

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

ЭКСПРЕССИЯ CD56 ЦИТОТОКСИЧЕСКИМИ Т-ЛИМФОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

© 2018 г. И. В. Кудрявцев^{1*}, А. Г. Ильвес², О. М. Новоселова², К. С. Рубаник¹,
М. К. Серебрякова¹, Л. Н. Прахова²

*E-mail: igorek1981@yandex.ru

¹ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”,
Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУН Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН,
Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 14.04.2018. Принята: 05.09.2018

Рассеянный склероз (РС), в основе которого лежат аутоиммунные воспалительные реакции и нейродегенеративные процессы, относится к иммунологически опосредованным заболеваниям нервной системы. В последние годы появляется все больше работ, указывающих на участие CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов в патогенезе РС. С применением десяти-цветной проточной цитометрии был проведен анализ относительного и абсолютного содержания различных субпопуляций CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов, а также особенностей экспрессии ими CD56 и CD57 у 51 условно здорового добровольца и больных РС в период обострения (n = 31) или ремиссии (n = 20). CD3⁺CD8⁺ клетки на основании экспрессии CD45RA, CD62L, CD27 и CD28 были разделены на “наивные” клетки, клетки центральной (СМ) и эффекторной (ЕМ) памяти, а также зрелые эффекторные (TEMRA) лимфоциты. Достоверных различий по N, СМ и TEMRA Тцит между группами отмечено не было, хотя выявлена негативная корреляция между относительным и абсолютным содержанием “наивных” Тцит у больных в период обострения и баллами шкалы EDSS у больных ОРС (r = –0,512 при p = 0,003 и r = –0,430 при p = 0,014, соответственно). В обеих группах больных РС отмечено снижение относительно и абсолютного содержания ЕМ клеток. Относительное содержание CD57⁺ клеток было отмечено среди “наивных” и СМ CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов при РС. Уровень CD56⁺ клеток был выше во всех исследованных популяциях CD3⁺CD8⁺ при РС за исключением TEMRA клеток больных РС в период ремиссии при сравнении с контролем. Таким образом, изменение уровня экспрессии CD56 различными популяциями цитотоксических Т-лимфоцитов может рассматриваться в качестве нового маркера воспалительных процессов при РС.

Ключевые слова: рассеянный склероз, цитотоксические Т-лимфоциты, проточная цитометрия, экспрессии CD56

DOI:

Адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. академика Павлова, 12. ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”. Тел./факс: +78122342929. Кудрявцев Игорь Владимирович. E-mail: igorek1981@yandex.ru

Авторы:

Кудрявцев И.В., к.б.н., с.н.с. отдела иммунологии ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”, Санкт-Петербург, Россия;

Ильвес А.Г., к.м.н., с.н.с. лаборатории нейроиммунологии ФГБУН Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Новоселова О.М., м.н.с. лаборатории нейрореабилитации ФГБУН Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Рубаник К.С., м.н.с. лаборатории нейрореабилитации ФГБУН Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Серебрякова М.К., н.с. отдела иммунологии ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”, Санкт-Петербург, Россия;

Прахова Л.Н., д.м.н., заведующая лабораторией нейрореабилитации ФГБУН Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие рассеянного склероза (РС) связано с формированием очагов воспаления и демиелинизации в пределах ткани центральной нервной системы (ЦНС) [1]. Патогенез РС традиционно связывают с появлением в организме больного аутореактивных клонов Т-хелперов,

способных проникать через гемато-энцефалический барьер и направленно мигрировать в нервную ткань. Основная роль в индукции воспаления и повреждении клеток ЦНС, отводится Т-хелперам 17 (Th17) и привлекаемым ими из периферической крови нейтрофилам. Более того, цитокины, синтезируемые Th17 — IL-17 и IL-22 — способны не только усиливать “хоуминг” клеток в ЦНС, но и нарушать структуру плотных контактов между эндотелиальными клетками, входящих в состав гемато-энцефалического барьера, как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro* [2]. Вместе с тем, к продукции IL-17 способны не только Th17, но и некоторые популяции цитотоксических Т-лимфоцитов (Тцит), получившие в литературе обозначение “Tc17”, которые также обнаруживаются в составе активных очагов поражения нервной ткани при помощи гистологических методов исследования [3]. Tc17 секретируют большое количество как IL-17, так и TNF α , тогда как уровень продукции IFN γ у них значительно снижен. Следует отметить, что относительное содержание Tc17 увеличивалось не только в составе очагов воспаления, как это отмечалось выше, но и в периферической крови больных РС при сравнении с контрольной группой [4]. Увеличение в периферической крови уровня циркулирующих IL-17-синтезирующих Tc17 отмечалось в фазе обострения у больных с рецидивирующим РС при сравнении с группой условно здоровых доноров [5].

