

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Пермский государственный национальный исследовательский университет»
Биологический факультет
Кафедра микробиологии и иммунологии

Представлено на кафедру:
«___» _____ 20___ г.

Зав. кафедрой _____

Новые маркеры для исследования пролиферации CD4⁺ Т-лимфоцитов человека

Направление 06.03.01 Биология

Квалификация: бакалавр

Профиль: Микробиология

Выпускная квалификационная
работа студентки 4 курса очной
формы обучения
Марченко Дарьи Максимовны

(подпись)

Научный руководитель
канд. биол. наук
Сайдакова Евгения Владимировна

(подпись)

Пермь – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ	
ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1. <i>Пролиферация Т-лимфоцитов</i>	5
1.2. <i>Исследование пролиферации</i>	7
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	14
2.1 <i>Получение биологического материала</i>	14
2.2 <i>Разморозка образцов</i>	14
2.3 <i>Культивирование клеток</i>	15
2.4 <i>Окрашивание Т-лимфоцитов</i>	15
2.5 <i>Гейтирование субпопуляций Т-лимфоцитов</i>	16
2.6 <i>Статистическая обработка результатов</i>	19
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	20
3.1 <i>Особенности экспрессии Ki67</i>	20
3.2 <i>Особенности экспрессии CD71</i>	22
3.3 <i>Взаимосвязь экспрессии CD71 и Ki67</i>	25
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	29
ВЫВОДЫ	31
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	32
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	33

ВВЕДЕНИЕ

Т-лимфоциты, экспрессирующие молекулу CD4, играют важную роль в формировании иммунного ответа [Zhu, Paul, 2008]. Благодаря пролиферации в периферических лимфоидных органах они быстро увеличивают свою численность для эффективной борьбы с патогенами [Liao *et al.*, 2016]. Нарушение в процессе деления CD4⁺ Т-клеток приводит к возникновению различных заболеваний. Так, в случае неограниченной пролиферации Т-лимфоцитов возникают злокачественные новообразования – лимфомы. Напротив, недостаточное деление Т-клеток обуславливает развитие хронических инфекционных [Chou, Effros, 2013] и аутоиммунных заболеваний [Moulton, Tsokos, 2011]. Следовательно, исследование пролиферации CD4⁺ Т-лимфоцитов является крайне важным для фундаментальной и прикладной науки, в частности иммунологии.

Необходимость изучения клеточного деления способствовала появлению множества способов его оценки. Однако самым востребованным и широко применяемым методом на сегодняшний день является проточная цитометрия. Ее преимущества заключаются в быстром анализе большого количества событий; возможности проведения многопараметрического анализа; качественной и удобной визуализации результатов. Надежным диагностическим маркером пролиферации в проточной цитометрии является внутриклеточная молекула Ki67 [Scholzen, Gerdes, 2000].

Изучение экспрессии Ki67 в CD4⁺ Т-лимфоцитах требует предварительной фиксации и пермеабиллизации образцов [Jamur, Oliver, 2010], что накладывает ограничения на дальнейшие исследования. Например, подобная обработка исключает возможность проведения функциональных тестов и анализа транскриптома [Iglesias-Ussel, Marchionni, Romerio, 2013]. В связи с этим отказ от фиксации/пермеабиллизации клеток и поиск поверхностных молекул-аналогов Ki67 является актуальным.

Перспективным кандидатом на роль маркера пролиферации Т-лимфоцитов является рецептор трансферрина 1 (CD71). Известно, что в активированных Т-клетках молекула CD71 обеспечивает трансмембранный перенос железа, играющего важную роль в различных биохимических процессах, в т.ч. синтезе дезоксирибонуклеотидов [Testa, Pelosi, Peschle, 1993] и железосерных кластеров митохондрий [Napier, Ponka, Richardson, 2005].

Целью данной работы было исследование возможности использования поверхностной молекулы CD71 в качестве маркера пролиферации CD4⁺ Т-лимфоцитов.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи.

1. Определить особенности экспрессии Ki67 и CD71 в нестимулированных и стимулированных Т-лимфоцитах *in vitro*.
2. Оценить степень зависимости между экспрессией Ki67 и CD71 на Т-клетках.
3. Установить равнозначность молекул Ki67 и CD71 при исследовании пролиферации Т-лимфоцитов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Проллиферация Т-лимфоцитов

Быстрое увеличение численности Т-лимфоцитов при иммунном ответе и регенерации достигается посредством пролиферации [Liao *et al.*, 2016]. Проллиферация Т-лимфоцитов подразумевает их размножение путем непрямого деления (митоза) [Conlon, Raff, 1999]. Покоящаяся Т-клетка, взаимодействуя с антигеном и/или митогенами (цитокинами, ростовыми факторами), активируется, делится и формирует многочисленные дифференцированные клоны [Kaech, Wherry, Ahmed, 2002]. При этом Т-лимфоциты различной степени зрелости (наивные и памяти) имеют разные требования к индукции пролиферации. Так, например, более чувствительные к цитокиновому окружению Т-клетки памяти проявляют большую реактивность по сравнению с наивными Т-лимфоцитами [Sassano *et al.*, 2005].

Вместе с тем, вне зависимости от степени дифференциации пролиферативный цикл у Т-клетки протекает однотипно. Получивший пролиферативный сигнал покоящийся (G0) Т-лимфоцит активируется и последовательно проходит 4 стадии, процессы которых строго контролируются клеткой. Сначала происходит подготовка к репликации ДНК (G1). Затем образуются два идентичных набора хромосом (S). Далее синтезируется значительное количество белка и осуществляется репарация (G2). В завершении происходит деление (митоз) с образованием двух дочерних клеток (M). После митоза существуют два варианта развития событий: либо новообразованные клоны начинают собственный пролиферативный цикл со стадии G1, либо покидают его, останавливаясь в состоянии G0 [Coller, 2007].

Таким образом, пролиферация Т-лимфоцитов – это последовательный процесс, который играет роль в формировании иммунного ответа и поддержании оптимального количества клеток в периферических лимфоидных органах.

Нарушение в процессе деления Т-лимфоцитов обуславливает возникновение различных заболеваний. Так, неконтролируемая пролиферация зрелых

Т-лимфоцитов может приводить к формированию периферических Т-клеточных лимфом. При этом к ключевым механизмам, ответственным за опухолевые трансформации Т-клеток, относят дисрегуляцию сигнальных путей, действие опухолевого микроокружения и опосредованную вирусом перестройку биологии Т-лимфоцитов [Pizzi, Margolskee, Inghirami, 2018].

Помимо неограниченного деления Т-клеток известны явления недостаточной пролиферации Т-лимфоцитов. К такого рода изменениям в процессах активации и/или дифференцировки относится анергия. Ее механизм основан на стимуляции антигеном Т-клеток в отсутствие костимулирующего сигнала, что переводит Т-лимфоциты в гипореактивное состояние (G0) на продолжительный период времени [Schwartz, 2003]. При повторном столкновении с теми же стимулами и оптимальной костимуляцией анергичные Т-клетки не могут пролиферировать и производить цитокины, в особенности интерлейкин-2 (IL-2) [Choi, Schwartz, 2007]. Анергичные фенотипы связаны с целым рядом аутоиммунных заболеваний, включая сахарный диабет 1 типа [Burrack, Martinov, Fife, 2017], системную красную волчанку [Moulton, Tsokos, 2011], аутоиммунный гастрит [Harakal *et al.*, 2016] и миастению [Reim *et al.*, 1992]. Также к недостаточной пролиферации Т-лимфоцитов приводит их репликативное старение или сенесценция. Она происходит вследствие укорочения теломер после нескольких делений клеток, что связано с естественным старением организма [Collado, Blasco, Serrano, 2007; Collado, Serrano, 2010; Kasakovski, Xu, Li, 2018]. Однако сенесценция Т-клеток может развиваться и при хронических инфекциях вне зависимости от возраста [Hove-Skovsgaard *et al.*, 2020]. Повышенное количество стареющих Т-лимфоцитов увеличивает восприимчивость организма к онкологическим и вирусным заболеваниям [Weng, Akbar, Goronzy, 2009; Chou, Effros, 2013].

Таким образом, нарушение пролиферации Т-лимфоцитов возможно в сторону как чрезмерного, так и недостаточного деления клеток, что обуславливает развитие онкологических, аутоиммунных, хронических инфекционных заболеваний и других патологических состояний организма.

1.2. Исследование пролиферации

Поскольку проблема пролиферации Т-лимфоцитов является актуальной, было разработано немало способов изучения клеточного деления, которые применяются как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях. Далее будут рассмотрены некоторые из них.

1.2.1 Авторадиография

Первоначально преобладающим методом исследования клеточного цикла была авторадиография [Rogers, 1973]. Она заключалась в радиоизотопном мечении клеток, которые затем фиксировали на предметных стеклах и покрывали фотографической серебряной эмульсией почти в полной темноте. После тщательной сушки на воздухе авторадиограммы приходилось оставлять в светонепроницаемых боксах на несколько дней, а иногда и недель. Количественный анализ делящихся клеток также был трудоемок. Исследователь должен был идентифицировать меченые объекты под микроскопом, подсчитывая их вручную сотнями. Такой анализ отнимал много времени и вредил глазам. Более того, авторадиографию приходилось применять при диагностике опухолей. Для этого перед биопсией пациентам делали инъекцию радиоактивно меченых предшественников ДНК, что было этически сомнительно [Trepel, 1968]. Несмотря на трудоемкость первых анализов пролиферации Т-лимфоцитов и других популяций клеток, именно результаты авторадиограмм послужили основанием для выделения четырех стадий клеточного цикла [Howard, Pelc, 1951; Quastler, Sherman, 1959].

