

УРОВНИ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ КЛЕТОК CD8+ У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ© 2021 г. **О. А. Ставинская**, Л. К. Добродеева, В. П. Патракеева

ФГБУН Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н. П. Лавёрова Уральского отделения Российской академии наук, Институт физиологии природных адаптаций, г. Архангельск

Введение: Цитотоксические Т-лимфоциты играют важную роль в специфическом иммунном ответе, осуществляя литическое действие по отношению к инфицированным и опухолевым клеткам организма. Уровни данных клеток значительно увеличиваются при различных хронических патологиях. Кроме того, повышенный уровень цитотоксической активности характерен для иммунного ответа людей, проживающих на северных территориях. В этих условиях важно разобраться, какую функцию преимущественно выполняют цитотоксические Т-лимфоциты у практически здоровых людей – цитолитическую или супрессорную?

Цель: Определить соотношение содержания CD8+ и активности иммунных реакций у практически здоровых людей, установить характер взаимосвязи содержания лимфоцитов CD8+ с процессами апоптоза иммунокомпетентных клеток.

Методы: Выборочную совокупность составили 93 практически здоровых резидента европейского Севера России. Апоптотическую гибель лимфоцитов изучали методом проточной цитофлуориметрии. Детектировались клетки, меченные FITC-аннексином-V и пропидиумом йодидом. Концентрацию цитокинов и медиаторов апоптоза определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. В мазках крови, окрашенных по Романовскому – Гимзе, изучали нейтрограмму, моноцитогамму, фагоцитарную активность нейтрофилов. Уровень фенотипической активности лимфоцитов устанавливали методом двойной пероксидазной метки с использованием моноклональных антител. Для реализации поставленной цели были выделены две группы практически здоровых обследуемых людей: с пониженным ($0,2-0,4 \times 10^9$ кл/л) и повышенным (более $0,6 \times 10^9$ кл/л) уровнем цитотоксических лимфоцитов (CD8+) в периферической крови. Группы были практически равноценны по возрасту и полу. Описание полученных данных проводили при помощи среднего значения и стандартного отклонения, медианы, первого и третьего квартилей. Группы сравнивали с помощью непарного критерия Стьюдента и критерия Манна – Уитни в зависимости от распределения.

Результаты: У практически здоровых людей при увеличении содержания цитотоксических лимфоцитов CD8+ в периферической венозной крови нарастает общий уровень лейкоцитов с ($5,5 \pm 0,23$) до ($7,4 \pm 0,49$) $\times 10^9$ кл/л ($p = 0,003$), лимфоцитов с ($1,8 \pm 0,07$) до ($2,8 \pm 0,17$) $\times 10^9$ кл/л ($p = 0,005$) и зрелых дифференцированных нейтрофилов с ($3,4 \pm 0,49$) до ($4,1 \pm 0,19$) $\times 10^9$ кл/л ($p = 0,013$). Не установлено статистически значимых различий в уровне апоптоза лимфоцитов (AnV+/PI-) и таких показателей некротической гибели клеток, как sFasL, TRAIL, TNF α , цитохром c.

Выводы: Лимфоциты CD8+ у практически здоровых людей выполняют в основном цитотоксическую функцию, что связано с реализацией клеточно-опосредованной защиты, и не связано с клеточной гибелью по механизму апоптоза или некроза.

Ключевые слова: апоптоз лимфоцитов, Т-клетки CD8+, цитотоксичность, человек

ASSOCIATIONS BETWEEN BLOOD CONCENTRATIONS OF CYTOTOXIC CD8+ CELLS AND LYMPHOCYTE APOPTOSIS IN HEALTHY HUMANS**О. А. Stavinskaya**, L. K. Dobrodeeva, V. P. Patrakeeva

N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Institute of Environmental Physiology, Arkhangelsk, Russia

Introduction: Cytotoxic T-lymphocytes play an important role in a specific immune response via a lytic effect in relation to abnormal cells. The number of these cells greatly increases in pathological states. In addition, an increased cytotoxic activity is a characteristic of the immune response of people living in the Far North. Therefore, it is important to understand what function cytotoxic T-lymphocytes predominantly perform in healthy people in the North - cytolytic or suppressor?