В рамках другого исследования было показано, что значительная часть Тцит, обнаруживаемых в составе нервной ткани, обладали фенотипом CD62L⁺CCR7⁺гранзимB^{hi} и относились к клеткам эффекторной памяти [6]. Ключевую роль в селективном проникновении клеток эффекторной памяти в пределы ЦНС играли эндотелиальные клетки сосудов гематоэнцефалического барьера, причем привлекались именно CD3⁺CD8⁺ лимфоциты, способные к синтезу и секреции IFN γ и IL-17. Ведущую роль в процессах трансмиграции, по крайней мере *in vitro*, играет α 4-интегрин, экспрессируемый цитотоксическими Т-лимфоцитами, а не ICAM-1 (CD54), ALCAM (CD166) или MCP-1/CCL2. Другой важнейшей молекулой, определяющей миграцию CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов в пределы нервной ткани, является MCAM [7]. Уровень MCAM⁺ Тцит у больных РС повышался во время рецидива заболевания. Более того, относительное содержание клеток, способных к продукции цитокинов IL-17, IFN γ , GM-CSF и TNF α (свойственных для Th17), в рамках

данной популяции был существенно выше, чем среди CD8⁺ Т-лимфоцитов с фенотипом MCAM⁺. Более того, MCAM⁺ Тцит больных РС обладали выраженной цитолитической активностью в отношении олигодендроцитов в условиях *in vitro*. Блокада MCAM при помощи антител снижала эффективность трансмиграции Тцит через эндотелий гемато-энцефалического барьера в условиях *in vitro*.

Несколько ранее было обнаружено, что Тцит, специфически распознающие антигены MOG1 и MAG1 нервной ткани, способны в условиях *in vitro* подавлять пролиферативную активность Т-хелперов, вызванную аналогичными антигенами нервной ткани [8]. Более того, у больных в период обострения активность этой популяции регуляторных CD8⁺ клеток была снижена по сравнению с лимфоцитами, полученными от больных в период ремиссии или условно здоровых доноров. Снижение регуляторных свойств Тцит также отмечалось другими исследователями. Например, уровень экспрессии транскрипционного фактора foxp3 NKG2C⁺CD8⁺ лимфоцитами у больных РС снижался при сравнении с контрольной группой [9]. Более того, у этих больных отмечалось увеличение уровня NKG2A⁺CD8⁺ клеток, обладавших способностью к синтезу и секреции провоспалительных цитокинов. Таким образом, многочисленные данные литературы указывают на то, что среди CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов при РС отмечается снижение регуляторных субпопуляций клеток, тогда как содержание и функциональная активность клеток, обладающих провоспалительными и эффекторными свойствами, существенно возрастает, особенно в периоды обострения РС.

Приведенные выше наблюдения разных исследователей подтверждают идею о том, что Тцит больных РС способны покидать кровотоки и мигрировать в пределы ЦНС. Поэтому исследование этой популяции Т-клеток периферической крови поможет приблизиться к пониманию патогенеза РС, а также обнаружить новые маркеры прогноза развития и течения данного заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила венозная кровь условно здоровых доноров (n = 51) и больных с рецидивирующим РС (n = 52), полученная путем пункции периферической вены и собранная в вакуумные пробирки с содержанием К₃ЭДТА. Диагноз РС устанавливался согласно

критериям МакДональда [10]. В исследование вошли пациенты, никогда не получавшие никакой патогенетической иммуномодулирующей терапии РС и не леченные кортикостероидами за последние 3 месяца. По стадии заболевания больные были разделены на две группы – обострение РС ($n = 32$, ОРС) и ремиссия ($n = 20$, РРС). Под обострением понималось острое или подострое появление/нарастание неврологических симптомов, характерных для РС, сохранявшихся минимум 48 часов, возникших на фоне отсутствия лихорадки, инфекций и интоксикаций. Наличие/отсутствие “активных”, то есть накапливающих контраст, очагов при наличии выполненной магнитно-резонансной терапии не учитывалось. Выраженность неврологических симптомов заболевания оценивалась с помощью расширенной шкалы инвалидизации (EDSS), включающей балльную оценку состояния функциональных систем (зрительной, пирамидной, мозжечковой, чувствительной, функций тазовых органов, ствола мозга) и нарушений ходьбы [11].

Все сравниваемые в рамках данной работы группы достоверно не различались по половому и возрастному составу. Все исследования были проведены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации “Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека” с поправками 2000 г. и “Правилами клинической практики в Российской Федерации”, утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Исследование одобрено Комиссией по этике ФГБУН “Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой” РАН 23 октября 2014 года.

Все исследования проводились в день взятия крови. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями производителей антител. Для выявления основных популяций Тцит и оценки уровня экспрессии ими CD56 и CD57 применялась следующая панель моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами (все антитела производства Beckman Coulter, США): CD57-FITC (клон NC1, кат. № IM0466U), CD56-PE (клон N901 (NKH-1), кат. № A07788), CD62L-ECD (клон DREG56, кат. № IM2713U), CD28-PC5 (клон CD28.2, кат. № 6607108), CD27-PC7 (клон 1A4CD27, кат. № A54823), CD3-APC (клон UCHT1, кат. № IM2467), CD8-APC-Alexa Fluor 700 (клон B9.11, кат. № A66332), CD45RA-APC-Alexa Fluor 750 (клон 2H4LDH11LDB9

(2H4), кат. № A86050), CD4-Pacific Blue (клон 13B8.2, кат. № A82789), CD45-Krome Orange (клон J.33, кат. № A96416). Указанным коктейлем антител окрашивали 100 мкл периферической крови в соответствии с рекомендациями производителя. Удаление эритроцитов из образцов проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора VersaLyse (кат. № A09777), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (кат. № A07800). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Для выявления основных популяций цитотоксических Т-клеток использовали алгоритм, детально описанный ранее [12]. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США).

