

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ НК- И НКТ-ЛИМФОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Табакон Д.В., Заботина Т.Н., Борунова А.А., Панчук И.О.,
Короткова О.В., Кадагидзе З.Г.

Научно-исследовательский институт клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Натуральные киллеры (НК) и НКТ-лимфоциты являются важными составляющими врожденного иммунитета и играют роль первой линии защиты от онкологических заболеваний. Данные популяции отличаются высокой гетерогенностью и разделяются на несколько субпопуляций, отличающихся по степени экспрессии маркеров CD56 и CD16 и функциональной активностью. Исследование гетерогенности данных популяций лимфоцитов у здоровых доноров актуально, так как является основой для изучения нарушений баланса между различными субпопуляциями у онкологических больных. Изменения соотношения выше представленных субпопуляций могут обладать прогностическим и клиническим значением при опухолевых заболеваниях. Было проведено исследование лимфоцитов периферической крови 50 здоровых доноров. При анализе популяции НК-лимфоцитов было выявлено $18,0 \pm 11,3\%$ антиген-положительных клеток, колебания значений составило от 7,6 до 29,2%, в то время как количество клеток с фенотипами CD3⁺CD56⁺ и CD3⁺CD16⁺ было равно $16,2 \pm 8,1$ и $11,0 \pm 6,7\%$ соответственно. Анализ субпопуляционной структуры показал, что основной пул НК-клеток представлен CD56^{dim}CD16^{dim} клетками $52,3 \pm 19,9\%$, а минорные субпопуляции CD56^{dim}CD16^{bright}, CD56⁺CD16⁺, CD56^{bright}CD16⁺ составляют $0,3 \pm 0,2$, $1,7 \pm 0,9$ и $1,3 \pm 0,6\%$ соответственно. При исследовании внутриклеточного содержания перфорина оказалось, что количество CD56⁺Perf⁺ клеток в среднем равно $25,1 \pm 14,8\%$, а CD16⁺Perf⁺ – $23,8 \pm 16,0\%$. Цитометрический анализ показал, что перфорин преимущественно содержится в CD56^{dim}CD16^{dim} НК-лимфоцитах, в то время как CD56^{dim}CD16^{bright}, CD56⁺CD16⁺, CD56^{bright}CD16⁺ перфорина не содержали. В работе впервые обнаружена субпопуляция НК-клеток с иммунофенотипом CD56^{dim}CD16^{dim}, не содержащая внутриклеточный перфорин (2,0%). Популяция НКТ-клеток с фенотипом CD3⁺CD16/CD56⁺ является в 7,1% (25% – 3,45; 75% – 8,75) антиген-положительных клеток в диапазоне от 2,5 до 11,9% и не подчиняется законам нормального распределения. При анализе с помощью комбинации МКА CD3/CD56/CD16 количество CD3⁺CD56⁺ клеток составило 4,33% (25% – 2,25; 75% – 7,3), а количество CD3⁺CD16⁺ – 3,087% (25% – 0,9; 75% – 6,2). Оказалось, что различия между определением с помощью тест-системы CD3/CD16/CD56 и с помощью CD3/CD16 является статистически значи-

Адрес для переписки:

Табакон Дмитрий Вячеславович
Научно-исследовательский институт клинической
онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный
центр им. Н.Н. Блохина» Министерства
здравоохранения РФ
115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, 23.
Тел.: 8 (962) 956-25-97.
E-mail: stargazer91@mail.ru

Address for correspondence:

Tabakov Dmitry V.
Research Institute of Clinical Oncology, N. Blokhin Research
Center for Oncology
115478, Russian Federation, Moscow, Kashirskoye ch., 23.
Phone: 7 (962) 956-25-97.
E-mail: stargazer91@mail.ru

Образец цитирования:

Д.В. Табаков, Т.Н. Заботина, А.А. Борунова, И.О. Панчук,
О.В. Короткова, З.Г. Кадагидзе «Гетерогенность
популяций НК- и НКТ-лимфоцитов у здоровых доноров»
// Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 401–408.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-401-408

© Табаков Д.В. и соавт., 2017

For citation:

D.V. Tabakov, T.N. Zabolina, A.A. Borunova, I.O. Panchuk,
O.V. Korotkova, Z.G. Kadagidze "Heterogeneity of NK and NKT
lymphocyte populations in healthy donors", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 4,
pp. 401–408. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-401-408

