

МИНОРНАЯ ПОПУЛЯЦИЯ НК-ЛИМФОЦИТОВ С КОЭКСПРЕССИЕЙ CD19

Калашникова А.А.¹, Бычкова Н.В.^{1,2}

¹ ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. В последнее десятилетие в связи с широким распространением многоцветной проточной цитометрии для рутинных тестов в зарубежной литературе появились единичные сообщения о выявлении в крови и костном мозге пациентов минорной субпопуляции НК-клеток со слабой коэкспрессией В-клеточного антигена CD19. Практически отсутствует оценка частоты встречаемости и относительного количества CD56⁺CD19^{dim} клеток, нет данных о фенотипических особенностях, а также связи этой субпопуляции с какой-либо патологией. Цель исследования – оценить частоту встречаемости, относительное количество и фенотипические характеристики минорной субпопуляции лимфоцитов CD56⁺CD19^{dim} в образцах крови пациентов, направляемых на исследование субпопуляционного состава лимфоцитов. Материалом являлась периферическая кровь иммунокомпрометированных лиц. Методом восьмицветной проточной цитометрии определяли субпопуляционный состав лимфоцитов с использованием маркеров CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD45, CD56, HLA-DR. Для оценки частоты встречаемости субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} осуществляли ретроспективный анализ LMD-файлов 1210 исследований для 935 пациентов. Средний возраст обследованных лиц 39,8±14,7 года, среди них 84 ребенка до 18 лет. Ряду пациентов исследование выполнялось неоднократно. Дополнительное фенотипирование CD56⁺CD19^{dim} клеток проводили с использованием широкой панели антител к В-клеточным и Т/НК-клеточным антигенам.

Частота встречаемости образцов крови, содержащих CD56⁺CD19^{dim} клетки, составила 1,2%, при относительном количестве субпопуляции 2,1±1,9% от лимфоцитов и 0,8±0,6% от лейкоцитов. Максимальный размер субпопуляции составил 8,8% от лимфоцитов (2,8% от лейкоцитов). Отмечено длительное сохранение субпопуляции на протяжении всего периода наблюдения за пациентами – от двух месяцев до 6 лет. Сопоставление экспрессии дополнительных маркеров субпопуляциями НК-лимфоцитов CD56⁺CD19^{dim} и CD56⁺CD19⁻ выявило особенности первой, а именно высокую экспрессию CD2 и CD57, сниженную плотность экспрессии CD7, CD16, CD38. Определен фенотип изученной субпопуляции: CD56⁺CD19^{dim}CD2^{bright}CD7^{dim}CD11c⁺CD16^{dim}CD38^{dim}CD45RA⁺CD57⁺CD94^{dim}NKG2D⁺CD3⁻CD4⁻CD5⁻CD20⁻CD21⁻CD25⁻CD45R0⁻CD62L⁻CD79b⁻CD117⁻ с вариабельной экспрессией CD8 и HLA-DR. Фенотип соответствует активированным терминально дифференцированным адаптивным НК-лимфоцитам, связанным с цитомегаловирусной инфекцией. В нашей работе у лиц с субпопуляцией CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов в крови отмечена цитомегаловирусная инфекция в анамнезе и реактивация хронической ВЭБ-инфекции на момент исследования. Вероятной при-

Адрес для переписки:

Калашникова Анастасия Андреевна
ФГБУ «Всероссийский центр экстренной
и радиационной медицины имени А.М. Никифорова»
МЧС России
197345, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Лебедева, 4/2.
Тел.: 8 (812) 339-39-39.
E-mail: petkova_nas@mail.ru

Address for correspondence:

Anastasia A. Kalashnikova
A. Nikiforov Russian Centre of Emergency
and Radiation Medicine
4/2 Lebedev St
St. Petersburg
197345 Russian Federation
Phone: +7 (812) 339-39-39.
E-mail: petkova_nas@mail.ru

Образец цитирования:

А.А. Калашникова, Н.В. Бычкова «Минорная популяция НК-лимфоцитов с коэкспрессией CD19» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 3. С. 513-522. doi: 10.15789/1563-0625-MPO-2920

© Калашникова А.А., Бычкова Н.В., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Kalashnikova, N.V. Bychkova “Minor population of NK lymphocytes with CD19 coexpression”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 3, pp. 513-522.
doi: 10.15789/1563-0625-MPO-2920

© Kalashnikova A.A., Bychkova N.V., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-MPO-2920

чиной коэкспрессии CD19 может быть трогоцитоз НК-клеткой фрагмента мембраны В-лимфоцита при активной ВЭБ-инфекции. Субпопуляция CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов может достигать заметных величин и искажать результаты иммунологических исследований, выполняемых методом проточной цитометрии. Особенно вероятны ошибки при оценке минимальной определяемой болезни при острых В-клеточных лейкозах. Минорная популяция НК-лимфоцитов CD56⁺CD19^{dim} может быть идентифицирована в рутинных иммунологических исследованиях, а ее функциональные особенности и связь с патологией нуждаются в дальнейшем изучении.

Ключевые слова: CD19⁺НК-клетки, CD56⁺CD19^{dim}, адаптивные НК, трогоцитоз, ВЭБ-инфекция

MINOR POPULATION OF NK LYMPHOCYTES WITH CD19 COEXPRESSION

Kalashnikova A.A.^a, Bychkova N.V.^{a, b}

^a A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Single reports were published concerning a minor subpopulation of NK cells with weak coexpression of the B cell antigen CD19 in the patients' blood and bone marrow. The frequency and relative number of CD56⁺CD19^{dim} cells is virtually not assessed, and there is no data on their phenotypic characteristics, as well as the connection of this subpopulation with any disease state. The purpose of the present study was to assess the frequency, relative quantity and phenotypic characteristics of CD56⁺CD19^{dim} lymphocytes in blood of patients referred for assessment of the lymphocyte subpopulation profile.

