

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ: РЕГУЛЯТОРНЫЕ И ЭФФЕКТОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ

**Кудрявцев И.В.^{1,2}, Борисов А.Г.^{3,4}, Васильева Е.В.⁵, Кробинцев И.И.⁶,
Савченко А.А.^{3,4}, Серебрякова М.К.¹, Тотолян Арег А.^{2,5}**

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

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр“ Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

⁵ ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Цитотоксические Т-лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD8⁺ играют ведущую роль в защите от внутриклеточных патогенов и собственных измененных клеток. Все CD3⁺CD8⁺ лимфоциты периферической крови на основании экспрессии CD45RA и CD62L были разделены на «наивные» клетки центральной (СМ) и эффекторной (ЕМ) памяти, а также «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные клетки (ТЕМРА). С использованием многоцветного анализа на указанных субпопуляциях проведен анализ коэкспрессии эффекторных (перфорин, гранзим В и CD57) и регуляторных (CD27, CD28, CD244 [2B4], CD279 [PD-1] и KLRG1) молекул. CD57 был выявлен на поверхности 2,39±0,31% «наивных» клеток и 5,45±0,91% клеток центральной памяти, тогда как среди CD45RA⁺CD62L⁻ Тцит и ТЕМРА Тцит уже 26,53±2,20% и 51,43±2,55% клеток, соответственно, экспрессировали данный антиген. Среди «наивных» Тцит гранзим В и перфорин были обнаружены в составе цитоплазматических гранул у 4,22±0,36% и 5,30±0,43% клеток соответственно. Для СМ Тцит эти значения составили 10,09±1,17% и 24,90±3,10% клеток соответственно. Существенное увеличение экспрессии гранзима В и перфорина также было отмечено в линии «клетки эффекторной памяти → клетки ТЕМРА», когда эти величины достигли значений в 41,05±2,63% и 66,73±3,29%, а также 59,33±4,26% и 75,08±3,12% клеток соответственно. Для регуляторных молекул CD244 и KLRG1 также отмечена сходная тенденция к увеличению экспрессии по мере перехода клеток в эффекторные фазы созревания, тогда как костимуляционные молекулы CD27 и CD28 снижались в линии N → СМ → ЕМ → ТЕМРА. Максимальный уровень CD279 был отмечен в рамках

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-16-69.
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) 234-16-69.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Кудрявцев, А.Г. Борисов, Е.В. Васильева,
И.И. Кробинцев, А.А. Савченко, М.К. Серебрякова,
Арег А. Тотолян «Фенотипическая характеристика
цитотоксических Т-лимфоцитов: регуляторные
и эффекторные молекулы» // Медицинская иммунология,
2018. Т. 20, № 2. С. 227-240.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-227-240
© Кудрявцев И.В. и соавт., 2018

For citation:

I.V. Kudryavtsev, A.G. Borisov, E.V. Vasilyeva, I.I. Krobinets,
A.A. Savchenko, M.K. Serebriakova, Areg A. Totolian
“Phenotypic characterisation of peripheral blood cytotoxic
T lymphocytes: regulatory and effector molecules”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018,
Vol. 20, no. 2, pp. 227-240.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-227-240
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-227-240

клеток EM. Показано, что CD57-позитивные клетки обычно содержат перфорин и гранзим В в составе своих цитоплазматических гранул и не экспрессируют CD28 на своей поверхности, что позволяет использовать CD57 в качестве маркера зрелых эффекторных клеток для проведения многоцветного иммунофенотипирования. Полученные нами результаты по коэкспрессии указанных выше молекул позволяют предполагать, что на роль зрелых эффекторных цитотоксических Т-клеток периферической крови могут претендовать CD45RA⁺CD62L⁻ лимфоциты, позитивные по CD244 и CD57, но не экспрессирующие костимуляционных молекул CD27 и CD28, а также не несущие на своей поверхности ингибиторных рецепторов CD279 и KLRG1.

Ключевые слова: проточная цитофлуориметрия, многоцветный анализ, цитотоксические Т-лимфоциты, дифференцировка, маркеры эффекторных клеток, ингибиторные рецепторы

PHENOTYPIC CHARACTERISATION OF PERIPHERAL BLOOD CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES: REGULATORY AND EFFECTOR MOLECULES

Kudryavtsev I.V.^{a, b}, Borisov A.G.^{c, d}, Vasilyeva E.V.^e, Krobinets I.I.^f, Savchenko A.A.^{c, d}, Serebriakova M.K.^a, Totolian Areg A.^{b, e}

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

^b First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^c Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

^d Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

^e St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^f Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Cytotoxic T lymphocytes (CD3⁺CD8⁺, Tcyt) play a major role in protective immunity against intracellular pathogens and can eradicate malignant cells. As based on CD45RA and CD62L expression, the peripheral CD3⁺CD8⁺ blood lymphocytes were divided into "naïve" (N) cells, central memory (CM) and effector memory (EM), as well as "terminally-differentiated" CD45RA-positive effector cells (TEMRA). Using multicolor flow cytometry, a co-expression of effector (perforin, granzyme B and CD57) and regulatory (CD27, CD28, CD244 (2B4), CD279 (PD-1) and KLRG1) molecules was studied on all these subsets. CD57 was expressed in 2.39±0.31% "naïve" and 5.45±0.91% of central memory Tcyt. Meanwhile, within EM and TEMRA Tcyt subset, its expression was identified on the cell membranes of 26.53±2.20% and 51.43±2.55% of cells, respectively. Cytolytic effector molecules (granzyme B and perforin) were detected in cytoplasmic granules of 4.22±0.36% and 5.30±0.43% of naïve Tcyt, respectively. For CM cells, these values were 10.09±1.17% and 24.90±3.10%, respectively. Dramatic increases of granzyme B and perforin expression were observed in the "EM → TEMRA" cell lineage, when the relative number of granzyme B-positive cells increased to 41.05±2.63% and 66.73±3.29%, respectively, while perforin was detected in 59.33±4.26% and 75.08±3.12% of cells, respectively. For regulatory molecules, CD244 and KLRG1, the similar dynamics were observed, their expression increased from "naïve" to late maturation stages, while the expression of two main costimulatory molecules – CD27 and CD28, decreased in the lineage N → CM → EM → TEMRA cells. The highest level of CD279 was observed in EM cells. It was shown that CD57-positive cells contain perforin and granzyme B in their cytoplasmic granules and lack CD28 expression. Furthermore, CD57 can be used as a surrogate marker for multicolor immunophenotyping to identify most mature effector cells containing cytolytic enzymes. Our results on the co-expression of all the beforementioned molecules suggest that the most mature CD45RA⁺CD62L⁻ effector peripheral blood cytotoxic T cells express CD244 and CD57, lack costimulation molecules CD27 and of CD28, as well as inhibitory receptors KLRG1 and CD279.