Aim: To assess associations between CD8+ concentration and immune response and apoptotic deaths of the lymphocytes in healthy individuals.

Methods: Ninety-three healthy adult residents of the Russian North comprised the sample. Apoptotic lymphocyte death was studied by flow cytometry. FITC-annexin-V and propidium iodide labelled cells were detected. Concentrations of cytokines and apoptosis mediators were assessed by a solid-phase enzyme immunoassay. Neutrophils, monocytes and phagocytic activity of neutrophils were studied in blood smears stained by Romanowsky's - Giemsa. The level of phenotypic activity of lymphocytes was assessed by double peroxidase labeling using monoclonal antibodies. The data were presented using means, standard deviations, medians, the 1st and the 3rd quartiles. All study participants were divided into two groups: with normal- ($0.2-0.4 \times 10^9$ kl/l) and elevated (more 0.6×10^9 kl/l) blood cytotoxic lymphocyte levels. The groups were similar in terms of by age- and gender distribution. Continuous variables were analyzed using Mann-Whitney tests.

Results: In individuals with an increased level of cytotoxic CD8+ lymphocytes in peripheral venous blood had greater concentrations of leukocytes ($7.4 \pm 0.49 \times 10^9$ cells/l vs. $5.5 \pm 0.23 \times 10^9$, $p = 0.003$), lymphocytes ($2.8 \pm 0.17 \times 10^9$ cells/l vs. $1.8 \pm 0.07 \times 10^9$ cells/l, $p = 0.005$), and mature neutrophils ($4.1 \pm 0.19 \times 10^9$ cells/l vs. $3.4 \pm 0.49 \times 10^9$ cells/l, $p = 0.013$). No associations between the level of apoptosis of lymphocytes (AnV+/PI-) and concentrations of sFasL, TRAIL, TNF α , and cytochrome C were observed.

Conclusions: Lymphocytes CD8+ in healthy residents of the Russian North perform mainly cytotoxic function, which is not related to apoptotic cellular death.

Key words: apoptosis of lymphocytes, CD8 T-cells, cytotoxicity, humans

Библиографическая ссылка:

Ставинская О. А., Добродеева Л. К., Патракеева В. П. Уровни апоптотической гибели лимфоцитов в зависимости от содержания цитотоксических клеток CD8+ у практически здоровых людей // Экология человека. 2021. № 9. С. 4–10.

For citing:

Stavinskaya O. A., Dobrodeeva L. K., Patrakeeva V. P. Associations between Blood Concentrations of Cytotoxic CD8+ Cells and Lymphocyte Apoptosis in Healthy Humans. *Ekologiya cheloveka (Human Ecology)*. 2021, 9, pp. 4-10.

Введение

Цитотоксические Т-лимфоциты играют важную роль в специфическом иммунном ответе, осуществляя литическое действие по отношению к инфицированным и опухолевым клеткам организма. Данные лимфоциты способны также оказывать супрессорное действие на клеточное окружение. Фенотипически популяция цитотоксических лимфоцитов неоднородна. Это проявляется различной степенью локализации на клеточной плазматической мембране поверхностных антигенов CD27, CD28, CD45RA и CD62L.

На молодых, или «наивных», CD3+CD8+ лимфоцитах располагаются в основном изоформы CD45RA+CD62L+, данная субпопуляция составляет в среднем до 30 % от общей численности CD3+CD8+. Клетки памяти могут иметь фенотипы CD45RA–CD62L+ (приблизительно 11 % от всей популяции CD3+CD8+ Т-клеток) и CD45RA–CD62L– (CD45RA–CD62L–CD27+CD28+, CD45RA–CD62L–CD27+CD28–, CD45RA–CD62L–CD27–CD28–, CD45RA–CD62L–CD27–CD28+, 35 % популяции). Оставшиеся 24 % относятся к терминально-дифференцированным цитотоксическим лимфоцитам TEMRA с фенотипом CD45RA+CD62L– (CD45RA+CD62L–CD27+CD28+, CD45RA+CD62L–CD27–CD28–, CD45RA+CD62L–CD27–CD28–) [3, 4].