Peripheral blood of immunocompromised individuals was taken, and subpopulation composition of lymphocytes was determined using eight-color flow cytometry (markers: CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD45, CD56, HLA-DR). To estimate incidence of the CD56⁺CD19^{dim} subpopulation, we have carried out a retrospective analysis of LMD files on 1210 studies for 935 patients (average age, 39.8±14.7 years old) including 84 children under 18 years old. The study was performed repeatedly for some patients. Phenotyping of CD56⁺CD19^{dim} cells was performed using a panel of antibodies to B cell, T/NK cell antigens.

The occurrence of blood samples containing CD56⁺CD19^{dim} was 1.2%, with a relative content of 2.1±1.9% among total lymphocyte population (0.8±0.6% of leukocytes). Long-term persistence of the subpopulation was noted in the patients throughout the entire observation period. The comparison of specific marker expression by NK CD56⁺CD19^{dim}, and CD56⁺CD19⁻ cells revealed high expression of CD2, CD57, reduced expression density of CD7, CD16, CD38. The phenotype of the studied NK cell subpopulation was as follows: CD56⁺CD19^{dim}CD2^{bright}CD7^{dim}CD11c⁺CD16^{dim}CD38^{dim}CD45RA⁺CD57⁺CD94^{dim}NKG2D⁺CD3⁻CD4⁻CD5⁻CD20⁻CD21⁻CD25⁻CD45R0⁻CD62L⁻CD79b⁻CD117⁻, with variable expression of CD8 and HLA-DR. The phenotype is consistent with activated terminally differentiated adaptive NK associated with cytomegalovirus infection. The individuals with CD56⁺CD19^{dim} had a history of CMV-infection and reactivation of chronic EBV-infection at the time of the study. A probable cause of CD19 coexpression may be trogocytosis of B cell membrane fragments by natural killer cells during active EBV-infection. CD56⁺CD19^{dim} lymphocytes can reach noticeable values thus altering the results of studies performed by flow cytometry. The errors are most likely to occur upon assessing the minimal residual disease levels in acute B cell leukemias. The minor CD56⁺CD19^{dim}NK subpopulation may be detected in routine immunological analysis. Its functional features and association with certain disorders require further studies.

Keywords: CD19⁺NK cells, CD56⁺CD19^{dim}, adaptive NK, trogocytosis, EBV infection

Введение

На протяжении последних десятилетий многоцветная проточная цитометрия получила широкое внедрение в практику иммунологических лабораторий. При выполнении рутинного исследования субпопуляционного состава лимфоцитов многоцветная проточная цитометрия позволяет выявить редкие и малоклеточные субпопуляции.

Начиная со второй декады XXI века в зарубежной литературе встречаются публикации с описа-

нием минорной субпопуляции НК-лимфоцитов, с низкой плотностью экспрессирующих на своей мембране CD19 [10, 21], в норме присутствующий только на лимфоцитах В-клеточного ростка. Это крайне редкая и плохо изученная субпопуляция НК-клеток. Точное определение частоты встречаемости популяции CD56⁺CD19^{dim} в образцах крови затруднено не только из-за редкости этого события, но и вследствие малочисленности популяции и ограничения в количестве анализируемых клеток при выполнении рутинных имму-

нологических исследований методом проточной цитометрии. В большинстве лабораторий для оценки субпопуляционного состава лимфоцитов проводят анализ 5000 событий в лимфоцитарном регионе, в результате чего популяции, составляющие менее 20 событий (0,4% от лимфоцитов), могут быть расценены исследователем как результат неспецифического связывания или дебрис. Однако в некоторых случаях субпопуляция CD56⁺CD19^{dim} клеток может достигать значимых величин и искажать результаты исследования субпопуляционного состава лимфоцитов, субпопуляций В-лимфоцитов, минимальной определяемой болезни при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе (В-ОЛЛ) [3, 10, 21].

Субпопуляция CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов встречается в 4,4% образцов крови детей с подозрением на иммунодефицитное состояние [10]. Эти клетки определяются в крови и в костном мозге детей и взрослых с В-ОЛЛ [3, 12, 21]. Максимальная частота встречаемости — около 15% — отмечается среди образцов костного мозга педиатрических пациентов с В-ОЛЛ после проведения этапов индукционной и консолидационной терапии. При дальнейшем наблюдении в этой группе пациентов частота встречаемости CD56⁺CD19^{dim} позитивных образцов костного мозга снижается и составляет 4,3% [3].

В крови детей, по тем или иным причинам направляемых на иммунологическое обследование, относительное количество CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов невелико — от 0,04% до 2,56% от лейкоцитов [10]. У детей с В-ОЛЛ до начала специфической терапии субпопуляция CD56⁺CD19^{dim} клеток составляет 0,04-0,69% от лейкоцитов крови и 0,02-0,05% от жизнеспособных клеток костного мозга [12].

На протяжении последних десяти лет в лаборатории клинической иммунологии ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России выполнено около 12000 исследований субпопуляционного состава лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии. При этом отмечались единичные случаи определения в лимфоцитарном регионе субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} клеток, что вызвало интерес к их изучению, особенно в контексте отсутствия в русскоязычной литературе упоминаний об этой необычной субпопуляции.

Цель исследования — оценить частоту встречаемости, относительное количество и фенотипические характеристики минорной субпопуляции лимфоцитов CD56⁺CD19^{dim} в образцах крови пациентов, направляемых на исследование субпопуляционного состава лимфоцитов.

Материалы и методы

Материалом являлась периферическая кровь иммунокомпрометированных лиц, направляемая для определения субпопуляционного состава

лимфоцитов в лабораторию ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России. Взятие крови проводили из локтевой вены с использованием вакутейнеров с ЭДТА.

Для оценки субпопуляционного состава лимфоцитов использовали восьмицветную панель моноклональных антител: HLA-DR-FITC, CD4-PE, CD3-ECD, CD56-PC5.5, CD25-PC7, CD8-APC, CD19-APC-AF700, CD45-APC-AF750. Для лизиса эритроцитов применяли VersaLyse. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios в соответствии с инструкциями к реактивам (все реактивы и прибор Beckman Coulter, США). При рутинном исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов накопление проводили до 5000 событий в лимфоцитарном регионе, определяемом как CD45^{bright}FS^{dim}SS^{dim}. Для оценки частоты встречаемости субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} осуществляли ретроспективный анализ LMD-файлов исследований, выполненных с января 2022 года по август 2023 года. Анализировали частоту встречаемости образцов крови, содержащих CD56⁺CD19^{dim} лимфоциты, и определяли относительное количество клеток в этой субпопуляции. За это время проведено 1210 исследований для 935 пациентов, средний возраст которых составлял 39,8±14,7 года, среди них 84 ребенка до 18 лет. Ряду пациентов исследование выполнялось неоднократно.