Keywords: flow cytometry, multicolor immunophenotyping, cytotoxic T cell subsets, CD3⁺CD8⁺ maturation, effector molecules, inhibitory receptors

Введение

Цитотоксические Т-лимфоциты (Тцит) с фенотипом CD3⁺CD8⁺ играют ведущую роль в защите от внутриклеточных патогенов и собственных измененных клеток, что позволяет рассматривать данную популяцию клеток периферической крови в качестве основной мишени для терапевтических воздействий при широком круге патологических состояний. Вместе с тем вопросы о дифференцировке антиген-специфических клеток данной популяции, равно как и механизмы, приводящие к появлению у этих лимфоцитов эффекторных свойств, остаются слабо исследованными. Так, в настоящее время в литературе активно обсуждаются как минимум четыре модели, описывающие возникновение эффекторных клеток и клеток памяти [18]. При этом даже клетки памяти периферической крови являются весьма гетерогенной популяцией, в составе которой выявляют как минимум клетки центральной и эффекторной памяти [27], клетки памяти, обладающие некоторыми свойствами стволовых клеток [16], не говоря уже о том, что многочисленные работы свидетельствуют о существовании тканевых резидентных клеток памяти, заселяющих периферические органы и ткани [32]. С другой стороны, уже не подвергается сомнению наличие многочисленных переходных форм между всеми указанными выше субпопуляциями CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов как в циркуляции, так и в лимфоидных органах и периферических тканях [35]. Что же касается зрелых эффекторных клеток, сформировавшихся в результате клональной экспансии, то основное внимание уделяется анализу экспрессии ими эффекторных молекул, к числу которых относятся перфорин и гранзимы [31], секретируемые клетками цитокины и хемокины [9] и, наконец, различного рода поверхностные молекулы, обладающие регуляторными свойствами и способные ингибировать сигнал, поступающий от Т-клеточного рецептора [22]. Поэтому **целью данного исследования** стал анализ экспрессии поверхностных и внутриклеточных антигенов CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов, позволяющих охарактеризовать эффекторный потенциал данной популяции клеток периферической крови.

Материалы и методы

Объектом исследования служила венозная кровь условно здоровых доноров, полученная путем пункции периферической вены и собранная в вакуумные пробирки с содержанием K₃ЭДТА. Все исследования проводились в день взятия крови. В рамках данного исследования было обследовано в общей сложности 82 практически здоровых человека (43 мужчины и 39 женщин)

в возрасте 21–60 лет. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными Хайдуковым С.В. и соавт. [7]. Лимфоциты выявляли при помощи антител против пан-лейкоцитарного маркера CD45 (клон J33). Для выявления цитотоксических Т-клеток (Тцит) с фенотипом CD3⁺CD8⁺ использовали антитела против CD3 (клон UCST1), CD4 (клон 13B8.2) и CD8 (клон B9.11). Для разделения CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов на отдельные субпопуляции применяли антитела против CD45RA (клон 2H4LDH11LDB9 [2H4]) и CD62L (клон DREG56) с использованием описанной ранее «тактики гейтирования» основных субпопуляций [4, 5]. Субпопуляция «наивных» (N) Тцит обладала фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺, клетки с фенотипами CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁻ соответствовали Т-лимфоцитам центральной (CM) и эффекторной (EM) памяти соответственно, тогда как «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные Т-клетки (TEMRA) определялись как CD45RA⁺CD62L⁻ (рис. 1).

На всех указанных выше субпопуляциях Тцит, находившихся на разных стадиях дифференцировки, анализировали уровень экспрессии следующих поверхностных антигенов. В рамках отдельного исследования на указанных выше субпопуляциях клеток оценивали уровень поверхностных CD27 (клон 1A4CD27, конъюгированные с PC7, кат. № A54823), CD28 (клон CD28.2, конъюгированные с PC5.5, кат. № B24027) и CD57 (клон NC1, конъюгированные с FITC, кат. № IM0455U). При оценке уровня накопления перфорина (клон B-D48, конъюгированные с фикоэритрином, кат. № 353303) и гранзима В (клон GB11, конъюгированные с Pacific Blue, кат. № 515407) на фоне изменения экспрессии CD57 цитотоксическими Т-клетками различного уровня дифференцировки использовали набор реагентов IntraPrep™ Permeabilization Reagent (кат. № A07803, Beckman Coulter, США). В дальнейшем на цитотоксических Т-клетках различных субпопуляций был проведен анализ поверхностных CD279 (клон EH12.2H7, конъюгированные с PE/Dazzle™ 594, кат. № 329940), CD28 (клон CD28.2, конъюгированные с Brilliant Violet 510™, кат. № 302935), KLRG1 (клон SA231A2, конъюгированные с фикоэритрином, кат. № 367711), CD244 (клон C1.7, конъюгированный с PC5.5, кат. № B21171), а также CD57 (клон NC1, конъюгированные с Pacific Blue, кат. № A74779). Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора VersaLyse (кат. № A09777, Beckman Coulter, США), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли

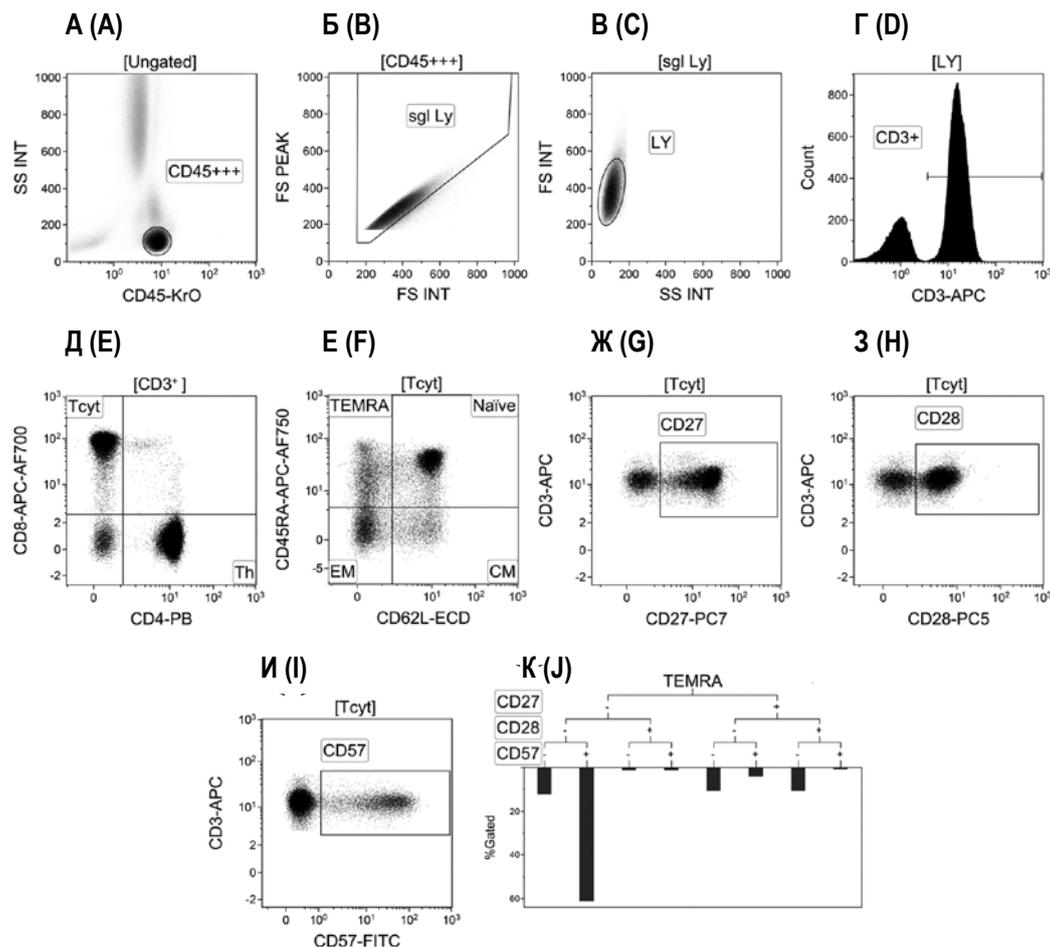


Рисунок 1. Алгоритм пошагового выявления (тактика «гейтирования») различных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов

Примечание. Гистограмма А – выделение популяции лимфоцитов периферической крови на основании экспрессии «пан-лейкоцитарного» маркера CD45 и структуры (боковое светорассеяние, SS) клеток. Гистограмма Б – удаление из зоны анализа слипшихся клеток на основании анализа интегрального и пикового сигналов малоуглового светорассеяния (относительный размер клеток, FS). Гистограмма В – удаление из зоны анализа разрушенных клеток и моноцитов на основании параметров малоуглового (FS) и бокового (SS) светорассеяния. Гистограмма Г – выявление популяции Т-лимфоцитов на основании экспрессии CD3. Гистограмма Д – разделение лимфоцитов (из области CD3⁺ гистограммы Г) на Т-хелперы, экспрессирующие CD4 (область «Th»), и цитотоксические Т-лимфоциты, экспрессирующие CD8 (область «Tcyt»). Гистограмма Е – разделение цитотоксических Т-лимфоцитов, выделенных при помощи области «Tcyt» гистограммы Д, на «наивные» клетки (область «Naive»), клетки центральной (CM) и эффектоной памяти (EM), а также «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные клетки (TEMRA). Гистограммы Ж-И – пример оценки уровня экспрессии CD27, CD28 и CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами (в областях «CD27», «CD28» и «CD57» расположены клетки, экспрессирующие данные поверхностные антигены, границы областей поставлены на основании оценки неспецифического связывания антител соответствующих изотипических контролей) для построения иерархических дендрограмм. Гистограмма К – пример иерархической дендрограммы, использованной для анализа коэкспрессии CD27, CD28 и CD57 клетками субпопуляции TEMRA (аналогичные дендрограммы применялись для анализа коэкспрессии всех исследованных поверхностных и внутриклеточных антигенов субпопуляциями Тцит, выявленных на основании CD45RA и CD62L).

Figure 1. Flow cytometric gating strategy used to identify main peripheral blood cytotoxic T cells (Tcyt) differentiation stages
Note. Gating strategy for Tcyt cell analysis. (A) Lymphocytes were selected on the side scatter/CD45 expression plot with a gate "CD45⁺⁺⁺"; (B) Singlet gating based on FS PEAK versus FS INT (the region is set to discriminate cell doublets, single cells were located in the gate "sgl Ly"); (C) All lymphocytes were gated on the side scatter/forward scatter plot with a gate "LY"; (D) T cells were identified based on CD3 expression (gate "CD3⁺"); (E) Tcyt were purified within T cell subset as CD4 negative and CD8 positive subset (gate "Tcyt"); (F) then total Tcyt subset was separated in differentiation subsets using CD45RA and CD62L expression (naïve Tcyt were CD45RA⁺CD62L⁺; central memory Tcyt were CD45RA⁻CD62L⁺; effector memory Tcyt were CD45RA⁻CD62L⁻ and "terminally differentiated CD45RA-positive" Tcyt cells were CD45RA⁺CD62L⁻). Dot plots (G), (H) and (I) – expression of CD27, CD28 and CD57, respectively, by total Tcyt cell population, regions "CD27", "CD28" and "CD57" were used as branches for hierarchical tree histograms. Hierarchical tree histogram – histogram (J) – was gated on TEMRA Tcyt as an example. The frequency histograms below the trees indicates the relative proportion of cells in each subset that express CD27, CD28 and CD57 within TEMRA Tcyt as an example.

25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800, Beckman Coulter, США). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора при 330 г в течение 7 минут, после чего надосады удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе с рН 7,2-7,4, содержащем 2% параформальдегида (кат. № HT5011, Sigma-Aldrich, 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). Для анализа коэкспрессии различных антигенов на поверхности цитотоксических Т-клеток различного уровня дифференцировки использовали иерархические дендрограммы [24]. Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Нормальность распределения проверяли по критерию согласия Пирсона – хи-квадрат. Результаты выражали в виде % позитивных клеток от искомой популяции, приводили в виде среднего и ошибки среднего. Сравнение уровней экспрессии основных рецепторов цитотоксическими Т-клетками различных стадий дифференцировки проводили при помощи t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Среди цитотоксических Т-клеток субпопуляции TEMRA CD57 был выявлен примерно на половине клеток (51,43±2,55% клеток, рис. 2А). На CD3⁺CD8⁺ клетках, не обладавших выраженными эффекторными свойствами (клетки с фенотипами CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁺), данный антиген был представлен на поверхности 2,39±0,31% и 5,45±0,91% лимфоцитов соответственно. Тогда как среди CD45RA⁻CD62L⁻ Тцит уже более 20% (26,53±2,20%) клеток экспрессировали эту молекулу. Полученные значения согласуются как с собственными предварительными результатами [2], так и с данными литературы, когда было показано, что среди цитотоксических Т-клеток различного уровня дифференцировки высокая экспрессия CD57 была обнаружена у клеток с фенотипом CD27⁻CD45R0⁻ [12]. В рамках другого исследования было показано, что по мере перехода CD3⁺CD8⁺ клеток от популяции CD27^{high}CD45R0^{low}, состоящей из «наивных» клеток, недавно покинувших тимус, к популяциям CD27^{high}CD45R0^{high} → CD27^{low}CD45R0^{high} → CD27^{low}CD45R0^{dim} → CD27^{low}CD45R0^{low} уровень

экспрессии CD57 возрастал, достигая своего максимума в последней [25].

Гранзим В и перфорин рассматриваются в качестве основных эффекторных молекул цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных киллеров периферической крови [10]. Основной функцией гранзима В является индукция апоптоза при помощи каспаза-зависимых и каспаза-независимых механизмов, тогда как перфорин способствует более эффективному проникновению различных гранзимов в цитоплазму клеток за счет формирования поры в поверхностной мембране клетки-мишени. Среди «наивных» цитотоксических Т-клеток с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺ гранзим В и перфорин были обнаружены у 4,22±0,36% и 5,30±0,43% клеток соответственно (рис. 2Б и В соответственно). Среди Тцит центральной памяти, уже прошедших антиген-зависимую дифференцировку в периферических лимфоидных органах, эти цитолитические молекулы содержались в цитоплазме уже 10,09±1,17% и 24,90±3,10% клеток соответственно. Существенное увеличение экспрессии гранзима В и перфорина также было отмечено в линии «клетки эффекторной памяти → клетки TEMRA», когда эти величины достигли значений в 41,05±2,63% и 66,73±3,29%, а также 59,33±4,26% и 75,08±3,12% клеток соответственно.

Накопление перфорина и гранзима В цитотоксическими Т-клетками происходит по мере их перехода от популяции «наивных» клеток к «терминально-дифференцированным» CD45RA-позитивным эффекторным клеткам, причем параллельно увеличивается плотность экспрессии CD57 на их поверхности. Было отмечено постепенное снижение относительного числа клеток, негативных по указанным выше антигенам, с 93,45±0,45% и 66,28±3,17% среди CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов с фенотипами CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁺ соответственно, до значений в 25,46±2,35% среди клеток эффекторной памяти с достижением минимальных показателей (16,08±1,98%) в популяции TEMRA. Параллельно наблюдалось увеличение уровня клеток, несущих на своей поверхности или в составе цитоплазматического компартмента все три эффекторные молекулы (рис. 3А). Среди «наивных» клеток и клеток центральной памяти объем данной субпопуляции находился в пределах 2-3% (2,02±0,27% и 3,56±0,69% соответственно), тогда как переход клеток в EM сопровождался почти восьмикратным ее увеличением (до 27,49±2,86%), а среди TEMRA относительное содержание лимфоцитов данного фенотипа достигало уже 48,23±3,69%. Также отмечено, что цитотоксические Т-клетки, не экспрессировавшие CD57, но уже накопившие перфорин