1.2.2 Матрицы с микроячейками

С целью детектировать активность пролиферации каждой клетки конструируют особые матрицы с микроячейками [Polonsky, Chain, Friedman, 2016]. Одна такая матрица включает тысячи ячеек размером от 20 до 100 мкм. В каждую ячейку вносится по одной клетке, где она культивируется в питательной среде в течение нескольких дней. После культивации исследователь

получает данные о пролиферации с разрешением в одну клетку. Примечательно, что клетки, ограниченные одной и той же микроячейкой (клоны), могут взаимодействовать посредством как прямого контакта, так и секретируемых цитокинов, в то время как клетки из соседних ячеек могут «общаться» только через общую культуральную среду. Однако такие эксперименты не позволяют анализировать пролиферативную активность клеток *in vivo*, что сужает возможности применения микроячеек в исследованиях.

1.2.3 Проточная цитометрия

Несмотря на достижения описанных ранее методов самым популярным подходом к изучению пролиферации Т-лимфоцитов является проточная цитометрия. Метод основан на детекции флуоресцентного сигнала, который появляется в случае связывания клетки с меченым флуорохромным красителем моноклональным антителом, специфичным к конкретной белковой структуре. С помощью проточной цитометрии довольно быстро можно оценить экспрессию поверхностных и внутриклеточных маркеров пролиферации целого массива объектов с учетом параметров каждой клетки [Darzynkiewicz, Crissman, Jacobberger, 2004]. Кроме этого, у исследователей есть возможность идентифицировать отдельные популяции и субпопуляции, используя одновременно несколько меченых антител [Kafri *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2013]. Помимо возможности проведения многопараметрического анализа уникальными достоинствами проточной цитометрии являются быстрый анализ большого количества событий, количественное измерение интенсивности флуоресценции и качественная удобная визуализация результатов. Однако основная сложность состоит в составлении панели маркеров, где необходимо учитывать спектральные свойства флуорохромов и детекторов флуоресценции. [Camplejohn, 1994; Bendall *et al.*, 2011].

1.2.3.1 Маркеры пролиферации Т-лимфоцитов

По мере того, как клетка переходит из одной стадии клеточного цикла в другую, в ней происходят существенные изменения в экспрессии различных белков. Среди них выделяют ряд основных поверхностных и внутриклеточных маркеров активации (ранней и поздней) и пролиферации [Shipkova, Wieland, 2012].

Маркер CD69

Молекула CD69 является мембранным рецептором и относится к лектинам С-типа, т.е. белкам, связывающим углеводы в присутствии кальция. Сигналы, поступающие от CD69, вызывают увеличение продукции IL-2 в Т-лимфоцитах, а также повышают экспрессию рецепторов к этому цитокину, что принято считать одними из ключевых процессов клеточной активации [Marzio, Mauël, Betz-Corradin, 1999]. Поэтому CD69 выступает в качестве молекулы костимуляции для Т-клеточной активации и пролиферации. Вместе с тем, этот маркер участвует в контроле миграции Т-лимфоцитов, а также приобретении ими эффекторных или регуляторных фенотипов [Cibrián, Sánchez-Madrid, 2017]. Молекула CD69 экспрессируется в течение 1–2 часов после антигенной стимуляции и является маркером наиболее ранней стадии активации Т-лимфоцитов.

Маркер CD25

Ранее было отмечено, что синтез IL-2 и его рецептора определяет активацию Т-лимфоцитов. На покоящихся Т-клетках рецептор IL-2 является димером (состоит из субъединиц β (CD122) и $\gamma\epsilon$ (CD132)) и способен к проведению сигнала после связывания с IL-2. Однако он обладает низким сродством к своему лиганду [Leonard, Lin, 2000; Gaffen, 2001; Eicher, Damjanovich, Waldmann, 2002; Lindenmann, Benczik, Gaffen, 2003]. В процессе активации в Т-клетках формируется гетеротримерный компонент, в состав которого кроме цепей β и $\gamma\epsilon$, входит α -цепь (CD25) [Waldmann, 1994]. Появление α -цепи в составе рецептора вызывает повышение сродства к IL-2 в несколько раз. Это стимулирует

пролиферацию Т-лимфоцитов и дифференцировку эффекторных лимфоцитов и клеток памяти. Поэтому CD25 также считается маркером активации Т-лимфоцитов [Graca, Cobbold, 2002].

Маркер CD38

Молекула CD38 – это рецептор-фермент, который участвует в передаче сигналов внутрь клетки, а также в межклеточной кооперации [Lee, 2000]. Гликопротеин CD38 представляет собой гидролазу, которая катализирует деградацию НАД или НАДФ с образованием циклической АДФ-рибозы и никотинамида. Продукты этой реакции необходимы для регулирования внутриклеточного пула кальция – универсальной сигнальной системы. Помимо своей каталитической активности этот мембранный фермент обеспечивает проведение сигнала в Т-лимфоциты, активируя их для выработки различных цитокинов. Однако экспрессия этого маркера неравномерна: CD38 регистрируется на самых ранних и поздних стадиях активации и дифференциации, исчезая в период созревания клетки [Ярилин, 1999]. Также лимфоциты с высоким уровнем экспрессии CD38 проявляют низкую пролиферативную активность, обладая при этом высоким потенциалом в отношении продукции цитокинов, например IL-2 и IFN γ [Sandoval-Montes, Santos-Argumedo, 2005]. Вместе с тем, молекула CD38 активно используется в качестве маркера активации в проточной цитометрии.

Маркер HLA-DR

Маркер HLA-DR принадлежит к молекулам главного комплекса гистосовместимости II класса. Система HLA обеспечивает регуляцию иммунного ответа, взаимодействие иммунокомпетентных клеток, распознавание своих и чужеродных, в том числе измененных собственных антигенов [Хаитов, 2009]. На Т-лимфоцитах молекула HLA-DR выступает в качестве рецептора, участвующего в трансдукции сигнала с CD3-комплекса, индуцируя фосфорилирование ITAM-последовательностей [Odum *et al.*, 1991]. В связи с этим

HLA-DR⁺ Т-лимфоциты можно рассматривать как активированные клетки. Также экспрессия этого маркера ассоциирована с длительной активацией Т-лимфоцитов, т.е. их способностью к продолжительной циркуляции в крови [Чередеев, Горлина, Козлов, 1999].

Маркер CD71

Молекула CD71 является рецептором трансферрина 1. Благодаря высокой аффинности к железу, он считается главным белком, ответственным за поступление этого микроэлемента в клетку [Marsee, Pinkus, Yu, 2010]. При Т-клеточной активации CD71 связывает железо-трансферрин на мембране, после чего образовавшийся комплекс поглощается путем эндоцитоза. Так рецептор позволяет клеткам накопить железо, которое играет важную роль в различных биохимических процессах. Например, этот микроэлемент участвует в синтезе железосерных кластеров митохондрий [Napier, Ponka, Richardson, 2005]. Также железо служит кофактором фермента рибонуклеотидредуктазы, ответственного за синтез необходимых для репликации ДНК дезоксирибонуклеотидов [Testa, Pelosi, Peschle, 1993]. Поэтому CD71 является маркером активации Т-лимфоцитов. В свою очередь известно, что недостаточность экспрессии этой молекулы приводит к нарушению пролиферативных процессов [Хаитов, 2009; Newman *et al.*, 1983; Baynes, Skikne, Cook, 1994].

Маркер Ki67

Ядерный негистонный белок Ki67 экспрессируется только в делящихся клетках, в связи с чем считается наиболее надежным маркером пролиферации Т-лимфоцитов. Замечено, что уровень Ki67 в клетке постепенно увеличивается при переходе от стадии G1 к митозу и резко падает при завершении деления [Rioux-Leclercq *et al.*, 2000; Bui *et al.*, 2004].

Причины тесной связи белка с активными фазами клеточного цикла кроются в его функциях. Молекула Ki67 обеспечивает прикрепление хромосом к ядерной

мембране в фазу G1 и препятствует их слиянию в единую массу хроматина при деградации оболочки ядра. Так белок Ki67 создает стерический и электростатический барьер, изолирующий хромосомы друг от друга и обеспечивающий их эффективное и независимое прикрепление к веретену деления [Cuypen *et al.*, 2016]. Помимо этого, доказана связь Ki67 с белками, участвующими в процессах сплайсинга, транскрипции, трансляции, синтеза рибосом и рРНК [Sobecki *et al.*, 2016]. Исследование экспрессии Ki67 широко применяется для оценки роста опухоли [Антонеева, Петров, 2008; Scholzen, Gerdes, 2000], а также эффективности деления Т-лимфоцитов в ответ на антиген [Soares *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012]. Например, известно, что количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, активно экспрессирующих этот ядерный белок, возрастает на 4–6 сутки после введения вакцин. Таким образом, ввиду своих функций, тесно связанных с процессом деления, значение Ki67 для определения пролиферирующих опухолевых и здоровых клеток является общепринятым стандартом.

Изучение экспрессии внутриклеточной молекулы Ki67 методом проточной цитометрии требует предварительного нарушения целостности цитоплазматической мембраны клетки для связывания Ki67 детектирующими антителами. Это достигается методом фиксации/пермеабилзации [Jamur, Oliver, 2010]. Вначале проводят фиксацию, внося 2–4 % раствор альдегида (пара-, формальдегида) к клеткам. Под фиксацией подразумевают сшивку аминокрупп мембранных белков, которая иммобилизует клетку, а также позволяет сохранить ее целостность. Далее в образец добавляют какой-либо детергент, который создает поры в мембране, т.е. пермеабилзует ее.