У пяти пациентов CD56⁺CD19^{dim} лимфоциты определялись в значимом количестве (более 0,4%) в текущем исследовании, что позволило дополнительно оценить экспрессию В-клеточных и Т/НК-клеточных антигенов. Для углубленного изучения фенотипа субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} использовали моноклональные антитела: CD7-FITC, CD16-FITC, CD38-FITC, CD45RA-FITC, CD57-FITC, CD11c-PE, CD21-PE, CD45R0-PE, CD79b-PE, CD94-PE, CD314-PE, CD3-ECD, CD5-PC5, CD20-PC5, CD62L-PC5, CD279-PC5, HLA-DR-PC5, CD2-PC7, CD56-PC7, CD117-PC7. Пробоподготовка проводилась аналогично с таковой при рутинной оценке субпопуляционного состава лимфоцитов, все реактивы и прибор Beckman Coulter (США). При фенотипировании субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} клеток накапливали не менее 500 событий в целевом регионе. Экспрессию молекулы считали позитивной (+) в том случае, если она определялась более чем на 20% клеток субпопуляции. В тех случаях, когда относительное количество клеток, экспрессировавших изучавшийся антиген, находилось в пределах 20-30%, говорили о слабопозитивной экспрессии (+).

Результаты

Выявлено 13 образцов от 11 человек, в которых относительное количество CD56⁺CD19^{dim} клеток было 0,4% и более. Среди них 2 образца

крови принадлежали детям. Частота встречаемости образцов крови, содержащих субпопуляцию CD56⁺CD19^{dim}, составила 1,2% от всех проанализированных образцов. Причем среди детей эта субпопуляция клеток определялась в 2,4 раза чаще, чем у взрослых (2,4% против 1,0% соответственно). Средний возраст лиц, в крови которых определялись CD56⁺CD19^{dim} лимфоциты, составил 29,5±10,5 года. У двух пациенток субпопуляцию определили повторно через несколько месяцев после первого исследования.

В лимфоцитарном регионе относительное количество CD56⁺CD19^{dim} клеток изменялось от 0,4% до 8,8% (2,1±1,9%) и составляло от 0,08% до 2,8% от лейкоцитов CD45⁺ (0,8±0,6%) (табл. 1). Сведения о заболеваниях лиц на момент обследования, согласно данным медицинской электронной информационной системы, представлены в таблице 1.

Из семи человек с известными анамнестическими данными пятерым проводилась лабораторная диагностика герпесвирусных инфекций молекулярно-генетическим методом. У всех пациентов получено подтверждение обострения хронической ВЭБ-инфекции.

Во всех случаях субпопуляция CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов имела слабую коэкспрессию CD19 (mean 1,56±0,2 против 7,02±1,0 на В-лимфоцитах) и умеренную экспрессию CD56, сопоставимую с субпопуляцией CD56⁺CD19⁻ зрелых NK-клеток. Во всех образцах субпопуляция CD56⁺CD19^{dim} была негативна по CD3, CD4, CD25. Экспрессия CD8 и HLA-DR была вариабельна. В четырех образцах отмечалась коэкспрессия CD8 и HLA-DR: относительное количество CD8⁺ клеток субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} было в пределах от 26% до 47%; относительное количество HLA-DR⁺ клеток – от 22% до 61%. В одном образце четверть CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов экспрессировала только HLA-DR.

В образцах крови пяти пациентов (№ 5, 8, 9, 10, 11 из таблицы 1) изучена экспрессия CD56⁺CD19^{dim} клетками широкого спектра В-клеточных и Т/NK-клеточных антигенов, связанных с цитотоксической активностью, созреванием и активацией (табл. 2).

Гистограммы результатов фенотипирования образца крови пациента № 9 представлены на рисунке 1.