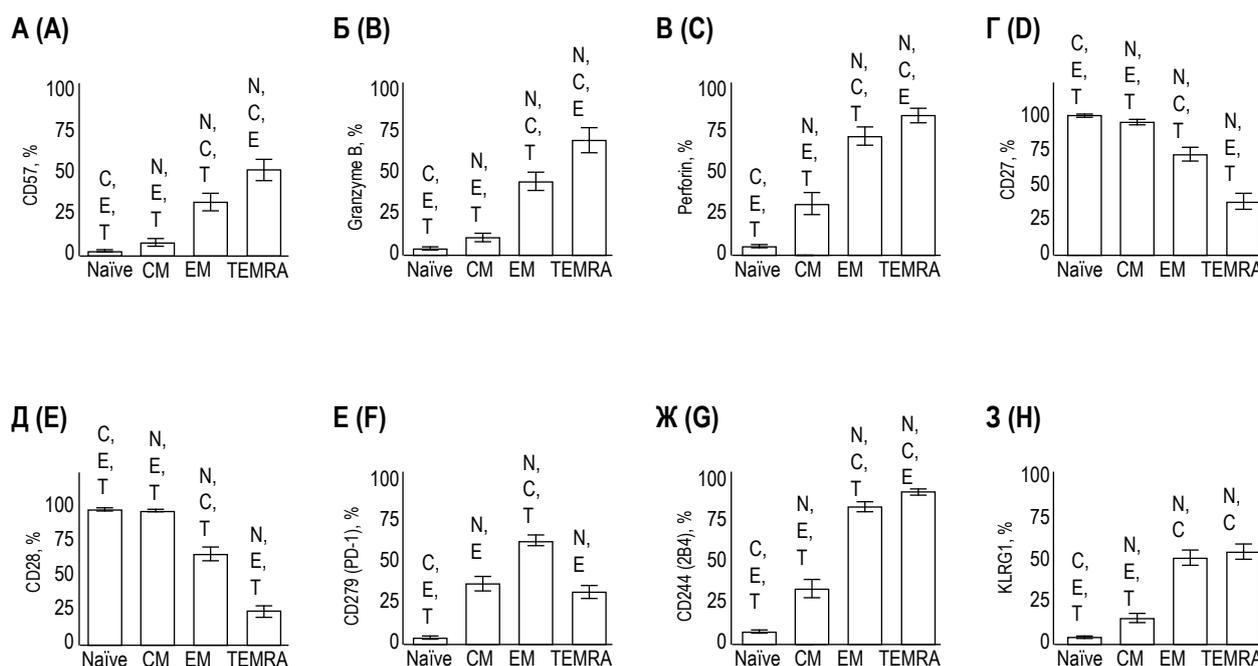


Рисунок 2. Результаты исследования экспрессии поверхностных и внутриклеточных антигенов цитотоксическими Т-лимфоцитами периферической крови

Примечание. Гистограммы А-Г – относительное содержание клеток, экспрессирующих CD57, гранзим В, перфорин, CD27, CD28, CD279 (PD-1), CD244 (2B4) и KLRG1 соответственно.

Здесь и далее на рисунках 3-5: «Naive» – «наивные» цитотоксические Т-лимфоциты с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺, «CM» – клетки центральной памяти с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺, «EM» – клетки эффекторной памяти с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻, «TEMRA» – «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные цитотоксические Т-клетки. «N», «C», «E» и «T» – различия с популяциями «наивных» клеток, CM, EM и TEMRA достоверны при $p < 0,05$ согласно t-критерию Стьюдента.

Figure 2. Expression of main cell surface and intracellular antigens by peripheral blood naive, central memory, effector memory and TEMRA Tcyt subsets

Note. Histograms A-H – frequency of naive, central memory, effector memory and TEMRA Tcyt cells expressing CD57, granzyme B, perforin, CD27, CD28, CD279 (PD-1), CD244 (2B4) and KLRG1, respectively. The mean percentage and SD of each population are shown.

Here and below on Figures 3-5: «Naive» – «naive» CD45RA⁺CD62L⁺ Tcyt, «CM» – central memory CD45RA⁺CD62L⁺ Tcyt, «EM» – effector memory CD45RA⁺CD62L⁻ Tcyt, «TEMRA» – terminally differentiated CD45RA-positive effector memory Tcyt. «N», «C», «E» and «T» – statistically significant differences as compared with «naive», central memory, effector memory or TEMRA Tcyt subset were identified (p value was less than 0.05) according to the two-tailed Student t test.

и гранзим В в составе своих цитоплазматических гранул, составляли $18,71 \pm 1,71\%$ от субпопуляции TEMRA (рис. 3Б), что было существенно выше значений, полученных для EM, CM и «наивных» клеток ($13,73 \pm 1,12\%$, $5,97 \pm 0,80\%$ и $1,46 \pm 0,19\%$ соответственно). Что касается CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов, экспрессирующих только одну из исследованных молекул, то наиболее выраженная динамика была отмечена только для перфорина (рис. 3В). Так, относительное содержание клеток, накопивших исключительно перфорин в составе цитоплазматических гранул, повышалось в линии «наивные» клетки ($2,04 \pm 0,25\%$) → клетки центральной памяти ($18,65 \pm 2,10\%$) → клетки эффекторной памяти ($25,99 \pm 2,22\%$), тогда как в рамках субпопуляции TEMRA перфорин-позитивные лимфоциты составляли

лишь $12,72 \pm 2,11\%$. Цитотоксические Т-клетки, экспрессировавшие исключительно перфорин или CD57 в отсутствие остальных цитолитических молекул, практически не встречались во всех указанных субпопуляциях. Также следует отметить и тот факт, что CD3⁺CD8⁺ лимфоциты, несущие CD57 и перфорин (рис. 3Г), практически не обнаруживались среди «наивных» клеток, а в рамках остальных исследованных субпопуляций их относительное содержание находилось в пределах 2-3% клеток. Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что CD57 может рассматриваться в качестве поверхностного антигена, свойственного наиболее зрелым цитотоксическим Т-лимфоцитам, которые уже накопили в составе своих цитоплазматических гранул такие цитолитические молекулы, как перфорин

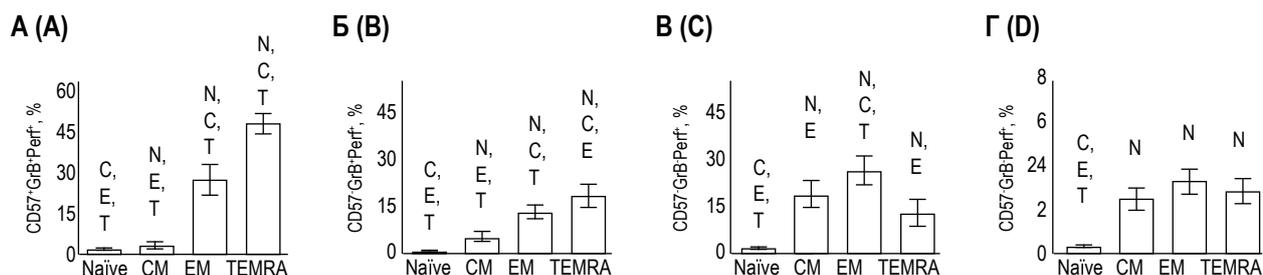


Рисунок 3. Анализ коэкспрессии CD57, гранзима В и перфорины цитотоксическими Т-клетками различных субпопуляций

Примечание. Гистограммы А-Г – относительное содержание клеток с фенотипами CD57⁺гранзим В⁺перфорин⁺, CD57⁺гранзим В⁺перфорин⁺, CD57⁺гранзим В⁻перфорин⁺ и CD57⁺гранзим В⁻перфорин⁺ в рамках субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови, выявленных на основании экспрессии CD45RA и CD62L соответственно.

См. примечание к рисунку 2.