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-401-408

мой ($p < 0,05$). Было показано, что основной пул NKT-клеток составляют $CD56^+CD16^-$ клетки, количество которых 5,45% (25% – 2,95; 75% – 7,3) среди $CD3^+$ лимфоцитов. При этом были выявлены две минорные субпопуляции, отличающиеся по экспрессии антигенов CD56 и CD16. Так уровень $CD56^+CD16^+$ составил 3% (25% – 0,25; 75% – 3,05), а количество $CD56^+CD16^+$ оказалось равным 0,67% (25% – 0,25; 75% – 0,9). Таким образом, широкое фенотипическое разнообразие NK- и NKT-клеток отражает их способность к реализации различной функциональной активности. Данное исследование, указывающее на высокую гетерогенность NK- и NKT-лимфоцитов, может послужить основой для изучения нарушений баланса между различными субпопуляциями этих клеток у онкологических больных.

Ключевые слова: проточная цитометрия, иммунофенотип, NK-лимфоциты, NKT-лимфоциты, перфорин, субпопуляции лимфоцитов, CD56, CD16

HETEROGENEITY OF NK AND NKT LYMPHOCYTE POPULATIONS IN HEALTHY DONORS

Tabakov D.V., Zabolina T.N., Borunova A.A., Panchuk I.O.,
Korotkova O.V., Kadagidze Z.G.

Research Institute of Clinical Oncology, N. Blokhin Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Natural killer (NK) and NKT lymphocytes are important components of innate immunity, and compose a first-line defense against cancer. These populations are characterized by high heterogeneity and are divided into several subpopulations, by differences in functional activity as well as CD56 and CD16 expression. Studying heterogeneity for these lymphocyte populations in healthy donors is important, due to imbalance between different lymphocyte subsets in cancer patients. Changes in the ratio of these subpopulations may be of prognostic and clinical significance in malignant diseases. The present study was conducted with peripheral blood lymphocytes in 50 healthy donors. When analysing population of NK lymphocytes we have identified $18.0 \pm 11.3\%$ of antigen-positive cells, their fluctuations ranged from 7.6 to 29.2%, whereas average number of cells with $CD3^+CD56^+$ and $CD3^+CD16^+$ phenotypes was equal to $16.2 \pm 8.1\%$, and $11.0 \pm 6.7\%$, respectively. The subpopulation analysis showed that the primary pool of NK cells was presented by $CD56^{dim}CD16^{dim}$ cells by 52.3 ± 19.9 percent. We detected minor subpopulations, e.g., $CD56^{dim}CD16^{bright}$, $CD56^+CD16^+$, $CD56^{bright}CD16^-$ ($0.3 \pm 0.2\%$, $1.7 \pm 0.9\%$, and $1.3 \pm 0.6\%$, respectively). Search for intracellular perforin has revealed that the number of $CD56^+Perf^+$ cells comprised $25.1 \pm 14.8\%$, $CD16^+Perf^+$, $23.8 \pm 16.0\%$. Cytometric analysis showed that perforin is found, predominantly, in $CD56^{dim}CD16^{dim}$ NK lymphocytes, whereas the cells with $CD56^{dim}CD16^{bright}$, $CD56^+CD16^+$, $CD56^{bright}CD16^-$ immunophenotypes did not produce perforin. For the first time, we have discovered a subpopulation of NK cells with the $CD56^{dim}CD16^{dim}$ immunophenotype that did not contain intracellular perforin (2.0%). The NKT cell population with $CD3^+CD16/CD56^+$ phenotype was detected in 7.1% (25% – 3.45; 75% – 8.75) antigen-positive cells, within a range of 2.5 to 11.9%. Analysis with a combination of monoclonal antibodies CD3/CD56/CD16 has shown that the number of $CD3^+CD56^+$ cells was 4.33% (25% – 2.25; 75% – 7.3), whereas the number of $CD3^+CD16^+$ was 3.087% (25% – 0.9; 75% – 6.2). These data demonstrate that the differences in results between the CD3/CD16/CD56, and CD3/CD16 test systems are statistically significant ($p < 0.05$). It was shown that the primary-pool NKT-cells are $CD56^+CD16^-$ cells, whose number is about 5.45% (25% – 2.95; 75% – 7.3) among total $CD3^+$ lymphocyte population. Two minor subpopulations were also detected which differed in expression of CD56 and CD16 antigens. Hence, the level of $CD56^+CD16^+$ cells was 3% (25% – 0.25; 75% – 3.05), and the number of $CD56^+CD16^+$ was equal to 0.67% (25% – 0.25; 75% – 0.9). Hence, the observed wide phenotypic diversity of NK and NKT-cells reflects their ability to exert various functional activities. This study, showing high heterogeneity of NK and NKT lymphocytes, may serve as a basis for the study of imbalances between different subpopulations of these cells in cancer patients.

