

Анализ экспрессии CD57 и CD279 цитотоксическими Т-лимфоцитами различного уровня дифференцировки у больных ветряной оспой

А.Г.Борисов^{1,2}, А.А.Савченко^{1,2}, Е.П.Тихонова², И.В.Кудрявцев³, Ю.С.Калинина²

¹НИИ медицинских проблем Севера, Красноярск, Российская Федерация;

²Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого, Красноярск, Российская Федерация;

³НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Цель. Изучение цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови различного уровня дифференцировки у больных вирусом варицелла-зостер (VZV), а также определение уровня экспрессии ключевых регуляторных молекул на примере CD57 и CD279.

Пациенты и методы. Обследован 31 больной с верифицированным диагнозом «ветряная оспа». Иммунологические исследования проведены при поступлении в стационар до начала терапии. С использованием многоцветной проточной цитометрии на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови различного уровня дифференцировки оценивали экспрессию CD57 и CD279.

Результаты. Установлено, что у больных с VZV наблюдаются нарушения в созревании и дифференцировке цитотоксических Т-лимфоцитов за счет накопления популяции клеток эффекторной памяти, связанных с активацией вируса. У больных с VZV наблюдается снижение экспрессии CD28-рецептора на терминально-дифференцированных эффекторных клетках, что отразилось в увеличении субпопуляции эффекторных клеток. При сравнении с контрольным уровнем у больных с VZV обнаружено отсутствие изменений экспрессии CD57 и CD279 на терминально-дифференцированных эффекторных клетках и клетках эффекторной памяти.

Заключение. При ветряной оспе на ранней стадии дифференцировки цитотоксических Т-лимфоцитов происходит накопление перфорина и гранзима с последующим увеличением клеток эффекторной памяти и с нормализацией их количества при дифференцировке до истинно эффекторных клеток – терминально-дифференцированных эффекторных клеток.

Ключевые слова: ветряная оспа, дифференцировка, проточная цитометрия, цитотоксические Т-клетки, экспрессия

Для цитирования: Борисов А.Г., Савченко А.А., Тихонова Е.П., Кудрявцев И.В., Калинина Ю.С. Анализ экспрессии CD57 и CD279 цитотоксическими Т-лимфоцитами различного уровня дифференцировки у больных ветряной оспой. *Инфекционные болезни*. 2017; 15(4): 26–32. DOI: 10.20953/1729-9225-2017-4-26-32

Analysis of CD57 and CD279 expression by cytotoxic T lymphocytes with different degrees of differentiation in patients with varicella

A.G.Borisov^{1,2}, A.A.Savchenko^{1,2}, E.P.Tikhonova², I.V.Kudryavtsev³, Yu.S.Kalinina²

¹Research Institute for Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

²V.F.Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation;

³Research Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russian Federation

The objective. To study cytotoxic T lymphocytes with different degrees of differentiation in peripheral blood of patients with varicella-zoster virus (VZV), and to determine the level of expression of key regulatory molecules by the example of CD57 and CD279.

Patients and methods. We examined 31 patients with the verified diagnosis «Varicella». Immunological examinations were performed at admission to hospital before therapy began. Using multicolour flow cytometry on the surface of peripheral blood cytotoxic T lymphocytes with different degrees of differentiation we assessed CD57 and CD279 expression.

Для корреспонденции:

Борисов Александр Геннадьевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера, ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии с курсом последипломного образования Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого

Адрес: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3Г
Телефон: (391) 228-0683
E-mail: 2410454@mail.ru

Статья поступила 22.05.2017 г., принята к печати 07.09.2017 г.

For correspondence:

Alexandr G. Borisov, MD, PhD, Researcher in the laboratory of cellular molecular physiology and pathology of Research Institute for Medical Problems of the North, assistant of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology with a postgraduate course of V.F.Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University

Address: 3G Partizana Geleznyaka str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation
Phone: (391) 228-0683
E-mail: 2410454@mail.ru

The article was received 22.05.2017, accepted for publication 07.09.2017

Results. As has been found, disorders of maturation and differentiation of cytotoxic T lymphocytes can be observed in patients with VZV due to accumulation of effector memory cell populations associated with virus activation. In patients with VZV, decreased CD28-receptor expression on terminally differentiated effector cells is observed, which was reflected in an increased effector cell subpopulation. As compared with control levels, in patients with VZV we have found no changes of CD57 and CD279 expression on terminally differentiated effector cells or effector memory cells.

Conclusion. In varicella, at early stage of cytotoxic T lymphocyte differentiation, accumulation of perforin and granzyme occurs with a subsequent increase of effector memory cells and with normalisation of their amounts during differentiation into genuine effector cells – terminally differentiated effector cells.

Key words: varicella, differentiation, flow cytometry, cytotoxic T cells, expression

For citation: Borisov A.G., Savchenko A.A., Tikhonova E.P., Kudryavtsev I.V., Kalinina Yu.S. Analysis of CD57 and CD279 expression by cytotoxic T lymphocytes with different degrees of differentiation in patients with varicella. *Infekc. bolezni (Infectious diseases)*. 2017; 15(4): 26–32. (In Russian). DOI: 10.20953/1729-9225-2017-4-26-32

Ветряная оспа является одной из самых распространенных инфекций в мире. Клинически инфекция, вызванная вирусом варицелла-зостер (*Varicella Zoster*), проявляется генерализованной розеолезно-везикулезной сыпью (ветряная оспа) или в виде нечетких розоватых пятен и/или папуловезикулезной сыпью по ходу отдельных чувствительных нервов (опоясывающий герпес). Вирус преимущественно поражает эпителиальные клетки, не затрагивая ростковый слой эпидермиса, однако патогномичным считается поражение клеток нервной системы с возможной генерализацией процесса. Степень тяжести течения ветряной оспы и генерализация инфекционного процесса с неблагоприятным исходом обусловлены рядом факторов, ведущим из которых, прежде всего, является неадекватная работа иммунной системы [1, 2].