Figure 3. Coexpression of CD57, granzyme B and perforin by Tcyt of differentiation states

Note. Histograms A-D – frequency of naive, central memory, effector memory and TEMRA Tcyt cells with CD57⁺granzyme B⁺perforin⁺, CD57⁺granzyme B⁺perforin⁺, CD57⁺granzyme B⁻perforin⁺ and CD57⁺granzyme B⁻perforin⁺ phenotypes, respectively.

See note to Figure 2.

и гранзим В. Отдельных дальнейших исследований заслуживает факт обнаружения субпопуляции CD3⁺CD8⁺ клеток, негативных по CD57, но экспрессировавших обе цитолитические молекулы. Более того, синтез и накопление перфорины предшествовало появлению гранзима В в цитоплазме клеток и CD57 на их поверхности.

Поверхностные CD27 и CD28 Т-лимфоцитов традиционно рассматриваются в качестве «костимуляционных» молекул [23]. CD27 принадлежит в семейству рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR), и его основной функцией служит защита активированных «наивных» Т-клеток и Т-клеток памяти от апоптоза за счет усиления экспрессии антиапоптотических белков. Вследствие чего данный антиген считается маркером «неэффекторных» клеток, которым для активации и формирования клона антиген-специфических клеток необходим CD70 [9]. В свою очередь, CD28 принадлежит к иммуноглобулиновому суперсемейству и является трансмембранным гомодимерным гликопротеином, основным лигандом которого являются белки семейства B7. Результатом взаимодействия этой пары молекул является формирование «второго» активационного сигнала, в результате запускается пролиферация Т-клеток, продукция цитокинов (в первую очередь IL-2), а также увеличивается выживаемость Т-клеток за счет экспрессии антиапоптотических белков [30].

Именно поэтому подавляющее большинство «наивных» Т-клеток и Т-клеток центральной памяти, единственным ответом которых на активацию Т-клеточного рецептора антигеном, презентруемым АПК, экспрессируют на своей

поверхности CD27 и CD28 (рис. 2Г и Д соответственно). Анализ экспрессии CD27 показал, что почти 99% «наивных» цитотоксических Т-клеток (98,80±0,41%) несут данный антиген на своей поверхности (рис. 2Г). Несколько меньшие значения – 94,06±0,89% – были отмечены для CM CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов, тогда как на лимфоцитах субпопуляций EM и TEMRA имело место постепенное снижение уровня CD27 до 71,14±2,42% и 37,70±2,82% соответственно. Аналогичная тенденция наблюдалась при анализе относительного содержания CD28-позитивных клеток в указанных субпопуляциях цитотоксических Т-лимфоцитов (рис. 2Д). Так, около 95% клеток с фенотипами CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁺ экспрессировали CD28 (95,41±0,56% и 94,72±0,48% соответственно). Уровень данной молекулы снижался на клетках эффекторной памяти до 63,78±2,49% позитивных клеток, достигая своего минимума в рамках Тцит субпопуляции TEMRA (23,18±1,96%). С другой стороны, именно данная пара костимуляционных молекул, а не CD45RA и CD62L, рассматривается в качестве ключевых маркеров для разделения как Т-хелперов, так и цитотоксических Т-клеток на отдельные субпопуляции [3]. Более того, на основании экспрессии CD27 и CD28 клетки эффекторной памяти и TEMRA принято разделять на отдельные субпопуляции, которые различаются по своему пролиферативному и эффекторному потенциалу, спектру синтезируемых цитокинов и т.д. (более подробно [1, 6]).

Доминирующим фенотипом «наивных» цитотоксических Т-клеток был CD27⁺CD28⁺CD57⁻ (94,65±0,65%), а по мере дифференцировки

наблюдалось снижение относительного содержания этих клеток до $87,35 \pm 0,87\%$ среди клеток центральной памяти, до $54,74 \pm 2,34\%$ и $19,80 \pm 1,77\%$ среди клеток эффекторной памяти и TEMRA соответственно (рис. 4А). Параллельно имело место увеличение клеток, негативных по этим трем поверхностным антигенам, чей фенотип может рассматриваться в качестве переходного между неэффекторными и эффекторными клетками. Так, $CD27^-CD28^-CD57^-$ лимфоциты составляли менее 1% среди первых двух субпопуляций, в рамках ЕМ их доля возрастала до $3,86 \pm 0,42\%$, тогда как среди «терминально-дифференцированных» клеток они уже достигали значений в $13,93 \pm 1,24\%$. Экспрессия только одной из ко-стимуляционных молекул – CD27 – была свойственна примерно для 3% $CD3^+CD8^+$ «наивных» и СМ лимфоцитов, тогда как относительное содержание этих клеток возрастало до $8,06 \pm 0,49\%$ и $11,27 \pm 0,95\%$ в рамках ЕМ и TEMRA соответственно (рис. 4Б). Фенотип $CD27^-CD28^+CD57^-$ был характерен для 4-5% клеток центральной и эффекторной памяти, а в оставшихся двух субпопуляциях эти лимфоциты составляли не более 1% клеток. Цитотоксические клетки, коэкспрессировавшие CD28 и CD57, во всех исследованных субпопуляциях не превышали значений в 1%. Наличие CD27 и CD57 на поверхностной мембране было характерно для субпопуляций ЕМ и TEMRA ($5,02 \pm 0,47\%$ и $5,95 \pm 0,68\%$ соответственно), тогда как в рамках оставшихся двух субпопуляций они составляли менее 1% от общего числа проанализированных лимфоцитов (рис. 4В). Наибольший интерес представляет динамика клеток с фенотипом $CD27^-CD28^-CD57^+$, который можно рассматривать в качестве фенотипа самых зрелых эффекторных клеток. Для «наивных» цитотоксических Т-лимфоцитов и клеток центральной памяти данный фенотип был не характерен. Переход в состояние ЕМ сопровождался резким увеличением относительного содержания этих клеток до $19,28 \pm 2,29\%$, а дальнейшая дифференцировка приводила к тому, что в рамках TEMRA $CD57^-$ -позитивные лимфоциты составляли уже $45,67 \pm 2,69\%$ (рис. 4Г).

Таким образом, снижение уровня экспрессии CD27 и CD28 на фоне накопления перфорина и гранзима В в цитолитических гранулах параллельно с увеличением поверхностного CD57 может рассматриваться в качестве главных факторов, свидетельствующих о переходе цитотоксического Т-лимфоцита в эффекторную фазу своего развития. Однако для проявления функциональной активности по отношению к клетки-мишени, распознанной Т-клеточным рецептором, $CD3^+CD8^+$ клетка не должна получать сигнал от широкого спектра ингибиторных рецепторов, весь спектр которых до настоящего

времени еще не изучен [23]. Поэтому в рамках отдельной серии экспериментов нами были исследованы уровни экспрессии трех регуляторных рецепторов – CD279 (PD-1), CD244 (2B4) и KLRG1 – цитотоксическими Т-клетками, экспрессирующими CD57, но уже не несущими на своей поверхности CD28.

Так, на «наивных» $CD3^+CD8^+$ клетках CD279 практически отсутствовал ($4,51 \pm 0,41\%$), тогда как в СМ, и в первую очередь ЕМ PD-1, был представлен на поверхности $36,53 \pm 2,25\%$ и $60,88 \pm 1,72\%$ клеток соответственно (рис. 2Е). Однако при переходе к популяции TEMRA отмечалось резкое снижение клеток, экспрессирующих данный антиген, до $30,87 \pm 2,11\%$. При анализе уровня экспрессии PD-1 цитотоксическими Т-клетками периферической крови условно здоровых доноров данный рецептор был обнаружен на примерно 40-80% клеток памяти ([15], по другим оценкам – 15-35% [36], тогда как на «наивных» клетках он отсутствовал, что в целом совпадает с полученными в ходе проведенного исследования результатами. Среди зрелых цитотоксических Т-клеток PD-1 обнаруживался на 60% клеток эффекторной памяти с фенотипом $CD45RA^-CCR7^-$, тогда как процент позитивных по этому маркеру клеток TEMRA на превышал одной трети от общего числа клеток, а для клеток центральной памяти эта величина составляла в среднем 25% [36].