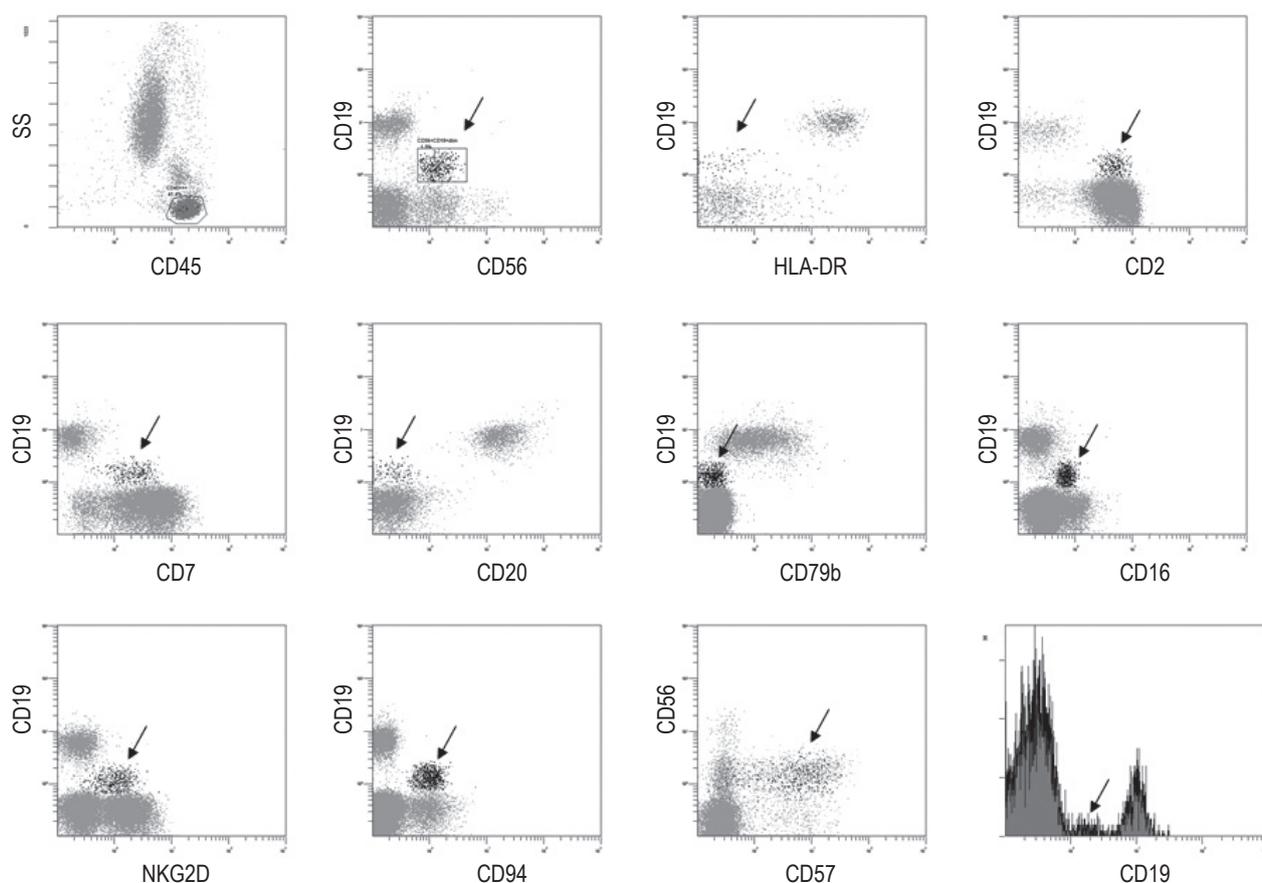


Рисунок 1. Гистограммы распределения маркеров на субпопуляциях лимфоцитов пациента № 9

Примечание. Субпопуляция CD56⁺CD19^{dim} клеток выделена черным цветом и стрелкой.

Figure 1. Plotting the distribution of marker on subpopulations lymphocytes of patient 9

Note. Subpopulation of CD56⁺CD19^{dim} cells is highlighted in black and an arrow.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ И СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИИ CD56⁺CD19^{dim} ЛИМФОЦИТОВ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF PATIENTS AND LEVELS OF THE SUBPOPULATION CD56⁺CD19^{dim} LYMPHOCYTES

№ No.	Возраст, лет Age, years	Пол Sex	Анамнез Anamnesis	Доля CD56 ⁺ CD19 ^{dim} от лейкоцитов / лимфоцитов Proportion CD56 ⁺ CD19 ^{dim} from leukocytes / lymphocytes % / %
1	31	М	Наследственная оптическая нейропатия Лебера. Хроническая герпесвирусная инфекция (ВГVI, ВЭБ) Leber's optic neuropathy. Chronic herpesvirus infection (HHV-6, EBV)	0,15 / 0,6
2	35 35	Ж F	Нет данных No data	0,24 / 0,5 0,21 / 0,4
3	4	Ж F	Нет данных No data	1,38 / 3,4
4	12 14	Ж F	Хроническая герпесвирусная инфекция (ВГVI, ЦМВ, ВЭБ) Chronic herpesvirus infection (HHV-6, HCMV, EBV)	0,17 / 0,4 0,05 / 0,2
5	45	М	Хронический билиарнозависимый панкреатит. Хроническая герпесвирусная инфекция (ВГVI, ВЭБ) Chronic pancreatitis. Chronic herpesvirus infection (HHV-6, EBV)	2,8 / 8,8
6	39	Ж F	Аденовирусный кератит. Железодефицитная анемия. Хроническая герпесвирусная инфекция (ВГI/II, ВГVI, ЦМВ, ВЭБ) Adenoviral keratitis. Iron deficiency anemia. Chronic herpesvirus infection (HHV-1/2, HHV-6, HCMV, EBV)	0,24 / 0,5
7	41	Ж F	Внебольничная пневмония. Бронхоэктатическая болезнь. Железодефицитная анемия Community-acquired pneumonia. Bronchiectasis. Iron deficiency anemia	0,31 / 0,5
8	35	М	Невропатия половых нервов. Нейрогенный мочевого пузыря. Болезнь Бехтерева Pudendal neuralgia. Neurogenic bladder. Ankylosing spondylitis	2,15 / 6,6
9	20	Ж F	Железодефицитная анемия. В12-дефицитная анемия. Рецидивирующая крапивница. Рецидивирующие ангиоотеки. Субфебрилитет неясной этиологии. Хроническая герпесвирусная инфекция (ВГVI, ВЭБ) Iron deficiency anemia. B12 deficiency. Chronic inducible urticaria. Recurrent angioedema. Low-grade fever. Chronic herpesvirus infection (HHV-6, EBV)	0,89 / 1,6
10	28	М	Нет данных No data	0,60 / 1,7
11	45	М	Нет данных No data	0,82 / 1,5

Примечание. ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр, ВГI/II – вирус простого герпеса I/II типа, ВГVI – вирус герпеса VI типа, ЦМВ – цитомегаловирус.

Note. EBV, Epstein–Barr virus; HHV-1/2, Herpes Simplex virus type 1 and type 2; HHV-6, Human Herpesvirus type 6; HCMV, Human Cytomegalovirus.

ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ НА CD56⁺CD19^{dim} ЛИМФОЦИТАХ

TABLE 2. MARKER EXPRESSION ON CD56⁺CD19^{dim} LYMPHOCYTES

	№ 5 No. 5	№ 8 No. 8	№ 9 No. 9	№ 10 No. 10	№ 11 No. 11
CD2	+	+	+	+	+
CD3	-	-	-	-	-
CD4	-	-	-	-	-
CD5	-	-	-	-	-
CD7	+	+	+	+	+
CD8	-+	-+	-	-	-
CD11c				+	+
CD16	+	+	+	+	+
CD19	+	+	+	+	+
CD20	-	-	-	-	-
CD21				-	-
CD25	-	-	-	-	-
CD38	+		+	+	+
CD45RA			+	+	+
CD45R0			-	-	-
CD57		+	+	+	+
CD62L				-+	-
CD79b		-	-		-
CD94			+	+	-+
CD117		-		-	-
CD279			-		-
CD314			+		+
HLA-DR	+	+	-	-	-

На основании экспрессии субпопуляцией CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов Т/НК-клеточных антигенов CD2, CD7, НК-ассоциированных антигенов CD16 и CD56, а также отсутствии экспрессии CD3 можно сделать заключением о том, что фенотип субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов соответствовал НК-клеткам.