Keywords: flow cytometry, immunophenotype, NK cells, NKT cells, perforin, lymphocyte subsets, CD56, CD16

Введение

Основными иммунокомпетентными клетками организма человека являются лимфоциты, которые делятся на несколько линейных популяций, несущих определенные функции (Т-, В-, NK-лимфоциты). В ходе развития методов исследования оказалось, что данные популяции гетерогенны и, в свою очередь, разделяются на несколько субпопуляций, способных выполнять как эффекторные, так и регуляторные функции. Нарушение баланса между этими субпопуляциями происходит при многих заболеваниях, в том числе онкологических [7]. При изучении иммунофенотипа линейных популяций лимфоцитов периферической крови первичных больных раком яичников до и после хирургического лечения было обнаружено, что происходит нарушение линейности, то есть у таких больных снижено количество Т-лимфоцитов по сравнению с контрольной группой доноров ($62,5 \pm 3,1$ и $73,9 \pm 2,5\%$ соответственно), в том числе за счет повышения количества NK-лимфоцитов [4]. При подобном исследовании у первичных больных раком молочной железы оказалось, что происходит повышение ряда регуляторных популяций, таких как Т-регуляторные клетки с фенотипом $CD4^+CD25^+CD127^-FoxP3^+$, $CD8^+CD28^-CD11b^-$ и NKT-лимфоциты, причем в подавляющем большинстве случаев повышается именно количество NKT-клеток [3].

NK-клетки являются важной частью врожденного иммунитета. Отличительной характеристикой NK-лимфоцитов является их способность к активации без предварительной стимуляции антигеном [15, 18]. Классический фенотип NK-клеток $CD3^-CD56^+$ и/или $CD16^+$. CD56 или NCAM (Neural cell adhesion molecule) — связывающий гликопротеин, экспрессированный на нейронах, клетках глии, скелетной мускулатуры и натуральных киллерах, играющий роль в межклеточной адгезии, росте нервов и образовании синапсов [19]. CD16 представляет собой мембранный низкоаффинный IgG рецептор III типа. Эта молекула участвует в антителозависимой клеточной цитотоксичности, осуществляемой NK-клетками [23]. По степени экспрессии белков CD56 и CD16 выделяют три субпопуляции NK-лимфоцитов. Основной субпопуляцией являются $CD56^{dim}CD16^{dim}$ клетки со средней экспрессией данных маркеров. Они обладают высокой способностью к цитотоксичности и меньшей к продукции цитокинов и являются эффекторными. Минорная субпопуляция $CD56^{bright}CD16^-$ клеток практически не способна к секреции перфорина, но обладает высокой способностью к пролиферации и секреции цитокинов. Цитокины, секретируемые NK-клетками, относятся

в основном к провоспалительному ряду (TNF α , IFN γ). В то же время некоторые NK-клетки способны синтезировать IL-10, подавляющий иммунный ответ [5, 11, 14]. $CD56^-CD16^{bright}$ клетки также секретируют цитокины, но слабо способны продуцировать перфорин и пролиферировать [8, 9, 12, 26, 29]. Данные две субпопуляции обладают регуляторными функциями. Таким образом, различный фенотип субпопуляций NK-клеток отражает их различия по функциональной активности, и изменение их соотношения может обладать прогностическим и клиническим значением при различных заболеваниях.

NKT-клетки также являются важным элементом врожденного иммунитета человека. Их содержание в периферической крови 1-10%. Имеют черты как Т-, так и NK-лимфоцитов, классический фенотип представляет собой $CD3^+CD56^+$ и/или $CD16^+$. NKT-лимфоциты также обладают гетерогенностью и делятся на два типа — инвариантные (iNKT), обладающие ограниченной вариабельностью цепей Т-клеточного рецептора, и NKT-лимфоциты II типа, представляющие большинство NKT-клеток у человека. iNKT распознают гликолипидные антигены, ассоциированные с молекулой CD1d, представляющей собой аналог молекулы МНС, и обладают в основном цитотоксической функцией. NKT II типа распознают сульфатид-антиген, способны продуцировать цитокины и играют регуляторную роль при опухолевых и аутоиммунных заболеваниях. В ряде источников описано понижение количества iNKT-лимфоцитов при онкологических заболеваниях, наряду с встречающимся повышением числа NKT-клеток II типа. Также показано подавление активности iNKT-клеток NKT-лимфоцитами II типа, что связывают с прогрессированием опухолевого роста [10, 24, 28].