Статистическую обработку проводили при помощи пакетов программ 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, полученные в ходе исследования относительно содержания различных субпопуляций цитотоксических Т-клеток в периферической крови, приводили в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q_{25} и Q_{75}). Для оценки достоверности различий использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, тогда как корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции r-Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У больных с ОРС отмечено увеличение относительного и абсолютного содержания общей популяции Т-лимфоцитов (75,55% (66,64; 77,90) и 1205 кл/мкл (900; 1466), соответственно) при сравнении с группой контроля (78,10% (72,95; 83,61) при $p = 0,026$ и 1327 (11,24; 1651) при $p = 0,043$, соответственно). Более того, выявлена корреляция между снижением процентного содержания $CD3^+CD8^+$ и баллом по шкале EDSS ($r = -0,448$ при $p = 0,010$). При сравнении относительного и абсолютного содержания Тцит периферической крови во всех трех группах выявлено достоверное ($p = 0,042$) снижение Тцит у больных РРС при сравнении

с контролем (394 кл/мкл (282; 439) и 443 кл/мкл (365; 530), соответственно).

На основании экспрессии CD45RA и CD62L общая популяция Тцит была разделена на “наивные” клетки с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺ (N), клетки центральной и эффекторной памяти – CD45RA⁺CD62L⁺ (CM) и CD45RA⁺CD62L[–] (EM), соответственно, а также “терминально-дифференцированные” CD45RA-позитивные эффекторные клетки (TEMRA) с фенотипом CD45RA⁺CD62L[–], как это было описано ранее [13]. Достоверных различий по N, CM и TEMRA Тцит между группами отмечено не было, хотя выявлена негативная корреляция между относительным и абсолютным содержанием “наивных” Тцит у больных OPC и баллами шкалы EDSS у больных OPC ($r = -0,512$ при $p = 0,003$ и $r = -0,430$ при $p = 0,014$, соответственно). Исследование клеток с фенотипом CD45RA⁺CD62L[–] показано, что их относительное и абсолютное содержание как у больных OPC (8,21% (5,61; 10,54) при $p = 0,028$ и 118 кл/мкл (80; 184) при $p = 0,017$, соответственно), так и больных PPC (6,45% (5,14; 8,97) при $p = 0,006$ и 104 кл/мкл (85; 142) при $p = 0,003$) было достоверно ниже значений контрольной группы (9,67% (7,94; 11,59) и 166 кл/мкл (124; 213), соответственно).

На основании экспрессии ко-стимуляционных молекул CD27 и CD28 Тцит эффекторной памяти были разделены на четыре независимые субпопуляции – EM1, EM2, EM3 и EM4, с фенотипами CD27⁺CD28⁺, CD27⁺CD28[–], CD27[–]CD28[–] и CD27[–]CD28⁺, соответственно (более подробно [14]). Относительное содержание EM1 клеток было несколько снижено в группе PPC по сравнению с контролем (68 кл/мкл (35; 84) и 86 кл/мкл (57; 110) при $p = 0,048$, соответственно). Концентрация EM2 Тцит достоверно была ниже у всех больных РС (при OPC – 14 кл/мкл (10; 25) при $p = 0,003$; в случае PPC – 16 кл/мкл (9; 24) при $p = 0,031$) по сравнению с условно здоровыми донорами (23 кл/мкл (15; 31)). Сходная тенденция отмечалась при сравнении значений группы контроля по CD27–CD28–EM3 Тцит и больных РС (37 кл/мкл (14; 83) против 23 кл/мкл (13; 34) при $p = 0,040$ и 17 кл/мкл (10; 35) при $p = 0,021$, соответственно). Тогда как достоверных различий между сравниваемыми группами по относительному и абсолютному содержанию EM4 Тцит отмечено не было.

Что касается CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD62L[–] лимфоцитов периферической крови, то на

основании ко-экспрессии CD27 и CD28 были выделены три популяции клеток: “пре-эффекторы” 1 типа (pE1), ко-экспрессирующие CD27 и CD28 (pE2), “пре-эффекторы” 2 типа, экспрессирующие только CD27, и “зрелые” эффекторы (E), не несущие обеих молекул на своей поверхности (более подробно [14]). Достоверных различий по относительному или абсолютному содержанию указанных субпопуляций TEMRA отмечено не было.

В ходе дальнейших исследований на всех описанных выше популяциях Тцит периферической крови был проведен анализ экспрессии двух эффекторных молекул CD56 и CD57. Следует отметить, достоверное увеличение уровня экспрессии CD57 было зарегистрировано только в пределах “наивных” клеток и CM Тцит. Так, у больных с OPC относительное содержание CD57⁺ клеток повышалось с 0,96% (0,46; 2,19) до 1,73% (0,73; 2,93) при $p = 0,044$. При анализе цитотоксических Т-лимфоцитов популяции CM отмечено увеличение CD57⁺ в обеих группах больных с 3,83% (2,03; 7,74) до 6,24% (5,87; 8,24) в период обострения ($p = 0,028$) и до 6,71% (5,33; 8,16) в период ремиссии ($p = 0,006$). По остальным более высоко дифференцированным популяциям Тцит значимых изменений между сравниваемыми группами выявлено не было.

