vol. 85, no. 1, pp. 25-35.
26. Mahnke Y.D., Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin. Lab. Med.* 2007, Vol. 27, pp. 469-485.
27. Moro-Garcia M.A., Alonso-Arias R., Lepez-Larrea C. Molecular mechanisms involved in the aging of the T-cell immune response. *Curr. Genomics*, 2012, Vol. 13, no. 8, pp. 589-602.
28. Naylor K., Li G., Vallejo A.N., Lee W.W., Koetz K., Bryl E., Witkowski J., Fulbright J., Weyand C.M., Goronzy J.J. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 11, pp. 7446-7452.
29. Newell E.W., Sigal N., Bendall S.C., Nolan G.P., Davis M.M. Cytometry by time-of-flight shows combinatorial cytokine expression and virus-specific cell niches within a continuum of CD8⁺ T cell phenotypes. *Immunity*, 2012, Vol. 36, no. 1, pp. 142-152.
30. Okada R., Kondo T., Matsuki F., Takata H., Takiguchi M. Phenotypic classification of human CD4⁺ T cell subsets and their differentiation. *Int. Immunol.*, 2008, Vol. 20, no. 9, pp. 1189-1199.
31. Picker L.J., Treer J.R., Ferguson-Darnell B., Collins P.A., Buck D., Terstappen L.W. Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. *J. Immunol.*, 1993, Vol. 150, no. 3, pp. 1105-1121.
32. Qi Q., Liu Y., Cheng Y., Glanville J., Zhang D., Lee J.Y., Olshen R.A., Weyand C.M., Boyd S.D., Goronzy J.J. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *PNAS*, 2014, Vol. 111, no. 36, pp. 13139-13144.
33. Romero P., Zippelius A., Kurth I., Pittet M.J., Touvrey C., Iancu E.M., Corthesy P., Devivre E., Speiser D.E., Rufer N. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 7, pp. 4112-4119.
34. Rufer N., Zippelius A., Batard P., Pittet M.J., Kurth I., Corthesy P., Cerottini J.C., Leyvraz S., Roosnek E., Nabholz M., Romero P. Ex vivo characterization of human CD8⁺ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 5, pp. 1779-1787.
35. Sallusto F., Lenig D., Förster R., Lipp M., Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 1999, Vol. 401, no. 6754, pp. 708-712.

36. Saule P, Trauet J, Dutriez V, Lekeux V, Dessaint J.P, Labalette M. Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment. *Mech. Ageing. Dev.*, 2006, Vol. 127, no. 3, pp. 274-281.
37. Sharpe A.H. Mechanisms of costimulation. *Immunol. Rev.*, 2009, Vol. 229, no. 1, pp. 5-11.
38. Sperling A.I., Auger J.A., Ehst B.D., Rulifson I.C., Thompson C.B., Bluestone J.A. CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation. *J. Immunol.*, 1996, Vol. 157, no. 9, pp. 3909-3917.
39. van Aalderen M.C., Remmerswaal E.B., ten Berge I.J., van Lier R.A. Blood and beyond: properties of circulating and tissue-resident human virus-specific $\alpha\beta$ CD8(+) T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, no. 4, pp. 934-944.
40. van Epps P, Banks R., Aung H., Betts M.R., Canaday D.H. Age-related differences in polyfunctional T cell responses. *Immun. Ageing.*, 2014, Vol. 11, p. 14.

Авторы:

Кудрявцев И.В. — к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория общей иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; отдел онкоиммунологии, ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург; кафедра фундаментальной медицины ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Борисов А.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия; кафедра инфекционных болезней и эпидемиологии с курсом ПО, ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, г. Красноярск, Россия

Кробинец И.И. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория изосерологии, ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург, Россия

Савченко А.А. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия; кафедра физиологии им. проф. А.Т. Пионика, ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, г. Красноярск, Россия

Серебрякова М.К. — аспирант, научный сотрудник, отдел иммунологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Kudryavtsev I.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; department of oncoimmunology, N.N. Petrov Research Institute of Oncology, St. Petersburg; School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular & Cellular Physiology, and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation; Department of Infection Diseases and Epidemiology, Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Krobinets I.I., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Isoserology, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Molecular & Cellular Physiology, and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation; A.T. Pshonik's Department of Physiology, Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Serebryakova M.K., Graduate Student, Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 13.06.2015
Принята к печати 21.09.2015

Received 13.06.2015
Accepted 21.09.2015