Уровень экспрессии CD244 возрастал по мере дифференцировки $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов (рис. 2Ж). Так, лишь $7,60 \pm 0,53\%$ «наивных» клеток были позитивны по данному маркеру, тогда как после прохождения антиген-зависимой дифференцировки и формирования клеток центральной памяти уровень экспрессии CD244 возрастал более чем в четыре раза и достигал значений $32,89 \pm 2,62\%$. Подавляющее большинство T_{cyt} с фенотипами $CD45RA^-CD62L^-$ и $CD45RA^+CD62L^-$ несли на своей поверхности данную молекулу ($81,20 \pm 1,51\%$ и $89,91 \pm 0,85\%$ соответственно). Данные литературы также свидетельствуют об увеличении относительного содержания CD244-позитивных клеток среди субпопуляций клеток эффекторной памяти и эффекторных $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов, выявленных на основании наличия CD27, CD28 и CD45RA [11]. Причем среди «терминально-дифференцированных» Тцит клетки данного фенотипа могут достигать значений почти в 100% от популяции как у условно здоровых доноров, так и больных, инфицированных ВИЧ [34]. Вместе с тем большинство современных представлений о роли этого рецептора получены либо на мышинных моделях [13], либо на результатах исследования образцов клеток от больных с хроническими вирусными инфекциями, такими

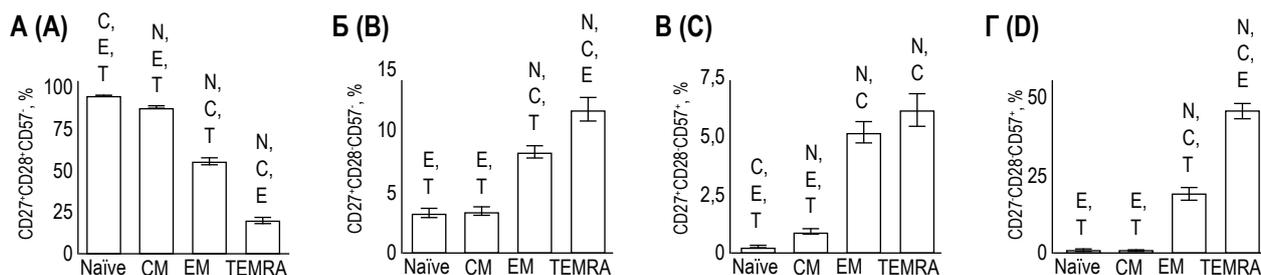


Рисунок 4. Анализ коэкспрессии CD27, CD28 и CD57 цитотоксическими Т-клетками различных субпопуляций

Примечание. Гистограммы А-Г – относительное содержание клеток с фенотипами CD27⁺CD28⁺CD57⁺, CD27⁺CD28⁻CD57⁺, CD27⁻CD28⁺CD57⁺ и CD27⁻CD28⁻CD57⁺ в рамках субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови, выявленных на основании экспрессии CD45RA и CD62L соответственно.

См. примечание к рисунку 2.

Figure 4. Coexpression of CD27, CD28 and CD57 by TcT of differentiation states

Note. Histograms A-D – frequency of naïve, central memory, effector memory and TEMRA TcT cells with CD27⁺CD28⁺CD57⁺, CD27⁺CD28⁻CD57⁺, CD27⁻CD28⁺CD57⁺ and CD27⁻CD28⁻CD57⁺ phenotypes, respectively.

See note to Figure 2.

как ВИЧ [43] или хронический вирусный гепатит С [11]. Однако даже в подобного рода исследованиях CD244 часто рассматривается в качестве рецептора, способного формировать как активирующий, так и ингибиторный сигнал [28].

KLRG1 используется в качестве маркера зрелых лимфоцитов человека и мыши достаточно длительное время, однако, несмотря на его детальную структурную и функциональную характеристику при помощи молекулярно-биологических методов, его роль *in vivo* у человека до сих пор практически не исследована [32]. В ходе собственного исследования было показано, что уровень экспрессии KLRG1 возрастал по мере дифференцировки клеток (рис. 23). Так, среди CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺ данный антиген был представлен на 4,51±0,38%. Прохождение антиген-зависимой дифференцировки сопровождалось почти трехкратным увеличением относительного содержания KLRG1⁺ лимфоцитов в рамках субпопуляции клеток центральной памяти (15,83±1,38%), а среди клеток с фенотипами CD45RA⁻CD62L⁻ и CD45RA⁺CD62L⁻ KLRG1-позитивные лимфоциты составляли более половины от исследованных субпопуляций (51,22±2,29% и 54,72±2,31% соответственно). Следует отметить, что на мышинной модели было показано, что взаимодействия KLRG1 с его лигандом – E-кадгеринном – приводит к снижению функциональной активности как натуральных киллеров, так и цитотоксических Т-лимфоцитов [14]. С другой стороны, активация KLRG1 сопровождается снижением пролиферативной активности лимфоцитов [33], что может являться, по мнению авторов, одним из механизмов блокады клональной экспансии лимфоцитов.

В рамках другого исследования было высказано предположение о том, что ингибиторный сигнал от KLRG1 эффективен лишь в случае, когда антиген в ассоциации с МНС, активирующий Т-клеточный рецептор лимфоцита, и лиганды для данного рецептора представлены на одной клетке-мишени [26].

На основании коэкспрессии CD28, CD57, CD244, CD279 и KLRG1 цитотоксические Т-клетки четырех основных стадий дифференцировки были разделены на 32 субпопуляции, лишь половина из которых несли на своей поверхности CD57. Более того, только 4 субпопуляции (с фенотипами CD28⁻CD244⁺CD279⁻CD57⁺KLRG1⁻, CD28⁻CD244⁺CD279⁻CD57⁺KLRG1⁺, CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁻ и CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁺) из этих 16 были представлены на достаточно значимом уровне, тогда как относительное содержание остальных типов клеток находилось в пределах от нескольких тысячных до нескольких десятых процента. Присутствие CD279 на поверхности клетки свидетельствует о том, что активация, опосредованная распознаванием комплекса МНС-антиген антиген-специфическим рецептором, может не сопровождаться активацией Т-лимфоцита из-за наличия специфических лигандов для CD279 – PD-L1 и PD-L2 [19]. Более того, низкоаффинное взаимодействие Т-клеточного рецептора комплексом антиген-МНС практически полностью нивелируется эффектами от взаимодействия PD-1 со своими лигандами на поверхности антигенпрезентирующей клетки. Блокада сигнальных путей PD-1 сопровождается увеличением пролиферативной активности лимфоцитов мыши и человека в условиях *in vitro* и увеличением уровня фосфорили-

рования Акт по остатку серина в положении 473 у высокодифференцированных цитотоксических Т-клеток человека [8]. В ходе собственных экспериментов среди CD57⁺ цитотоксических Т-клеток нами были выявлены две субпопуляции (CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁻ и CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁺), несущие CD279 на своей поверхности. Клетки обоих указанных выше фенотипов практически полностью отсутствовали среди CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁺ лимфоцитов (0,06±0,01% и 0,16±0,05%, а также 0,15±0,03% и 0,75±0,21% соответственно). Вместе с тем дифференцировка в сторону клеток эффекторной памяти сопровождалась увеличением относительного содержания CD244⁺CD279⁺CD57⁺ до 3,12±0,57% (рис. 5А), а среди субпопуляции TEMRA они составляли уже 4,83±0,62%, хотя достоверных различий между EM и TEMRA отмечено не было (p = 0,077). Цитотоксические Т-клетки с фенотипом CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁺ (рис. 5Б) среди данных субпопуляций составляли 7,86±1,07% и 7,67±0,96% (p = 0,891) соответственно. Наличие CD279, равно как и отсутствие достоверных различий по относительному содержанию этих клеток между субпопуляциями эффекторной памяти и TEMRA CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов, позволяют рассматривать CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁻ и CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁺ в качестве незрелых эффекторных клеток. Для детальной характеристики этих клеток требуются дальнейшие исследования. Косвенным подтверждением тому являются результаты применения антител, блокирующих взаимодействие PD-1 с его лиганда-

ми, на опухоль-инфильтрирующих цитотоксических Т-клетках, что приводило к увеличению уровня продукции цитокинов, но не сопровождалось усилением цитолитической активности этих клеток [29].