Исследование относительного содержания Тцит, находящихся на различных стадиях дифференцировки и несущих на своей поверхности молекулу межклеточной адгезии CD56, выявило существенное увеличение CD56-позитивных клеток при РС. Как показано на **рис. 1** у больных OPC и PPC относительное содержание этих клеток в рамках “наивных” Тцит, а также среди CM и EM клеток было достоверно выше значений контрольной группы (**рис. 1**). При анализе эффекторных клеток популяции TEMRA прирост CD56⁺ клеток был отмечен при сравнении больных OPC и группой контроля ($p = 0,014$). Вместе с тем, у больных PPC выявлена корреляционная взаимосвязь между CD56⁺ TEMRA Тцит и баллами шкалы EDSS ($r = 0,465$ при $p = 0,046$).

Анализ четырех основных популяций клеток эффекторной памяти, выявленных на основании коэкспрессии CD27 и CD28, показал, что относительное содержание CD56-позитивных Тцит у обеих групп больных РС достоверно превышал аналогичных показателей группы сравнения (**рис. 2**). Более того, аналогичная тенденция была отмечена и для различных популяций TEMRA Тцит, когда значения, полученные для

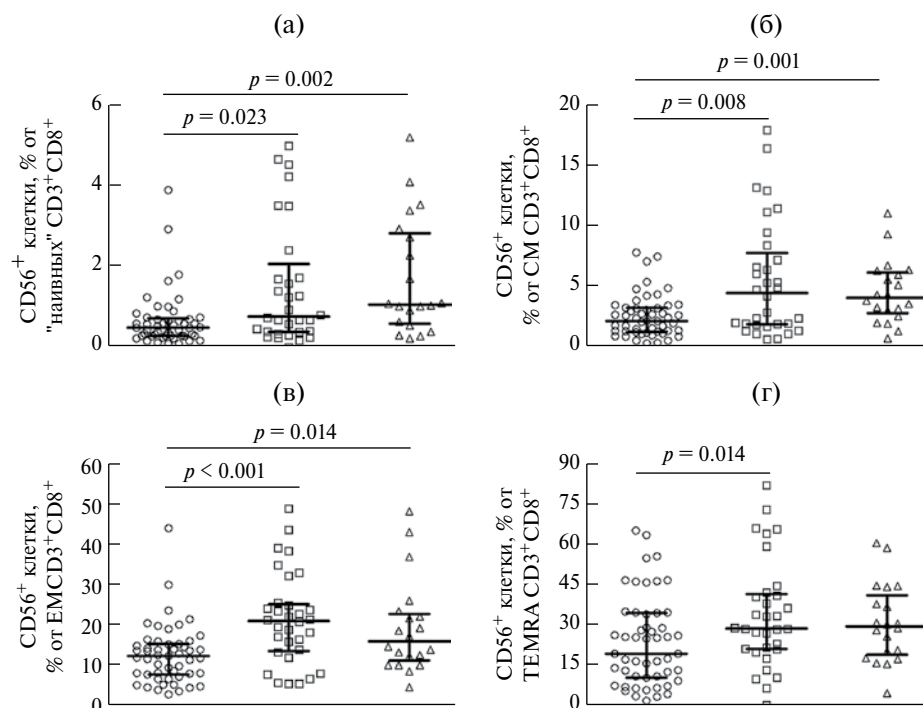


Рис. 1. Относительное содержание CD56-позитивных клеток в рамках популяций "наивных" цитотоксических Т-лимфоцитов (А), клеток центральной (Б) и эффекторной (В) памяти, также эффекторных клеток популяции TEMRA. Здесь и далее на **рис. 2** и **3**: белыми кругами (слева) обозначены результаты группы контроля (условно здоровые добровольцы, $n = 51$); квадратами и треугольниками (по центру и справа, соответственно) – больные рассеянным склерозом в период обострения ($n = 32$) и ремиссии ($n = 20$), соответственно. Результаты приведены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q₂₅ и Q₇₅). Достоверные различия указаны согласно непараметрическому U-критерию Манна-Уитни.