Для выявления особенностей фенотипа CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов по сравнению с преобладающей в периферической крови субпопуляцией НК-лимфоцитов CD56⁺CD19⁻, проведено сопоставление их фенотипических характеристик: относительного количества позитивных по изучаемым антигенам клеток, плотности экспрессии антигенов. Поскольку согласно классической линейной модели развития НК-клеток, лимфоциты субпопуляции CD56⁺bright находятся на более раннем этапе дифференцировки и отличаются спектром экспрессируемых молекул от основной субпопуляции НК с умеренной экс-

прессией CD56 [18], клетки CD56⁺bright были исключены из сопоставления.

Все клетки CD56⁺CD19^{dim} и значительная часть клеток CD56⁺CD19⁻ экспрессировали CD2, но плотность экспрессии этой молекулы была в два раза выше у первой субпопуляции (mean 6,5±1,2 vs 3,5±1,0 соответственно). Относительное количество клеток, экспрессирующих CD7 и CD16, было сопоставимо в обеих субпопуляциях, но плотность экспрессии этих антигенов была ниже у CD56⁺CD19^{dim} клеток (CD7: mean 4,2±0,9 vs 8,3±2,3; CD16: mean 1,0±0,2 vs 1,9±0,1 соответственно). НК-клетки обеих субпопуляций не экспрессировали CD5. Не выявлено отличий в относительном количестве CD38⁺ клеток между субпопуляциями, однако плотность экспрессии этого антигена CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитами была в три раза ниже (mean 1,7±0,7 vs 4,9±2,5). Клетки обеих субпопуляций экспрессировали изоформу CD45RA и не экспрессировали CD45R0. Экспрессия CD57 была позитивна более чем на половине клеток субпопуляции CD56⁺CD19^{dim}, что было выше, чем в субпопуляции CD56⁺CD19⁻НК-лимфоцитов (65,3±14,5% vs 33,9±6,1%). Экспрессия CD94 была сопоставима в обеих субпопуляциях. Клетки, экспрессирующие CD279 (PD1) в субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} составляли менее 1% (0,5±0,3%), что было ниже, чем в субпопуляции CD56⁺CD19⁻НК-лимфоцитов (4,5±2,6%). Экспрессия CD11c и NKG2D была позитивна и сопоставима в обеих субпопуляциях НК-клеток. Экспрессия CD62L была различна: лимфоциты CD56⁺CD19^{dim} слабее экспрессировали эту молекулу по сравнению с НК-клетками CD56⁺CD19⁻ (15,3±6,3% vs 30,2±5,6%). Клетки обеих субпопуляций CD56⁺НК не экспрессировали CD117.

Коэкспрессия В-клеточных антигенов CD20, CD21 и CD79b на CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитах не выявлялась.

Таким образом, фенотип CD56⁺CD19^{dim} клеток соответствовал зрелым терминально дифференцированным цитотоксическим НК-лимфоцитам. Ограниченное число исследованных образцов позволяет сделать только предварительное заключение о наличии у этой субпопуляции ряда особенностей фенотипа по сравнению с преобладающей в крови субпопуляцией НК-клеток CD56⁺CD19⁻.

Особенностями фенотипа субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} являются:

- экспрессия В-клеточного антигена CD19 с низкой плотностью;
- тотальная экспрессия CD2 с высокой плотностью;
- сниженная плотность экспрессии CD7;
- сниженная плотность экспрессии CD16;

- высокое относительное количество CD57⁺ лимфоцитов;
- сниженная плотность экспрессии CD38;
- низкое относительное количество CD62L⁺ лимфоцитов.

Итоговый фенотип можно представить как CD56⁺CD19^{dim}CD2^{bright}CD7^{dim}CD11c⁺CD16^{dim}CD38⁺CD45RA⁺CD57⁺CD94^{dim}NKG2D⁺CD3⁻CD4⁻CD5⁻CD20⁻CD21⁻CD25⁻CD45R0⁻CD62L⁻CD79b⁻CD117⁻ с вариабельной экспрессией CD8 и HLA-DR.

Пациентка № 4 (табл. 1) проходила иммунологическое обследование в лаборатории иммунологии ВЦЭРМ в среднем каждые полгода в течение нескольких лет. Ретроспективно провели оценку изменения субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов с 2017 по 2023 год (рис. 2).

При первом исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов (январь 2017 г.) субпопуляция CD56⁺CD19^{dim} в образце крови отсутствовала, затем выявлено ее появление (май 2017 г.) и сохранение на протяжении 6 лет наблюдений. При первом определении субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} на 30% клеток была отмечена экспрессия HLA-DR, затем трижды определялась коэкспрессия HLA-DR и CD8 в диапазоне от 28% до 47% для CD8 и от 26% до 33% для HLA-DR. Отсутствие клинических и ограниченный спектр дополнительных лабораторных данных не позволяют связать манифестацию интересующей субпопуляции клеток с каким-либо заболеванием. Однако можно отметить многолетнюю персистенцию и периодическую активацию субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} НК-лимфоцитов в периферической крови.

Обсуждение

Фенотипирование CD56⁺CD19^{dim} клеток ранее выполнялось коллективом сотрудников отделения Иммунологии и Ревматологии Педиатрической больницы Гаррахан (Буэнос-Айрес, Аргентина), оценивавших субпопуляционный состав лимфоцитов в образцах крови детей с подозрением на иммунодефицитное состояние [10]. Авторы детально описали фенотип интересующей субпопуляции в 11 образцах крови, отметили длительную персистенцию CD56⁺CD19^{dim} у 6 пациентов. Основное внимание было уделено изучению В-клеточных антигенов CD10, CD20, CD21, CD22, CD24, CD79a, IgD, IgG, мембранного и цитоплазматического IgM, легких цепей иммуноглобулинов, CD138, цитоплазматического TdT. Как и в нашем исследовании, экспрессия клетками субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} других В-клеточных антигенов помимо CD19 отсутствовала. В одном из образцов была определена частичная экспрессия CD5, что в редких случаях может

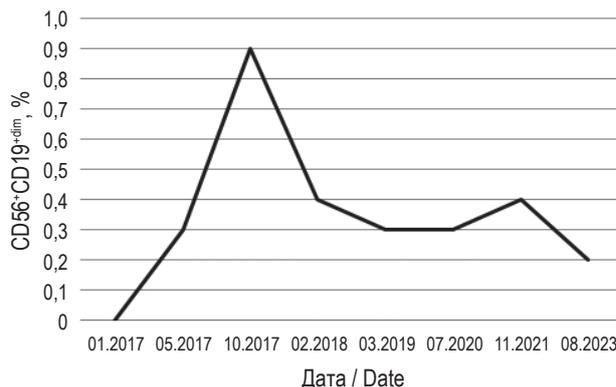


Рисунок 2. Изменение относительного количества CD56⁺CD19^{dim} клеток в крови пациентки № 4 (% от лимфоцитов)

Figure 2. Change in the relative amount of the CD56⁺CD19^{dim} cells in the blood of patient 4 (% of lymphocytes)

иметь место на реактивных НК-лимфоцитах [17]. Исследователи определили позитивную экспрессию CD16, перфорина, гранзимов А и В на уровнях, сопоставимых с преобладающей в периферии субпопуляции НК-лимфоцитов CD56⁺, позитивную экспрессию CD57, CD94, CD158b, отрицательную CD159. В результате изучения субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов исследователи пришли к выводу о соответствии фенотипа активированным НК-лимфоцитам со слабой коэкспрессией CD19, что совпадает с результатами нашей работы.

Длительное сохранение в периферии и сходный высокодифференцированный иммунофенотип характерен для недавно выделенных адаптивных НК, которые отмечаются у клинически здоровых лиц с предшествующей цитомегаловирусной инфекцией [6, 15, 18]. Их описывают как клетки, обладающие признаками клональной экспансии, с усиленной эффекторной функцией, увеличенной продолжительностью жизни и фенотипом NKG2C⁺CD57^{bright}CD2^{bright}CD7^{dim}CD16^{dim}CD38^{dim}FcεR1γ [6]. Это популяция терминально дифференцированных НК-лимфоцитов, имеющих стабильные эпигенетические модификации, которые определяют клеточный метаболизм, а также экспрессию поверхностных рецепторов и сигнальных белков [18]. Ряд фенотипических особенностей адаптивных НК, а именно высокая экспрессия коактиваторной молекулы CD2, проведение сигнала от CD16 с вовлечением сигнальной молекулы CD3ζ вместо FcεR1γ, приводят к эффективному уничтожению клеток-мишеней, опсонизированных антителами, в реакциях антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности [5], а также к выраженному синтезу IFNγ и TNF в ответ на стимулы через CD16 [6]. После активации CD16 поверхностная экспрессия этой

молекулы снижается в результате интернализации или расщепления металлопротеазой-17 [4]. По сравнению с преобладающими в периферии CD56⁺CD19⁻ NK-лимфоцитами, адаптивные NK-клетки имеют пониженную примерно на 50% плотность экспрессии CD16 [13], что также было выявлено в нашем исследовании у субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} клеток. Слабая экспрессия CD7 ограничивает пролиферативный и синтетический ответ после связывания этой молекулы со своим лигандом SECTM1 [23] и может играть роль в ограничении участия в HLA-I рестриктированных реакциях клеточной цитотоксичности, как это показано для мышей с дефицитом экспрессии CD7 [22]. Последнее свойство описано для адаптивных NK, которые, помимо низкой экспрессии костимуляторной молекулы CD7, также слабо экспрессируют рецепторы натуральных киллеров NKp46, NK30 [13]. Отсутствие на мембране CD62L, который способствует миграции от вторичных лимфоидных органов к периферическим тканям [9], а также низкая экспрессия CD7 сближает фенотип адаптивных NK с эффекторными Т-клетками памяти. Между CD8⁺Т-клетками памяти и адаптивными NK описаны сходные эпигенетические модификации [20], которые, по-видимому, и приводят к общим для этих субпопуляций фенотипическим особенностям. В изучаемой нами субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов отмечалось двукратное снижение плотности экспрессии CD7 и практически отсутствие экспрессии CD62L, что характерно для адаптивных NK.

По нашему мнению, отмеченные нами фенотипические особенности субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} клеток, выявляемой в периферической крови некоторых пациентов, позволяют оценить ее как субпопуляцию адаптивных NK-лимфоцитов с коэкспрессией CD19.

На сегодняшний день только для цитомегаловирусной инфекции убедительно показана связь с формированием клона адаптивных NK-лимфоцитов [6]. Популяция адаптивных NK-клеток отмечается у 30% клинически здоровых лиц [8] и может увеличиваться при обострении различных хронических вирусных инфекций, в том числе герпетических, играя заметную роль в антителозависимых защитных реакциях [7, 16]. В нашем исследовании из 11 лиц, в крови которых определена субпопуляция CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов, только у семи присутствовала информация об анамнезе и результатах дополнительных лабораторных исследований. Пятерым из них выполнялась серодиагностика антител к цитомегаловирусу или ПЦР-исследование содержания копий ДНК вируса в слюне с положительным результатом во всех случаях. Помимо этого, у этих пациентов имело место обострение хронической герпетической инфекции, связан-

ной с персистенцией вируса Эпштейна–Барр и герпеса VI типа. Таким образом, у большинства пациентов с известным анамнезом подтверждена предшествующая цитомегаловирусная инфекция и наличие обострения хронической ВЭБ-инфекции, способствующего увеличению клона адаптивных NK.

Экспрессия NK-лимфоцитами поверхностных антигенов других клеточных линий описана при ряде состояний и связана с трогицитозом – переносом и встраиванием фрагментов клеточной мембраны клеток-мишеней в мембрану клеток-эффекторов [19, 24]. Описаны минорные (не более 15% от NK-лимфоцитов) популяции противоопухолевых NK-лимфоцитов с коэкспрессией CD19 у пациентов с хроническим лимфолейкозом, с фолликулярной и диффузной В-крупноклеточной лимфомой, с коэкспрессией CD19 и CD10 при остром В-лимфобластном лейкозе, с коэкспрессией CD14 и CD33 у пациентов с острыми миелоидными лейкозами [11]. При солидных опухолях также возможно обнаружение минорных популяций противоопухолевых адаптивных NK с коэкспрессией тканеспецифичных антигенов [2]. Как при гемобластозах, так и при солидных опухолях NK-клетки с коэкспрессией опухолевых антигенов являются крайне малочисленной популяцией, недоступной для визуализации при выполнении рутинных исследований.

Недавно группой авторов [1, 14] в экспериментальных исследованиях была показана способность NK-лимфоцитов взаимодействовать с неинфицированными В-лимфоцитами, опсонизированными гликопротеином gp350 вируса Эпштейна–Барр в присутствии сыворотки пациентов, содержащей высокоаффинные антитела к этому белку. Авторами *in vitro* была показана возможность трогицитоза фрагментов В-клеточной мембраны с последующей экспрессией на поверхности NK-клетки антигенов CD21, CD20 и CD19. Как в нашем исследовании, так и в работе Korol С. и соавт. (2015), не выявлена коэкспрессия клетками субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} других В-клеточных антигенов, в частности CD21 – рецептора для вируса Эпштейна–Барр, составляющего комплекс с CD19 на мембране В-клетки. Несмотря на это, рассмотренный выше механизм может быть возможной причиной появления в периферии субпопуляции CD19⁺NK-лимфоцитов у пациентов с обострением хронической ВЭБ-инфекции.

Так или иначе, причины длительной персистенции в периферии субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} клеток у пациентов без гемобластозов и солидных опухолей, ее клиническая значимость нуждаются в дополнительном изучении.

Эта субпопуляция, чаще встречающаяся у лиц детского и молодого возраста и достигающая в

некоторых случаях заметных величин (в практике нашей лаборатории – до 9% от лимфоцитов), может искажать результаты иммунологических исследований, выполняемых методом проточной цитометрии. При высоком количестве этих клеток сумма Т-, В- и НК-лимфоцитов может быть выше 100% ввиду одновременной идентификации CD56⁺CD19^{dim} клеток в качестве В- и НК-лимфоцитов. Особенно вероятны ошибки при оценке минимальной остаточной болезни при острых В-клеточных лейкозах, когда даже небольшое количество опухолевой популяции критично для оценки состояния пациента.

Заключение

Следует заключить, что минорная популяция НК-лимфоцитов CD56⁺CD19^{dim} может быть идентифицирована в рутинных иммунологических исследованиях – в нашей работе частота выявления этой популяции составила 1,2%. Определенный в нашем исследовании фенотип этих клеток соответствовал зрелым терминально дифференцированным цитотоксическим НК-лимфоцитам – CD56⁺CD19^{dim}CD2^{bright}CD7^{dim}CD11c⁺CD16^{dim}CD38⁺CD45RA⁺CD57⁺CD94^{dim}NKG2D⁺CD3⁻CD4⁻CD5⁻CD20⁻CD21⁻CD25⁻CD45R0⁻CD62L⁻CD79b⁻CD117⁻ с вариабельной

экспрессией CD8 и HLA-DR. На наш взгляд, эти клетки представляют собой одну из субпопуляций адаптивных НК-лимфоцитов, коэкспрессирующих CD19. Наиболее вероятной причиной появления на мембране НК-лимфоцитов В-клеточного рецептора у иммунокомпрометированных лиц представляется трогоцитоз клетками-эффекторами части мембраны В-лимфоцита у пациентов с обострением хронической герпесвирусной инфекции, ассоциированной с вирусом Эпштейна–Барр. Распространение цитомегаловирусной инфекции, приводящей к образованию высокоспециализированных для выполнения антителозависимой клеточной цитотоксичности клонов адаптивных НК-лимфоцитов, наличие хронической ВЭБ-инфекции, часто встречающееся у иммунокомпрометированных лиц, может способствовать появлению в периферической крови субпопуляции CD56⁺CD19^{dim}. У пациентов с известным анамнезом в нашем исследовании подтверждена предшествующая цитомегаловирусная инфекция и обострение хронической ВЭБ-инфекции. Популяция НК-лимфоцитов со слабой коэкспрессией В-клеточного антигена CD19 может сохраняться годами, а ее функциональные особенности и связь с патологией нуждаются в дальнейшем изучении.