Несмотря на то, что метод фиксации/пермеабилзации является оптимальным для идентификации внутриклеточных молекул, он имеет свои ограничения. Иммобилизация Т-лимфоцитов исключает возможность проведения функциональных тестов, таких как анализ интенсивности продукции цитокинов, митохондриального дыхания, гликолиза и др. Также нарушение целостности мембраны вызывает деградацию РНК. Так фиксация клеток альдегидами

приводит к значительному сшиванию и фрагментации РНК-белков, в то время как пермеабелизация позволяет проникать РНКазам во внутриклеточные компартменты [Iglesias-Ussel, Marchionni, Romero, 2013]. В итоге такая обработка становится причиной значительного ухудшения качества транскрипта [Schroeder *et al.*, 2006].

Таким образом, предварительная фиксация/пермеабелизация клеток для анализа экспрессии Ki67 оказывается ограничивающим фактором проточной цитометрии как метода изучения пролиферации Т-лимфоцитов. Отказ от фиксации/пермеабелизации и выбор в пользу поверхностного маркера может снять существующее ограничение. Поверхностный рецептор CD71 является показателем биологической активности Т-лимфоцитов и их готовности к делению. В отличие от других активационных молекул, маркер CD71 ответственен в большей степени за пластический обмен в клетке, чем за передачу внутриклеточных сигналов [Gammella *et al.*, 2017]. Совокупность представленных факторов делает молекулу CD71 перспективным кандидатом на роль аналога Ki67 в исследовании митотической активности Т-лимфоцитов методом проточной цитометрии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

План работы был одобрен локальным этическим комитетом (рег. № IRB00008964); каждый обследованный подписал форму информированного согласия. В исследование были приглашены 10 относительно здоровых добровольных доноров крови. Большинство участников (80 %) составили женщины. Средний возраст обследованных составил 25 лет.

2.1 Получение биологического материала

Забор крови проводился из кубитальной вены в пробирки Vacutainer, обработанные антикоагулянтом. Мононуклеарные лейкоциты периферической крови получали путем центрифугирования (400 g, 40 мин) в градиенте плотности Диаколла-1077 (Диаэм, Россия). Выделенные клетки собирали, дважды отмывали фосфатно-солевым буферным раствором в модификации Дульбекко (DPBS; Gibco, США) и подсчитывали в камере Горяева согласно стандартной методике [Клиническая лабораторная диагностика: методы исследования, 2005]. Полученные образцы переносили в криопробирки и подвергали контролируемому замораживанию до -80°C в среде, содержащей 90 % инактивированной теплом эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; Gibco, США) и 10 % диметилсульфоксида (MP Biochemicals, США). По истечении суток клетки переносили в пары жидкого азота для длительного хранения.

2.2 Разморозка образцов

Для разморозки мононуклеарных лейкоцитов периферической крови после жидкого азота криопробирки нагревали при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ с помощью водяной бани. После полной разморозки клетки помещали в пробирки объемом 15 мл и капельно вносили по 10 мл полной питательной среды (ППС), содержащей ЭТС (10 %, Gibco, США) и смесь пенициллина/стрептомицина (1 %, Gibco, США) в RPMI-1640 с глутамином (Gibco, США). Образцы перемешивали, аккуратно наклоняя и переворачивая пробирки. Осадив клетки

центрифугированием (400 g, 10 мин), сливали супернатант и вносили в пробирки по 1 мл ППС. После перемешивания на вортексе определяли абсолютное количество мононуклеарных лейкоцитов периферической крови с помощью проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США).

2.3 *Культивирование клеток*

Мононуклеарные лейкоциты культивировали в ППС в концентрации $2 \cdot 10^6$ /мл культуры. Образцы стимулировали фитогемагглютинином (ФГА; Serva, Германия) в конечной концентрации 15 мг/мл. В качестве контроля использовали клетки без добавления митогена. Полученные лейкоциты инкубировали в пробирках типа эппендорф объемом 2 мл при $+37^\circ\text{C}$ в течение 42 часов.

2.4 *Окрашивание Т-лимфоцитов*

Клетки окрашивали набором коммерческих флуоресцентных красителей и антител: Zombie UV, CD3 PerCP, CD4 Brilliant Violet 605 (BioLegend, США); CD8 FITC (Dako, Дания); CD45R0 APCe-Fluor780 (eBioscience, США); CD71 Alexa Fluor 700 (Invitrogen, США); Ki67 PE (BD Pharmingen, США).

Окрашивание Т-лимфоцитов производили по следующей схеме. После культивирования клетки отмывали в DPBS посредством центрифугирования (1000 g, 3 мин). Объем образцов восстанавливали, добавляя по 100 мкл DPBS. В каждую пробу вносили Zombie UV в соотношении 1:100 и инкубировали 15 мин в темноте при комнатной температуре. После инкубации клетки отмывали (1000 g, 3 мин) в DPBS с 1% бычьим сывороточным альбумином (DPBS/1%BSA) и добавляли заранее приготовленный коктейль антител, который включал: 100 мкл DPBS/1%BSA, 0,5 мкл анти-CD3 антител, 0,6 мкл анти-CD4 антител, 1,2 мкл анти-CD8 антител, 0,3 мкл анти-CD45R0 антител и 1,2 мкл анти-CD71 антител. Образцы инкубировали 15 мин в темноте при комнатной температуре, после чего отмывали в DPBS/1%BSA (1000 g, 3 мин). Окрашивание анти-Ki67 антителами проводили после предварительной фиксации и пермеабелизации

клеток. В образцы вносили по 450 мкл True-Nuclear™ 1X Fix Concentrate (Biolegend, США) и инкубировали 60 мин в темноте при комнатной температуре. Клетки дважды отмывали (400 g, 5 мин) в 1 мл True-Nuclear™ 1X Perm Buffer (Biolegend, США). Затем в образцы вносили по 100 мкл 1X Perm Buffer и по 0,6 мкл анти-Ki67 антител. Пробы инкубировали 45–60 мин в темноте при комнатной температуре. После инкубации к клеткам добавляли по 1 мл 1X Perm Buffer и центрифугировали (400 g, 5 мин). Затем образцы отмывали в 1 мл DPBS/1%BSA (400 g, 5 мин).

Окрашенные клетки ресуспендировали в 100 мкл DPBS/1%BSA и анализировали с помощью проточного цитометра CytoFLEX S. Для визуализации результатов использовали программу CytExpert (Beckman Coulter, США).

2.5 Гейтирование субпопуляций Т-лимфоцитов

Гейтирование осуществляли с помощью программы FlowJo (FlowJo LLC, США). Из пула анализируемых клеток последовательно выделяли одиночные и жизнеспособные элементы (рис. 1). Затем CD3-позитивные клетки идентифицировали как Т-лимфоциты, которые, в свою очередь, делили на CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки. Степень дифференцировки каждой субпопуляции анализировали по экспрессии CD45R0: CD45R0⁺ элементы оценивали как Т-лимфоциты памяти, CD45R0⁻ как наивные Т-клетки. Следует обратить внимание, что среди CD8⁺CD45R0⁻ Т-лимфоцитов присутствуют как наивные, так и эффекторные фенотипы [Akbar *et al.*, 1988].

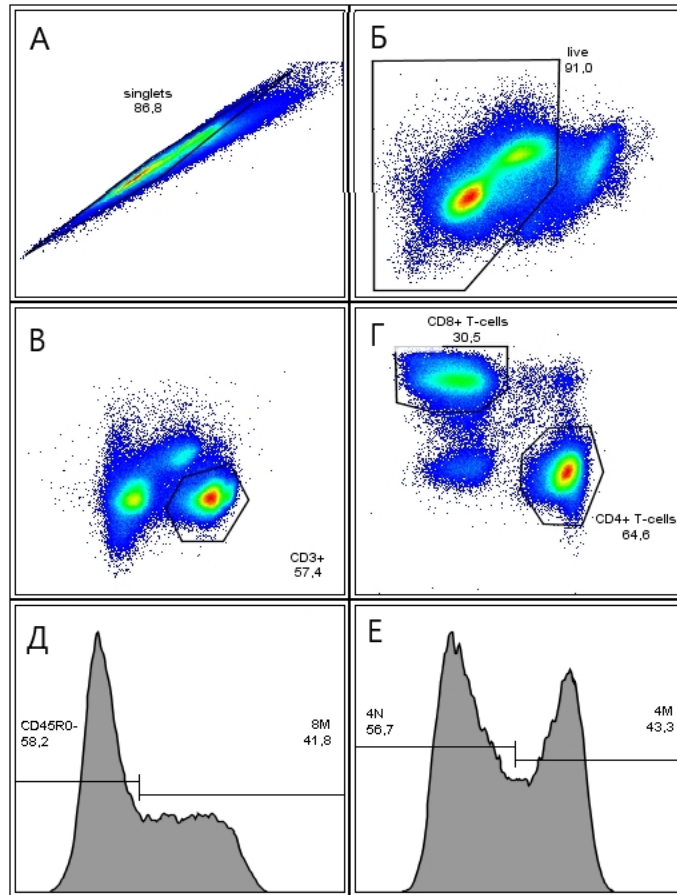


Рисунок 1 – Алгоритм гейтирования субпопуляций лимфоцитов

Примечание: по оси абсцисс: А – интенсивность прямого светорассеяния (FSC-A); Б – интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных Zombie UV; В – интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных анти-CD3-PerCP антителами; Г – интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных анти-CD4-BV605 антителами; Д, Е – интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных анти-CD45R0-APCе-F780 антителами. По оси ординат: А – интенсивность бокового светорассеяния (SSC-H); Б, В – интенсивность прямого светорассеяния (FSC-H); Г – интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных анти-CD8-FITC антителами; Д, Е – число событий.