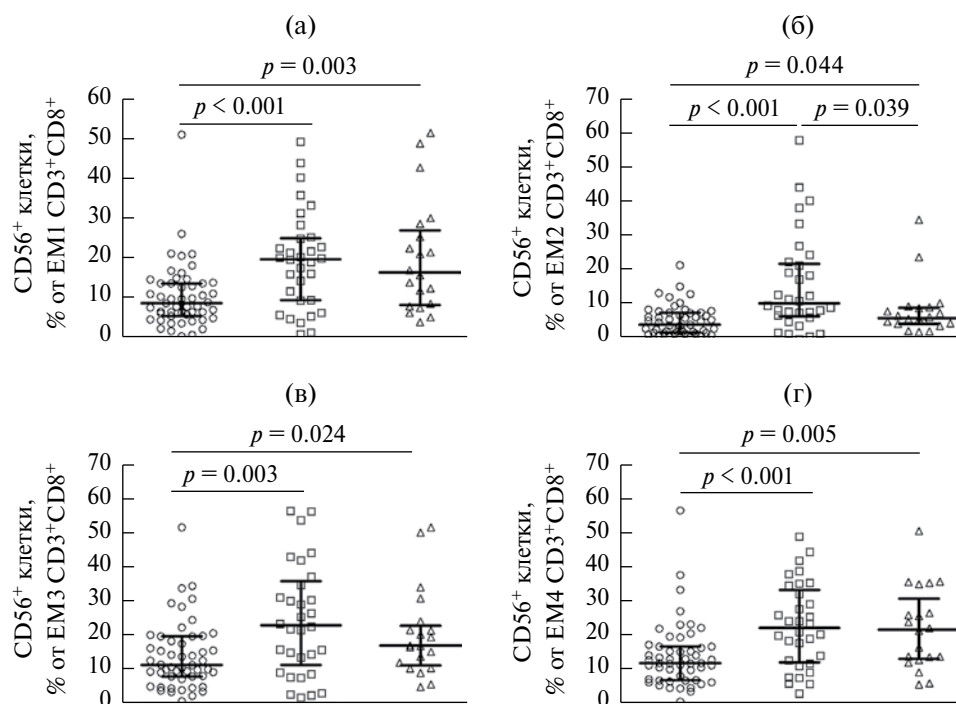


Рис. 2. Относительное содержание цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности CD56, в рамках популяций EM1, EM2, EM3 и EM4 (гистограммы А, Б, В и Д, соответственно) эффекторной памяти.

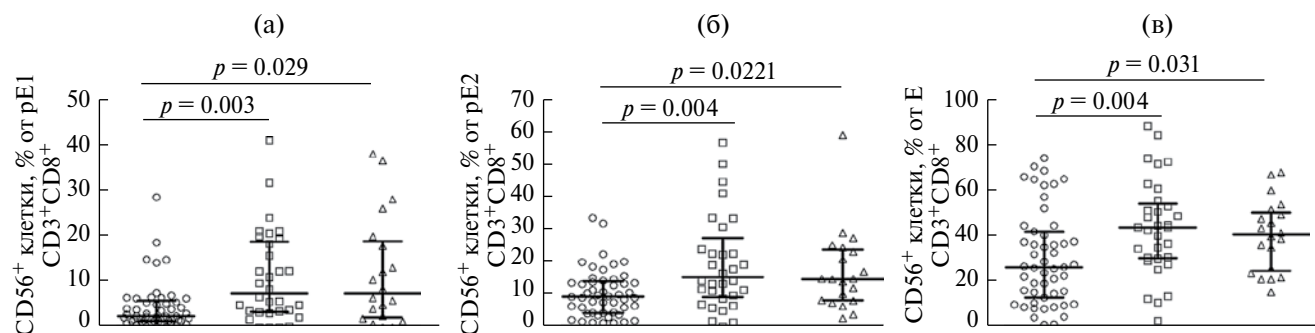


Рис. 3. Относительное содержание цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности CD56, в рамках популяций “пре-эффекторов” 1 и 2 типа, а также зрелых эффекторных клеток (гистограммы А, Б и В, соответственно) популяции TEMRA.

Ттит больных РС в период обострения и в период ремиссии, достоверно превосходили значения контрольной группы (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Данные литературы, посвященные анализу уровня дифференцировки Ттит периферической крови при РС весьма противоречивы. Так, для больных РС может быть характерно снижение общего пула CD3⁺CD8⁺ клеток периферической крови, связанные, в первую очередь, со снижением уровней ЕМ и TEMRA клеток [15]. Для первично-прогрессирующей формы РС также было характерно снижение уровня “наивных” Ттит при сравнении с группой контроля, тогда как для больных с рецидивирующей и вторично прогрессирующей формами РС таких различий отмечено не было. В рамках упомянутого исследования не удалось обнаружить взаимосвязь между длительностью заболевания, а также значениями шкал инвалидизации (EDSS) и тяжести течения РС (MSSS). По мнению авторов, уменьшение пула ЕМ Ттит и зрелых эффекторов может быть связано со снижением пролиферативной активности “наивных” и СМ клеток в ответ на гомеостатические цитокины, равно как и повышением чувствительности к проапоптотическим факторам более дифференцированных популяций CD3⁺CD8⁺ у больных РС. В рамках другого исследования было показано, что у больных РС с низким уровнем инвалидизации (EDSS в пределах 1,0–2,0 баллов) уровень ЕМ Ттит (CD45R0⁺CCR7[–]) повышался до 30,3% (18,3; 40,5), что превосходило значения контрольной группы (19,3% (11,9; 26,4), хотя и не отличались от больных с EDSS в диапазоне 2,5–4,0 баллов [16]. Однако в рамках еще одной работы у больных РС среди Ттит

существенно увеличивались уровни клеток центральной памяти и TEMRA [17]. В рамках другого исследования увеличение уровня циркулирующих Ттит с фенотипом клеток эффекторной памяти было отмечено у больных РС, что, по мнению авторов, указывало на системную активацию данного звена приобретенного иммунитета [18]. Таким образом, изменения клеточного состава Ттит при РС могут быть обусловлены широким спектром факторов, хотя можно отметить тенденцию к изменению уровня, в первую очередь, “наивных” клеток, равно как и их тесную взаимосвязь с клиническими проявлениями РС, на что указывает тесная взаимосвязь между уровнем этих клеток в крови и баллом по шкале EDSS.