Таким образом, исследование гетерогенности данных популяций лимфоцитов у здоровых доноров актуально, так как является основой для изучения нарушений баланса между различными субпопуляциями у онкологических больных. Изменения соотношения вышепредставленных субпопуляций могут обладать прогностическим и клиническим значением при опухолевых заболеваниях.

Материалы и методы

В качестве клеток-мишеней использовали лимфоциты периферической крови 50 здоровых доноров, из которых 38 женщин (76%) и 12 мужчин (24%). Средний возраст составил 29 лет (от 22 до 42 лет).

Выделение лимфоцитов из периферической крови осуществляли с помощью разделения клеток на градиенте плотности фиколла-урографина

ТАБЛИЦА 1. СПЕЦИФИЧНОСТЬ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В РАБОТЕ

TABLE 1. THE SPECIFICITY OF THE MONOCLONAL ANTIBODIES USED IN THE PRESENT WORK

Кластер дифференцировки (CD), антиген, белок Cluster of differentiation (CD), an antigen, a protein	Клетки-мишени Target Cells
CD3	Зрелые Т-лимфоциты Mature T-lymphocytes
CD8	Субпопуляция Т-лимфоцитов, субпопуляция НК-клеток Subpopulation of T-lymphocytes, subpopulation of NK cells
CD4	Субпопуляция Т-лимфоцитов Subpopulation of T-lymphocytes
CD16	Субпопуляция НК-клеток Subpopulation of NK cells
CD56	Субпопуляция НК-клеток Subpopulation of NK cells
перфорин perforin	Субпопуляция Т-лимфоцитов, субпопуляция НК-клеток Subpopulation of T-lymphocytes, subpopulation of NK cells
CD45	Все лейкоциты Total leukocyte marker

(1,077 г/см), полученную суспензию мононуклеарных клеток дважды отмывали средой PBS с последующим центрифугированием на 1500 об/мин центрифуги СМ-6 (Elmi).

Окрашивание клеток осуществляли в прямой реакции иммунофлуоресценции с применением моноклональных антител (МКА), конъюгированных различными флуорохромами: FITC, PE, PE-Cy5 (Beckman Coulter, BD Biosciences). Использовали следующие комбинации МКА к дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека: CD45/CD14, CD3/CD56/CD16, CD3/CD16⁺CD56 (табл. 1).

Для изучения цитотоксической состоятельности НК- и NKT-лимфоцитов использовали коммерческую тест-систему, содержащую моноклональные антитела к внутриклеточному белку перфоруину (BD Biosciences). В этом случае применяли комбинированное окрашивание поверхностных антигенов в сочетании с окрашиванием внутриклеточного белка CD8/Perforin/CD16, Perforin/CD56/CD16.

Многopараметровый количественный проточно-цитометрический анализ проводили на двухлазерном проточном цитометре аналитического типа FACSCalibur с применением пакета программного обеспечения сбора и анализа данных CELLQuest (BD Biosciences). Выделение гейта клеток осуществляли в смешанном линейно-логарифмическом режиме SSC vs CD45 (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки). В каждом образце накапливали и анализировали не менее 10000 событий в гейте CD45⁺ лимфоцитов. Субпопуляционную структуру клеток исследовали путем

дополнительного анализа ListMod файлов в программе WinMDI (версия 2.8) с применением стратегии последовательного гейтирования клеток. Использовали гистограммный и дот-плот анализ образцов, учитывали относительное число антиген(белок)-позитивных клеток (%), а также показатели среднего канала интенсивности флуоресценции для позитивной популяции клеток (MFI), отражающего количество антигенных детерминант на/в клетке.

Специфичность МКА представлена в таблице 1.

Полученные данные были обработаны с помощью программы Statistica 7.0, проведен тест на нормальность по Шапиро—Уилку и сравнение различных методов определения НК- и NKT-клеток с помощью U-теста и р-теста.

Результаты

Анализ NKT-лимфоцитов

Анализ CD45⁺ лимфоидных клеток показал, что популяция NKT-клеток с фенотипом CD3⁺CD16/CD56⁺ выявляется в 7,1% (25% — 3,45; 75% — 8,75) антиген-положительных клеток в диапазоне от 2,5 до 11,9% и не подчиняется законам нормального распределения. При анализе с помощью комбинации МКА CD3/CD56/CD16 количество CD3⁺CD56⁺ клеток составило 4,33% (25% — 2,25; 75% — 7,3), а количество CD3⁺CD16⁺ — 3,087% (25% — 0,9; 75% — 6,2).