А – выделение гейта одиночных клеток по светорассеянию (singlets); Б – выделение гейта живых клеток из гейта singlets (live); В – выделение гейта CD3⁺ клеток из гейта live; Г – выделение гейта CD8⁺ и CD4⁺ лимфоцитов из гейта CD3⁺ клеток; Д – выделение гейта CD45R0^{+/-} клеток из гейта CD8⁺ лимфоцитов; Е – выделение гейта CD45R0^{+/-} клеток из гейта CD4⁺ лимфоцитов.

Митотическую активность клеток оценивали по экспрессии CD71 и Ki67 (рис. 2). Границы CD71-позитивных и Ki67-позитивных субпопуляций устанавливали с помощью FMO (fluorescence minus one) контролей.

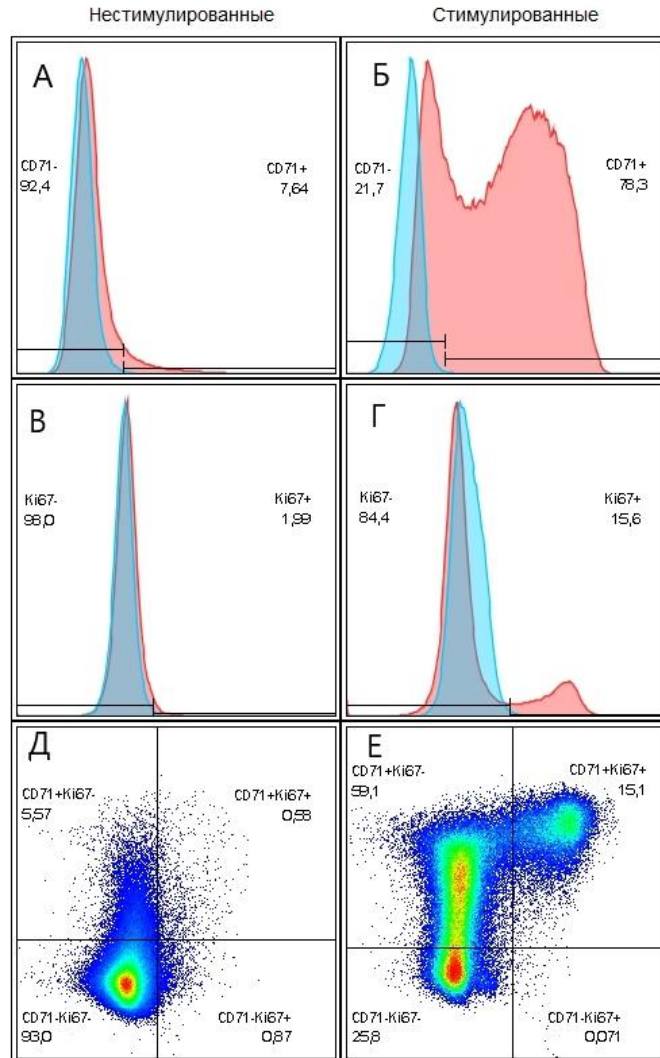


Рисунок 2 – Алгоритм определения CD71-позитивных и Ki67-позитивных субпопуляций лимфоцитов

Примечание: обозначены нестимулированные и стимулированные образцы. По оси абсцисс: А, Б – интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных анти-CD71-AF700 антителами; В, Г, Д, Е – интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных анти-Ki67-PE антителами. По оси ординат: А, Б, В, Г – число событий; Д, Е – интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных анти-CD71-AF700 антителами.

2.6 Статистическая обработка результатов

Анализ данных выполнялся методами непараметрической статистики. Рассчитывали медиану и интерквартильный размах (25–75 %). Статистическую значимость различий между группами устанавливали на основе U-критерия Манна-Уитни. Корреляционный анализ выполняли по методу Спирмена. Вычисления и построение графиков проводили с использованием пакета Microsoft Office и программы GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Перспективным маркером для изучения пролиферации Т-лимфоцитов представляется поверхностная молекула CD71. С целью оценить возможность использования CD71 в исследованиях были изучены особенности его экспрессии в нестимулированных и стимулированных Т-клетках. Полученные данные сравнивались с результатами экспрессии референсного маркера Ki67.

3.1 Особенности экспрессии Ki67

На первом этапе исследования была проведена оценка экспрессии молекулы Ki67 в нестимулированных и стимулированных Т-лимфоцитах периферической крови человека. Было установлено, что стимуляция мононуклеарных лейкоцитов ФГА в течение 42 ч приводит к увеличению доли Т-лимфоцитов, экспрессирующих Ki67. Это наблюдалось в общем пуле Т-лимфоцитов (рис. 3А) и среди CD4-позитивных (рис. 3Б) и CD8-позитивных (рис. 3В) Т-клеток.

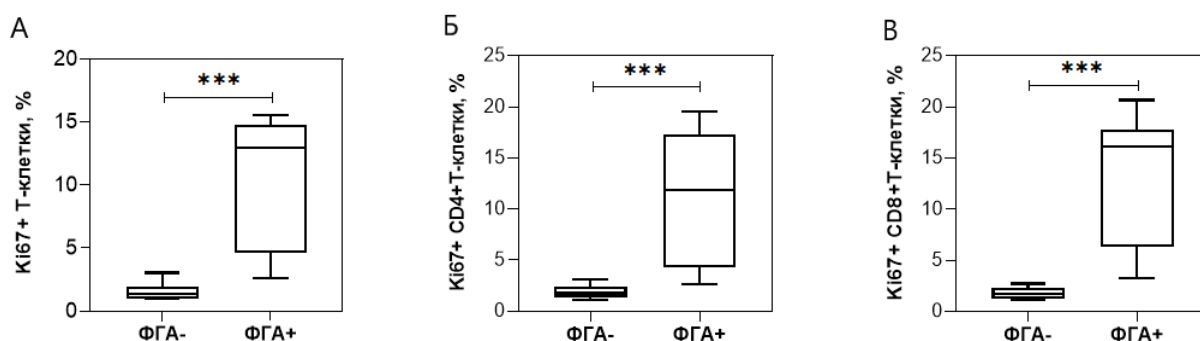


Рисунок 3 – Процентное содержание Ki67-позитивных клеток среди нестимулированных и стимулированных Т-лимфоцитов

Примечания: представлены медианы, интерквартильные размахи и 10–90 % размахи. ФГА⁺ – образцы, стимулированные фитогемагглютинином; ФГА⁻ – контроль.*** – $P < 0,001$ (тест Манна-Уитни). А – Т-лимфоциты; Б – CD4⁺ Т-лимфоциты; В – CD8⁺ Т-лимфоциты

Помимо этого, в стимулированных Т-лимфоцитах по сравнению с нестимулированными клетками повысился средний уровень экспрессии молекулы Ki67. Отмеченное изменение не зависело от субпопуляционной

принадлежности Т-лимфоцитов и наблюдалось в их общем пуле (рис. 4А) и пулах CD4⁺ (рис. 4Б) и CD8⁺ (рис. 4В) Т-клеток.

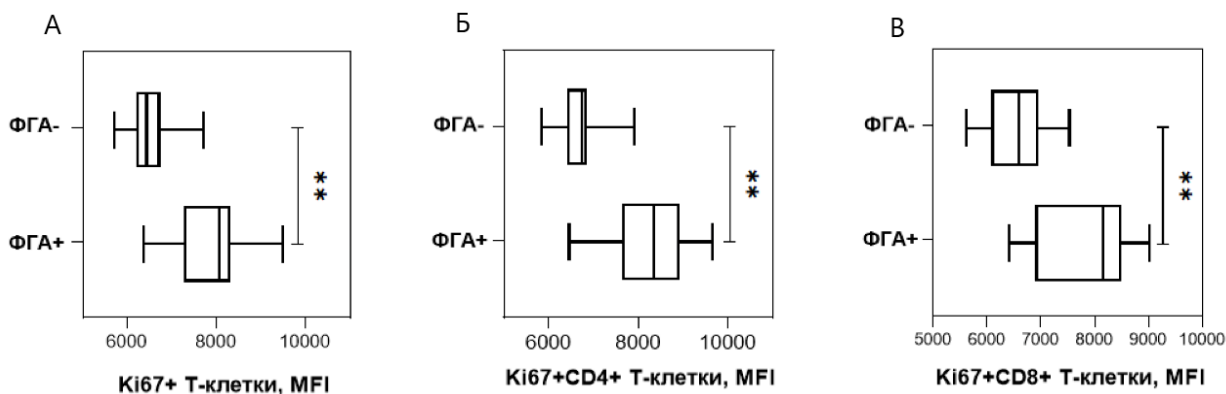


Рисунок 4 – Уровень внутриклеточной экспрессии Ki67 в нестимулированных и стимулированных Т-лимфоцитах

Примечания: представлены медианы, интерквартильные размахи и 10–90 % размахи. MFI – медиана интенсивности флуоресценции (median fluorescence intensity). ФГА⁺ – образцы, стимулированные фитогемагглютинином; ФГА⁻ – контроль. ** – $P < 0,01$ (тест Манна-Уитни). А – Т-лимфоциты; Б – CD4⁺ Т-лимфоциты; В – CD8⁺ Т-лимфоциты

Аналогичные результаты были получены в субпопуляциях различной степени зрелости, в т.ч. наивных Т-клетках и Т-лимфоцитах памяти (табл. 1): после стимуляции среди них выросли доля Ki67-положительных клеток и уровень экспрессии молекулы. Таким образом, в стимулированной культуре Т-лимфоцитов по сравнению с нестимулированными клетками растут доля Ki67-положительных элементов и уровень экспрессии маркера пролиферации. Полученные результаты не противоречат данным литературы. Известно, что экспрессия Ki67 наблюдается в активно делящихся клетках растущих опухолей [Антонеева, Петров, 2008], а также CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитах, отвечающих пролиферацией на введение вакцин [Soares *et al.*, 2010]. Выявленный феномен легко объясним ролью молекулы Ki67 в активных фазах клеточного цикла: при разрушении ядерной оболочки она обеспечивает изоляцию хромосом и их независимое прикрепление к веретену деления [Cuylen *et al.*, 2016]. Поэтому в стимулированных Т-лимфоцитах после действия митогена обнаруживается белок Ki67, который говорит о процессе пролиферации в клетках.