Как показано на рисунке (рис. 5В), цитотоксические Т-клетки, экспрессирующие CD244 и CD57, практически не встречаются среди «наивных» клеток и клеток центральной памяти (0,78±0,19% и 0,15±0,06% соответственно). При переходе CD3⁺CD8⁺ в клетки эффекторной памяти относительное содержание лимфоцитов данного фенотипа несколько возрастает (2,08±0,40%). В ходе дальнейшей дифференцировки отмечено увеличение уровня CD244⁺CD57⁺ клеток почти в семь раз (p < 0,001) до 14,70±1,56%. Клетки данного фенотипа можно рассматривать в качестве зрелых эффекторов, обладающих как полным набором цитолитических факторов, о чем свидетельствует наличие на их поверхности CD57, так и отсутствием основных ингибиторных молекул, в качестве которых выступают CD279 и KLRG1, способных подавлять активирующий сигнал от Т-клеточного рецептора. Взаимодействие же CD244 со своим лигандом, в качестве которого выступает CD48, может усиливать эффекторные свойства CD3⁺CD8⁺, в том числе способность к продукции эффекторных цитокинов, высвобождению цитолитических гранул и пролиферации [20]. Отсутствие CD244 на поверхности CD3⁺CD8⁺ сопровождается уменьшением цитотоксических способностей этих клеток по сравнению с CD244⁺ лимфоцитами данной популяции [21].

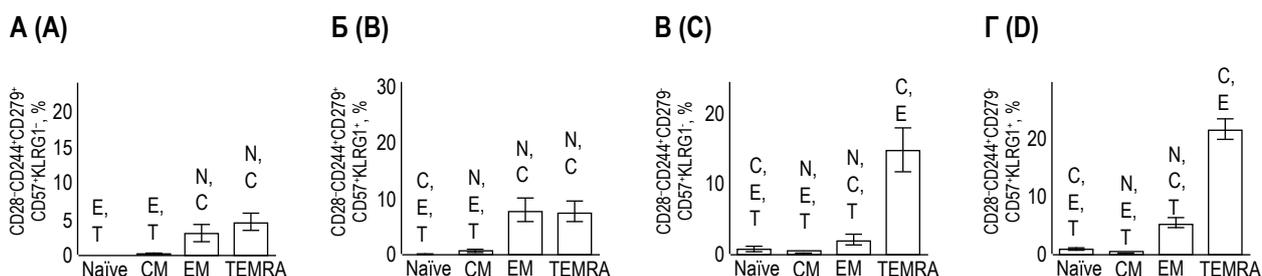


Рисунок 5. Анализ коэкспрессии регуляторных молекул CD244, CD279 и KLRG1 CD28⁻CD57⁺ цитотоксическими Т-клетками различных субпопуляций

Примечание. Гистограммы А-Г – относительное содержание клеток с фенотипами CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁻, CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁺, CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁻ и CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁺ в рамках субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови, выявленных на основании экспрессии CD45RA и CD62L соответственно.

См. примечание к рисунку 2.

Figure 5. Coexpression of CD244, CD279 and KLRG1 by CD28⁻CD57⁺ Tcyt of differentiation states

Note. Histograms A-D – frequency of naïve, central memory, effector memory and TEMRA Tcyt cells with CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁻, CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁺, CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁻ and CD28⁻CD244⁺CD279⁺CD57⁺KLRG1⁺ phenotypes, respectively. See note to Figure 2.

С другой стороны, на роль предшественников эффекторных клеток могут претендовать CD3⁺CD8⁺ лимфоциты, несущие на своей поверхности не только CD244 и CD57, но и KLRG1, при отсутствии CD28 и CD279 (рис. 5Г). Так, лимфоциты этого фенотипа практически не встречались среди «наивных» клеток и клеток центральной памяти (0,96±0,15% и 0,51±0,13% соответственно). Накопление CD244⁺KLRG1⁺CD57⁺ клеток отмечено в рамках субпопуляции с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁻, где их относительное содержание достигало 5,54±0,93%, тогда как максимальное их число было показано для CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов субпопуляции TEMRA – 1,44±1,69%. Следует отметить, что наличие KLRG1 на поверхности цитотоксической Т-клетки рассматривается как маркер зрелости и, в частности, как один из признаков отсутствия пролиферативной активности [33]. С другой стороны, результаты некоторых исследований свидетельствуют об увеличении уровня экспрессии Ki-67 KLRG1-позитивными антиген-специфическими CD3⁺CD8⁺ лимфоцитами в ответ на антигенную стимуляцию [17]. Так, в случае хронического

инфицирования цитомегаловирусом и вирусом Эпштейна–Барр подавляющее большинство вирус-специфических зрелых эффекторных клеток экспрессировали данный антиген на своей поверхности, тогда как среди зрелых цитотоксических Т-лимфоцитов, способных к распознаванию вируса гриппа, данный маркер был представлен существенно реже.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют предполагать, что на роль зрелых эффекторных цитотоксических Т-клеток периферической крови могут претендовать CD45RA⁺CD62L⁻ лимфоциты, позитивные по CD244 и CD57, но не экспрессирующие ко-стимуляционные молекулы CD27 и CD28, а также не несущие на своей поверхности ингибиторных рецепторов CD279 и KLRG1. Многоцветная проточная цитометрия позволяет детально исследовать фенотип эффекторных клеток, но роль большинства ингибиторных молекул CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов человека остается слабо исследованной в связи с отсутствием адекватных модельных систем для оценки функциональных свойств антиген-специфических эффекторных клеток как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo*.

Список литературы / References

1. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8, № 4 (17). С. 947-964. [Kudryavtsev I.V. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 4, pp. 947-964. (In Russ.)].
2. 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. 47-52. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Volkov A.E., Savchenko A.A., Serebryakova M.K., Polevshchikov 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.)].
3. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии. Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 525-538. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinec I.I., Savchenko A.A., Serebryakova M.K. Multicolor flow cytometric analysis of cytotoxic T cell subsets. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 525-538. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2015-6-525-538.
4. 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 immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2013, Vol. 7 (16), no. 2-3 (1), pp. 57-61. (In Russ.)].
5. Кудрявцев И.В., Савицкий В.П. Многоцветный анализ основных субпопуляций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток методом проточной цитофлуориметрии // Российский иммунологический журнал, 2012. Т. 6, №3 (1) (14). С. 94-97. [Kudryavtsev I.V., Savitskiy V.P. Multicolor flow cytometric analysis of the main subpopulations of T-helpers and cytotoxic T-cells from peripheral blood. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2012, Vol. 6, no. 3 (1) (14), pp. 94-99. (In Russ.)].
6. 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.)].