CD56 или NCAM (от англ. “Neural Cell Adhesion Molecule”) является поверхностным гликопротеином с молекулярной массой около 140–220 кДа и принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов. Экспрессия CD56 обнаружена на клетках нейрального происхождения, мышечных клетках, а также натуральных киллерах и некоторых популяциях Т-лимфоцитов периферической крови [19]. В тканях нервной системы CD56 отвечает за межклеточные взаимодействия. Аналогичные функции, по-видимому, данный поверхностный антиген выполняет в циркулирующих клетках периферической крови. Так, блокада данной молекулы при помощи блокирующих антител сопровождается снижением способности НК-клеток вызывать гибель клеток-мишеней [20]. Хотя в литературе можно найти и противоположные результаты, указывающие на то, что CD56 не участвует процессах распознавания и формирования контактом между цитотоксическими клетками и их мишенями [21].

В настоящее время роль CD56⁺ Тцит при РС остается слабо исследованной, хотя накопление клеток данного фенотипа наблюдается в периферической крови больных с различными аутоиммунными заболеваниями, например, при ревматоидном артрите [22] и болезни Бехчета [23]. При анализе уровня дифференцировки Тцит периферической крови показано, что у больных с различными формами РС — рецидивирующим, вторично и первично прогрессирующим — относительное содержание CD8⁺CD56⁺перфорин⁺ клеток превосходило значения, полученные для контрольной группы [24]. Более того, что у больных с более высоким баллом по шкале инвалидизации (EDSS $\geq$ 3) уровень этих клеток в циркуляции был выше такового больных с EDSS < 3, что, по-видимому, свидетельствует о роли эффекторных CD3⁺CD8⁺ в развитии повреждений нервной ткани. Таким образом, как приведенные выше данные литературы, так и собственные результаты указывают на взаимосвязь между наличием РС и изменениями в составе Тцит и, особенно, клеток, способных к экспрессии CD56.

Сравнительная характеристика функциональной активности CD56⁺CD57⁺, CD56⁺CD57⁺ и CD56⁺CD57⁺ цитотоксических Т-клеток показала, что наличие CD56 и/или CD57 тесно связано со способностью клеток в ответ на стимуляцию Т-клеточного рецептора секретировать IFN γ , накапливать перфорин и гранзимы, а также эффективно уничтожать клетки-мишени линии K562 в условиях *in vitro* [25]. Однако в отношении клеток линии Raji, не чувствительных к действию НК-клеток, цитолитическая активность CD56⁺CD8⁺CD3⁺ клеток была значительно выше таковой остальных популяций Тцит. Более того, в ответ на внесении IL-2, IL-12 и IL-15 именно CD56⁺ Тцит синтезировали максимальное количество IFN γ . На фоне стимуляции Т-клеточного рецептора и внесения IL-15 или IL-2 количество CD56⁺CD3⁺ клетки, способных накапливать IFN γ в цитоплазме, удваивалось [26]. Более того, по способности синтезировать IFN γ клетки данного фенотипа более чем в 5 раз превосходили CD56⁺CD3⁺ лимфоциты. Следует отметить, что для больных РС характерно увеличение уровня как самого этого цитокина в крови и спинно-мозговой жидкости, так и уровня клеток, способных к его синтезу и секреции [27]. Более того, продукция IFN γ при РС как в периферической крови, так и спинно-мозговой жидкости может быть связана

именно с Тцит, а не субпопуляциями Т-хелперов, как это было показано с использованием молекулярно-биологических методов исследования [28]. Так как накопление именно CD56⁺ клеток, а не эффекторных CD57⁺, способных к контактному цитолизу, но не к продукции большого количества эффекторных цитокинов, может быть связано с патогенезом РС и запуском воспалительных реакций в пределах нервной ткани.

С другой стороны, отдельного упоминания заслуживает популяция CD8 $\alpha\beta$ ⁺CD161⁺CD56⁺ Т-клеток, которая, в соответствии с целым рядом работ последних лет, рассматривается в качестве популяции регуляторных цитотоксических Т-клеток [29]. Клетки данного фенотипа в среднем составляют около 7% от общего числа цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови условно здоровых доноров и повышаются при РС среди различных субпопуляций Тцит, как это показано нами выявленных на основании экспрессии ключевых маркеров дифференцировки. Анализ экспрессии основных поверхностных маркеров этих клеток показал, что CD3⁺CD8⁺CD56⁺ клетках был обычно представлен CD45RA, тогда как CD45R0, а также ко-стимулирующие молекулы CD28 и CD27, на большинстве отсутствовали [29]. Более того, CD161⁺CD56⁺ цитотоксические Т-клетки были способны уничтожать Т-хелперы только после их активации при помощи анти-CD3 антител. Последнее обстоятельство может рассматриваться в качестве одного из факторов, способных ограничивать очаг воспаления в пределах нервной ткани при РС. Вместе с тем, в период обострения в периферической крови больных РС снижаются уровни зрелых эффекторных цитотоксических Т-клеток с фенотипом CD57⁺CD62L⁺, а также CD3⁺CD8⁺ клеток, несущих в составе своих цитолитических гранул перфорин и гранзим В, по сравнению с показателями, отмеченными у данных пациентов при ремиссии [30]. Это обстоятельство, равно как и отсутствие какой-либо динамики по CD57⁺ Тцит, отмеченной в рамках собственного исследования, может также указывать на нарушения регуляторных свойств цитотоксических Т-клеток при рассеянном склерозе.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют поставить вопрос о роли CD56⁺ цитотоксических Т-клеток при развитии РС. С одной стороны, увеличение уровня этих клеток в крови может быть связано с запуском воспалительной реакции в нервной ткани и рецидивом заболевания. С другой стороны, именно