Таблица 1 – Отличия экспрессии Ki67 в нестимулированных и стимулированных Т-лимфоцитах различной степени зрелости

Показатели	ФГА ⁻	ФГА ⁺	P
Наивные Ki67 ⁺ CD4 ⁺ Т-клетки (%)	1,39 (0,95-1,9)	11,57 (4,79-16,58)	<0,001
Ki67 ⁺ CD4 ⁺ Т-клетки памяти(%)	2,02 (1,77-3,08)	9,21 (5,41-13,44)	<0,001
Ki67 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁻ Т-клетки (%)	1,43 (1,28-2,16)	15,41 (5,12-19,75)	<0,001
Ki67 ⁺ CD8 ⁺ Т-клетки памяти (%)	1,70 (1,59-2,10)	10,57 (6,37-15,65)	<0,001
Наивные Ki67 ⁺ CD4 ⁺ Т-клетки (MFI)	6270 (5983-6439)	8002 (7686-8090)	<0,001
Ki67 ⁺ CD4 ⁺ Т-клетки памяти (MFI)	7209 (7098-7300)	8573 (8072-9326)	<0,01
Ki67 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁻ Т-клетки (MFI)	6583 (6112-6783)	8228 (7198-8683)	<0,01
Ki67 ⁺ CD8 ⁺ Т-клетки памяти (MFI)	6621 (6234-6868)	7899 (7463-8355)	<0,05

Примечания: представлены медианы и интерквартильные размахи. MFI – медиана интенсивности флуоресценции (median fluorescence intensity). ФГА⁺ – образцы, стимулированные фитогемагглютинином; ФГА⁻ – контроль. Различия между группами установлены на основе U-критерия Манна-Уитни

3.2 Особенности экспрессии CD71

Следующий этап исследования заключался в анализе экспрессии молекулы CD71 на поверхности нестимулированных и стимулированных Т-лимфоцитов. Было обнаружено, что содержание CD71-позитивных Т-клеток повысилось в стимулированных образцах относительно нестимулированных проб. Рост был характерен для общего пула лимфоцитов (рис. 5А) и пулов CD4⁺ (рис. 5Б) и CD8⁺ (рис. 5В) Т-клеток.

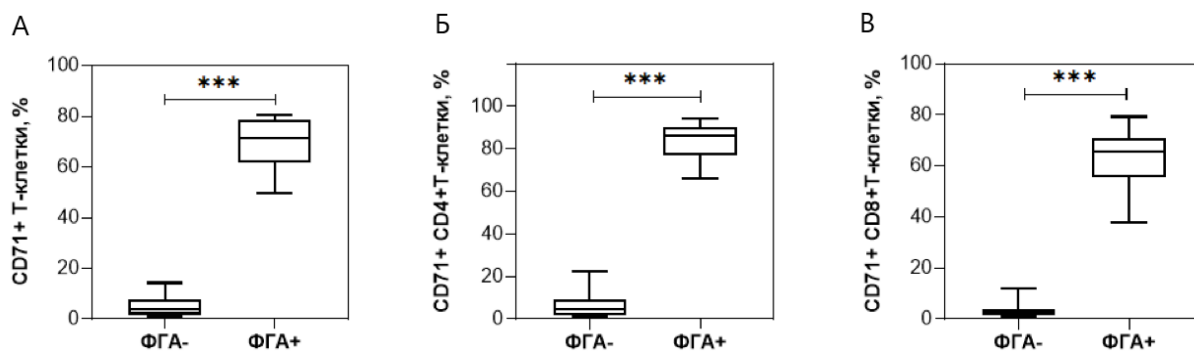


Рисунок 5 – Процентное содержание CD71-позитивных клеток среди нестимулированных и стимулированных Т-лимфоцитов

Примечания: представлены медианы, интерквартильные размахи и 10–90 % размахи. ФГА⁺ – образцы, стимулированные фитогемагглютинином; ФГА⁻ – контроль.*** – $P < 0,001$ (тест Манна-Уитни). А – Т-лимфоциты; Б – CD4⁺ Т-лимфоциты; В – CD8⁺ Т-лимфоциты

Также после стимуляции увеличился средний уровень экспрессии молекулы CD71, что было отмечено в общем пуле Т-клеток (рис 6А) и среди CD4-позитивных (рис 6Б) и CD8-позитивных (рис 6В) Т-лимфоцитов.

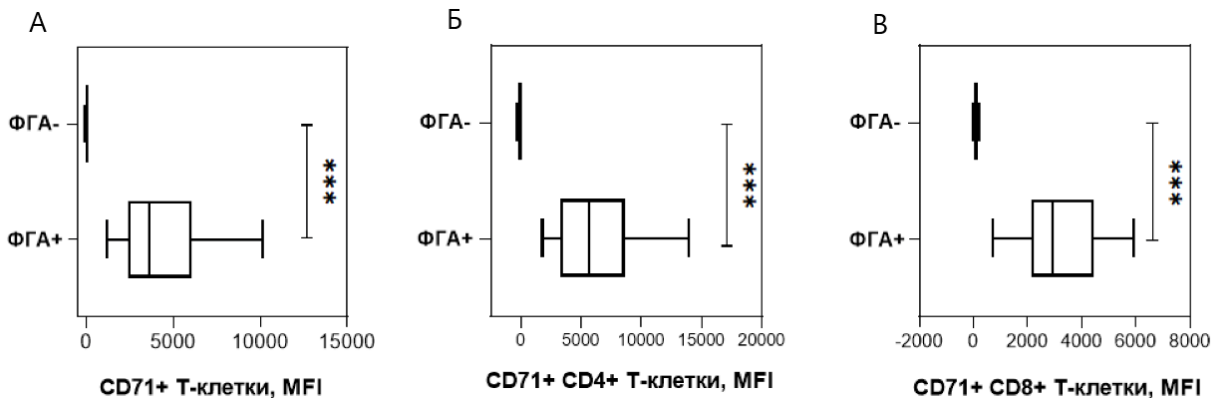


Рисунок 6 – Уровень поверхностной экспрессии CD71 на нестимулированных и стимулированных Т-лимфоцитах

Примечания: представлены медианы, интерквартильные размахи и 10–90 % размахи. MFI – медиана интенсивности флуоресценции (median fluorescence intensity). ФГА⁺ – образцы, стимулированные фитогемагглютинином; ФГА⁻ – контроль.*** – $P < 0,001$ (тест Манна-Уитни). А – Т-лимфоциты; Б – CD4⁺ Т-лимфоциты; В – CD8⁺ Т-лимфоциты

Сходное увеличение доли CD71-положительных элементов и уровня экспрессии молекулы было зафиксировано в субпопуляциях различной степени зрелости, в т.ч. наивных Т-клетках и Т-лимфоцитах памяти (табл. 2).

Таблица 2 – Отличия экспрессии CD71 на нестимулированных и стимулированных Т-лимфоцитах различной степени зрелости

Показатели	ФГА ⁻	ФГА ⁺	P
Наивные CD71 ⁺ CD4 ⁺ Т-клетки (%)	5,98 (3,77-8,46)	94,11 (88,12-95,77)	<0,001
CD71 ⁺ CD4 ⁺ Т-клетки памяти(%)	5,50 (2,64-5,92)	79,63 (73,74-85,86)	<0,001
CD71 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁻ Т-клетки (%)	5,32 (2,79-6,95)	70,06 (63,78-77,50)	<0,001
CD71 ⁺ CD8 ⁺ Т-клетки памяти (%)	2,33 (1,81-3,81)	61,17 (43,96-63,68)	<0,001
Наивные CD71 ⁺ CD4 ⁺ Т-клетки (MFI)	-191 (-237... -149)	7827 (3626-10392)	<0,001
CD71 ⁺ CD4 ⁺ Т-клетки памяти (MFI)	9,77 (-26,83...56,68)	4436 (3152-4937)	<0,001
CD71 ⁺ CD8 ⁺ CD45R0 ⁻ Т-клетки (MFI)	96,30 (26,20-135,25)	4456 (2922-5484)	<0,001
CD71 ⁺ CD8 ⁺ Т-клетки памяти (MFI)	220 (181-297)	2184 (1497-3461)	<0,001

Примечания: представлены медианы и интерквартильные размахи.

MFI – медиана интенсивности флуоресценции (median fluorescence intensity).

ФГА⁺ – образцы, стимулированные фитогемагглютинином; ФГА⁻ – контроль.

Различия между группами установлены на основе U-критерия Манна-Уитни.

Следовательно, в стимулированной культуре Т-лимфоцитов увеличиваются доля CD71-позитивных клеток, а также уровень экспрессии маркера. При этом полученные результаты изменения экспрессии CD71 после стимуляции соответствуют данным других научных коллективов. Так, усиленная продукция этого маркера ассоциирована с формированием опухолей [Тупицын и др., 2001]. Вместе с тем, известно, что недостаточная экспрессия CD71 на стимулированных лимфоцитах обуславливает отсутствие в них деления [Lio *et al.*, 1996]. Это объясняется функцией молекулы в делящихся клетках. Рецептор трансферрина 1 обеспечивает поступление внутрь клетки железа, которое играет важную роль

в различных биохимических процессах. Например, железо является кофактором фермента рибонуклеотидредуктазы, осуществляющего синтез необходимых для репликации ДНК дезоксирибонуклеотидов [Testa, Pelosi, Peschle, 1993].