Молекулы дифференцировки имеют различное значение в жизненном цикле цитотоксических клеток. CD45RA (тирозинфосфатаза) участвует в передаче антигенного сигнала с Т-клеточного рецептора внутрь клетки, CD62L способствует адгезии и миграции «наивных» Т-лимфоцитов в периферические лимфоидные органы. Функция CD27 заключается в защите Т-клеток памяти, а также активированных «наивных» Т-клеток от программируемой гибели путем повышения экспрессии антиапоптотических белков в ядре в результате активации киназ JNK и NF-κB. CD28 является рецептором костимуляции цитотоксических Т-лимфоцитов, что выражается в увеличении продукции цитокинов (IL-2, IL-6) и росте выживаемости Т-лимфоцитов путем экспрессии антиапоптотических белков, например Bcl-XL [22].

Нужно отметить, что среди различных дефектов иммунологической реактивности у практически здоровых людей, родившихся и проживающих на территории Арктической зоны Российской Федерации, активизация Т-клеточной цитотоксичности или повышение содержания относительно нормативных значений лимфоцитов CD8+ [6] в периферической венозной крови регистрируется довольно часто. По результатам иммунологического мониторинга состояния здоровья жителей Архангельской области

за период 1980–2000 гг. установлено, что данный дисбаланс содержания Т-клеток отмечается у ($7,09 \pm 0,21$) % обследованных лиц [1]. В настоящее время, в динамике 20 лет наблюдения, отмечается очевидная тенденция к росту частоты регистрации повышенных концентраций циркулирующих CD8+ до ($24,63 \pm 0,36$) %.

В период биологических сумерек (ноябрь, февраль) и полярной ночи (декабрь) концентрация цитотоксических клеток увеличивается в 1,5–2 раза по сравнению с таковыми значениями в период полярного дня, что ассоциировано с повышением среднего уровня IgE и содержания концентраций аутоантител к двухцепочечной ДНК, РНК, тиреоглобулину, комплексному антигену щитовидной железы и печени [1]. Избыточное потребление белков и жиров (сверх рекомендуемых нормативов) при интенсивных физических нагрузках как у мужчин, так и у женщин приводит к увеличению относительного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов на фоне сокращения числа Т-хелперов [8]. Усиление цитотоксической активности лимфоцитов наблюдается у людей с возрастом, что в большей степени выражено у лиц старше 75 лет (по сравнению с лицами 45–59 лет). Данная реакция сочетается с повышением содержания циркулирующих в крови антителообразующих клеток CD20+ на фоне снижения концентрации лимфоцитов CD95+, готовых к рецепторному запуску программы апоптоза [2]. У детей, воспитывающихся в детских домах с рождения, также статистически значимо чаще регистрируется высокий уровень фоновой антителозависимой (68,88 %) и клеточноопосредованной цитотоксичности (48,33 %) наряду с дефицитом фагоцитарной защиты нейтрофилов (в 58,56 % случаев) по сравнению с активностью фагоцитоза у детей, живущих в полноценных семьях [5].

Увеличивается частота регистрации повышенных концентраций CD8+ клеток в крови и у лиц со злокачественными новообразованиями. Так, у больных раком желудка и толстого кишечника III, IV стадий выявлены максимально высокие значения содержания CD8+: с частотой 90,32 и 89,47 % соответственно. И даже в условиях неблагоприятного исхода патологического процесса содержание цитотоксических лимфоцитов остается всегда очень большим, зачастую в значительной степени превышая уровень CD4+ [2]. При обострении хронического воспалительного процесса активизация местной иммунной реакции напрямую связана с увеличением общего числа лимфоцитов, преимущественно цитотоксических CD8+ и CD16+ [9]. У лиц с хронической патологией легких такое увеличение наблюдается в период как обострения, так и ремиссии, что обуславливает по-

вреждение легочной ткани больных из-за развития пневмосклероза и эмфиземы [7].

В этих условиях важно разобраться, какую функцию преимущественно выполняют цитотоксические Т-лимфоциты у практически здоровых людей – цитолитическую или супрессорную? Непомерная, неконтролируемая активизация одной из функций CD8+ Т-клеток в виде дефекта иммунологической реактивности у практически здорового человека может привести к развитию патологии воспалительного или онкологического генеза. В случае усиления цитотоксической активности лимфоцитов важно понимать, на что направлена данная реакция и как это влияет на общий иммунный фон. Имеет значение ответ на вопрос, существует ли взаимосвязь между уровнем клеточной гибели путем цитолиза и апоптозом, основной генетически запрограммированной формой клеточной гибели. В связи с вышесказанным была поставлена цель – определить соотношение содержания CD8+ и активности иммунных реакций у практически здоровых людей, установить характер взаимосвязи содержания лимфоцитов CD8+ с процессами апоптоза иммунокомпетентных клеток.

Методы

Были обследованы 93 взрослых (20–60 лет), практически здоровых человека, которые постоянно проживают и ведут трудовую деятельность на территории Архангельской области Российской Федерации. Все волонтеры на момент обследования не имели острых заболеваний и обострения хронических. Для изучения взаимосвязи содержания циркулирующих цитотоксических лимфоцитов CD8+ и состояния программируемой клеточной гибели среди данных практически здоровых людей были выделены две группы обследуемых: с пониженным ($0,2–0,4 \times 10^9$ кл/л; $n = 59$) и повышенным (более $0,6 \times 10^9$ кл/л; $n = 34$) уровнем цитотоксических лимфоцитов в крови – средние значения составляют $(0,32 \pm 0,01)$ и $(0,87 \pm 0,04) \times 10^9$ кл/л, $p < 0,001$. Группы были практически равноценные как по полу – 43–47 % мужчин, 53–57 % женщин, так и по возрасту – $(28,3 \pm 2,1)$ и $(23,4 \pm 5,1)$ года.

Весь комплекс обследований проводился с соблюдением норм и правил биомедицинской этики, представленных в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации об этических принципах проведения медицинских исследований (2013). Для проведения исследования получено заключение этического комитета ФГБУН ФИЦКИА РАН (Протокол № 4 от 07.12.2016 г.).

Апоптотическую гибель циркулирующих лимфоцитов изучали на лазерном проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США) согласно рекомендованному производителем протоколу исследования. Детектировались клетки, меченные FITC-аннексин-В и пропидиумом йодидом. В целях определения состава нейтрограммы, моноцитогаммы, фагоцитарной активности нейтрофилов методом микроскопирования были изучены мазки

крови, окрашенные по Романовскому – Гимзе. Мазки рассматривались под микроскопом Vision MT5300L (Meiji Techno, Япония). Количественное содержание биологически активных веществ (TNF- α , IL-10, ЦИК-С3D, sFasL, TRAIL, цитохрома *c*) было установлено в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с помощью реактивов фирмы Bender MedSystems (Австрия) на фотометре Multiskan MS (Labsystems, Финляндия). Уровень фенотипической активности лимфоцитов оценивался в реакции «высушенной капли» методом двойной пероксидазной метки с применением моноклональных антител (НПЦ «Медбиоспектр», Россия).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью компьютерной прикладной программы Statistica 6 (StatSoft, США). Проверку нормальности распределения количественных показателей осуществляли за счет критерия Шапиро – Уилка. Описание полученных данных проводили при помощи среднего значения и стандартного отклонения, медианы, нижнего и верхнего квартилей. Группы сравнивали, используя параметрический *t*-критерий Стьюдента для независимых выборок, а также непараметрический критерий Манна – Уитни в зависимости от распределения. Различия считались статистически значимыми при p менее 0,05.