Отдельного внимания заслуживают наблюдения, свидетельствующие о способности вируса варицелла-зостер (VZV) избегать иммунологического надзора за счет нарушения процессов презентации вирусных антигенов, как это было впервые показано на примере экспрессии молекул МНС II фибробластами человека [3]. Вирус-инфицированные клетки не были способны эффективно презентировать антигены, локализованные в цитоплазме, за счет блокады экспрессии МНС I [4]. Последнее обстоятельство, даже при условии формирования пула эффекторных цитотоксических Т-клеток, снижает эффективность противовирусного ответа. Ключевым событием для запуска специфического иммунного ответа является презентация антигена в периферических лимфоидных органах, когда в роли антиген-презентирующих клеток выступают различные популяции дендритных клеток, локализованные в Т-зависимых зонах [5]. Однако VZV существенно изменяет активность дендритных клеток, отвечающих за запуск специфического противовирусного ответа Т-лимфоцитами. Это выражалось как в снижении экспрессии ими ко-стимуляционных молекул (CD80, CD83 и CD86), так и молекул главного комплекса гистосовместимости I и II класса [6, 7].

Данные литературы указывают на то, что к специфическому распознаванию эпитопов VZV способны, в первую очередь, Т-хелперы с фенотипом CD3⁺CD4⁺, тогда как среди цитотоксических Т-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD8⁺ такие клетки практически не обнаруживались [8]. Среди Т-хелперов подавляющее большинство клеток памяти, способных отвечать пролиферацией и секрецией эффекторных цитокинов на повторный контакт с антигенами VZV, обладало фенотипами

клеток центральной (CCR7⁺CD45RA⁻CD45RO⁺) и эффекторной (CCR7⁻CD45RA⁻CD45RO⁺) памяти [9]. Причем если Т-хелперы были способны отвечать *in vitro* на весь набор антигенов VZV (gB, gE, IE62, IE63 и ORF9), то спектр распознавания цитотоксических Т-клеток сводился лишь к эпитопу ORF9. Кроме того, лишь после вакцинации ORF9 в периферической крови добровольца удавалось обнаружить цитотоксические Т-клетки, способные к продукции интерферона-γ и накоплению перфорина в составе цитоплазматических гранул, тогда как полифункциональные CD3⁺CD8⁺-клетки памяти, формирующие долговременную иммунологическую защиту организма, практически не встречались [10].

Целью данного исследования было изучение цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови различного уровня дифференцировки у больных с VZV, а также определение уровня экспрессии ключевых регуляторных молекул – на примере CD57 и CD279.

Пациенты и методы

В исследование включены 31 больной (22 мужчины и 9 женщин в возрасте 18–45 лет) с верифицированным диагнозом «ветряная оспа». Из исследования исключали больных с тяжелым течением заболевания и/или с развитием гнойно-воспалительных осложнений.

Иммунологические исследования проведены при поступлении в стационар до начала терапии. Все исследования проводились в день взятия крови. В рамках данного исследования было обследовано 45 условно здоровых доноров, достоверно не отличавшихся по возрасту и половому составу от группы больных. Для выявления основных популяций цитотоксических Т-клеток и оценки уровня экспрессии ими CD57 и CD279 применялась следующая панель моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами, собранная в DuraClone IM cell subsets Tube (кат. №B53328 производства Beckman Coulter, США): CD45RA-FITC (клон 2H4, изотип IgG1), CCR7-PE (клон G043H7, изотип IgG2a), CD28-ECD (клон CD28.2, изотип IgG1), PD1-PC5.5 (клон PD1.3.5, изотип IgG2b), CD27-PC7 (клон 1A4.CD27, изотип IgG1), CD4-APC (клон 13B8.2, изотип IgG1), CD8-APC-Alexa Fluor 700 (клон B9.11, изотип IgG1), CD3-APC-Alexa Fluor 750 (клон UCHT-1, изотип IgG1), CD57-Pacific Blue (клон NC1, изотип IgM), CD45-Krome Orange (клон J33, изотип IgG1). Указанной смесью антител окрашивали 100 мкл периферической крови в соответствии с рекомендациями производителя.