накопление этих клеток в ЦНС может сопровождаться уничтожением активированных Т-хелперов, способных специфически распознавать антигены нервной ткани, и ремиссией РС. По-видимому, дальнейшие исследования функциональных особенностей и роли CD56 в регуляции процессов миграции цитотоксических Т-клеток за пределы гемато-энцефалического барьера помогут в понимании механизмов патогенеза РС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Столяров И.Д., Петров А.М., Вотинцева М.В., Ивашкова Е.В. Нейроиммунология: теоретические и клинические аспекты. Физиология человека 2013, 39, 51–59. [Stolyarov I.D., Petrov A.M., Votintseva M.V., Ivashkova E.V. Neuroimmunology: theoretical and clinical aspects. Human Physiology 2013, 39, 40–47.]
2. Kebir H., Kreymborg K., Ifergan I., Dodelet-Devillers A., Cayrol R., Bernard M., Giuliani F., Arbour N., Becher B., Prat A. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. Nat Med 2007, 13(10), 1173–1175.
3. Tzartos J.S., Friese M.A., Craner M.J., Palace J., Newcombe J., Esiri M.M., Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. Am J Pathol 2008, 172(1), 146–155.
4. Wang H.H., Dai Y.Q., Qiu W., Lu Z.Q., Peng F.H., Wang Y.G., Bao J., Li Y., Hu X.Q. Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. J Clin Neurosci 2011, 18(10), 1313–1317.
5. Salehi Z., Doosti R., Beheshti M., Janzamin E., Sahraian M.A., Izad M. Differential frequency of CD8+ T cell subsets in multiple sclerosis patients with various clinical patterns. PLoS One 2016, 11(7), e0159565.
6. Ifergan I., Kebir H., Alvarez J.I., Marceau G., Bernard M., Bourbonnière L., Poirier J., Duquette P., Talbot P.J., Arbour N., Prat A. Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on $\alpha 4$ integrin. Brain 2011, 134(Pt 12), 3560–3577.
7. Larochelle C., Lécuyer M.A., Alvarez J.I., Charabati M., Saint-Laurent O., Ghannam S., Kebir H., Flanagan K., Yednock T., Duquette P., Arbour N., Prat A. Melanoma cell adhesion molecule-positive CD8 T lymphocytes mediate central nervous system inflammation. Ann Neurol 2015, 78(1), 39–53.
8. Baughman E.J., Mendoza J.P., Ortega S.B., Ayers C.L., Greenberg B.M., Frohman E.M., Karandikar N.J. Neuroantigen-specific CD8+ regulatory T-cell function is deficient during acute exacerbation of multiple sclerosis. J Autoimmun 2011, 36(2), 115–124.
9. Pannemans K., Broux B., Goris A., Dubois B., Broekmans T., Van Wijmeersch B., Geraghty D., Stinissen P., Hellings N. HLA-E restricted CD8+ T cell subsets are phenotypically altered in multiple sclerosis patients. Mult Scler 2014, 20(7), 790–801.
10. Polman C.H., Reingold S.C., Banwell B., Clanet M., Cohen J.A., Filippi M., Fujihara K., Havrdova E., Hutchinson M., Kappos L., Lublin F.D., Montalban X., O'Connor P., Sandberg-Wollheim M., Thompson A.J., Waubant E., Weinshenker B., Wolinsky J.S. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. Ann Neurol 2011, 69(2), 292–302.
11. Kurtzke J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology 1983, 33(11), 1444–1452, Kappos L. Slightly modified, version 09/08.
12. 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(60), 30–35. [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 T lymphocytes. Pacific Medical Journal 2015, 2(60), 30–35.]
13. 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, 7(16), 2–3(1), 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. Russian Journal of Immunology 2013, 7(16), 2–3(1), 57–61.]
14. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кроби́нец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии. Медицинская иммунология 2015, 17(6), 525–538. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobins I.I., Savchenko A.A., Serebryakova M.K. Multicolor flow cytometric analysis of cytotoxic T cell subsets. Medical Immunology (Russia) 2015, 17(6), 525–538.]
15. Pender M.P., Csürhes P.A., Pfluger C.M., Burrows S.R. Deficiency of CD8+ effector memory T cells is an early and persistent feature of multiple sclerosis. Mult Sclerosis 2014, 20(14), 1825–1832.
16. Mikulkova Z., Praksova P., Stourac P., Bednarik J., Michalek J. Imbalance in T-cell and cytokine profiles in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. J Neurol Sci 2011, 300(1–2), 135–141.
17. Liu G.Z., Fang L.B., Hjelmström P., Gao X.G. Increased CD8+ central memory T cells in patients with multiple sclerosis. Mult Scler 2007, 13(2), 149–155.
18. Haegele K.F., Stueckle C.A., Malin J.P., Sindern E. Increase of CD8+ T-effector memory cells in peripheral

- blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis compared to healthy controls. *J Neuroimmunol* 2007, 183(1–2), 168–174.
19. Lanier L.L., Testi R., Bindl J., Phillips J.H. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *JEM* 1989, 169(6), 2233–2238.
 20. Nitta T., Yagita H., Sato K., Okumura K. Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *JEM*, 1989, 170(5), 1757–1761.
 21. Lanier L.L., Chang C., Azuma M., Ruitenberg J.J., Hemperly J.J., Phillips J.H. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol* 1991, 146(12), 4421–4426.
 22. Michel J.J., Turesson C., Lemster B., Atkins S.R., Iclozan C., Bongartz T., Wasko M.C., Matteson E.L., Vallejo A.N. CD56-expressing T cells that have features of senescence are expanded in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007, 56(1), 43–57.
 23. Ahn J.K., Park Y.G., Park S.W., Yoon K.C., Yu H.G., Chung H. Combined low dose cyclosporine and prednisone down-regulate natural killer cell-like effector functions of CD8brightCD56+ T cells in patients with active Behçet uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* 2006, 14(5), 267–275.
 24. Giovanni F., Domenico P., Alessandro M., Raffaele I., Viviana N., Katia P.A., Paola B.A. Circulating CD8+CD56-perforin+ T cells are increased in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2011, 240–241, 137–141.
 25. Ohkawa T., Seki S., Dobashi H., Koike Y., Habu Y., Ami K., Hiraide H., Sekine I. Systematic characterization of human CD8+ T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8+ T cells. *Immunology* 2001, 103(3), 281–290.
 26. Dunne J., Lynch S., O'Farrelly C., Todryk S., Hegarty J.E., Feighery C., Doherty D.G. Selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15. *J Immunol* 2001, 167(6), 3129–3138.
 27. Stadholders R., Lubberts E., Hendriks R.W. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *J Autoimmun* 2018, 87, 1–15.
 28. Romme Christensen J., Börnsen L., Hesse D., Krakauer M., Sørensen P.S., Søndergaard H.B., Sellebjerg F. Cellular sources of dysregulated cytokines in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroinf* 2012, 9, 215.
 29. Hu D., Weiner H.L., Ritz J. Identification of cytolytic CD161- CD56+ regulatory CD8 T cells in human peripheral blood. *PLoS One* 2013, 8(3), e.59545.
 30. Cunnusamy K., Baughman E.J., Franco J., Ortega S.B., Sinha S., Chaudhary P., Greenberg B.M., Frohman E.M., Karandikar N.J. Disease exacerbation of multiple sclerosis is characterized by loss of terminally differentiated autoregulatory CD8+ T cells. *Clin Immunol* 2014, 152(1–2), 115–126.

CD56 EXPRESSION BY PERIPHERAL BLOOD CYTOTOXIC T CELLS IN MULTIPLE SCLEROSIS

© 2018 I.V. Kudryavtsev¹, A.G. Ilves², O.M. Novoselova², K.S. Rubanik¹, M.K. Serebriakova¹, L.N. Prakhova²

*E-mail: igorek1981@yandex.ru

¹Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", Saint-Petersburg, Russia;

²N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

Received: 14.04.2018. Accepted: 05.09.2018

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic inflammatory autoimmune disease of the central nervous system. Recent reports have shown CD3⁺CD8⁺ and their different subsets take part in neuroinflammation. During the current study frequency, phenotype as well as CD56 and CD57 expression of peripheral blood CD3⁺CD8⁺ cells derived from healthy volunteers (n = 52), MS subjects during relapse (n = 31) or remission (n = 20) were characterized using ten-color flow cytometry. CD3⁺CD8⁺ were divided into naïve, central (CM) and effector memory (EM), as well as effector cells (TEMRA) based on the expression of CD45RA, CD62L, CD27 and CD28. No differences were observed during the comparison of N, CM and TEMRA CD3⁺CD8⁺ subsets relative and absolute number between the groups, but the number of CM cells was decreased in MS groups. The relative and absolute number of "naïve" CD3⁺CD8⁺ cells were inversely related ($r = -0,512$, $p = 0,003$ and $r = -0,430$, $p = 0,014$, respectively) to the degree of disability of examined patients. The percentages of CD57⁺ cells were increased only within naïve and CM subsets in both MS groups compared with healthy volunteers. While the relative numbers of CD56⁺ cells were significantly evaluated in all investigated cytotoxic T cell subsets in MS group with the exception of TEMRA cells from patients during remission in comparison with control group. Our data demonstrate that CD56 level on CD3⁺CD8⁺ subsets may represent a biomarker of neuroinflammation in MS patients.

Key words: multiple sclerosis, cytotoxic T cells, flow cytometry, CD56 expression

Authors:

Kudryavtsev I.V.,  PhD, senior researcher, department of immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", St. Petersburg, Russia;
197376 St. Petersburg, acad. Pavlov str., 12, Scientific Research Institute of Experimental Medicine; Phone/fax: +78122342929,
E-mail: igorek1981@yandex.ru;
Ilves A.G., PhD, senior researcher, laboratory of neuroimmunology, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences St. Petersburg, Russia;
Novoselova O.M., junior researcher, laboratory of neurorehabilitation, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia;
Rubanik K.S., junior researcher, laboratory of neurorehabilitation, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia;
Serebriakova M.K., Research Associate, department of immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", St. Petersburg, Russia;
Prakhova L.N., MD, Head of the laboratory of neurorehabilitation, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia.