

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ ПУРИНЕРГИЧЕСКОГО СИГНАЛИНГА НА Т-ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Головкин А.С.¹, Серебрякова М.К.², Жидулева Е.В.¹,
Муртазалиева П.М.¹, Титов В.А.¹, Иртюга О.Б.¹,
Моисеева О.М.¹, Кробинец И.И.³, Кудрявцев И.В.^{2,4}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр
им. В. А. Алмазова», Санкт-Петербург

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт гематологии
и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург

⁴ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет имени академика И. П. Павлова»
Министерства здравоохранения РФ

Контактная информация:

Головкин Алексей Сергеевич
ФГБУ «НМИЦ им. В. А.
Алмазова» Минздрава России
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: golovkin_a@mail.ru

Статья поступила в редакцию 03.11.2017
и принята к печати 20.11.2017.

Резюме

Актуальность. Компоненты пуринергической системы (подобно цитокинам и хемокинам) принимают участие в регуляции функций различных клеток иммунной системы и развитии эффективного ответа, направленного на элиминацию внеклеточных и внутриклеточных патогенов, собственных измененных клеток и/или погибших клеток. Несмотря на активное исследование пуринергической регуляции в патогенезе многих заболеваний, уровень спонтанной экспрессии таких участников пуринергического сигналинга, как CD39 и CD73 на субпопуляциях Т-лимфоцитов здоровых доноров, мало изучен. **Целью** настоящего исследования было определение уровня экспрессии CD39 и CD73 на субпопуляциях Т-лимфоцитов периферической крови здоровых доноров, а также выявление возможных изменений, связанных с полом и возрастом обследуемых. **Материалы и методы.** В исследование включены 65 условно здоровых доноров в возрасте от 25 лет до 61 года. С использованием многоцветной проточной лазерной цитометрии на субпопуляциях Т-хелперов (Th), цитотоксических (Tcyt) и регуляторных (Tрег) Т-клеток на разных стадиях их дифференцировки, выявленных на основании экспрессии CD45R0 и CD62L — «наивные», фенотип CD45R0–CD62L+, клетки центральной памяти (СМ) — CD45R0+CD62L+, клетки эффекторной памяти (ЕМ) — CD45R0+CD62L–, а также «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные клетки (TEMRA) — CD45R0–CD62L–) оценивали уровни экспрессии CD39 и CD73. **Результаты.** У женщин количество CD73+ ЕМ ($p = 0,027$) и TEMRA ($p = 0,006$) цитотоксических Т-клеток было достоверно более высоким. Были выявлены положительные корреляционные связи с возрастом у CD39-позитивных «наивных» Th и Tcyt, а также ЕМ Tcyt; и отрицательные — с CD73+ «наивными» CD3+CD8+ клетками и СМ. Подтвердились предположения об уменьшении количества CD73+ клеток по мере повышения их «зрелости» по направлению «наивные» — СМ — ЕМ — TEMRA у цитотоксических Т-лимфоцитов. **Заключение.** Полученные результаты подтверждают предположение о влиянии пола и возраста на уровень экспрессии CD39 и CD73 на субпопуляциях Т-лимфоцитов здоровых доноров и открывают перспективы их изучения у пациентов с различными заболеваниями.

Ключевые слова: пуринергическая регуляция, CD39, CD73, Т-лимфоциты, здоровые доноры

Для цитирования: Трансляционная медицина. 2017; 4 (5): 46–60.

PURINERGIC SIGNALING RECEPTORS EXPRESSION ON PERIPHERAL T-LYMPHOCYTES OF HEALTHY DONORS

Golovkin A. S.¹, Serebryakova M. K.², Zhiduleva E. V.¹,
Murtazalieva P. M.¹, Titov V.A.¹, Irtuga O. B.¹, Moiseeva O. M.¹,
Krobinec I. I.³, Kudryavtsev I. V.^{2,4}

Corresponding author:

Alexey Golovkin
National Almazov Medical Research Centre
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341
E-mail: golovkin_a@mail.ru

¹ National Almazov Medical Research Centre, St. Petersburg

² Institution of experimental medicine, St. Petersburg

³ Russian research institute of hematology and transfusiology FMBA
Russia, St. Petersburg

⁴ Pavlov First Saint Petersburg medical university, St. Petersburg

Received 03 November 2017;
accepted 20 November 2017.

Abstract

Background. The components of the purinergic system participate in the function regulation of various immune system cells as well as in the development of an effective response aimed to extracellular and intracellular pathogens, altered and/or dead cells elimination. Despite the active research of purinergic regulation in the pathogenesis of many diseases, the level of spontaneous expression of such participants of purinergic signaling as CD39 and CD73 on the T-lymphocytes subpopulation of healthy donors has been little studied. **The aim** of the present study was to determine the expression of CD39 and CD73 on the peripheral T-lymphocytes subpopulations of healthy donors, and to identify possible changes related to the sex and age of the subjects. **Materials and methods.** The study included 65 healthy donors 25–61 years old. Multicolor flow cytometry was used to identify T-helpers (Th), T-cytotoxic (Tcyt), T-regulatory (Treg) cells and their subpopulations — Naïve (CD45R0–CD62L+), Central memory (CM) (CD45R0+CD62L+), Effector memory (EM) (CD45R0+CD62L–) and terminally differentiated CD45RA-positive effector cells (TEMRA) (CD45R0–CD62L–). Additionally CD39 and CD73 expression levels were detected. **Results.** The levels of CD73+ EM ($p = 0,027$) and TEMRA ($p = 0,006$) Tcyt in female subjects were significantly higher. Positive correlations with age were found in CD39+ Naïve Th and Tcyt and EM Tcyt. Negative correlations were detected with CD73+ Naïve and CM Tcyt. Assumptions that the number of CD73+ cells decreased in the direction of Naive-CM-EM-TEMRA in cytotoxic T-lymphocytes were confirmed. **Conclusions.** The results confirm the assumption of sex and age influence on the expression of CD39 and CD73 on the T-lymphocytes subpopulations of healthy donors

Key words: purinergic regulation, CD39, CD73, T-lymphocytes, healthy donors.

For citation: Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2017; 4 (5): 46–60.

В настоящее время ведется активное изучение роли пуринергического сигналинга в патогенезе широкого спектра заболеваний и патологических состояний, к числу которых относятся регуляция инфекционного и неинфекционного воспаления, опухолевого роста и метастазирования, реакции отторжения трансплантата, аутоиммунные заболевания, кальцификация элементов сердечно-сосудистой системы и т.д. Компоненты пуринергиче-

ской системы (подобно цитокинам и хемокинам) принимают участие в регуляции функций клеток иммунной системы и развитии эффективного ответа, направленного на элиминацию внеклеточных и внутриклеточных патогенов, собственных измененных клеток и/или погибших клеток [1, 2, 3, 4].

Внеклеточный АТФ как ключевой компонент пуринергической системы обладает широким спектром провоспалительных эффектов и участвует

в «тонкой» настройке иммунного ответа. Более того, АТФ относится к DAMP (от англ. «danger-associated-molecular-pattern») — эндогенным тканевым факторам, которые, в кооперации с другими сигналами, запускают и регулируют иммунный ответ. В частности, АТФ вовлечен в хемотаксис, продукцию активных форм кислорода фагоцитами и синтез цитокинов воспалительными клетками [1].

Аденозин обладает противоположными АТФ эффектами и играет ведущую роль в ограничении воспалительного ответа. Так, этот метаболит подавляет адгезию лейкоцитов к эндотелиальным клеткам микроциркуляторного русла, снижает уровень продукции активных форм кислорода нейтрофилами и угнетает синтез и секрецию провоспалительных цитокинов клетками различного происхождения [5]. С другой стороны, аденозин способствует выходу противовоспалительного IL10 из моноцитов, а также запускает продукцию VEGF (vascular endothelial growth factor) — мощного индуктора ангиогенеза и сосудистой проницаемости [6].

После выхода АТФ во внеклеточное пространство происходит дефосфорилирование данной молекулы различными сывороточными и мембранными ферментами. Основными нуклеотидазами, участвующими в этом процессе, являются CD39 (E-NTPDase1, от англ. «ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1») и CD73 (Ecto5'NTase, от англ. «ecto-5'-nucleotidase»). Первая метаболизирует АТФ до АДФ, пирофосфата и АМФ. Последний, в свою очередь, расщепляется до аденозина и фосфата с помощью поверхностного рецептора CD73 [7]. Таким образом, активность экзонуклеотидаз CD39 и CD73 обеспечивает баланс провоспалительного АТФ и противовоспалительного аденозина в очаге воспаления. Эти молекулы высоко экспрессируются на клетках многих тканей и органов: сердца, плаценты, легких, печени, кишечника, мозга, почек и др. Более того, данные мембранно-ассоциированные ферменты широко представлены на клетках иммунной системы: моноцитах, нейтрофилах, дендритных клетках, В-лимфоцитах, субпопуляциях Т-лимфоцитов [8].

В настоящее время показано, что пуриnergическая регуляция контролирует активность Т-клеток. Предполагается, что пуриновые нуклеотиды и нуклеозиды играют заметную роль в проведении сигнала, необходимого для распознавания антигена Т-клетками при формировании иммунологического синапса [9]. АТФ участвует в реакциях специфического иммунного ответа посредством регуляции дифференцировки и функциональной активности регуляторных Т-клеток (Трег) [10]. Аденозин является антагонистом АТФ и в отношении Т-клеток. Он подавляет активность некоторых популяций

Т-клеток (например, проявление цитолитических свойств или синтез цитокинов), в частности, Т-хелперов 17 (Th17) [1], а также активирует Трег. Кроме того, аденозин подавляет дифференцировку Тхелперов (Th) - Th1 и Th2 за счет снижения уровня пролиферативной активности и продукции IL2 [11].

Экспрессия CD39 и CD73 была показана на регуляторных клетках мыши и человека, а также на других типах Т-клеток [8]. Вместе с тем широкое внедрение многоцветного анализа при изучении циркулирующих Т-клеток методом проточной лазерной цитометрии позволило выявить субпопуляции Т-лимфоцитов, не детектировавшиеся ранее [12, 13]. Это позволило провести как оценку фенотипа, так и определить функциональные характеристики клеток в свете их участия в системе пуриnergической регуляции.

Несмотря на активное исследование пуриnergической регуляции в патогенезе многих заболеваний, уровень спонтанной экспрессии таких участников пуриnergического сигналинга, как CD39 и CD73 на субпопуляциях Т-лимфоцитов здоровых доноров, мало изучен. В настоящее время имеются лишь отдельные наблюдения о возможных возрастных и половых различиях [14]. Хотя именно этот аспект является наиболее важным на этапе изучения клинической значимости нарушений работы иммунной системы у пациентов с различными заболеваниями.

В связи с этим **целью** настоящего исследования было определение уровня экспрессии CD39 и CD73 на субпопуляциях Т-лимфоцитов периферической крови здоровых доноров, а также выявление возможных изменений, связанных с полом и возрастом обследуемых.

Материал и методы

В исследование включены 65 условно здоровых доноров в возрасте от 25 лет до 61 года (медиана возраста 45 (41;49) лет). Мужчин — 31, женщин — 34 человека. Медиана возраста мужчин составила 43 (40;48) лет, женщин — 46 (41;52). На момент исследования на состояние здоровья жалоб не предъявляли, и все были признаны условно здоровыми. Критериями исключения были острые или обострения хронических заболеваний, аутоиммунные, онкологические, психические заболевания в анамнезе, а также изменения при стандартном клиническом и биохимическом лабораторном обследовании, выходящим за пределы референсных значений.

Все исследования проводились с информированного согласия обследуемых 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.

Забор крови из кубитальной вены осуществляли натошак, в состоянии физического и эмоционального покоя вакуумными системами Vacuette с K_2EDTA . Все исследования проводились в день забора крови. Подготовку образцов для проведения цитофлуориметрического учета проводили в соответствии с общепринятыми рекомендациями [15].

Моноклональные антитела и проточная цитометрия.

Для выявления основных популяций Т-лимфоцитов и оценки уровня экспрессии ими CD39 и CD73 применялась следующая панель моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами — CD39-FITC (clone A1, cat. 328206, BioLegend, Inc., USA), CD25-PE (clone B1.49.9, cat. A07774, Beckman Coulter, USA), CD62L-ECD (clone DREG56, cat. IM2713U, Beckman Coulter, USA), CD45R0-PC5.5 (clone UCHL1, cat. IM2712U, Beckman Coulter, USA), CD4-PC7 (clone SFC112T4D11 (T4), cat. 737660, Beckman Coulter, USA), CD8-APC (clone B9.11, cat. IM2469, Beckman Coulter, USA), CD3-APC-Alexa Fluor 750 (clone UCHT1, cat. A94680, Beckman Coulter, USA), CD73-Pacific Blue (clone AD2, cat. 344012, BioLegend, Inc., USA) and CD45-Krome Orange (clone J33, cat. A96416, Beckman Coulter, USA). Распределение антител по канал флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [16, 17]. Указанным выше набором моноклональных 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). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора при 330g в течение 7 минут, после чего надосадок удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе с pH 7,2-7,4, содержащем 2% параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм.

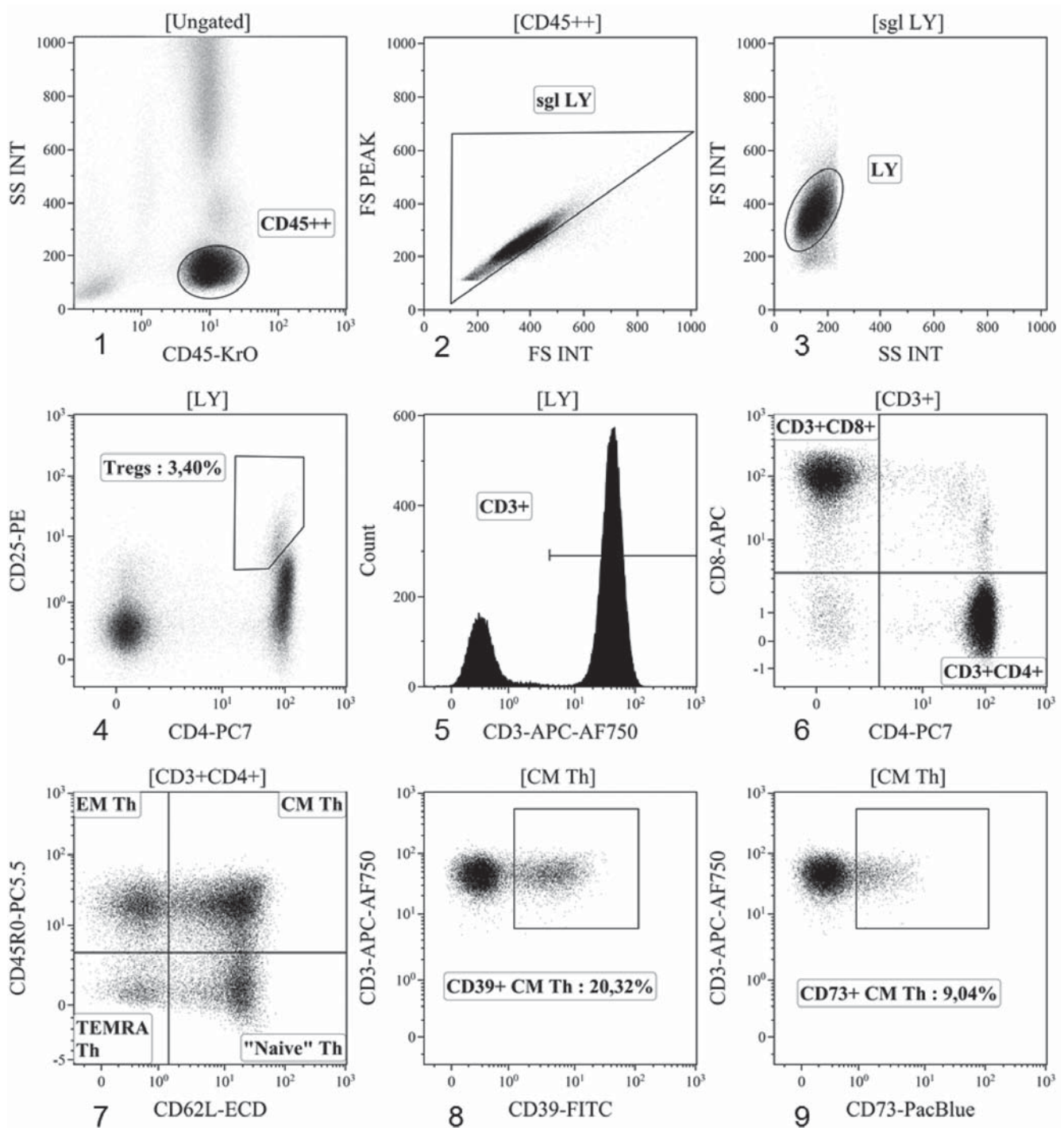
Все полученные результаты сравнивали в выборках для мужчин и для женщин, в разных возрастных группах (до 45 лет и старше 45 лет), а также

в зависимости от возраста с поправкой на пол обследуемых.

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 программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Нормальность распределения проверяли по критерию согласия Пирсона хи-квадрат. Результаты выражали в виде % позитивных клеток от искомой популяции и приводили в виде медианы и интерквартильного размаха (25%; 75%). Дисперсионный анализ проводили с использованием теста ANOVA. Достоверность различий оценивали с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни, а также t-критерия Стьюдента, корреляционный анализ — критерием Спирмена. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Для выявления основных популяций Т-лимфоцитов периферической крови применяли алгоритм (тактику «гейтирования»), приведенный на рисунке 1. Для каждого из образцов анализировали не менее 40000 одиночных лимфоцитов, выделенных с использованием гистограмм 1–3 рисунка 1. Затем при помощи гистограммы 4 на основании яркой экспрессии поверхностного CD25 и наличия на поверхности клеток CD4 выделяли регуляторные Т-клетки (область «Tregs»), фенотип которых можно было описать как CD4+CD25bright. На основании результатов собственных предварительных исследований и данных литературы [18] можно утверждать что в рамках данной популяции Т-хелперов относительное содержание Т-лимфоцитов, экспрессирующих транскрипционный фактор FoxP3, не менее 90-92%, что позволяет применять данный методический подход для выявления популяции Трег. С использованием гистограммы 5 в рамках общей популяции лимфоцитов периферической крови выявляли Т-лимфоциты на основании экспрессии CD3 — линейного маркера Т-клеточной линии дифференцировки клеток. Далее при помощи гистограммы 6 общую популяцию Т-клеток подразделяли на Т-хелперы (Th) с фенотипом CD3+CD4+ и цитотоксические Т-лимфоциты (Tcyt) (CD3+CD8+). В ходе дальнейших исследований проводили анализ субпопуляционного состава Трег, Th и цитотоксических Т-клеток. На каждой из указанных популяций Т-лимфоцитов проводили оценку уровней экспрессии CD45R0 и CD62L, как это было описано ранее [19, 20]. На основании экспрессии CD45R0 и CD62L клетки указанных выше популяций Т-лимфоцитов (показано на примере Т-хелперов с фенотипом

Рисунок 1. Тактика поэтапного гейтирования, применявшаяся для выявления основных субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови и анализа экспрессии поверхностных CD39 и CD73



Гистограмма 1: по оси абсцисс — уровень экспрессии CD45; по оси ординат — боковое светорассеяние (SS), характеризующее структуру («сложность» организации) цитоплазмы клеток; в области «CD45++» находятся клетки с высокой экспрессией CD45 и низкими значениями бокового светорассеяния. Гистограмма 2: по оси абсцисс — интегральный сигнал прямого светорассеяния; по оси ординат — пиковый сигнал прямого светорассеяния; в области «sgl LY» находятся не слипшиеся лимфоциты, на гистограмме отображены клетки из области «CD45++» гистограммы 1. Гистограмма 3: по оси абсцисс — боковое светорассеяние (SS); по оси ординат — прямое светорассеяние (FS), характеризующее размер клеток; в области «лимфоциты» находятся клетки соответствующие по своим размерам и структуре популяции лимфоцитов периферической крови. Описание последующих этапов выявления основных популяций Т-лимфоцитов («тактика гейтирования») приведена в разделе «Материалы и методы».

CD3+CD4+) были разделены на «наивные» клетки с фенотипом CD45R0–CD62L+ (Naïve на гистограмме 7 рисунка 1), клетки центральной памяти с фенотипом CD45R0+CD62L+ (CM), клетки эффекторной памяти, позитивные только по CD45R0 (EM) и «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные клетки (TEMRA), на поверхности которых оба исследованных антигена отсутствовали. Далее каждую из выделенных субпопуляций Т-клеток анализировали при помощи двухпараметрических гистограмм по уровням экспрессии CD3 и CD39 (гистограмма 8 рисунка 1), а также CD3 и CD73 (гистограмма 9 рисунка 1), как это показано на гистограммах 8 и 9 рисунка на примере популяции Т-хелперов центральной памяти.

Гистограмма 1: по оси абсцисс — уровень экспрессии CD45; по оси ординат — боковое светорассеяние (SS), характеризующее структуру («сложность» организации) цитоплазмы клеток; в области «CD45++» находятся клетки с высокой экспрессией CD45 и низкими значениями бокового светорассеяния. Гистограмма 2: по оси абсцисс — интегральный сигнал прямого светорассеяния; по оси ординат — пиковый сигнал прямого светорассеяния; в области «sgl LY» находятся не слипшиеся лимфоциты, на гистограмме отображены клетки из области «CD45++» гистограммы 1. Гистограмма 3: по оси абсцисс — боковое светорассеяние (SS); по оси ординат — прямое светорассеяние (FS), характеризующее размер клеток; в области «лимфоциты» находятся клетки соответствующие по своим размерам и структуре популяции лимфоцитов периферической крови. Описание последующих этапов выявления основных популяций Т-лимфоцитов («тактика гейтирования») приведена в разделе «Материалы и методы».

Результаты

Подходы к разделению Т-клеток на субпопуляции и возможные тактики гейтирования были описаны и апробированы нами ранее [12, 13, 21]. Анализ уровня экспрессии CD39 и CD73 на субпопуляциях Т-лимфоцитов (рисунок 2) продемонстрировал неравномерность в зависимости от зрелости клеток.

Обозначения на рисунке: «Naïve» — «наивные» Т-лимфоциты с фенотипом CD45R0–CD62L+; CM — Т-лимфоциты центральной памяти с фенотипом CD45R0+CD62L+; EM — Т-лимфоциты эффекторной памяти с фенотипом CD45R0+CD62L–; TEMRA — «терминально-дифференцированные» клетки эффекторной памяти с фенотипом CD45R0–CD62L–. N, C, E, T — различия с популяцией

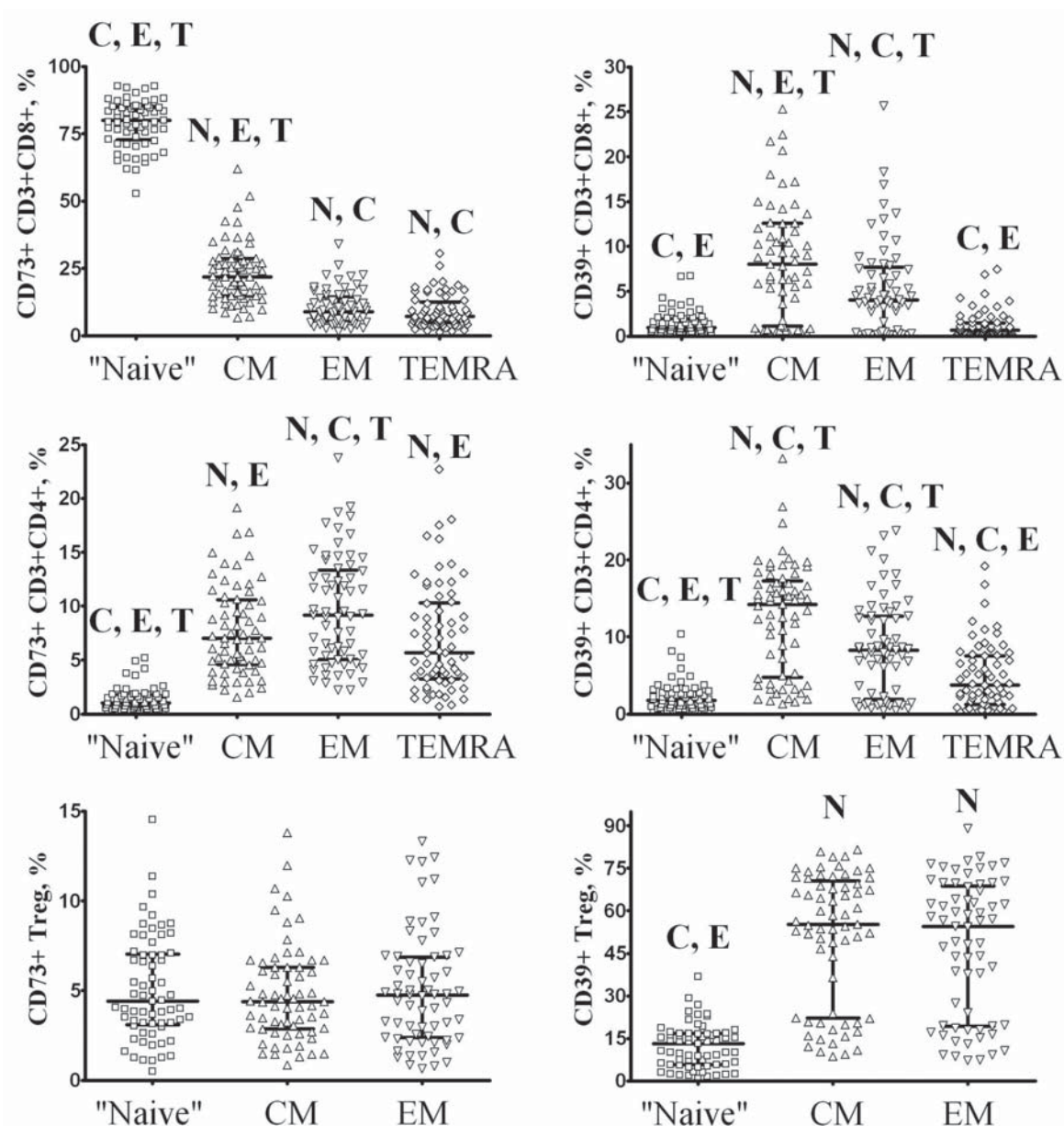
«наивных» клеток, клеток центральной памяти, клеток эффекторной памяти и клетками TEMRA достоверны при $p < 0,05$ согласно U-критерию Манна-Уитни.

При анализе основных популяций цитотоксических Т-клеток, выявленных при помощи антител против CD45R0 и CD62L, отмечено постепенное снижение относительного содержания CD73-позитивных клеток в линии «наивные» — CM — EM — TEMRA, для которых эти величины составили 79,91 (72,89; 85,03)%, 21,88 (14,78; 28,60)%, 8,91 (5,28; 13,72)% и 7,15 (5,09; 11,84) % соответственно (различия между всеми популяциями были достоверны при $p < 0,001$, кроме EM и TEMRA, между которыми различий отмечено не было ($p = 0,223$, рисунок 2). При анализе уровня экспрессии CD39 наблюдалась несколько другая динамика между сравниваемыми популяциями Tcut. Данный антиген практически не обнаруживался на CD3+CD8+ клетках с фенотипом CD45R0–CD62L+ — 0,94 (0,36; 1,87)%, но его экспрессия достигала своего максимума на клетках с фенотипом CD45R0+CD62L+, около 8 (1,17; 12,58)% которых несли его на своей поверхности. Полученные для CM значения достоверно ($p < 0,001$) превосходили показатели не только «наивных» Tcut, но и клеток EM ($p < 0,001$), для которых эта величина составляла 4,04 (0,49; 7,53)%, и клеток TEMRA (0,69 (0,21; 1,47)%, $p < 0,001$).

Проведенное нами исследование уровня CD73 на различных популяциях CD3+CD4+ клеток (рисунок 2) показало, что данная молекула лучше всего представлена на поверхности субпопуляций Th, уже прошедших антиген-зависимую стадию дифференцировки — 7,00 (4,63; 10,48)% и 9,18 (5,08; 13,24)% позитивных клеток среди CM и EM, соответственно ($p = 0,002$). «Наивные» клетки данный антиген практически не экспрессировали (всего около 1% позитивных клеток), тогда как среди TEMRA относительное содержание CD73+ клеток находилось в пределах 5%. Что же касается CD39, то на «наивных» клетках данный антиген практически не обнаруживался (около 2% CD39+ клеток), тогда как увеличение экспрессии CD45R0 сопровождалась почти десятикратным увеличением ($p < 0,001$) уровня CD39 в рамках данной популяции клеток. Снижение поверхностного CD62L и переход в стадию Т-хелперов эффекторной памяти приводило к двукратному снижению относительного содержания CD39-позитивных клеток (до 8,29 (2,27; 12,66)%). На зрелых эффекторных CD3+CD4+ лимфоцитах CD39 обнаруживался лишь на 3,75 (1,31; 7,54)% клеток.

Исследование субпопуляционного состава регуляторных Т-лимфоцитов не выявило достоверных различий по экспрессии CD73 между «наивными»

Рисунок 2. Относительное содержание CD73+ и CD39+ клеток среди цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-хелперов и регуляторных Т-клеток различного уровня созревания



Обозначения на рисунке: «Naive» — «наивные» Т-лимфоциты с фенотипом CD45R0–CD62L+; CM — Т-лимфоциты центральной памяти с фенотипом CD45R0+CD62L+; EM — Т-лимфоциты эффекторной памяти с фенотипом CD45R0+CD62L–; TEMRA — «терминально-дифференцированные» клетки эффекторной памяти с фенотипом CD45R0–CD62L–. N, C, E, T — различия с популяцией «наивных» клеток, клеток центральной памяти, клеток эффекторной памяти и клетками TEMRA достоверны при $p < 0,05$ согласно U-критерию Манна-Уитни.

клетками, клетками центральной и эффекторной памяти (рисунок 2). Тогда как относительное содержание CD39-позитивных клеток в рамках популяций CM и EM (55,22 (22,23; 69,52)% и 54,40 (19,38; 68,42)%, соответственно) достоверно (в обоих случаях $p < 0,001$) превосходило значения, полученные для Трег с фенотипом CD45R0–CD62L+, среди которых лишь 13,19 (5,74; 16,65)% несли данную молекулу на своей поверхности.

При проведении сравнительного анализа относительного содержания CD73-позитивных лим-

фоцитов в рамках популяций цитотоксических Т-клеток, Th и Трег с учетом гендерных различий было выявлено достоверно более высокий уровень CD73+ клеток EM Tcyt ($p = 0,027$) и TEMRA Tcyt ($p = 0,006$) у женщин (таблица 1). В тоже время уровень CD39+ клеток у мужчин и женщин не различался ни по одной из исследованных субпопуляций Т-лимфоцитов (таблица 2).

У здоровых доноров старшей возрастной категории (старше 45 лет) отмечался достоверно более низкий уровень «наивных» цитотоксических

Таблица 1. Общий уровень CD73+ клеток на субпопуляциях Т-лимфоцитов в зависимости от пола доноров, % от искомой популяции, Me (25;75)

Популяция Т-клеток	Мужчины (n = 31)	Женщины (n = 34)	p
Naïve Tcyt	79,39 (70,31;85,03)	80,69 (75,56;85,20)	0,478
CM Tcyt	19,89 (12,50;27,61)	24,86 (16,25;28,63)	0,152
EM Tcyt	6,34 (4,15;12,02)	10,41 (6,87;15,24)	0,027
TEMRA Tcyt	5,67 (3,81;8,79)	9,19 (6,17;16,32)	0,006
Naïve Th	0,74 (0,35;1,83)	1,05 (0,68;1,59)	0,494
CM Th	7,20 (3,97;11,33)	6,94 (5,00;10,10)	0,823
EM Th	8,15 (4,66;13,81)	9,38 (5,39;13,24)	0,599
TEMRA Th	6,21 (3,16;10,23)	5,67 (3,42;10,92)	0,947
Naïve Tper	3,97 (2,12;6,68)	4,73 (3,39;7,69)	0,131
CM Tper	3,60 (2,59;6,08)	4,64 (3,26;6,68)	0,074
EM Tper	4,16 (2,16;6,89)	4,98 (2,57;6,86)	0,368

Таблица 2. Общий уровень CD39+ клеток на субпопуляциях Т-лимфоцитов в зависимости от пола доноров, % от искомой популяции, Me (25;75)

Популяция Т-клеток	Мужчины (n = 31)	Женщины (n = 34)	p
Naïve Tcyt	1,05 (0,36;1,61)	0,84 (0,32;2,07)	0,984
CM Tcyt	8,04 (0,87;13,60)	8,10 (1,76;12,52)	0,717
EM Tcyt	3,93 (0,28;6,72)	4,44 (0,67;8,67)	0,415
TEMRA Tcyt	0,81 (0,17;1,61)	0,65 (0,21;1,47)	0,669
Naïve Th	2,13 (0,70;3,27)	1,25 (0,78;2,66)	0,214
CM Th	12,68 (4,64;16,82)	15,13 (5,28;18,40)	0,267
EM Th	8,29 (1,38;13,19)	8,13 (2,64;12,43)	0,838
TEMRA Th	3,89 (0,83;8,10)	3,52 (1,31;6,99)	0,947
Naïve Tper	13,82 (4,83;16,79)	11,58 (5,74;16,18)	0,824
CM Tper	53,65 (22,02;69,52)	58,09 (36,34;72,25)	0,454
EM Tper	44,00 (17,86;69,73)	57,26 (19,58;68,42)	0,331

Т-клеток, несущих на своей поверхности CD73 (младше 45 — 83,81 (78,33;87,13)%; старше 45 — 77,03 (71,13;82,90)%, при $p = 0,007$). При этом такая закономерность была отмечена только у доноров-женщин. У мужчин достоверных отличий в уровне экспрессии CD39 и CD73 на основных популяциях Т-клеток в разных возрастных группах отмечено не было.

В отношении CD39-позитивных клеток закономерностей, связанных с разделением всех обследуемых на две возрастные группы, отмечено не было.

Вместе с тем при проведении корреляционного анализа количества позитивных по CD73 или

CD39 Т-лимфоцитов и возрастом доноров, была зафиксирована достоверная ($p < 0,05$) отрицательная связь ($r = -0,517$) между уровнем «наивных» Тcyt, экспрессирующих CD73 и возрастом доноров-мужчин. У доноров-женщин достоверных ($p < 0,05$) корреляционных взаимосвязей с возрастом было зафиксировано больше. В частности отрицательные связи были отмечены с уровнем Naïve Tcyt CD73+ ($r = -0,520$) и CM Tcyt CD73+ ($r = -0,397$), а положительные с Naïve Tcyt CD39+ ($r = 0,361$), EM Tcyt CD39+ ($r = 0,367$) и Naïve Th CD39+ ($r = 0,378$).

Анализ выявленных взаимосвязей свидетельствует о том, что уровень экспрессии CD73 цитотоксическими Т-лимфоцитами у обследованных представителей обоих полов связан с возрастом пациентов. Кроме того, наблюдаются существенные возрастные изменения суммарной экспрессии CD39 и CD73 у доноров-женщин. Вместе с тем для дальнейших исследований и определения нормативных значений по CD39+ и CD73+ Т-лимфоцитам различных субпопуляций проводился анализ уровня коэкспрессии изучаемых регуляторных молекул без учета половых и возрастных различий (таблица 3).

Уровень экспрессии CD39 и CD73 на субпопуляциях цитотоксических Т-клеток выявил постепенное снижение CD73+CD39- клеток в линии «наивные» клетки — CM — EM — TEMRA (таблица 3). В то же время относительное содержание дважды-негативных (CD73-CD39-) в той же линии прогрессивно снижалось.

В отношении Т-хелперов отмечалась обратная тенденция. Так, относительное содержание CD73+CD39- среди «наивных» клеток было наименьшим, в то время как среди EM — наибольшим, сохраняя значительное присутствие и среди зрелых клеток популяции TEMRA. Большая часть субпопуляций CD3+CD4+ клеток была представлена CD73-CD39-. При этом наиболь-

шее количество дважды-негативных было отмечено среди «наивных» (97,12 (95,89; 98,05)%, а наименьшее — среди клеток центральной памяти (79,88 (75,24;84,78)%). Важно отметить, что в периферической крови условно здоровых доноров Т-хелперы, ко-экспресировавшие CD39 и CD73, практически не обнаруживались — их относительное содержание не превышало 0,20%.

Количество CD73-CD39- и CD73-CD39+ среди регуляторных Т-клеток центрально и эффекторной памяти распределялось примерно поровну. Среди «наивных» Трег и TEMRA Трег популяция CD73-CD39- преобладала.

Обсуждения

Несмотря на то, что многими авторами признается существенное значение пуринаргической системы в регуляции процессов воспаления и функции непосредственно Т-клеток, работ по оценке уровня экспрессии CD39 и CD73 на поверхности субпопуляций циркулирующих Т-лимфоцитов совсем немного [22].

Уровень экспрессии CD39 на Т-лимфоцитах у возрастных пациентов выше, чем у молодых, причем уровень экспрессии является генетически детерминированным [14]. Таким образом, возможные

Таблица 3. Коэкспрессия CD39 и CD73 различными субпопуляциями Т-лимфоцитов.

№	Популяции	Доля клеток (комбинация маркеров), %			
		CD73+CD39-	CD73+CD39+	CD73-CD39-	CD73-CD39+
1	Naïve Tcyt	79,38 (72,66;84,42) ^{2,3,4}	0,31 (0,15;0,58) ^{3,4}	19,43 (14,72;26,09) ^{2,3,4}	0,60 (0,12;1,08) ^{2,3}
2	CM Tcyt	21,67 (14,21;26,68) ^{1,3,4}	0,51 (0,21;0,87) ^{3,4}	68,87 (61,54;76,27) ^{1,3,4}	7,16 (0,86;12,01) ^{1,3,4}
3	EM Tcyt	8,75 (5,12;13,41) ^{1,2}	0,13 (0,03;0,35) ^{1,2,4}	85,26 (78,46;91,00) ^{1,2,4}	3,88 (0,45;7,12) ^{1,2,4}
4	TEMRA Tcyt	6,85 (5,06;11,81) ^{1,2}	0,07 (0,03;0,14) ^{1,2,3}	91,57 (86,54;94,28) ^{1,2,3}	0,62 (0,20;1,36) ^{2,3}
5	Naïve Th	0,95 (0,40;1,53) ^{6,7,8}	0,06 (0,04;0,10) ^{6,7,8}	97,12 (95,89;98,05) ^{6,7,8}	1,69 (0,74;2,70) ^{6,7,8}
6	CM Th	6,30 (4,44;10,28) ^{5,7}	0,36 (0,20;0,58) ^{5,8}	79,88 (75,24;84,78) ^{5,8}	13,47 (4,32;16,27) ^{5,7,8}
7	EM Th	8,91 (4,83;13,01) ^{5,6,8}	0,21 (0,10;0,37) ⁵	83,21 (75,84;86,82) ^{5,8}	7,88 (2,05;12,49) ^{5,6,8}
8	TEMRA Th	5,63 (3,10;10,13) ^{5,7}	0,12 (0,01;0,29) ^{5,6}	89,30 (84,67;93,41) ^{5,6,7}	3,70 (1,15;7,21) ^{5,6,7}
9	Naïve Treg	3,63 (2,50;5,81) ^{10,11}	0,71 (0,25;1,15) ^{10,11,12}	83,20 (79,94;88,75) ^{10,11,12}	12,37 (5,28;15,77) ^{10,11}
10	CM Treg	2,21 (1,30;3,93) ^{9,12}	1,81 (0,79;2,78) ⁹	41,01 (29,40;70,51) ^{9,12}	53,88 (22,01;67,01) ⁹
11	EM Treg	2,50 (1,18;4,11) ^{9,12}	1,08 (0,61;2,88) ⁹	42,29 (29,35;75,63) ^{9,12}	52,21 (19,07;62,50) ⁹
12	TEMRA Treg	6,02 (0,01;9,38) ^{10,11}	0,01 (0,01;3,85) ⁹	62,50 (43,37;79,20) ^{9,10,11}	—

Примечания: ¹⁻¹² — различие с популяцией, обозначенной соответствующим номером, статистически значимо ($p < 0,05$). Сравнения проводились только внутри соответствующих популяций клеток: Tcyt, Th, Treg.

возрастные особенности экспрессии целесообразно учитывать при анализе результатов пациентов с различными заболеваниями.

При исследовании субпопуляций Т-лимфоцитов было показано, что уровень экспрессии CD39 и CD73 на поверхности Т-клеток может меняться по мере их созревания и активации. Так, «наивные» цитотоксические Т-клетки экспрессируют экзонуклеотидазу CD73, которая быстро снижается при активации и дифференцировке в эффекторные Т-клетки. И наоборот, экспрессия CD39 увеличивается при активации Т-клеток. Клетки центральной памяти и эффекторной памяти экспрессируют обе нуклеотидазы – CD39 и CD73 — на своей поверхностной мембране [23].

Литературные данные указывают на то, что наличие CD39 на поверхностной мембране характерно в среднем для 6% общей популяции циркулирующих цитотоксических Т-клеток условно здоровых доноров [24]. При этом считается, что экспрессия CD39 может служить одним из признаков зрелых антиген-специфических CD3+CD8+ лимфоцитов, как это было показано для вирус-специфических клеток при ВИЧ-инфекции и хроническом вирусном гепатите С. По-видимому, длительная хроническая активация цитотоксических Т-клеток антигенами, которые не могут быть элиминированы из организма, приводит к накоплению пула CD39+ клеток в периферической крови. Это наблюдение подтверждается обнаруженной высокой корреляционной зависимостью между уровнем антиген-специфических CD39+CD8+CD3+ клеток в циркуляции и вирусной нагрузкой у больных ВИЧ и хроническим вирусным гепатитом С [24]. Более того, сходные результаты были получены в экспериментах с мышами, когда на фоне хронической инфекции, вызванной вирусом лимфоцитарного хориоменингита, в крови экспериментальных животных наблюдалось накопление CD39+CD8+ клеток. Вместе с тем в случае цитотоксических Т-лимфоцитов CD39 может рассматриваться в качестве одного из маркеров регуляторных CD8+ Т-клеток. Так, в условиях *in vitro* CD8+CD39+CD26– клетки периферической крови условно здоровых добровольцев обладали выраженной супрессорной активностью по отношению к активированным Т-хелперам [25]. В рамках другого исследования было показано, что CD39+CD8+ лимфоциты экспрессируют некоторые молекулы (CD25, Foxp3, LAG-3 и CCL4), характерные для «классических» регуляторных Т-клеток с фенотипом CD4+CD25+FoxP3+ [26]. Данная популяция лимфоцитов была способна снижать эффективность антиген-специфической пролиферации Т-хелперов 1 типа в условиях

in vitro, тогда как подавление активности CD39 при помощи блокирующих антител частично отменяла этот эффект «регуляторных» CD3+CD8+ клеток.

Экспрессия экзонуклеотидаз на поверхности Т-клеток может поддерживать аутокринный аденозиновый сигналинг, который необходим для CD8+ Т-клеток памяти. Аденозин, продуцируемый CD73, является медиатором формирования системы, которая блокирует дифференцировку Т-клеток, что способствует более эффективному формированию долгоживущих Т-клеток памяти [23]. С другой стороны, было показано, что «наивные» CD45RA+CD45RO– CD8+ Т-клетки, экспрессирующие CD73, обладают низкой чувствительностью к активации *in vitro* при помощи анти-CD3 антител, но при добавлении в среду для культивирования анти-CD73 антител, уровень пролиферативной активности клеток резко увеличивался [27]. По мнению авторов, CD73 может участвовать в проведении сигнала внутрь клетки при активации, так как его активация при помощи специфических антител сопровождалась увеличением уровня фосфорилирования белков цитоплазмы. Следует отметить, что данные о роли самого CD73, а также формируемого им внеклеточного аденозина, в дифференцировке «наивных» CD8+ Т-клеток весьма фрагментарны, хотя некоторые авторы [23] предполагают, что продукция аденозина приводит к остановке дифференцировки Т-клеток в отсутствие сильной сигнализации через Т-клеточный рецептор, что может являться одним из потенциальных механизмов ограничения аутоагрессии при формировании клона антиген-специфических клеток.

Снижение уровня экспрессии CD73 на цитотоксических Т-лимфоцитах по мере созревания можно рассматривать как один из способов реализации эффекторных функций этих клеток в очаге воспаления. Наличие на поверхностной мембране CD73, способного генерировать во внеклеточном пространстве противовоспалительный аденозин, может ограничиваться функциональную активность CD3+CD8+ клеток по отношению к клеткам-мишеням посредством A2AR рецепторов. Именно поэтому определение нормативных показателей по экспрессии этой молекулы цитотоксическими Т-лимфоцитами является важной задачей, а полученные результаты могут найти применение в клинической лабораторной диагностике. Например, у больных с ANCA-ассоциированным васкулитом (ANtineutrophil Cytoplasmic Antibody) относительное содержание CD73+CD45RA– и CD45RA+ цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови было значительно ниже значений контрольной группы [28]. Более того, уровень CD73-позитивных клеток на-

ходился в обратной зависимости с содержанием С-реактивного белка в сыворотке крови больных, а повышение количества этих клеток ассоциировалось с увеличением скорости клубочковой фильтрации и обнаружением микроРНК-31 — регулятора фактора, подавляющего активность HIF 1 α (гипоксия-индуцируемого фактора 1 альфа).

Субпопуляции клеток памяти Т-хелперов также могут нести на себе CD39 [29, 30]. Хотя для CD39+ Т-клеток и характерна АТФ-азная активность, они не обладают иммуносупрессивными свойствами. Вследствие этого было высказано предположение, что экспрессия CD39 клетками памяти может, наоборот, способствовать угнетению текущих воспалительных процессов или/и защищать эти клетки от АТФ-индуцированного апоптоза/некроза в условиях очага воспаления [30].

Принципиальные отличия между CD39+ и CD39– Т-хелперами были отмечены при исследовании функциональной активности этих популяций клеток в условиях *in vitro* [14]. Наличие CD39 на поверхностной мембране связано с более высоким уровнем экспрессии транскрипционного фактора Т-bet, выраженной продукцией эффекторных цитокинов (IL4, IL17 и IFN γ) и сниженным синтезом IL2, что позволило рассматривать эти клетки в качестве зрелой эффекторной популяции Т-хелперов. Вместе с тем CD39-негативные Т-клетки эффективно секретировали IL2 и IL21, а при сокультивировании с аутологичными «наивными» В-лимфоцитами запускали дифференцировку В-клеток в сторону плазматических клеток. Кроме того, CD39+ Т-хелперы были более восприимчивы к проапоптотическим сигналам *in vitro* по сравнению с CD39– клетками. Перенос генетических конструкций, содержащих CD39, в цитоплазму CD39-негативных Т-клеток сопровождался увеличением уровня погибших клеток в образцах. Еще одной особенностью CD39+ Т-хелперов была более высокая экспрессия рецептора для аденозина A2AR, взаимодействие которого со своими лигандами в очаге воспаления сопровождается запуском апоптоза в эффекторных клетках, что способствует ограничению воспалительной реакции в тканях.

Как уже отмечалось выше, CD39+ Т-хелперы являются зрелыми или «поляризованными» эффекторами, способными к продукции широкого спектра цитокинов, специфичных для Th1, Th2 и Th17, но не фолликулярных Т-хелперов. Вместе с тем наличие на поверхности CD3+CD4+ клетки CD39 и CD161 одновременно позволяет выявить субпопуляцию Th17 [31]. Более того, CD39+CD161+ клетки периферической крови экспрессировали высокий уровень мРНК ключевых хемокиновых

рецепторов (CCR5, CCR6 и CXCR3) и рецепторов для цитокинов (TGFR1, IL23R и IL6R), характерных для Th17. В ответ на стимуляцию *in vitro* в клетках данной популяции увеличивался уровень экспрессии генов, кодирующих IL17, IL22 и транскрипционного фактора ROR γ . В периферической крови и биоптатах слизистых оболочек больных с болезнью Крона уровень этих клеток был существенно выше такового условно здоровых доноров. Причем оценка относительного содержания клеток данной субпопуляции Т-хелперов в крови больных позволяла отличить активную форму болезни Крона от неактивной, что позволяет использовать оценку уровня CD39+CD161+CD4+ клеток в диагностических целях [32].

Уровень экспрессии поверхностного CD73 Т-хелперами периферической крови находится на весьма низком уровне при сравнении с цитотоксическими Т-лимфоцитами. Это соотносится с литературными данными, указывающими на то, что большая часть молекул CD73 обычно локализуется во внутриклеточном компартменте Т-хелперов (до 20% клеток), тогда как лишь 1–7% Т-хелперов несут ее на своей поверхности [33]. Вместе с тем, нами было отмечено увеличение относительного содержания CD73+ клеток в рамках субпопуляций CD3+CD4+ лимфоцитов, прошедших антиген-зависимую дифференцировку. Причем, относительно высокий уровень данного антигена сохранялся на клетках эффекторной памяти, способных покидать кровотоки и мигрировать в периферические ткани. Возможно, в случае Т-хелперов, подобно CD3+CD8+ лимфоцитам, CD73 и аденозин играют роль в ограничении функциональной активности потенциально аутореактивных клонов клеток. Эти механизмы могут быть реализованы как в рамках лимфоидной ткани, так и на периферии, когда мишенью для аденозина являются зрелые эффекторные лимфоциты. Например, Th17 могут нести CD39 и CD73 и угнетать иммунный ответ за счет продукции аденозина [34]. Одновременная экспрессия CD39 и CD73 на этих клетках регулируется факторами, которые индуцируют дифференцировку Th17, а именно провоспалительным IL6 и противовоспалительным TGF- β .

Что же касается Трег как отдельной высоко специализированной популяции Т-хелперов, то уровень экспрессии CD39 на поверхностной мембране пропорционален уровню FOXP3 в их ядре [35]. Более того, существовали предложения об использовании CD39 в качестве дополнительного маркера всех Трег [7]. Катаболическая активность пары CD39/CD73 тесно связана с уровнем активации этих клеток. В экспериментах на лабораторных живот-

ных отмечалось, что повышенная активность CD39 на Трег наблюдается только после активации посредством Т-клеточного рецептора (35). Считается, что повышенный метаболизм АТФ является критическим для иммуносупрессивной активности регуляторных Т-клеток [36, 37]. Кроме того, высказано предположение, что усиленная активность CD39 облегчает выход этих клеток в очаги воспаления, где они снижают уровень внеклеточного АТФ, тем самым снижая опосредованную P2-рецепторами гибель Трег [35]. На CD39-дефицитных мышах показано, что CD39 совместно с CD73 осуществляет внеклеточную продукцию аденозина, который опосредует значительную часть иммуносупрессивной и противовоспалительно активности Трег [8].

Уровень экспрессии CD39 регуляторными Т-лимфоцитами среди группы условно здоровых доноров может находиться в пределах от 10% до 60% клеток [35]. Однако при сравнении данной группы и больных рассеянным склерозом было отмечено, что у пациентов уровень CD39+ регуляторных Т-клеток в периферической крови снижен почти в два раза [33]. Сходные результаты были получены другой группой авторов, показавших, что в периферической крови больных с рецидивирующе-ремиттирующей формой заболевания уровень CD39+ Трег снижен по сравнению не только с группой контроля, но и с группой больных с вторично прогрессирующим рассеянным склерозом [38]. Увеличение уровня CD39+ регуляторных Т-клеток в циркуляции отмечалось при исследовании патогенеза хронического вирусного гепатита В [39]. Повышенное относительное содержание клеток данной популяции было повышено у больных с асимптомным носительством вируса при сравнении не только с условно здоровыми донорами, но и больными с активной формой хронического гепатита В, а также с пациентами, у которых наблюдалась острая или хроническая печеночная недостаточность, связанная с вирусом. Более того, увеличение CD39+ Трег в крови коррелировало с увеличением вирусной нагрузки, но обладала обратной зависимостью с уровнем аланинаминотрансферазы в сыворотке крови. Существенный прирост CD39-позитивных Трег в циркуляции отмечается и при онкологических заболеваниях [37]. Причем, как это было показано для больных с колоректальным раком, обнаруживается прямая зависимость между экспрессией CD39 на CD4+CD25+CD127^{low} Трег и уровнем мРНК рецептора для аденозина A2AR лейкоцитами периферической крови больных.

В нашем исследовании показано, что экспрессия CD73 на субпопуляциях Т-лимфоцитов здоро-

вых доноров может иметь гендерные особенности. У женщин количество CD73+ позитивных EM и TEMRA цитотоксических Т-клеток было достоверно более высоким. Наряду с этим, мы подтвердили, что уровень экспрессии экзонуклеотидаз может быть связан с возрастом пациентов, что особенно хорошо заметно у женщин. Были выявлены положительные корреляционные связи с возрастом у «наивных» Tcyt CD39+, EM Tcyt CD39+, CD39+ «наивных» Th и отрицательные — с CD73+ «наивными» и CM Tcyt.

Подтвердились предположения об уменьшения количества CD73+ клеток по мере повышения их «зрелости» по направлению «наивные» — CM — EM — TEMRA среди цитотоксических Т-лимфоцитов. Относительно CD39+ клеток такой однозначной закономерности не прослеживалось. Однако, наблюдалась тенденция к увеличению относительного содержания CD39+ лимфоцитов в рамках клеток центральной памяти, «патрулирующих» Т-зависимые зоны лимфатических узлов и Пейеровых бляшек и способных осуществлять регуляторные функции в рамках лимфоидной системы. Клетки эффекторной памяти с фенотипом CD45R0+CD62L- способны к миграции в периферические ткани, и в состав данной популяции могут входить как регуляторные, так и антиген-специфические клетки. Тогда как при переходе в эффекторную фазу созревания CD3+CD8+ уровень CD39 снижается до минимальных значений, что, видимо, связано с необходимостью выполнять реакции контактного цитолиза в очаге проникновения патогена и активации под действием местных провоспалительных факторов.

Все субпопуляции Т-хелперов были представлены преимущественно дубль-негативными клетками. Вместе с тем позитивные по CD39 клетки относились преимущественно к клеткам центральной и эффекторной памяти. Скорее всего, низкий уровень экспрессии экзонуклеотидаз на Т-хелперах можно объяснить отсутствием активных воспалительных процессов у здоровых доноров.

Заключение.

Пуриnergическая регуляция функционирования Т-клеток играет важную роль в иммунном ответе. Результаты исследований последних лет указывают на высокую значимость определения уровней CD39 и CD73 на различных популяциях циркулирующих Т-лимфоцитов в диагностике, мониторинге эффективности терапии и прогнозе многих заболеваний. Вместе с тем, для использования данных подходов в клинической лабораторной диагностике целесообразно определить нормативные

величины с учетом влияния половых и возрастных особенностей пациентов на изучаемые параметры. В нашем исследовании показано, что у женщин количество CD73+ позитивных EM и TEMRA цитотоксических Т-клеток было более высоким. Установлена связь между уровнем экспрессии экзонуклеотидаз и возрастом обследованных пациентов. Выявлены положительные корреляционные связи с возрастом у CD39-позитивных «наивных» Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток, а также EM Tсут; тогда как отрицательные — с CD73+ «наивными» CD3+CD8+ клетками и клетками центральной памяти. Подтвердились предположения об уменьшения количества CD73+ клеток по мере повышения их «зрелости» по направлению «наивные» — CM — EM — TEMRA у цитотоксических Т-лимфоцитов.

Финансирование/Funding

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-34-60199).

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Faas MM, Sáez T, de Vos P. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses? *Molecular Aspects of Medicine*. 2017; Vol. 55: 9–19.
2. Zhao H, Bo C, Kang Y, Li H. What else can CD39 tell us? *Front Immunol*. 2017; 8: 1–10.
3. Burnstock G. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol*. 2009;147(S1):S172–81.
4. Serebryanay N.B. Nucleotides as regulators of the immune response. *Immunology*. 2010; 31 (5): 73–280. In Russian [Серебряная Н.Б. Нуклеотиды как регуляторы иммунного ответа. *Иммунология*. 2010; 31 (5): 273–280].
5. Barletta KE, Ley K, Mehrad B. Regulation of Neutrophil Function by Adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32: 856–864
6. Koscsó B, Csóka B, Selmezy Z, et al. Adenosine Augments IL-10 Production by Microglial Cells through an A2B Adenosine Receptor-Mediated Process. *J Immunol*. 2012; 188 (1): 445–453.
7. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 2013; 19 (6): 355–367.
8. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007;204 (6): 1257–1265.
9. Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11 (3): 201–212.
10. Trabanelli S, Očadlíková D, Gulinelli S, et al. Extracellular ATP Exerts Opposite Effects on Activated and Regulatory CD4+ T Cells via Purinergic P2 Receptor Activation. *J Immunol*. 2012; 189 (3): 1303–1310.
11. Csóka B, Himer L, Selmezy Z, et al. Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J*. 2008; 22 (10): 3491–3499.
12. Kudryavtsev IV. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. *Russian immunology journal*. 2014;8 (4(17)):947–964. In Russian [Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки. *Российский иммунологический журнал*. 2014;8(4 (17)):947–964].
13. Kudryavtsev IV, Borisov AG, Krobinets II, et al. Multicolor flow cytometric analysis of cytotoxic T-cells subsets. *Medical immunology (Russia) = Meditsinskaya Immunologiya*. 2015; 17 (6): 525–538. In Russian [Кудрявцев, И.В., Борисов, А.Г., Кробинец, И.И., с соавт. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии. *Медицинская иммунология*. 2015; 17 (6): 525–538].
14. Fang F, Yu M, Cavanagh MM, et al. Expression of CD39 on Activated T Cells Impairs their Survival in Older Individuals. *Cell Rep*. 2016; 14 (5): 1218–1231.
15. Khaidukov SV, Baidun LA, Zurochka AV, Totolyan Areg A. Standardized technology “study of peripheral lymphocytes subpopulations using flow cytometers-analyzers” (project). *Medical immunology (Russia) = Meditsinskaya Immunologiya*. 2012; 14 (3): 255–268. In Russian [Хайдуков С.В., Байдун, Л.А., Зурочка, А.В., Тотолян, Арег А. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект). *Медицинская иммунология*. 2012; 14 (3): 255–268].
16. Kudryavtsev IV, Subbotovskaya AI. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Medical immunology (Russia) = Meditsinskaya Immunologiya*. 2015; 17 (1): 19–26. In Russian [Кудрявцев, И.В., Субботовская АИ. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шести-цветного цитофлуориметрического анализа. *Медицинская иммунология*. 2015; 17 (1): 19–26].

17. Mahnke Y., Roederer M. Optimizing a Multicolor Immunophenotyping Assay. *Clin Lab Med.* 2007; 27 (3): 469–485.
18. Garcia Santana CA, Tung JW, Gulnik S. Human treg cells are characterized by low/negative CD6 expression. *Cytom Part A.* 2014; 85 (10): 901–908.
19. Kudryavtsev IV, Savitsky VP. Multicolor analysis of the main subpopulations of T-helpers and cytotoxic T cells by flow cytometry. *Russian journal of immunology.* 2012; 6 (3 (1) (14): 94–97. In Russian [Кудрявцев, И.В., Савицкий В.П. Многоцветный анализ основных субпопуляций Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток методом проточной цитофлуориметрии. *Российский иммунологический журнал.* 2012;6(3(1)(14):94–97].
20. Kudryavtsev IV, Elezov DC. Analysis of the main peripheral cytotoxic T-lymphocytes subpopulations based on the expression of CD27, CD28, CD45R0 and CD62L. *Russian journal of immunology.* 2013; 7 (16) (2–3 (1)): 57–61. In Russian [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].
21. Barbarash L, Kudryavtsev I, Rutkovskaya N, Golovkin A. T Cell Response in Patients with Implanted Biological and Mechanical Prosthetic Heart Valves. *Mediat inflammation.* 2016; 2016 (Article ID 1937564): 12 pages.
22. Sokhnevich NA, Khaziakhmatova OG, Yurova KA, et al. Phenotypic characterization and functional features of memory T- And B-cells. *Cell and tissue biology.* 2015; 57 (5): 311–318. In Russian [Сохневич, Н.А.; Хазиахматова, О.Г.; Юрова, К.А.; Шуплетова, В.В.; Литвинова ЛС. Фенотипическая характеристика и функциональные особенности Т- и В-клеток иммунной памяти. *Цитология.* 2015; 57 (5): 311–318].
23. Bono MR, Fernandez D, Flores-Santibez F, Roseblatt M, Sauma D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett.* 2015; 589 (22): 3454–3460.
24. Gupta PK, Godec J, Wolski D, et al. CD39 Expression Identifies Terminally Exhausted CD8+ T Cells. *PLoS Pathog.* 2015; 11 (10): 1–21.
25. Wen Z, Shimojima Y, Shirai T, et al. NADPH oxidase deficiency underlies dysfunction of aged CD8+ Tregs. *J Clin Invest.* 2016; 126 (5): 1953–1967.
26. Boer MC, van Meijgaarden KE, Bastid J, et al. CD39 is involved in mediating suppression by *Mycobacterium bovis* BCG-activated human CD8⁺ CD39⁺ regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2013; 43 (7): 1925–1932.
27. Dinzani U, Redoglia V, Bragardo M, et al. Co-stimulatory signal delivered by CD73 molecule to human CD45RAhiCD45ROlow (naive) CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 1993; 151 (8): 3961–3970.
28. Kling L, Benck U, Breedijk A, et al. Changes in CD73, CD39 and CD26 expression on T-lymphocytes of ANCA-associated vasculitis patients suggest impairment in adenosine generation and turn-over. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 11683.
29. Moncrieffe H, Nistala K, Kamhieh Y, et al. High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population. *J Immunol.* 2010; 185 (1): 134–143.
30. Zhou Q, Yan J, Wu Y, Sun X. Isolated CD39 Expression on CD4 + T Cells Denotes. *Am J Transplant.* 2009; 6 (2): 2303–2311.
31. Bai A, Moss A, Kokkotou E, et al. CD39 and CD161 Modulate Th17 Responses in Crohn's Disease. *J Immunol.* 2014; 193 (7): 3366–3377.
32. Bai A, Robson S. Beyond ecto-nucleotidase: CD39 defines human Th17 cells with CD161. *Purinergic Signal.* 2015;11 (3): 317–319.
33. Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, et al. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J Biol Chem.* 2010; 285 (10): 7176–7186.
34. Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, et al. Stat3 and Gfi-1 Transcription Factors Control Th17 Cell Immunosuppressive Activity via the Regulation of Ectonucleotidase Expression. *Immunity.* 2012; 36 (3): 362–373.
35. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 2007;110(4):1225–1232.
36. Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *J Immunol;* 185 (4): 1993–1998.
37. Zhulai GA, Oleinik EK, Churov A V., et al. Significance of Treg cells for adenosine-mediated immune suppression in colorectal cancer. 2017; 19 (1): 89–94.
38. Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, et al. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol* 2009; 183 (11): 7602–7610.
39. Tang Y, Jiang L, Zheng Y, Ni B, Wu Y. Expression of CD39 on FoxP3+ T regulatory cells correlates with progression of HBV infection. *BMC Immunol.* 2012; 13 (1): 17.

Информация об авторах:

Головкин Алексей Сергеевич, д.м.н., руководитель группы генно-клеточной инженерии Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Серебрякова Мария Константиновна, младший научный сотрудник отдела иммунологии Института экспериментальной медицины;

Жидулева Екатерина Викторовна, аспирант ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Муртазалиева Патимат Муртазалиевна, аспирант ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Титов Владислав Андреевич, аспирант ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Иртюга Ольга Борисовна, к.м.н., научный сотрудник ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Моисеева Ольга Михайловна, д.м.н., профессор, заведующая отделом некоронарогенных заболеваний сердца ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Кробинец Ирина Ивановна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории изосерологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России»;

Кудрявцев Игорь Владимирович, к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии Института экспериментальной медицины; доцент кафедры иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова»;

Author information:

Alexey S. Golovkin, MD, PhD, Principle investigator, institute of molecular biology and genetics, National Almazov medical research Centre;

Maria K. Serebryakova, Research Associate, immunology department, Institution of experimental medicine;

Ekaterina V. Zhiduleva, MD, PhD student, National Almazov medical research Centre;

Patimat M. Murtazalievna, MD, PhD student, National Almazov medical research Centre;

Vladislav A. Titov, MD, PhD student, National Almazov medical research Centre;

Olga B. Irtuga, MD, PhD, Senior Research Associate, National Almazov medical research Centre;

Olga M. Moiseeva, MD, PhD, professor, Head of the Research Department of Noncoronary Heart Disease, National Almazov medical research Centre;

Irina I. Krobinets, PhD, Senior Research Associate, Russian research institute of hematology and transfusiology FMBA Russia;

Igor V. Kudryavtsev, PhD, Senior Research Associate, immunology department, Institution of experimental medicine; assistant professor, department of immunology, Pavlov First Saint Petersburg medical university.