Таблица. Основные популяции клеток иммунной системы у больных ветряной оспой

| Показатель | Контроль (n = 45) | Больные (n = 31) | p |
|---|----------------------|----------------------|--------|
| Лейкоциты, 10 ⁹ /л | 6,20 (5,40; 7,02) | 4,85 (3,90; 6,50) | 0,023 |
| Лимфоциты, % | 30,5 (27,0; 33,2) | 30,0 (21,0; 37,0) | |
| Лимфоциты, 10 ⁹ /л | 1,85 (1,64; 1,98) | 1,48 (0,89; 1,98) | |
| Моноциты, % | 6,0 (5,0; 7,0) | 12,0 (9,0; 14,0) | <0,001 |
| Моноциты, 10 ⁹ /л | 0,35 (0,28; 0,43) | 0,55 (0,37; 0,72) | <0,001 |
| CD3 ⁺ , % | 73,5 (71,8; 76,3) | 75,0 (68,0; 80,0) | |
| CD3 ⁺ , 10 ⁹ /л | 1,35 (1,22; 1,45) | 0,93 (0,61; 1,44) | <0,001 |
| CD3 ⁺ CD4 ⁺ , % | 45,5 (39,8; 50,3) | 35,0 (28,0; 41,0) | <0,001 |
| CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10 ⁹ /л | 0,80 (0,71; 0,91) | 0,42 (0,29; 0,64) | <0,001 |
| CD3 ⁺ CD8 ⁺ , % | 29,0 (25,8; 31,3) | 35,0 (28,0; 48,0) | <0,001 |
| CD3 ⁺ CD8 ⁺ , 10 ⁹ /л | 0,50 (0,45; 0,58) | 0,39 (0,28; 0,70) | |
| CD4 ⁺ /CD8 ⁺ , 10 ⁹ /л | 1,53 (1,43; 1,74) | 1,00 (0,59; 1,41) | <0,001 |
| CD19 ⁺ , % | 11,5 (10,0; 14,0) | 10,0 (8,0; 13,3) | |
| CD19 ⁺ , 10 ⁹ /л | 0,20 (0,16; 0,26) | 0,13 (0,08; 0,23) | |
| CD16/CD56 ⁺ , % | 13,0 (11,0; 17,0) | 12,0 (8,0; 17,8) | |
| CD16/CD56 ⁺ , 10 ⁹ /л | 0,25 (0,19; 0,30) | 0,15 (0,08; 0,25) | |
| IgA, г/л | 2,90 (2,50; 3,23) | 2,00 (1,40; 2,90) | <0,001 |
| IgM, г/л | 1,35 (1,10; 1,70) | 1,50 (1,20; 1,90) | |
| IgG, г/л | 11,95 (10,38; 13,53) | 12,40 (10,20; 14,40) | |

Удаление эритроцитов из образцов проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора VersaLyse (кат. №A09777), к 975 мкл которого ex tempera добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (кат. №A07800). После чего образцы дважды отмывали избытком физиологического раствора (7 минут, 330g). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Для выявления основных популяций цитотоксических Т-клеток использовали алгоритм, описанный нами ранее [10]. Для каждого из образцов анализировали не менее 30 000 одиночных лимфоцитов. Математическую обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ CytExpert software v.1.1 и Kaluza™ v.1.5a (Beckman Coulter, США).

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2011 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C₂₅ и C₇₅). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты исследования и их обсуждение

При исследовании иммунологических показателей, характеризующих различные звенья иммунной системы у больных, выявлено снижение общего числа лейкоцитов, при этом определяется увеличение абсолютного и относительного числа моноцитов без увеличения лимфоидных клеток (таблица). За счет снижения общего количества лейкоцитов снижено общее число Т-лимфоцитов, относительное коли-

чество их статистически не отличается от контрольной группы. При этом определяется снижение относительного и абсолютного числа Т-хелперов и увеличение относительного числа цитотоксических Т-лимфоцитов. За счет таких изменений значительно снижено отношение между CD4⁺- и CD8⁺-клетками. Не выявлено статистических отличий относительно абсолютного числа В-лимфоцитов и NK-клеток. У больных с ветряной оспой также снижена концентрация IgA.

Способность проявлять эффекторные свойства определяется уровнем зрелости или стадией дифференцировки этих клеток. С использованием многоцветной проточной цитометрии на основании экспрессии CD45RA и CD62L цитотоксические Т-лимфоциты периферической крови можно разделить на несколько субпопуляций [11, 12]. По оценке уровня CD45RA и CD62L можно выявить «наивные» клетки (N, CD45RA⁺CD62L⁺), клетки центральной (CM, CD45RA⁻CD62L⁺) и эффекторной (EM, CD45RA⁻CD62L⁻) памяти, а также терминально-дифференцированные CD45RA-позитивные эффекторные клетки (TEMRA, CD45RA⁺CD62L⁻). Однако необходимо отметить неоднородность иммунных реакций при различных патологических процессах, в том числе и при вирусных инфекциях [13–15]. Рассматривая отдельные субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов, не выявлено значительных изменений их относительного числа (рис. 1), тогда как при анализе уровня дифференцировки CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов у больных было отмечено достоверное увеличение (p = 0,013) относительного содержания клеток эффекторной памяти с фенотипом CD45RA⁻CCR7 до 39,56% (28,22; 55,57), что превосходило значения контрольной группы, находящиеся в пределах 25,01% (21,70; 37,28).

Более детальный анализ субпопуляционного состава цитотоксических Т-клеток с фенотипами EM и TEMRA проведен на основании экспрессии CD27 и CD28 [10]. Так, клетки эффекторной памяти с использованием антител против дан-

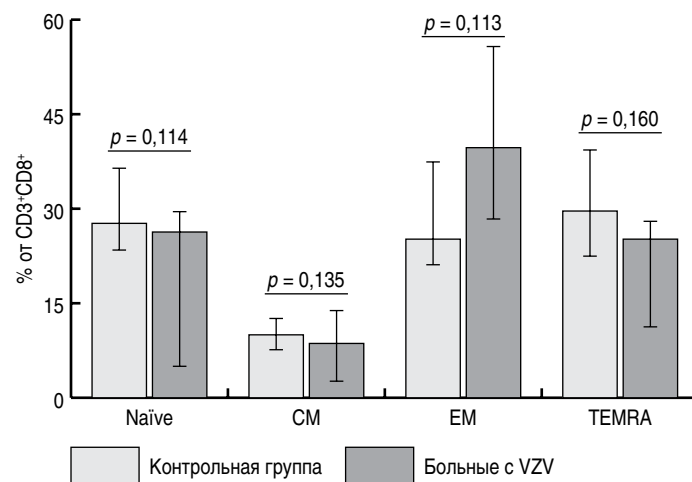


Рис. 1. Относительное содержание основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов.