Список литературы / References

1. Alari-Pahissa E., Ataya M., Moraitis I., Campos-Ruiz M., Altadill M., Muntasell A., Moles A., López-Botet M. NK cells eliminate Epstein-Barr virus bound to B cells through a specific antibody-mediated uptake. *PLoS Pathog.*, 2021, Vol. 17, no. 8, e1009868. doi: 10.1371/journal.ppat.1009868.
2. Campos-Mora M., Jacot W., Garcin G., Depondt M.-L., Constantinides M., Alexia C., Villalba M. NK cells in peripheral blood carry trogocytosed tumor antigens from solid cancer cells. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1199594. doi: 10.3389/fimmu.2023.1199594.
3. Chatterjee G., Sriram H., Ghogale S., Deshpande N., Khanka T., Girase K., Verma S., Arolkar G., Dasgupta N., Narula G., Shetty D., Dhamne C., Moulik N.R., Rajpal S., Patkar N.V., Banavali S., Gujral S., Subramanian P.G., Tembhare P.R. Mimics and artefacts of measurable residual disease in a highly sensitive multicolour flow cytometry assay for B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma: critical consideration for analysis of measurable residual disease. *Br. J. Haematol.*, 2022, Vol. 196, no. 2, pp. 374-379.
4. Coënon L., Villalba M. From CD16a biology to antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity improvement. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 913215. doi: 10.3389/fimmu.2022.913215.
5. Della Chiesa M., Pesce S., Muccio L., Carlomagno S., Sivori S., Moretta A., Marcenaro E. Features of memory-like and PD-1⁺ human NK cell subsets. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 351. doi: 10.3389/fimmu.2016.00351.
6. Gao F., Zhou Z., Lin Y., Shu G., Yin G., Zhang T. Biology and clinical relevance of HCMV-associated adaptive NK cells. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 830396. doi: 10.3389/fimmu.2022.830396.
7. Gill U.S., Golden-Mason L. HCMV jogs the 'memory' of NK cells in HBV. *J. Hepatol.*, 2019, Vol. 70, no. 3, pp. 343-345.
8. Hwang I., Zhang T., Scott J.M. Identification of human NK cells that are deficient for signaling adaptor FcRγ and specialized for antibody-dependent immune function. *Int. Immunol.*, 2012, Vol. 24, no. 12, pp. 793-802.
9. Ivetic A., Green H.L.H., Hart S.J. L-selectin: A major regulator of leukocyte adhesion, migration and signaling. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1068. doi: 10.3389/fimmu.2019.01068.
10. Korol C., Rossi J., Sanz M., Bernasconi A. NK cells expressing the B cell antigen CD19: Expanding the phenotypical characterization and the potential consequences from misinterpretation of this subset population. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2015, Vol. 88, no. 2, pp. 358-360.
11. Krzywinska E., Allende-Vega N., Cornillon A., Vo D.N., Cayrefourcq L., Panabieres C., Vilches C., Déchanet-Merville J., Hicheri Y., Rossi J.F., Cartron G., Villalba M. Identification of anti-tumor cells carrying natural killer (NK) cell antigens in patients with hematological cancers. *EBioMedicine*, 2015, Vol. 2, no. 10, pp. 1364-1376.

12. Li W., Morgan R., Nieder R., Truong S., Habeebu S.S.M., Ahmed A.A. Normal or reactive minor cell populations in bone marrow and peripheral blood mimic minimal residual leukemia by flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2021, Vol. 100, no. 5, pp. 531-608.
13. Liu W., Scott J.M., Langguth E., Chang H., Park P.H., Kim S. FcR γ Gene editing reprograms conventional NK cells to display key features of adaptive human NK cells. *iScience*, 2020, Vol. 23, no. 11, 101709. doi: 10.1016/j.isci.2020.101709.
14. López-Montañés M., Alari-Pahissa E., Sintés J., Martínez-Rodríguez J.E., Muntasell A., López-Botet M. Antibody-dependent NK Cell activation differentially targets EBV-infected cells in lytic cycle and bystander B lymphocytes bound to viral antigen-containing particles. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 199, no. 2, pp. 656-665.
15. Pahl J.H.W., Cerwenca A., Ni J. Memory-Like NK-cells: Remembering a previous activation by cytokines and NK cell receptors. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2796. doi: 10.3389/fimmu.2018.02796.
16. Peppas D. Natural killer cells in human immunodeficiency virus-1 infection: spotlight on the impact of human cytomegalovirus. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1322. doi: 10.3389/fimmu.2017.01322.
17. Pu Q., Cao X., Liu Y., Yan D., Tan R., Li J., Yue B. Comprehensive analysis and summary of the value of immunophenotypes of mature NK cell tumors for differential diagnosis, treatment, and prognosis. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 918487. doi: 10.3389/fimmu.2022.918487.
18. Quatrini L., Della Chiesa M., Sivori S., Mingari M.C., Pende D., Moretta L. Human NK cells, their receptors and function. *Eur. J. Immunol.*, 2021, Vol. 51, no. 7, pp. 1566-1579.
19. Reed J., Reichelt M., Wetzel S.A. Lymphocytes and trogocytosis-mediated signaling. *Cells*, 2021, Vol. 10, no. 6, 1478. doi: 10.3390/cells10061478.
20. Schlums H., Cichocki F., Tesi B., Theorell J., Beziat V., Holmes T.D., Han H., Chiang S.C., Foley B., Mattsson K., Larsson S., Schaffer M., Malmberg K.-J., Ljunggren H.-G., Miller J.S., Bryceson Y.T. Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity*, 2015, Vol. 42, no. 3, pp. 443-456.
21. Soma L., Wu D., Chen X., Edlefsen K., Fromm J.R., Wood B. Apparent CD19 expression by natural killers cells: a potential confounder for minimal residual disease detection by flow cytometry in B lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2015, Vol. 88, no. 2, pp. 145-147.
22. Stillwell R., Bierer B.E. T cell signal transduction and role of CD7 in costimulation. *Immunol. Res.*, 2001, Vol. 24, no. 1, pp. 31-52.
23. Wang T., Huang C., Lopez-Coral A., Slentz-Kesler K.A., Xiao M., Wherry E.J., Kaufman R.E. K12/SECTM1, an interferon- γ regulated molecule, synergizes with CD28 to costimulate human T cell proliferation. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, Vol. 91, no. 3, pp. 449-459.
24. Zhao S., Zhang L., Xiang S., Hu Y., Wu Z., Shen J. Gnawing between cells and cells in the immune system: friend or foe? A review of trogocytosis. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 791006. doi: 10.3389/fimmu.2022.791006.

Авторы:

Калашикова А.А. — к.б.н., старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела лабораторной диагностики научно-исследовательского центра ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Бычкова Н.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела лабораторной диагностики научно-исследовательского центра ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Kalashnikova A.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Research Department of Laboratory Diagnostics, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Bychkova N.V., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Research Department of Laboratory Diagnostics, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine; Associate Professor, Department of Immunology, St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 23.10.2023

Отправлена на доработку 10.11.2023

Принята к печати 29.11.2023

Received 23.10.2023

Revision received 10.11.2023

Accepted 29.11.2023