3.3 Взаимосвязь экспрессии CD71 и Ki67

Финальный этап исследования заключался в оценке взаимосвязи экспрессии CD71 и Ki67. Было обнаружено, что между ними наблюдается сильная положительная корреляция, которая была отмечена в общем пуле Т-лимфоцитов и следующих субпопуляциях: CD4⁺ Т-клетки, наивные CD4⁺ Т-лимфоциты, CD4⁺ Т-клетки памяти, CD8⁺ Т-лимфоциты, CD8⁺CD45R0⁻ Т-клетки, CD8⁺ Т-лимфоциты памяти (табл. 3).

Таблица 3 – Связь между экспрессией CD71 и Ki67 в субпопуляциях Т-лимфоцитов различной степени зрелости

Корреляционная связь	R	P
Т-клетки (%)	0,793	<0,001
CD4 ⁺ Т-клетки (%)	0,830	<0,001
Наивные CD4 ⁺ Т-клетки (%)	0,854	<0,001
CD4 ⁺ Т-клетки памяти (%)	0,823	<0,001
CD8 ⁺ Т-клетки (%)	0,847	<0,001
CD8 ⁺ CD45R0 ⁻ Т-клетки (%)	0,842	<0,001
CD8 ⁺ Т-клетки памяти (%)	0,827	<0,001

Примечание: при проведении анализа использован метод ранговых корреляций Спирмена

Примечательно, что среди Т-лимфоцитов все Ki67-положительные клетки экспрессировали молекулу CD71, при этом в культуре присутствовала субпопуляция CD71-монопозитивных лимфоцитов (рис 7).

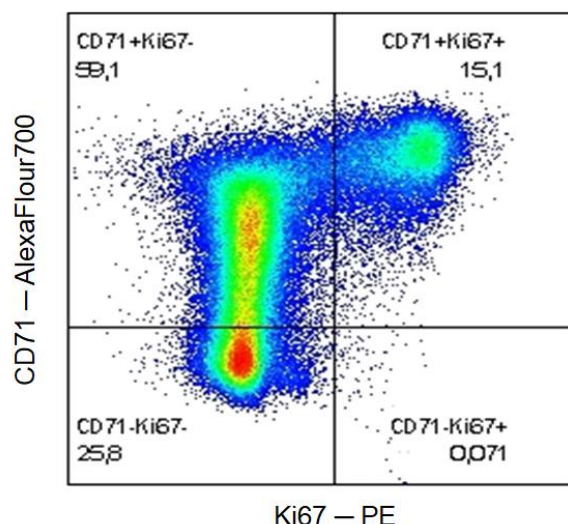


Рисунок 7 – Показательная точечная диаграмма экспрессии CD71 и Ki67 в стимулированных Т-лимфоцитах

Анализ численности CD71⁺Ki67⁻ Т-лимфоцитов показал, что содержание этих клеток в стимулированных и нестимулированных образцах значительно превышало количество CD71⁺Ki67⁺ Т-лимфоцитов. Данное явление наблюдалась в их общем пуле (рис. 8А) и пулах CD4⁺ (рис. 8Б) и CD8⁺ (рис. 8В) Т-клеток.

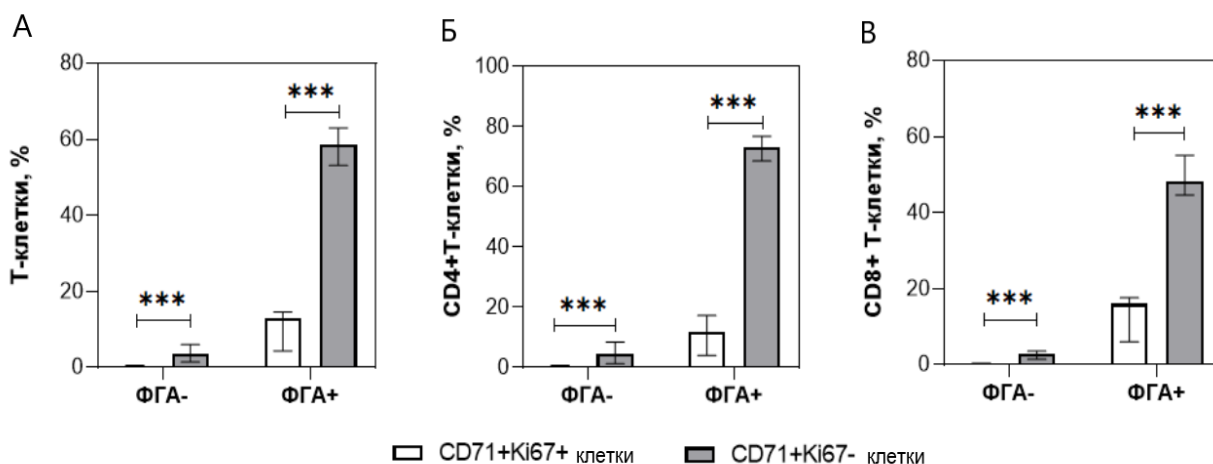


Рисунок 8 – Процентное содержание CD71⁺Ki67⁺ и CD71⁺Ki67⁻ клеток среди нестимулированных и стимулированных Т-лимфоцитов

Примечания: представлены медианы, интерквартильные размахи. ФГА⁺ – образцы, стимулированные фитогемагглютинином; ФГА⁻ – контроль. *** – P < 0,001 (тест Манна-Уитни). А – Т-лимфоциты; Б – CD4⁺ Т-лимфоциты; В – CD8⁺ Т-лимфоциты

Сходное отличие долей $CD71^+Ki67^+$ и $CD71^+Ki67^-$ клеток было установлено в субпопуляциях различной степени зрелости, в т.ч. наивных Т-лимфоцитах и Т-клетках памяти (табл. 4).

Таблица 4 – Отличие относительного количества $CD71^+Ki67^+$ и $CD71^+Ki67^-$ клеток среди нестимулированных и стимулированных Т-лимфоцитов различной степени зрелости

Показатели	ФГА ⁻		ФГА ⁺	
	$CD71^+Ki67^+$	$CD71^+Ki67^-$	$CD71^+Ki67^+$	$CD71^+Ki67^-$
	1	2	3	4
Наивные $CD4^+$ Т-клетки (%)	0,17 (0,11-0,44) P₁₋₂<0,001	5,76 (3,71-8,15)	11,51 (4,77-16,57) P₃₋₄<0,001	80,42 (74,14-84,04)
$CD4^+$ Т-клетки памяти(%)	0,59 (0,39-1,01) P₁₋₂<0,001	4,91 (2,04-9,12)	9,15 (5,14-13,40) P₃₋₄<0,001	69,30 (65,25-73,42)
$CD8^+$ $CD45RO^-$ Т-клетки (%)	0,21 (0,13-0,38) P₁₋₂<0,001	5,07 (2,70-6,40)	15,30 (4,96-19,44) P₃₋₄<0,001	51,33 (48,76-54,76)
$CD8^+$ Т-клетки памяти (%)	0,23 (0,20-0,33) P₁₋₂<0,001	2,10 (1,60-3,50)	10,47 (6,12-15,51) P₃₋₄<0,001	44,98 (34,25-53,42)

Примечания: представлены медианы, интерквартильные размахи. ФГА⁺ – образцы, стимулированные фитогемагглютинином; ФГА⁻ – контроль. Различия между группами установлены на основе U-критерия Манна-Уитни

Можно заключить, что $CD71$ -позитивные Т-лимфоциты отражают субпопуляцию активированных/делящихся клеток. Функция рецептора трансферрина 1 состоит в поставке железа внутрь клетки [Gammella *et al.*, 2017]. Активированным (G1) Т-лимфоцитам требуется больше этого микроэлемента, чем покоящимся клеткам. Так, железо необходимо для интенсификации биохимических процессов, связанных с последующим делением клеток, в т.ч. активации циклин-зависимых киназ, синтеза дезоксирибонуклеотидов [Testa, Pelosi, Peschle, 1993] и железосерных кластеров митохондрий [Napier, Ponka, Richardson, 2005]. Также известно, что истощение запасов железа вызывает

остановку клеточного цикла в G1/S и апоптоз лимфоцитов [Yu, Kovacevic, Richardson, 2007].

Отсутствие экспрессии Ki67 в части CD71-позитивных Т-лимфоцитов вызывает много вопросов. Поступившие внутрь лимфоцита атомы железа могут не только вовлекаться в процесс деления клетки, но и связываться с белком ферритином для хранения [Dörner *et al.*, 1980]. Однако известно, что экспрессия рецептора трансферрина 1 и ферритина являются взаимоисключающими процессами. Трансляция этих белков регулируется системой, включающей железочувствительный элемент мРНК (IRE) и его регуляторный белок (IRP) [Testa *et al.*, 1991]. При активации Т-лимфоцита свободный от железа IRP присоединяется к мРНК рецептора трансферрина и усиливает трансляцию CD71, чем увеличивает поток железа в клетку. В это же время к мРНК ферритина присоединяется блокирующий его трансляцию IRP. Следовательно, усиление притока железа через обильно экспрессирующийся на активированных Т-лимфоцитах рецептор CD71 не может рассматриваться как механизм увеличения запасов микроэлемента, но свидетельствует о подготовке клеток к делению. Поэтому судьба CD71⁺Ki67⁻ Т-лимфоцитов остается не до конца понятной.