Здесь и в рисунках 2, 3: Naive – цитотоксические Т-лимфоциты с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺, CM – клетки центральной памяти (CD45RA⁻CD62L⁺), EM – клетки эффекторной памяти, TEMRA – терминально-дифференцированные CD45RA-позитивные эффекторные клетки (CD45RA⁺CD62L⁻). Результаты представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (C₂₅ и C₇₅). Достоверность различий между показателями оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни.

ных антигенов разделяют на отдельные субпопуляции, к числу которых относятся EM1 (CD27⁺CD28⁺), EM2 (CD27⁺CD28⁻), EM3 (CD27⁻CD28⁻) и EM4 (CD27⁻CD28⁺). В свою очередь, популяция TEMRA подразделяются на пре-эффекторы 1-го типа (pE1, CD27⁺CD28⁺), пре-эффекторы 2-го типа (pE2, CD27⁺CD28⁻) и зрелые эффекторные клетки (E, CD27⁻CD28⁻). Достоверных различий по относительному содержанию отдельных субпопуляций (EM1-EM4) между больными с VZV и группой сравнения отмечено не было. Что касается распределения клеток в рамках TEMRA, то у больных с VZV уровень зрелых эффекторных клеток с фенотипом CD27⁻CD28⁻ в периферической крови достоверно ($p = 0,035$) возрастал с 55,01% (41,26; 72,98) до 71,55% (55,96; 80,26). В первую очередь, это было связано с уменьшением содержания ($p = 0,022$) pE1, относительное содержание которых снижалось с 12,29% (7,34; 40,21) в группе сравнения до 7,13% (4,94; 12,48) у больных VZV. Что же касается относительного содержания pE2, то достоверных различий между сравниваемыми группами по данному показателю отмечено не было.

Выявленные изменения в субпопуляционном составе цитотоксических Т-клеток позволили перейти к анализу экспрессии поверхностных антигенов, отвечающих за функциональную активность этих клеток. В качестве таких маркеров на цитотоксических Т-лимфоцитах различной степени дифференцировки можно рассматривать и дополнительные рецепторы, характеризующие эффекторный потенциал цитотоксических Т-клеток. Поэтому в дальнейшем ходе исследования была предпринята попытка сравнить уровень экспрессии и ко-экспрессии двух ключевых молекул – CD57 и CD279 – CD3⁺CD8⁺-клетками в группах больных VZV и здоровых доноров.

CD57, или HNK1 (от англ. Human Natural Killer-1), является углеводным эпитопом, представленным на поверхности цитоплазматической мембраны клеток, обладающих цитолитической активностью [16]. Более того, появление данного антигена на поверхности цитотоксических Т-клеток и натуральных киллерных клеток тесно связано с накоплением двух ключевых молекул – перфорина и гранзима В – в составе их цитоплазматических гранул. Ранее нами было показано, что по мере дифференцировки цитотоксических Т-лимфоцитов в линии «наивные» – CM – EM – TEMRA наблюдается постепенное увеличение относительного содержания CD57-позитивных клеток с достижением максимума в популяции TEMRA [17]. Полученные нами результаты указывают на увеличение уровня CD57 на «наивных» клетках и клетках центральной памяти (в обоих случаях $p < 0,001$) (рис. 2), то есть клетках, способных мигрировать в лимфоидную ткань или только что ее покинувших. Обычно эти популяции лимфоцитов не обладают выраженной способностью уничтожить вирус-инфицированные клетки-мишени, но именно они формируют клоны эффекторных клеток. Так как смена фенотипа клеток не может произойти быстро, то полученные нами результаты могут указывать именно на запуск процесса антиген-специфического ответа в лимфоидной ткани. Отсутствие значимых изменений в составе популяций EM и TEMRA могут свидетельствовать о нарушениях в формировании зрелых эффекторных клеток, способных к миграции в периферические ткани, накопивших перфорин и гранзим В и обладающих цитолитическими свойствами. Как отмечалось выше, у больных с VZV увеличено относитель-

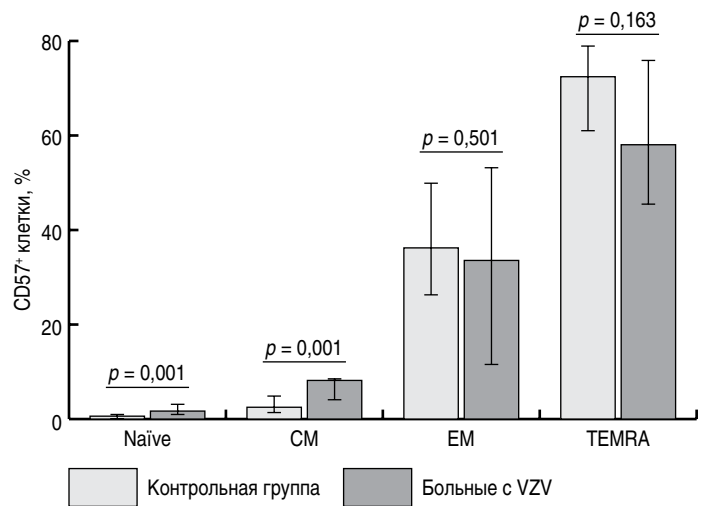


Рис. 2. Экспрессия CD57 различными субпопуляциями цитотоксических Т-лимфоцитов.

ное содержание клеток EM, однако это не связано с природой CD57-позитивных клеток в рамках этой популяции. Более того, в случае популяции TEMRA отмечается тенденция к снижению числа клеток, экспрессирующих CD57. Полученные нами результаты косвенно подтверждают данные литературы о нарушении вирусом механизмов презентации антигена и ко-стимуляции Т-лимфоцитов со стороны АПК, что отрицательно сказывается на формировании зрелых эффекторных клеток.