Оказалось, что различие между определением с помощью тест-системы CD3/CD16/CD56 и с помощью CD3/CD16 является статистически значимым (p < 0,05). Было показано, что основ-

ТАБЛИЦА 2. АНАЛИЗ ГЕТЕРОГЕННОСТИ NKT-ЛИМФОЦИТОВ

TABLE 2. ANALYSIS OF NKT LYMPHOCYTE HETEROGENEITY

Иммунофенотип Immunophenotype	Количество Count (%)
CD3 ⁺ CD16 ⁺ /CD56 ⁺	7,1% (25% – 3,45; 75% – 8,75)
CD3 ⁺ CD56 ⁺	4,33% (25% – 2,25; 75% – 7,3)
CD3 ⁺ CD16 ⁺	3,087% (25% – 0,9; 75% – 6,2)
CD56 ⁺ CD16 ⁺	5,45% (25% – 2,95; 75% – 7,3)
CD56 ⁺ CD16 ⁺	3% (25% – 0,25; 75% – 3,05)
CD56 ⁺ CD16 ⁺	0,67% (25% – 0,25; 75% – 0,9)

ной пул NKT-клеток составляют CD56⁺CD16⁺ клетки, количество которых 5,45% (25% – 2,95; 75% – 7,3) среди CD3⁺ лимфоцитов. При этом были выявлены две минорные субпопуляции, отличающиеся по экспрессии антигенов CD56 и CD16. Так, уровень CD56⁺CD16⁺ составил 3% (25% – 0,25; 75% – 3,05), а количество CD56⁺CD16⁺ оказалось равным 0,67% (25% – 0,25; 75% – 0,9) (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки; табл. 2).

Анализ NK-лимфоцитов

При анализе популяции NK-лимфоцитов с помощью тест-системы CD3/CD16/CD56 было выявлено 18,0±11,3% антиген-положительных клеток, колебание значений составило от 7,6 до 29,2%, в то время как количество клеток с фенотипами CD3⁺CD56⁺ и CD3⁺CD16⁺ было равно 16,2±8,1 и 11,0±6,7% соответственно. Следует отметить, что данные параметры имели нормальное распределение по тесту Шапиро–Уилка. Анализ субпопуляционной структуры показал, что основной пул NK-клеток представлен CD56^{dim}CD16^{dim} клетками 52,3±19,9%. А минорные субпопуляции CD56^{dim}CD16^{bright}, CD56⁺CD16⁺, CD56^{bright}CD16⁺ составляют 0,3±0,2, 1,7±0,9 и 1,3±0,6% соответственно (рис. 2, см. 3-ю стр. обложки; табл. 3).

Анализ функциональной активности NK-лимфоцитов

При исследовании внутриклеточного содержания перфорина оказалось, что количество

CD56⁺Perf⁺ клеток в среднем равно 25,1±14,8%, а CD16⁺Perf⁺ – 23,8±16,0%. Цитометрический анализ показал, что перфорин преимущественно содержится в CD56^{dim}CD16^{dim} NK-лимфоцитах, в то время как CD56^{dim}CD16^{bright}, CD56⁺CD16⁺, CD56^{bright}CD16⁺ перфорина не содержали (рис. 3, см. 3-ю стр. обложки).

Обсуждение

В результате проведенных исследований было выявлено, что количество NK-клеток составило в среднем 18% от всех лимфоцитов – от 7,6 до 29,2%, что согласуется с данными зарубежных авторов, где указывается, что число NK-лимфоцитов в периферической крови здоровых доноров составляет 2-20% [5, 13, 17]. При изучении субпопуляционной структуры натуральных киллеров подавляющее большинство NK-клеток имело иммунофенотип CD56^{dim}CD16^{dim} клеток, на долю которых приходилось 52,3±19,9% среди CD45⁺CD3⁺ клеток. Кроме того, были зафиксированы две субпопуляции с фенотипами CD56⁺CD16⁺ и CD56^{bright}CD16^{neg/low}, которые составили 1,7±0,9 и 1,3±0,6% среди CD45⁺CD3⁺ клеток соответственно. В зарубежных источниках в основном выделяют две субпопуляции – основную CD56^{dim}CD16^{dim} клеток (в некоторых источниках CD56^{dim}CD16^{bright}), при этом их доля составляет до 90% NK-лимфоцитов,

ТАБЛИЦА 3. АНАЛИЗ ГЕТЕРОГЕННОСТИ NK-ЛИМФОЦИТОВ

TABLE 3. ANALYSIS OF HETEROGENEITY OF NK LYMPHOCYTES

Иммунофенотип Immunophenotype	Количество (%) Count (%)
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ /CD56 ⁺	18,0±11,3%
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ⁺	16,2±8,1%
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺	11,0±6,7%
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ^{dim} CD16 ^{dim}	52,3±19,9%
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ^{dim} CD16 ^{bright}	0,3±0,2%
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺	1,7±0,9%
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ^{bright} CD16 ⁺	1,3±0,6%

и минорную CD56^{bright}CD16^{neg/low}, на долю которых приходится до 10% [13, 20, 25, 27].

Количество NKT-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD16/CD56⁺ в нашем исследовании оказалось равно 7,1% (25% – 3,45; 75% – 8,75). По данным зарубежных источников, NKT-клетки представлены 5-10% лимфоцитов периферической крови здоровых доноров [10, 16]. Нами получены достоверно значимые результаты анализа числа NKT-клеток при использовании различных методических подходов. Так, при учете относительного числа CD3⁺CD56⁺NKT-клеток показатели оказались значительно ниже, чем при использовании тест-системы CD3/CD16/CD56.

Как видно из рисунка 1, при определении лишь одного из двух характерных для NKT-клеток маркеров (CD56 или CD16), значительная доля NKT-лимфоцитов, экспрессирующих только другой антиген, является недоступной для анализа. Доля NKT-лимфоцитов, экспрессирующих оба маркера, составила лишь 0,67% (25% – 0,25 75% – 0,9) среди CD45⁺CD3⁺ клеток.

Соотношение количества NK-лимфоцитов и NKT-клеток оказалось равным 2,6. Некоторые авторы указывают, что снижение данного индекса при различных заболеваниях возможно за счет увеличения содержания NKT-лимфоцитов в периферической крови, что имеет прогностическое значение и делает актуальным определение этого соотношения у здоровых доноров [1, 21].

Ранее были исследованы основные перфорин-содержащие популяции лимфоцитов. Основными из них являются CD45⁺CD8⁺CD16⁺CD3⁺T-клетки (ЦТЛ), CD45⁺CD16⁺CD8⁺CD3⁺ лимфоциты (NK-клетки) и составляют 7,1±2,2 и 9,2±3,4% соответственно. Также, по данным

исследования, перфорин присутствует и в CD45⁺CD16⁺CD8⁺CD3⁺NKT-лимфоцитах [2].

Также было убедительно продемонстрировано изменение содержания перфорина в NK-клетках до и после взаимодействия с клетками-мишенями. При этом их количество не изменялось (16,7 и 17,0%), а истощение содержания внутриклеточного перфорина было показано с помощью показателя средней интенсивности флуоресценции (MFI). В процессе реакции он снижался примерно в два раза (со значения 40,45 до 22,13) [2]. В текущем исследовании мы показали, что перфорин содержится практически в 100% CD56^{dim}CD16^{dim} субпопуляции натуральных киллеров и отсутствует в CD56^{bright}CD16^{neg/low} клетках, что соответствует данным зарубежной литературы [6]. В работе впервые обнаружена субпопуляция NK-клеток с иммунофенотипом CD56^{dim}CD16^{dim}, не содержащая внутриклеточный перфорин (2,0%). В мировой научной литературе подобные сведения отсутствуют. Поскольку эти клетки представляют собой основной пул NK-лимфоцитов, то определение содержания в них внутриклеточного перфорина является важным показателем их способности к цитотоксичности.

Таким образом, широкое фенотипическое разнообразие NK- и NKT-клеток отражает их способность к реализации различной функциональной активности. Данное исследование, указывающее на высокую гетерогенность NK- и NKT-лимфоцитов, может послужить основой для изучения нарушений баланса между различными субпопуляциями этих клеток у онкологических больных.

Список литературы / References

1. Балмасова И.П., Ющук Н.Д., Знойко О.О., Шмелева Е.В., Дунда Н.И., Еремина О.Ф., Максимов С.Л., Зайцева М.Н., Малова Е.С., Сепиашвили Я.Р. Соотношение субпопуляций ЕК/ЕКТ как прогностический критерий хронического гепатита С // Аллергология и иммунология, 2009. Т. 10, № 3. С. 340-343. [Balmasova I.P., Yuschuk N.D., Znoiko O.O., Shmelyova E.V., Dunda N.I., Eryomina O.F., Maksimov S.L., Zaytseva M.N., Malova E.S., Sepiashvili Ya.R. NK/NKT ratio as a prognostic marker of chronic hepatitis C. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2009, Vol. 10, no. 3, pp. 340-343. (In Russ.)]
2. Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н. Перфорин-опосредованная цитотоксичность CD16⁺-лимфоцитов // Иммунология, 2006. Т. 27, № 1. С. 4-6. [Borunova A.A., Chkadua G.Z., Zabolitina T.N. Perforin-mediated cytotoxicity of CD16⁺-lymphocytes. *Immunologiya = Immunology*, 2006, Vol. 27, no.1, pp. 4-6. (In Russ.)]
3. Заботина Т.Н., Короткова О.В., Борунова А.А., Очеева Н.Ю., Бокин И.И., Жордания К.И., Паниченко И.В., Сельчук В.Ю., Кузнецов В.В., Кадагидзе З.Г. Субпопуляционная структура лимфоцитов у больных раком яичников // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2010. Т. 21, № 1. С. 46-52. [Zabolitina T.N., Korotkova O.V., Borunova A.A., Ocheyeva N.Yu., Bokin I.I., Zhordania K.I., Panichenko I.V., Selchuk V.Yu., Kuznetsov V.V., Kadagidze Z.G. Lymphocyte subset structure in patients with ovarian cancer. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMN = Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center*, 2010, Vol. 21, no. 1, pp. 46-52. (In Russ.)]

4. Короткова О.В., Заботина Т.Н., Скотаренко Л.В., Борунова А.А., Очеева Н.Ю., Воротников И.К., Кадагидзе З.Г. Субпопуляции лимфоцитов периферической крови больных РМЖ // Российский биотерапевтический журнал, 2011. Т. 10, № 3. С. 95-98. [Korotkova O.V., Zabolina T.N., Skotarenko L.V., Borunova A.A., Ocheeva N.Yu., Vorotnikov I.K., Kadagidze Z.G. Lymphocytes subpopulation from breast cancer patient's peripheral blood. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal*, 2011, Vol. 10, no. 3, pp. 95-98. (In Russ.)]
5. Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C., Cousens L.P., Salazar-Mather T.P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.*, 1999, Vol. 17, pp. 189-220.
6. Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.*, 2001, Vol. 22, no. 11, pp. 633-640.
7. Cristiani C.M., Palella E., Sottile R., Talerico R., Garofalo C., Carbone E. Human NK Cell Subsets in Pregnancy and Disease: Toward a New Biological Complexity. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, p. 656.
8. De Maria A., Bozzano F., Cantoni C., Moretta L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56^{dim}CD16⁺ NK cells as rapid producers of abundant IFN- γ on activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, Vol. 108, no. 22, pp. 728-732.
9. Del Zotto G., Marcenaro E., Vacca P., Sivori S., Pende D., Della Chiesa M., Moretta F., Ingegnere T., Mingari M.C., Moretta A., Moretta L. Markers and function of human nk cells in normal and pathological conditions. *Cytometry B Clin Cytom.* 2017 Jan 5. doi: 10.1002/cyto.b.21508. [Epub ahead of print]
10. East J.E., Kennedy A.J., Webb T.J. Raising the Roof: The Preferential Pharmacological Stimulation of Th1 and Th2 Response Mediated by NKT Cells. *Med. Res. Rev.*, 2014, Vol. 34, no. 1, pp. 45-76.
11. Fauriat C., Long E.O., Ljunggren H.-G., Bryceson Y.T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*, 2010, Vol. 115, no. 11, pp. 2167-2176.
12. Freud A.G., Caligiuri M.A. Human natural killer cell development. *Immunological Reviews*, 2006, Vol. 214, no. 1, pp. 56-72.
13. Gabrielli S., Ortolani C., Del Zotto G., Luchetti F., Canonico B., Buccella F., Artico M., Papa S., Zamai L. The Memories of NK Cells: Innate-Adaptive Immune Intrinsic Crosstalk. *J. Immunol. Res.*, 2016, Vol. 2016, 1376595. doi: 0.1155/2016/1376595. Epub 2016 Dec 19.
14. Gross C., Schulte-Mecklenbeck A., Wiendl H., Marcenaro E., Kerlero de Rosbo N., Uccelli A., Laroni A. Regulatory Functions of Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, p. 606.
15. Hazenberg M.D., Spits H. Human innate lymphoid cells. *Blood*, 2014, Vol. 124, no. 5, pp. 700-709.
16. Jiang Y., Cui X., Cui C., Zhang J., Zhou F., Zhang Z., Fu Y., Xu J., Chu Z., Liu J., Han X., Liao C., Wang Y., Cao Y., Shang H.. The Function of CD3⁺CD56⁺ NKT-Like Cells in HIV-Infected Individuals. *Biomed. Res. Int.*, 2014, 863625. Published online 2014 Mar 20.
17. Jiao Y., Huntington N.D., Belz G.T., Seillet C. Type 1 Innate Lymphoid Cell Biology: Lessons Learnt from Natural Killer Cells. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, p. 426.
18. Lanier L.L. Shades of grey-the blurring view of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2013, Vol. 13, no. 2, pp. 73-74.
19. Lanier L.L., Chang C., Azuma M., Ruitenberg J.J., Hemperly J.J., Phillips J.H. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J. Immunol.*, 1991, Vol. 146, no. 12, pp. 4421-4426.
20. Littwitz-Salomon E., Dittmer U., Sutter K. Insufficient natural killer cell responses against retroviruses: how to improve NK cell killing of retrovirus-infected cells. *Retrovirology*, 2016, Vol. 13, p. 77.
21. Lundgren S., Warfvinge C.F., Elebro J., Heby M., Nodin B., Krzyzanowska A., Bjartell A., Leandersson K., Eberhard J., Jirström K. The Prognostic Impact of NK/NKT Cell Density in Periapillary Adenocarcinoma Differs by Morphological Type and Adjuvant Treatment. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 6, e0156497. doi: 10.1371/journal.pone.0156497.
22. Mace E.M., Orange J.S. Genetic Causes of Human NK Cell Deficiency and Their Effect on NK Cell Subsets. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, p. 545.
23. Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D., Cantoni C., Mingari M.C. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001, Vol. 19, pp. 197-223.
24. Nowak M., Schmidt-Wolf I.G.H. Natural Killer T Cells Subsets in Cancer, Functional Defects in Prostate Cancer and Implications for Immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 2011, Vol. 3, no. 3, pp. 3661-3675.
25. Pesce S., Moretta L., Moretta A., and Marcenaro E. Human NK Cell Subsets Redistribution in Pathological Conditions: A Role for CCR7 Receptor. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, p. 414.