Таким образом, можно сделать следующее заключение. В стимулированной ФГА культуре мононуклеарных лейкоцитов по сравнению с нестимулированными клетками растут доли Ki67 и CD71-позитивных Т-лимфоцитов, а также уровни экспрессии данных маркеров, что говорит о вступлении клеток в пролиферативный цикл. Ввиду того, что молекула CD71 экспрессируется как на делящихся, так и на активированных Т-лимфоцитах, этот маркер не является полным аналогом Ki67 и не может использоваться как точный индикатор пролиферации Т-клеток. Вместе с тем, молекула CD71 может применяться при исследовании активации/пролиферации Т-лимфоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушение пролиферации CD4⁺ Т-лимфоцитов приводит к различным патологиям [Moulton, Tsokos, 2011; Chou, Effros, 2013]. Оптимальным методом исследования пролиферации Т-клеток на сегодняшний день является проточная цитометрия с оценкой экспрессии маркера Ki67 [Scholzen, Gerdes, 2000]. Однако важно отметить, что внутриклеточная локализация этой молекулы обуславливает необходимость фиксации и пермеабелизации клеточных мембран, что исключает возможность дальнейшей оценки функционального состояния делящихся лимфоцитов [Jamur, Oliver, 2010]. В связи с этим поиск поверхностных молекул-аналогов Ki67 является актуальным. Настоящая работа была посвящена исследованию возможности использования поверхностной молекулы CD71 в качестве маркера пролиферации CD4⁺ Т-клеток.

На первом этапе работы были рассмотрены особенности экспрессии маркера Ki67 в стимулированных ФГА и нестимулированных Т-лимфоцитах периферической крови человека. В стимулированной культуре по сравнению с нестимулированными клетками был зарегистрирован рост процентного содержания Ki67-позитивных элементов ($P < 0,001$) и уровня экспрессии данной молекулы ($P < 0,01$). Подобное изменение экспрессии Ki67 было отмечено в общем пуле Т-лимфоцитов, в CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках и лимфоцитах различной степени зрелости, в т.ч. наивных и памяти.

На втором этапе исследования аналогично предыдущему разделу были установлены особенности экспрессии молекулы CD71 в нестимулированных и стимулированных Т-лимфоцитах. Было обнаружено, что содержание CD71-позитивных Т-клеток и уровень экспрессии этой молекулы повысились в стимулированных образцах относительно нестимулированных проб ($P < 0,001$). Также рост экспрессии CD71 был характерен для CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, наивных клеток и лимфоцитов памяти.

Финальный этап работы заключался в оценке взаимосвязи экспрессии CD71 и Ki67. Между ними была выявлена сильная положительная корреляция,

отмеченная в общем пуле Т-лимфоцитов, пулах CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, субпопуляциях наивных лимфоцитов и клеток памяти ($P < 0,001$). Важно обратить внимание, что среди Т-лимфоцитов все Ki67-положительные клетки экспрессировали молекулу CD71, при этом в культуре присутствовала субпопуляция CD71-монопозитивных лимфоцитов. Примечательно, что численность этих CD71⁺Ki67⁻ клеток значительно ($P < 0,001$) превышала содержание CD71⁺Ki67⁺ лимфоцитов.

Следовательно, молекула CD71 не может считаться полным аналогом маркера Ki67, так как ее экспрессия свидетельствует не столько о делении, сколько об активации Т-лимфоцитов. В связи с этим рекомендуется провести работу по изучению пролиферации CD71⁺Ki67⁻ клеток, включающую в т.ч. сортировку и культивирование *in vitro* этой субпопуляции лимфоцитов. Также предлагается рассмотреть комбинацию из нескольких поверхностных маркеров в качестве альтернативы Ki67 при исследовании пролиферации Т-лимфоцитов. Помимо этого, представляет интерес сравнение результатов экспрессии CD71 и Ki67, полученных при стимуляции Т-лимфоцитов другими неспецифическими митогенами, например конканавалином А, или при связывании антителами молекул CD3 и CD28.

ВЫВОДЫ

1. Инкубация мононуклеарных лейкоцитов в течение 42 ч в присутствии фитогемагглютинина приводит к увеличению доли Ki67⁺ и CD71⁺ Т-клеток, а также повышению уровня экспрессии этих молекул на Т-лимфоцитах.
2. Относительное количество Ki67⁺ Т-клеток положительно и статистически значимо коррелирует с долей CD71⁺ Т-лимфоцитов.
3. Молекула CD71 не является полным аналогом маркера Ki67, но может эффективно применяться при исследовании активации/пролиферации Т-клеток.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- НАД – никотинамидадениндинуклеотид
- НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- ППС – полная питательная среда
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- РНКаза – рибонуклеаза
- рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота
- ФГА – фитогемагглютинин
- ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка
- BSA – бычий сывороточный альбумин
- CD – кластер дифференцировки (cluster of differentiation)
- DPBS – фосфатно-солевой буферный раствор в модификации Дульбекко (Dulbecco's phosphate-buffered saline)
- FMO – флуоресценция минус один (fluorescence minus one)
- HLA – человеческий лейкоцитарный антиген (human leukocyte antigen)
- IFN – интерферон (interferon)
- IL – интерлейкин (interleukin)
- IRE – железочувствительный элемент (iron-responsive element)
- IRP – белок, связывающийся с железочувствительным элементом (iron-responsive element binding proteins)
- ITAM – богатые тирозином активационные мотивы (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
- MFI – медиана интенсивности флуоресценции (median fluorescence intensity)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонеева И.И., Петров С.Б. Маркеры апоптоза и пролиферации опухолевых клеток в динамике прогрессирования рака яичника // Онкология. 2008. Вып. 10 (№ 2). С. 234–237.
2. Клиническая лабораторная диагностика: методы исследования / И.А. Зупанец, С.В. Мисюрева, В.В. Прописнова, С.Б. Попов, Т.С. Сахарова, Н.В. Бездетко, О.И. Залюбовская, Ф.С. Леонтьева, В.А. Туляков. 3-е изд., перераб. и доп. Харьков: НФаУ: Золотые страницы, 2005. 200 с.
3. Тупицын Н.Н., Летягин В.П., Паниченко А.В., Васильев М.Б., Шинкарев С.А., Артамонова Е.В., Огнерубов Н.А., Ермилова В.Д., Рязанцева С.Н. Новые иммунологические маркеры (CD71, LU-BCRU-G7), взаимосвязанные с прогнозом рака молочной железы // Современная онкология. 2001. Вып. 3 (№ 4). С. 161–163.
4. Хаитов Р.В. Иммунология: учебник для студентов медицинских вузов. М: ГЭОТАР-медиа, 2009. 311 с.
5. Чередеев А.Н., Горлина Н.К., Козлов И.Г. CD-маркеры в практике клинико-диагностических лабораторий // Клиническая лабораторная диагностика. 1999. Вып. 6. С. 25–31.
6. Ярилин А.А. Основы иммунологии. М: Медицина, 1999. 608 с.
7. Akbar N., Terry L., Timms A., Beverley P.C., Janossy G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells // J. Immunol. 1988. Vol. 140. № 7. P. 2171–2178.
8. Baynes R.D., Skikne B.S., Cook J.D. Circulating transferrin receptors and assessment of iron status // J. Nutr. Biochem. 1994. Vol. 5. P. 322–330.
9. Bendall S.C., Simonds E.F., Qiu P., Amir E.D., Krutzik P.O., Finck R., Bruggner R.V., Melamed R., Trejo A., Ornatsky O.I., Balderas R.S., Plevritis S.K., Sachs K., Pe D., Tanner S.D., Nolan G.P. Single-Cell Mass Cytometry of Differential Immune and Drug Responses Across a Human Hematopoietic Continuum // Science. 2011. Vol. 332. P. 687–697.

10. Bui M.H., Visapaa H., Seligson D., Kim H., Han K.R., Huang Y., Horvath S., Stanbridge E.J., Palotie A., Figlin R.A., Beldegrun A.S. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and Ki-67 as predictors of survival for renal cell carcinoma // *J. Urol.* 2004. Vol. 171. № 6. P 2461–2466.
11. Burrack A.L., Martinov T., Fife B.T. T cell-mediated beta cell destruction: Autoimmunity and alloimmunity in the context of type 1 diabetes // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2017. Vol. 8. P. 343.
12. Caccamo N., Meraviglia S., Ferlazzo V., Angelini D., Borsellino G., Poccia F., Battistini L., Dieli F., Salerno A. Differential requirements for antigen or homeostatic cytokines for proliferation and differentiation of human Vgamma9Vdelta2 naive, memory and effector T cell subsets // *Eur. J. Immunol.* 2005. Vol. 35. № 6. P. 1764–1772.
13. Campeljohann R.S. The measurement of intracellular antigens and DNA by multiparametric flow cytometry // *J. Microsc.* 1994. Vol. 176. № 1. P. 1–7.
14. Choi S., Schwartz R.H. Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models // *Semin. Immunol.* 2007. Vol. 19. P. 140–152.
15. Chou J.P., Effros R.B. T Cell Replicative Senescence in Human Aging // *Curr. Pharm. Des.* 2013. Vol. 19. P. 1680–1698.
16. Cibrián D., Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper // *Eur. J. Immunol.* 2017. Vol. 47. № 6. P. 946–953.
17. Collado M., Blasco M.A, Serrano M. Cellular Senescence in Cancer and Aging // *Cell.* 2007. Vol. 99. P. 1047–1078.
18. Collado M., Serrano M. Senescence in tumours: Evidence from mice and humans // *Nat. Rev. Cancer.* 2010. Vol. 10. P. 51–57.
19. Collier H.A. What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. Vol. 8. № 8. P. 667–670.
20. Conlon I., Raff M. Size Control in Animal Development // *Cell.* 1999. Vol. 96. № 2. P. 235–244.