CD279, или PD-1 (от англ. Programmed cell death-1), является трансмембранным белком, относящимся к семейству регуляторных белков CD28/CTLA-4/ICOS, которые обнаруживаются на поверхности различных субпопуляций лимфоцитов. В случае Т-клеток PD-1 играет важную роль в негативной регуляции реализации эффекторных функций Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов за счет блокады сигнала от Т-клеточного рецептора [18]. Эта молекула слабо представлена на поверхности покоящихся Т-клеток, однако уже через несколько часов после стимуляции ее уровень экспрессии резко возрастает [19]. В рамках другого исследования было показано, что уровень PD-1 увеличивался на Т-клетках периферической крови примерно в четыре раза (с 10% до 40%) уже через сутки после внесения в среду для культивирования клеток PMA и иономицина [20]. Поэтому PD-1 можно рассматривать еще и в качестве маркера активации лимфоцитов. При анализе уровня экспрессии PD-1 на CD3⁺CD8⁺-клетках периферической крови условно здоровых доноров данный рецептор был обнаружен на примерно 40–80% клеток памяти [21], по другим оценкам – 15–35% [22], тогда как на «наивных» клетках он отсутствовал. 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 не превышал одной трети от общего числа клеток, а для клеток CM эта величина не превышала 25%. Данные литературы в целом совпадают с полученными собственными результатами. Однако при сравнении больных с VZV было отмечено увеличение относительного содержания CD279-позитивных клеток в рамках «наивной» и CM популяций ($p = 0,034$ и $p = 0,015$) (рис. 3). В случае же более диф-

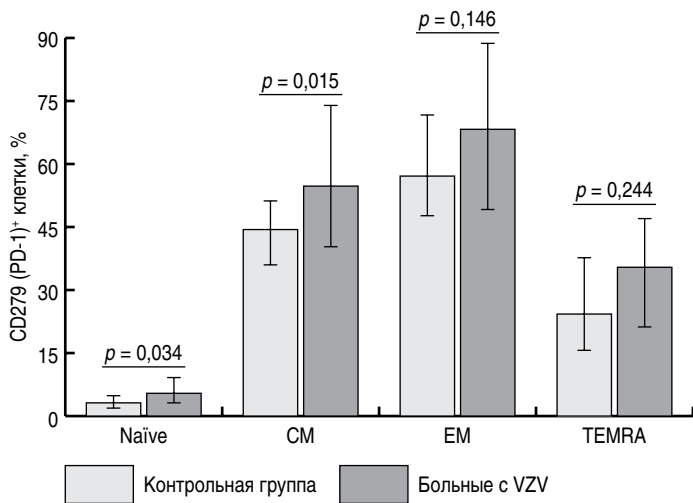


Рис. 3. Экспрессия CD279 (PD-1) различными субпопуляциями цитотоксических Т-лимфоцитов.

ференцированных типов цитотоксических Т-клеток отмечалась лишь тенденция к приросту лимфоцитов, экспрессировавших данный антиген на своей поверхности.

Особенно следует подчеркнуть тот факт, что увеличение уровня PD-1 тесно связано со снижением способности CD3⁺CD8⁺-клеток проявлять цитолитические свойства. Так, для PD-1⁺-клеток была характерна повышенная экспрессия РНК костимулирующих (CD28 и CD27) и ингибиторных (CTLA-4) рецепторов, хемокиновых рецепторов, отвечающих за хоуминг в ткани (CXCR6, CXCR4 и CCR5), и гранзима К [23]. По сравнению с цитотоксическими Т-клетками, не несущими PD-1, в данной популяции обнаружена сниженная экспрессия KIR и KLR, а также ключевых эффекторных молекул – гранулизына и гранзима В. Наличие PD-1 на поверхности клетки также было связано со снижением уровня мРНК молекул клеточной адгезии – CD11b, CD11c и CD56. В гранулах PD-1-негативных клеток CD3⁺CD8⁺-клеток было существенно больше перфорина при сравнении с PD-1-позитивными клетками.

Следующей задачей проведенного исследования был анализ ко-экспрессии CD57 и CD279 различными субпопуляциями цитотоксических Т-клеток. Т-клетки с фенотипом CD57⁺CD279⁺ уже накопили достаточное количество перфорина и гранзима В, но не способны проявлять цитолитические свойства из-за наличия CD279, блокирующего активационный сигнал от Т-клеточного рецептора при распознавании антигена. Относительное содержание клеток данного фенотипа среди «наивных» CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов, хотя и было на уровне следовых количеств в контроле, у больных с VZV увеличивалась ($p = 0,001$) с 0,06% (0,03; 0,17) до 0,30% (0,14; 0,46). В рамках клеток центральной памяти у больных их уровень возрастал ($p < 0,001$) почти в 3,5 раза, когда эти значения составляли 1,66% (1,15; 2,65) и 5,64% (3,17; 7,47) соответственно. Однако в случае более зрелых фенотипов лимфоцитов – EM и TEMRA – существенных изменений не наблюдалось.