7. Хайдуков С.В., 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. [Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standardized technology "Research of lymphocytes subpopulation composition in peripheral blood using flow cytometry analyzers" (Draft). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. (In Russ.)]. doi:10.15789/1563-0625-2012-3-255-268.
8. Akbar A.N., Henson S.M. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 4, pp. 289-295.
9. 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.
10. Barry M., Bleackley R.C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 2, no. 6, pp. 401-409.
11. Bengsch B., Seigel B., Ruhl M., Timm J., Kuntz M., Blum H.E., Pircher H., Thimme R. Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8⁺ T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation. *PLoS Pathog.*, 2010, Vol. 6, no. 6, e1000947. doi: 10.1371/journal.ppat.1000947.
12. Chattopadhyay P.K., Betts M.R., Price D.A., Gostick E., Horton H., Roederer M., De Rosa S.C. 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, pp. 88-97.
13. Chlewicki L.K., Velikovskiy C.A., Balakrishnan V., Mariuzza R.A., Kumar V. Molecular basis of the dual functions of 2B4 (CD244). *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 12, pp. 8159-8167.
14. Colonna M. Cytolytic responses: cadherins put out the fire. *J. Exp. Med.*, 2006, Vol. 203, no. 2, pp. 261-264.
15. Duraiswamy J., Ibegbu C.C., Masopust D., Miller J.D., Araki K., Doho G.H., Tata P., Gupta S., Zilliox M.J., Nakaya H.I., Pulendran B., Haining W.N., Freeman G.J., Ahmed R. Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 7, pp. 4200-4212.
16. Gattinoni L., Lugli E., Ji Y., Pos Z., Paulos C.M., Quigley M.F., Almeida J.R., Gostick E., Yu Z., Carpenito C., Wang E., Douek D.C., Price D.A., June C.H., Marincola F.M., Roederer M., Restifo N.P. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat. Med.*, 2011, Vol. 17, pp. 1290-1297.
17. Ibegbu C.C., Xu Y.X., Harris W., Maggio D., Miller J.D., Kourtis A.P. Expression of killer cell lectin-like receptor G1 on antigen-specific human CD8⁺ T lymphocytes during active, latent, and resolved infection and its relation with CD57. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 10, pp. 6088-6094.
18. Kaech S.M., Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 11, pp. 749-761.
19. Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Ann. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 26, pp. 677-704.
20. Kim J.S., Cho B.A., Sim J.H., Shah K., Woo C.M., Lee E.B., Lee D.S., Kang J.S., Lee W.J., Park C.G., Craft J., Kang I., Kim H.R. IL-7R α low memory CD8⁺ T cells are significantly elevated in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*, 2012, Vol. 51, no. 9, pp. 1587-1594.
21. Kis-Toth K., Comte D., Karampetsou M.P., Kyttaris V.C., Kannan L., Terhorst C., Tsokos G.C. Selective loss of signaling lymphocytic activation molecule family member 4-positive CD8⁺ T cells contributes to the decreased cytotoxic cell activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.*, 2016, Vol. 68, no. 1, pp. 164-173.
22. Kuchroo V.K., Anderson A.C., Petrovas C. Coinhibitory receptors and CD8 T cell exhaustion in chronic infections. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 2014, Vol. 9, no. 5, pp. 439-445.
23. Mahnke Y.D., Brodie T.M., Sallusto F., Roederer M., Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.*, 2013, Vol. 43, no. 11, pp. 2797-2809.
24. Perfetto S.P., Chattopadhyay P.K., Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 4, no. 8, pp. 648-655.
25. Petrovas C., Chaon B., Ambrozak D.R., Price D.A., Melenhorst J.J., Hill B.J., Geldmacher C., Casazza J.P., Chattopadhyay P.K., Roederer M., Douek D.C., Mueller Y.M., Jacobson J.M., Kulkarni V., Felber B.K., Pavlakis G.N., Katsikis P.D., Koup R.A. Differential association of programmed death-1 and CD57 with ex vivo survival of CD8⁺ T cells in HIV infection. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 2, pp. 1120-1132.
26. Rosshart S., Hofmann M., Schweier O., Pfaff A.K., Yoshimoto K., Takeuchi T., Molnar E., Schamel W.W., Pircher H. Interaction of KLRG1 with E-cadherin: new functional and structural insights. *Eur. J. Immunol.*, 2008, Vol. 38, no. 12, pp. 3354-3364.
27. Sallusto F., Lenig D., Forster 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.
28. Schlaphoff V., Lunemann S., Suneetha P.V., Jaroszewicz J., Grabowski J., Dietz J., Helfritz F., Bektas H., Sarrazin C., Manns M.P., Cornberg M., Wedemeyer H. Dual function of the NK cell receptor 2B4 (CD244) in the regulation of HCV-specific CD8⁺ T cells. *PLoS Pathog.*, 2011, Vol. 7, no. 5, e1002045. doi: 10.1371/journal.ppat.1002045.
29. Schreiner J., Thommen D.S., Herzig P., Bacac M., Klein C., Roller A., Belousov A., Levitsky V., Savic S., Moersig W., Uhlenbrock F., Heinzelmann-Schwarz V.A., Umana P., Pisa P., Lardinois D., Müller P., Karanikas V., Zippelius A. Expression of inhibitory receptors on intratumoral T cells modulates the activity

of a T cell-bispecific antibody targeting folate receptor. *Oncoimmunology*, 2015, Vol. 5, no. 2, e1062969. doi: 10.1080/2162402X.2015.1062969.

30. 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.

31. Takata H., Takiguchi M. Three memory subsets of human CD8⁺ T cells differently expressing three cytolytic effector molecules. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, no. 7, pp. 4330-4340.

32. van Aalderen M.C., Remmerswaal E.B., Verstegen N.J., Hombrink P., ten Brinke A., Pircher H., Kootstra N.A., ten Berge I.J., van Lier R.A. Infection history determines the differentiation state of human CD8⁺ T cells. *J. Virol.*, 2015, Vol. 89, no. 9, pp. 5110-5123.

33. Voehringer D., Koschella M., Pircher H. Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1). *Blood*, 2002, Vol. 100, no. 10, pp. 3698-3702.

34. Yamamoto T., Price D.A., Casazza J.P., Ferrari G., Nason M., Chattopadhyay P.K., Roederer M., Gostick E., Katsikis P.D., Douek D.C., Haubrich R., Petrovas C., Koup R.A. Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8⁺ T-cell exhaustion in HIV infection. *Blood*, 2011, Vol. 117, no. 18, pp. 4805-4815.

35. Yamanaka Y.J., Gierahn T.M., Love J.C. The dynamic lives of T cells: new approaches and themes. *Trends Immunol.*, 2013, Vol. 34, no. 2, pp. 59-66.

36. Zhang J.Y., Zhang Z., Wang X., Fu J.L., Yao J., Jiao Y., Chen L., Zhang H., Wei J., Jin L., Shi M., Gao G.F., Wu H., Wang F.S. PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8⁺ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood*, 2007, Vol. 109, no. 11, pp. 4671-4678.

Авторы:

Кудрявцев И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Борисов А.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр“ Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; доцент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Васильева Е.В. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории биопрепаратов ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

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

Authors:

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Assistant Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Krasnoyarsk State V.F. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Vasilyeva E.V., PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Biopreparations, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Krobinets I.I., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Iso-serology, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russian Federation

Савченко А.А. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр“ Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; заведующий кафедрой физиологии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

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

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; Head, Physiology Department, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, St. Petersburg Pasteur Institute; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 27.07.2017
Принята к печати 22.09.2017

Received 27.07.2017
Accepted 22.09.2017