21. Cuylen S., Blaukopf C., Politi A.Z., Muller-Reichert T., Neumann B., Poser I., Ellenberg J., Hyman A.A., Gerlich D.W. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes // *Nature*. 2016. Vol. 535. № 7611. P. 308–312.
22. Darzynkiewicz Z., Crissman H., Jacobberger J.W. Cytometry of the cell cycle: Cycling through history // *Cytometry*. 2004. Vol. 58A. P. 21–32.
23. Dörner M.H., Silverstone A., Nishiya K., de Sostoa A., Munn G., de Sousa M. Ferritin synthesis by human T lymphocytes // *Science*. 1980. Vol. 209. № 4460. P. 1019–1021.
24. Eicher D.M., Damjanovich S., Waldmann T.A. Oligomerization of IL-2 Ralpha // *Cytokine*. 2002. Vol. 17. № 2. P. 82–90.
25. Gaffen S.L. Signaling domains of the interleukin-2 receptor // *Cytokine*. 2001. Vol. 14. № 2. P. 63–77.
26. Gammella E., Buratti P., Cairo G., Recalcati S. The transferrin receptor: the cellular iron gate // *Metallomics*. 2017. Vol. 9, № 10. P. 1367–1375.
27. Graca L., Cobbold S.P. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts // *J. Exp. Med.* 2002. Vol. 195. № 12. P. 1641–1646.
28. Harakal J., Rival C., Qiao H., Tung K.S. Regulatory T Cells Control Th2-Dominant Murine Autoimmune Gastritis // *J. Immunol.* 2016. Vol. 197. P. 27–41.
29. Hove-Skovsgaard M., Zhao Y., Tingstedt J.L., Hartling H.J., Thudium R.F., Benfield T., Afzal S., Nordestgaard B., Ullum H., Gerstoft J., Mocroft A., Nielsen S.D. Impact of Age and HIV Status on Immune Activation, Senescence and Apoptosis // *Front. Immunol.* 2020. Vol. 30. №11. P. 583569.
30. Howard A., Pelc S.R. Nuclear incorporation of P³² as demonstrated by autoradiographs // *Exp. Cell. Res.* 1951. Vol. 2. P. 178–187.
31. Iglesias-Ussel M., Marchionni L., Romerio F. Isolation of microarray-quality RNA from primary human cells after intracellular immunostaining and fluorescence-activated cell sorting // *J Immunol Methods*. 2013. Vol. 391. № 12. P. 22–30.
32. Jamur M.C, Oliver C. Permeabilization of cell membranes // *Methods Mol Biol.* 2010. Vol. 588. P. 63–66.

33. Kaech S.M., Wherry E.J., Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development // *Nat. Rev. Immunol.* 2002. Vol. 2. № 4. P. 251–262.
34. Kafri R., Levy J., Ginzberg M.B., Oh S., Lahav G., Kirschner M.W. Dynamics extracted from fixed cells reveal feedback linking cell growth to cell cycle // *Nature*. 2013. Vol. 494. P. 480–483.
35. Kasakovski D., Xu L., Li Y. T cell senescence and CAR-T cell exhaustion in hematological malignancies // *J. Hematol. Oncol.* 2018. Vol. 11. P. 91.
36. Lee H.C. Enzymatic functions and structures of CD38 and homologs // *J. Chem. Immunol.* 2000. Vol. 75. P. 39–59.
37. Leonard W. J., Lin J. X. Cytokine receptor signaling pathways // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000. Vol. 105. № 5. P. 877–888.
38. Li X., Miao H., Henn A., Topham D.J., Wu H., Zand M.S., Mosmann T.R. Ki-67 expression reveals strong, transient influenza specific CD4 T cell responses after adult vaccination // *Vaccine*. 2012. Vol. 30. № 31. P. 4581–4584.
39. Liao F., Hsiao W., Lin Y., Chan Y. T cell proliferation and adaptive immune responses are critically regulated by protein // *Cell Cycle*. 2016. Vol. 15. № 8. P. 1073–1083.
40. Lindenmann M.J., Benczik M., Gaffen S.L. Anti-apoptotic signaling by the interleukin-2 receptor reveals a function for cytoplasmic tyrosine residues within the common γ (gc) receptor subunit // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. № 12. P. 10239–10249.
41. Lio D., Candore G., Cigna D., D'Anna C., Di Lorenzo G., Giordano C., Lucania G., Mansueto P., Melluso M., Modica M.A., Caruso C. In vitro T cell activation in elderly individuals: failure in CD69 and CD71 expression // *Mech. Ageing Dev.* 1996. Vol. 89. № 1. P. 51–58.
42. Marsee D.K., Pinkus G.S., Yu H. CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens // *Am. J. Clin. Pathol.* 2010. Vol. 134. № 3. P. 429–435.

43. Marzio R., Mauël J., Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 1999. Vol. 21. № 3. P. 565–582.
44. Moulton V.R., Tsokos G.C. Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus // *Arthritis. Res. Ther.* 2011. Vol. 13. P. 207.
45. Napier I., Ponka P., Richardson D.R. Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease // *Blood.* 2005. Vol. 105. № 5. P. 1867–1874.
46. Newman R., Schneider C., Sutherland R., Vodinelich L., Greaves M. The transferrin receptor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983. Vol. 80. № 3, P. 835–839.
47. Odum N, Martin P.J., Schieven G.L., Masewicz S., Hansen J.A., Ledbetter J.A. HLA-DR molecules enhance signal transduction through the CD3/Ti complex in activated T cells // *Tissue Antigens.* 1991. Vol. 38. № 2. P. 72–77.
48. Pizzi M., Margolskee E., Inghirami G. Pathogenesis of Peripheral T Cell Lymphoma // *Annu. Rev. Pathol.* 2018. Vol. 24. № 13. P. 293–320.
49. Polonsky M., Chain B., Friedman N. Clonal expansion under the microscope: studying lymphocyte activation and differentiation using live-cell imaging // *Immunol. Cell. Biol.* 2016. Vol. 94. № 3. P. 242–249.
50. Quastler H., Sherman F.G. Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse // *Exp. Cell. Res.* 1959. Vol. 17. P. 420–428.
51. Reim J., McIntosh K., Martin S., Daniel B.D. Specific immunotherapeutic strategy for myasthenia gravis: targeted antigen-presenting cells // *J. Neuroimmunol.* 1992. Vol. 41. P. 61–70.
52. Rioux-Leclercq N., Turlin B., Bansard J., Patard J., Manunta A., Moulinoux J.P., Guillé F., Ram e M.P., Lobel B. Value of immunohistochemical Ki-67 and p53 determinations as predictive factors of outcome in renal cell carcinoma // *Urology,* 2000. Vol. 55. P. 501–505.
53. Rogers A.W. *Techniques of autoradiography.* Amsterdam: Elsevier, 1973.
54. Roy S., Gascard P., Dumont N., Zhao J., Pan D., Petrie S., Margeta M., Tlsty T.D. Rare somatic cells from human breast tissue exhibit extensive lineage plasticity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. Vol. 110. P. 4598–4603.

- 55.Sandoval-Montes C., Santos-Argumedo L. CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T-cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines // *Leukocyte Biology*. 2005. Vol. 77. P. 513–521.
- 56.Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown // *J. Cell. Physiol*. 2000. Vol. 182. № 3. P. 311–322.
- 57.Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M. et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements // *BMC Mol Biol*. 2006. Vol. 7. № 3. P. 31.
- 58.Schwartz R.H. T cell anergy. // *Ann. Rev. Immunol*. 2003. Vol. 21. P. 305–334.
- 59.Shipkova M., Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation // *Clin. Chim. Acta*. 2012. Vol. 413. № 17-18. P. 1338–1349.
- 60.Soares A., Govender L., Hughes J., Mavakla W., de Kock M., Barnard C., Pienaar B., Janse van Rensburg E., Jacobs G., Khomba G., Stone L., Abel B., Scriba T.J., Hanekom W.A. Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation // *J. Immunol. Methods*. 2010. Vol. 362. № 1-2. P 43–50.
- 61.Sobecki M., Mrouj K., Camasses A., Parisis N., Nicolas E., Llères D., Gerbe F., Prieto S., Krasinska L., David A., Eguren M., Birling M.C., Urbach S., Hem S., Déjardin J., Malumbres M., Jay P., Dulic V., Lafontaine D.Lj., Feil R., Fisher D. The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin // *eLife*. 2016. Vol. 5. № 1. P. 13722–13755.
- 62.Testa U., Kühn L., Petrini M., Quaranta M.T., Pelosi E., Peschle C. Differential regulation of iron regulatory element-binding protein(s) in cell extracts of activated lymphocytes versus monocytes-macrophages // *J. Biol. Chem*. 1991. Vol. 266. № 21. P. 13925–13930.
- 63.Testa U., Pelosi E., Peschle C. The transferrin receptor // *Critical Reviews in Oncogenesis*. 1993. Vol. 4. № 3. P 241–276.
- 64.Trepel F. Tumor cell proliferation. Theory and results // *Med. Klin*. 1968. Vol. 63. № 17. P. 656–661.
- 65.Waldmann T.A. The interleukin-2 receptor // *J. Biol. Chem*. 1994. Vol. 266. № 5. P. 2681–2684.

66. Weng N-P., Akbar A.N., Goronzy J. CD28- T cells: their role in the age-associated decline of immune function // *Trends. Immunol.* 2009. Vol. 30. P. 306–312.
67. Yu Y., Kovacevic Z., Richardson D.R. Tuning cell cycle regulation with an iron key // *Cell Cycle.* 2007. Vol. 6. № 16. P. 1982–1994.
68. Zhu J., Paul W.E. CD4 T cells: fates, functions, and faults // *Blood.* 2008. Vol. 112. № 5. P. 1557–1569.