Следует отметить, что лигандами PD-1 являются PD-L1 (B7-H1 или CD274) и PD-L2 (B7-DC или CD273), относящиеся к семейству молекул B7. На постоянной основе PD-L1 экспрессируется клетками различного происхождения, к числу которых, в первую очередь, относится большая часть клеток соединительной ткани – клетки эндотелия сосудов, гладко-

мышечные клетки и клетки эпителиальных пластов [24]. Экспрессия PD-L2 также характерна для клеток эндотелия сосудов. Более того, под действие провоспалительных факторов плотность экспрессии лигандов для PD-1 резко возрастает. Так что вероятность эффективного уничтожения вирус-инфицированных клеток в случае цитотоксических Т-клеток с фенотипом CD57⁺CD279⁺ крайне низка. Именно поэтому столь принципиальное значение с точки зрения элиминации клеток-мишеней приобретают CD3⁺CD8⁺-лимфоциты с фенотипом CD57⁺CD279⁻. Именно в рамках этой популяции, обладающей необходимым арсеналом эффекторных молекул, возможны активация и проявление цитолитических свойств при распознавании антигена Т-клеточным рецептором. Однако достоверное увеличение ($p = 0,002$) уровня этих клеток в периферической крови больных с VZV при сравнении с контролем было отмечено лишь для популяции «наивных» CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов (0,76% (0,48; 0,99) и 0,22% (0,13; 0,66), соответственно), где они находились лишь на весьма незначительном уровне. В случае клеток эффекторной памяти и TEMRA отмечалась тенденция к снижению CD57⁺CD279⁻-клеток (в случае больных – 9,42% (2,47; 23,24) и 37,04% (25,79; 64,73), а в случае группы сравнения – 17,77% (6,72; 26,15) и 58,85% (39,42; 64,20) соответственно), хотя достоверных отличий зарегистрировано не было.

Иммунная система человека должна бороться с разнообразными патогенами и обеспечивать защиту организма на протяжении всей жизни. Т-клетки памяти, которые дифференцируются из «наивных» Т-лимфоцитов при первичной антигенной стимуляции и дают возможность быстрого и надежного ответа на ранее встречавшиеся патогены, являются ключевыми игроками адаптивного иммунитета. Генерация и поддержание патоген-специфических Т-клеток памяти имеет решающее значение для иммунитета против вируса герпеса зостер [25, 26]. Способность генерировать защитные иммунные реакции в значительной степени зависит от генерации и поддержания разнообразного и хорошо сбалансированного Т-клеточного репертуара. Но при заболевании можно ожидать сбой такого репертуара. Это имеет важное практическое значение, так как выявление нарушений в дифференцировке цитотоксических Т-лимфоцитов позволит найти мишени для коррекции подобных нарушений [27].

Заключение

При анализе популяционного состава цитотоксических Т-лимфоцитов у больных ветряной оспой обнаружены нарушения в созревании и дифференцировке цитотоксических Т-лимфоцитов за счет накопления популяции клеток эффекторной памяти, что, вероятно, связано, с активацией вируса зостер. Установлено снижение экспрессии CD28-рецептора на терминально-дифференцированных эффекторных клетках, что отразилось в увеличении субпопуляции эффекторных клеток. Все это послужило основанием более детально рассмотреть экспрессию других активационных маркеров на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов. Наиболее активными из них являются CD57 как маркер конечной дифференцировки клеток и CD279, или PD-1, как рецептор отрицательной регуляции цитотоксических Т-лимфоцитов. Проведенные исследования показали при сравнении с кон-

трольной группой отсутствие изменений экспрессии CD57 и CD279 на терминально-дифференцированных эффекторных клетках и клетках эффекторной памяти. Однако на «наивных» цитотоксических лимфоцитах и клетках центральной памяти отмечается увеличение клеток с вышеуказанными маркерами. Это, вероятно, связано с активацией на ранних стадиях дифференцировки цитотоксических Т-лимфоцитов как отражения реактивности иммунной системы на вирус зостер. Суммируя данные, можно сделать вывод, что при ветряной оспе на ранней стадии дифференцировки цитотоксических Т-лимфоцитов происходит накопление перфорина и гранзима с последующим увеличением клеток эффекторной памяти и с нормализацией их количества при дифференцировке до истинно эффекторных клеток – терминально-дифференцированных эффекторных клеток.

Литература

1. Кузьмина ТЮ, Тихонова ЮС, Тихонова ЕП, Бабушкин АО, Андронина НВ. Особенности течения ветряной оспы у взрослого населения. Сибирское медицинское обозрение. 2013;2:72-75.
2. Glode Helmuth I, Broccia MD, Glenhøj JP, Harder K, Jensen L, von Linstow ML, et al. Children Hospitalized With Varicella in Denmark: Sensitivity of the National Patient Register. *Pediatr Infect Dis J*. 2017;36(1):31-5. DOI: 10.1097/INF.0000000000001347
3. Abendroth A, Slobedman B, Lee E, Mellins E, Wallace M, Arvin AM. Modulation of major histocompatibility class II protein expression by varicella-zoster virus. *J Virol*. 2000;74(4):1900-7.
4. Eisfeld AJ, Yee MB, Erazo A, Abendroth A, Kinchington PR. Downregulation of class I major histocompatibility complex surface expression by varicella-zoster virus involves open reading frame 66 protein kinase-dependent and -independent mechanisms. *J Virol*. 2007;81:9034-49. DOI: 10.1128/JVI.00711-07
5. Ярилин АА. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010.
6. Morrow G, Slobedman B, Cunningham AL, Abendroth A. Varicella-zoster virus productively infects mature dendritic cells and alters their immune function. *J Virol*. 2003;77(8):4950-9.
7. Schönrich G, Raftery MJ. Dendritic cells as Achilles' heel and Trojan horse during varicella zoster virus infection. *Front Microbiol*. 2015 May 8;6:417. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00417
8. Asanuma H, Sharp M, Maecker HT, Maino VC, Arvin AM. Frequencies of memory T cells specific for varicella-zoster virus, herpes simplex virus, and cytomegalovirus by intracellular detection of cytokine expression. *J Infect Dis*. 2000;181(3):859-66. DOI: 10.1086/315347
9. Sei JJ, Cox KS, Dubey SA, Antonello JM, Krah DL, Casimiro DR, et al. Effector and Central Memory Poly-Functional CD4(+) and CD8(+) T Cells are Boosted upon ZOSTAVAX(®) Vaccination. *Front Immunol*. 2015 Oct 29;6:553. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00553
10. Кудрявцев ИВ, Борисов АГ, Кробионец ИИ, Савченко АА, Серебрякова МК. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии. *Медицинская иммунология*. 2015;17(6):525-38.
11. Кудрявцев ИВ. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки. *Российский иммунологический журнал*. 2014;17(4):947-64.
12. Кудрявцев ИВ, Елезов ДС. Выявление основных популяций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови на основании уровня экспрессии CD27, CD28, CD45RO и CD62L. *Российский иммунологический журнал*. 2013;7(2-3):57-61.
13. Борисов АГ, Савченко АА. Особенности состояния клеточного и гуморально-го иммунитета при остром и хроническом вирусном гепатите В. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2012;85(3-2):53-7.
14. Борисов АГ, Савченко АА, Кудрявцев ИВ. Особенности иммунного реагирования при вирусных инфекциях. *Инфекция и иммунитет*. 2015;5(2):148-56.
15. Борисов АГ. Кластерный анализ типов иммунных нарушений при инфекционно-воспалительных заболеваниях. *Российский иммунологический журнал*. 2014;8(4):1002-11.
16. Chattopadhyay PK, Betts MR, Price DA, Gostick E, Horton H, Roederer M et al. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc Biol*. 2009 Jan;85(1):88-97. DOI: 10.1189/jlb.0208107
17. Кудрявцев ИВ, Борисов АГ, Волков АЕ, Савченко АА, Серебрякова МК, Полевщиков АВ. Анализ уровня экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами различного уровня дифференцировки. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2015;2(60):30-5.
18. Karunaratne DS, Horne-Debets JM, Huang JX, Faleiro R, Leow CY, Amante F, et al. Programmed Death-1 Ligand 2-Mediated Regulation of the PD-L1 to PD-1 Axis Is Essential for Establishing CD4(+) T Cell Immunity. *Immunity*. 2016 Aug 16;45(2):333-45. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.07.017.
19. Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science*. 2017 Mar 31;355(6332):1428-1433. DOI: 10.1126/science.aaf1292
20. Sim JH, Park MJ, Park S, Lee ES. Altered expression of costimulatory molecules in Behçet's disease according to clinical activity. *Br J Dermatol*. 2011 Jun;164(6):1285-91. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10274.x
21. Duraiswamy J, Ibegbu CC, Masopust D, Miller JD, Araki K, Doho GH, et al. Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. *J Immunol*. 2011 Apr 1;186(7):4200-12. DOI: 10.4049/jimmunol.1001783
22. Zhang JY, Zhang Z, Wang X, Fu JL, Yao J, Jiao Y, et al. 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;109(11):4671-8. DOI: 10.1182/blood-2006-09-044826
23. Duraiswamy J, Ibegbu CC, Masopust D, Miller JD, Araki K, Doho GH, et al. Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults.. *J Immunol*. 2011 Apr 1;186(7):4200-12. DOI: 10.4049/jimmunol.1001783
24. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*. 2007;8(3):239-45. DOI: 10.1038/ni1443
25. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jan;14(1):24-35. DOI: 10.1038/nri3567
26. Ouwendijk WJ, Laing KJ, Verjans GM, Koelle DM. T-cell immunity to human alphaherpesviruses. *Current Opinion in Virology*. 2013;3(4):452-60.
27. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jan;14(1):24-35. DOI: 10.1038/nri3567

References

1. Kuzmina TU, Tikhonova US, Tikhonova EP, Babushkin AO, Andronova NV. Specific features of chickenpox in adults. *Siberian Medical Review*. 2013;2:72-75. (In Russian).
2. Glode Helmuth I, Broccia MD, Glenhøj JP, Harder K, Jensen L, von Linstow ML, et al. Children Hospitalized With Varicella in Denmark: Sensitivity of the National Patient Register. *Pediatr Infect Dis J*. 2017;36(1):31-5. DOI: 10.1097/INF.0000000000001347
3. Abendroth A, Slobedman B, Lee E, Mellins E, Wallace M, Arvin AM. Modulation of major histocompatibility class II protein expression by varicella-zoster virus. *J Virol*. 2000;74(4):1900-7.

4. Eisefeld AJ, Yee MB, Erazo A, Abendroth A, Kinchington PR. Downregulation of class I major histocompatibility complex surface expression by varicella-zoster virus involves open reading frame 66 protein kinase-dependent and - independent mechanisms. *J Virol.* 2007;81:9034-49. DOI: 10.1128/JVI.00711-07
5. Yarinin AA. *Immunologiya [Immunology].* Moscow: "GEOTAR-Media" Publ., 2010. (In Russian).
6. Morrow G, Slobedman B, Cunningham AL, Abendroth A. Varicella-zoster virus productively infects mature dendritic cells and alters their immune function. *J Virol.* 2003;77(8):4950-9.
7. Schönrich G, Raftery MJ. Dendritic cells as Achilles' heel and Trojan horse during varicella zoster virus infection. *Front Microbiol.* 2015 May 8;6:417. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00417
8. Asanuma H, Sharp M, Maecker HT, Maino VC, Arvin AM. Frequencies of memory T cells specific for varicella-zoster virus, herpes simplex virus, and cytomegalovirus by intracellular detection of cytokine expression. *J Infect Dis.* 2000;181(3):859-66. DOI: 10.1086/315347
9. Sei JJ, Cox KS, Dubey SA, Antonello JM, Krahl DL, Casimiro DR, et al. Effector and Central Memory Poly-Functional CD4(+) and CD8(+) T Cells are Boosted upon ZOSTAVAX(®) Vaccination. *Front Immunol.* 2015 Oct 29;6:553. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00553
10. Kudryavtsev IV, Borisov AG, Krobinets II, Savchenko AA, Serebryakova MK. Multicolor flow cytometric analysis of cytotoxic T cell subsets. *Medical Immunology.* 2015;17(6):525-38. (In Russian).
11. Kudryavtsev IV. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. *Russian Journal of Immunology.* 2014;17(4):947-64. (In Russian).
12. Kudryavtsev IV, Elezov DS. Vyyavlenie osnovnykh populyatsii tsitotoksicheskikh T-limfotsitov perifericheskoi krovi na osnovanii urovnya ekspressii CD27, CD28, CD45RO i CD62L. *Russian Journal of Immunology.* 2013;7(2-3):57-61. (In Russian).
13. Borisov AG, Savchenko AA. Features of cellular and humoral immunity in acute and chronic viral hepatitis B. *The Siberian Scientific Medical Journal.* 2012;85(3-2):53-7. (In Russian).
14. Borisov AG, Savchenko AA, Kudryavtsev IV. Features of the immune response during viral infection. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2015;5(2): 148-56. (In Russian).
15. Borisov AG. Cluster analysis of types of immune disorders in infectious and inflammatory diseases. *Russian Journal of Immunology.* 2014;8(4):1002-11. (In Russian).
16. Chattopadhyay PK, Betts MR, Price DA, Gostick E, Horton H, Roederer M et al. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc Biol.* 2009 Jan;85(1):88-97. DOI: 10.1189/jlb.0208107
17. Kudryavtsev IV, Borisov AG, Volkov AE, Savchenko AA, Serebryakova MK, Polevshchikov AV CD56 and CD57 expression by distinct populations of human cytotoxic T lymphocytes. *Pacific Medical Journal.* 2015;2(60):30-5. (In Russian).
18. Karunaratne DS, Horne-Debets JM, Huang JX, Faleiro R, Leow CY, Amante F, et al. Programmed Death-1 Ligand 2-Mediated Regulation of the PD-L1 to PD-1 Axis Is Essential for Establishing CD4(+) T Cell Immunity. *Immunity.* 2016 Aug 16; 45(2):333-45. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.07.017
19. Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science.* 2017 Mar 31;355(6332):1428-1433. DOI: 10.1126/science.aaf1292
20. Sim JH, Park MJ, Park S, Lee ES. Altered expression of costimulatory molecules in Behçet's disease according to clinical activity. *Br J Dermatol.* 2011 Jun; 164(6):1285-91. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10274.x
21. Duraiswamy J, Ibegbu CC, Masopust D, Miller JD, Araki K, Doho GH, et al. Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. *J Immunol.* 2011 Apr 1;186(7):4200-12. DOI: 10.4049/jimmunol.1001783
22. Zhang JY, Zhang Z, Wang X, Fu JL, Yao J, Jiao Y, et al. 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;109(11):4671-8. DOI: 10.1182/blood-2006-09-044826
23. Duraiswamy J, Ibegbu CC, Masopust D, Miller JD, Araki K, Doho GH, et al. Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. *J Immunol.* 2011 Apr 1;186(7):4200-12. DOI: 10.4049/jimmunol.1001783
24. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol.* 2007;8(3):239-45. DOI: 10.1038/ni1443
25. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014 Jan;14(1):24-35. DOI: 10.1038/nri3567
26. Ouwendijk WJ, Laing KJ, Verjans GM, Koelle DM. T-cell immunity to human alphaherpesviruses. *Current Opinion in Virology.* 2013;3(4):452-60.
27. Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014 Jan;14(1):24-35. DOI: 10.1038/nri3567

Информация о соавторах:

Савченко Андрей Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера, заведующий кафедрой физиологии им. профессора А.Т.Пшоника Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Адрес: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3Г Телефон/факс: (391) 228-0683 E-mail: aasavchenko@yandex.ru

Тихонова Елена Петровна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии с курсом последипломного образования Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Адрес: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1А Телефон: (391) 246-9375 E-mail: tihonovaep@mail.ru

Кудрявцев Игорь Владимирович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории общей иммунологии НИИ экспериментальной медицины Адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12 Телефон: (812) 234-9489 E-mail: igorek1981@yandex.ru

Калинина Юлия Сергеевна, ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии с курсом последипломного образования Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого, Адрес: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1А Телефон: (391) 246-9375 E-mail: tihonovaep@mail.ru

Information about co-authors:

Andrei A. Savchenko, MD, PhD, DSc, professor, head of the laboratory of cellular molecular physiology and pathology of Research Institute for Medical Problems of the North, Head of Department of Physiology named professor A.T.Pschonik of V.F.Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University Address: 3G Partizana Geleznyaka str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation Phone/fax: +7 (391) 228-0683 E-mail: aasavchenko@yandex.ru

Elena P. Tikhonova, MD, PhD, DSc, professor, head of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology with a postgraduate course of V.F.Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University Address: 1A Partizana Geleznyaka str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation Phone: +7 (391) 246-9375 E-mail: tihonovaep@mail.ru

Igor V. Kudryavtsev, MD, PhD in biology, Leading Researcher in the Laboratory of general immunology of Research Institute of Experimental Medicine Address: 12 Academician Pavlov str., St. Petersburg, 197376, Russian Federation Phone: +7 (812) 234-9489 E-mail: igorek1981@yandex.ru

Yuliya S. Kalinina, assistant of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology with a postgraduate course of V.F.Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University Address: 1A Partizana Geleznyaka str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation Phone: +7 (391) 246-9375 E-mail: tihonovaep@mail.ru