26. Poli A., Michel T., Thérésine M., Andrès E., Hentges F., Zimmer J. CD56^{bright} natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*, 2009, Vol. 126, no. 4, pp. 458-465.
27. Shevtsov M., Multhoff G. Immunological and Translational Aspects of NK Cell-Based Antitumor Immunotherapies. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 11, no. 7, p. 492.
28. Viale R., Ware R., Maricic I., Chaturvedi V., Kumar V. NKT Cell Subsets Can Exert Opposing Effects in Autoimmunity, Tumor Surveillance and Inflammation. *Curr. Immunol. Rev.*, 2012, Vol. 8, no. 4, pp. 287-296.
29. Zamai L., Del Zotto G., Buccella F., Galeotti L., Canonico B., Luchetti F., Papa S. Cytotoxic functions and susceptibility to apoptosis of human CD56bright NK cells differentiated in vitro from CD34⁺ hematopoietic progenitors. *Cytometry Part A*, 2012, Vol. 81, no. 4, pp. 294-302.

Авторы:

Табакон Д.В. — научный сотрудник, лаборатория клинической иммунологии опухолей, Научно-исследовательский институт клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Заботина Т.Н. — д.б.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клинической иммунологии опухолей, Научно-исследовательский институт клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Борунова А.А. — к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория клинической иммунологии опухолей, Научно-исследовательский институт клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Панчук И.О. — ординатор, лаборатория клинической иммунологии опухолей, Научно-исследовательский институт клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Короткова О.В. — к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория клинической иммунологии опухолей, Научно-исследовательский институт клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кадагидзе З.Г. — д.м.н., профессор, заведующая централизованным клинико-лабораторным отделом и лабораторией клинической иммунологии опухолей, Научно-исследовательский институт клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Tabakov D.V., Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology of Tumors, Research Institute of Clinical Oncology, N. Blokhin Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation

Zabotina T.N., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology of Tumors, Research Institute of Clinical Oncology, N. Blokhin Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation

Borunova A.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology of Tumors, Research Institute of Clinical Oncology, N. Blokhin Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation

Panchuk I.O., Resident Physician, Laboratory of Clinical Immunology of Tumors, Research Institute of Clinical Oncology, N. Blokhin Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation

Korotkova O.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology of Tumors, Research Institute of Clinical Oncology, N. Blokhin Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation

Kadagidze Z.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Centralized Clinical Laboratory Department, Laboratory of Clinical Immunology of Tumors, Research Institute of Clinical Oncology, N. Blokhin Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation

Поступила 09.02.2017
Принята к печати 22.02.2017

Received 09.02.2017
Accepted 22.02.2017