Результаты

Установлено, что в условиях повышенного содержания CD8+ в крови у практически здоровых людей выше общее содержание лимфоцитов, включая активированные (CD25+, CD71+, HLADR), пролиферирующие (CD10+), дифференцированные (CD4+, CD 16+, CD23+) клетки (табл. 1, рис. 1). В ответ на это увеличивается число лимфоцитов CD95+ с выраженной готовностью к рецепторному апоптозу и уровень активности апоптоза по абсолютному содержанию клеток ApV+/PI–.

Связан ли данный факт с деятельностью цитотоксических лимфоцитов, можно установить, если изучить динамику относительного содержания апоптотических лимфоцитов при различном уровне CD8+. Из 10 000 клеточных событий, регистрируемых проточным цитофлуориметром, у всех обследуемых лиц на апоптоз приходится 3,0 (1,05–6,5) % при повышенном значении CD8+ лимфоцитов и 2,9 (0,7–5,2) % при низкой концентрации цитотоксических клеток, различий между группами не выявлено. Вероятно, CD8+ не оказывает существенного влияния на программируемую клеточную гибель, увеличение уровня которой связано с факторами пролиферации, дифференцировки и активизации в системе лимфоцитов. Показатели некроза ApV+/PI+ и таких участников апоптоза, как sFasL, TNF α , TRAIL, цитохром *c*, также статистически значимо не менялись у обследуемых лиц, $p > 0,05$. Однако в ситуации повышенного содержания CD8+ в крови повышается концентрация ЦИК-С3D.

При изучении фона иммунных реакций со стороны нейтрофильных гранулоцитов у лиц с повышенным уровнем лимфоцитов CD8+ обращает на себя внимание больший уровень общего числа нейтрофилов за

Таблица 1

Содержание иммунологических показателей в крови практически здоровых людей в зависимости от содержания цитотоксических лимфоцитов CD8+, Ме (Q1–Q3), М ± m

Показатель	CD8+ >0,6 ×10 ⁹ кл/л	CD8+ 0,2–0,4 ×10 ⁹ кл/л	Уровень значимости, р
Лейкоциты, ×10 ⁹ кл/л	7,4±0,49	5,5±0,23	0,003
Лимфоциты, ×10 ⁹ кл/л	2,8±0,17	1,8±0,07	0,005
Апоптотические лимфоциты ApV+/PI-, ×10 ⁹ кл/л	0,07 (0,03–0,18)	0,05 (0,01–0,09)	0,532
Некротические лимфоциты ApV+/PI+, ×10 ⁹ кл/л	0,009 (0,005–0,024)	0,009 (0,003–0,03)	0,471
TNFα, пг/мл	20,2 (11,2–27,7)	20,3 (17,0–42,1)	0,112
TRAIL, пг/мл	38,5 (6,9–44,9)	42,5 (11,9–57,4)	0,094
sFasL, нг/мл	0,08 (0,04–0,25)	0,11 (0,06–0,17)	0,087
Цитохром с, нг/мл	0,08 (0,06–0,10)	0,07 (0,02–0,11)	0,122
ЦИК-С3D, мкг ЭКВ/мл	30,9±4,41	20,7±3,43	0,015

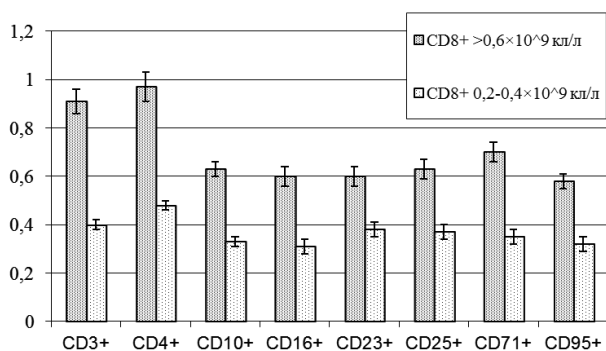


Рис. 1. Содержание фенотипов лимфоцитов в крови практически здоровых людей в условиях различного содержания цитотоксических лимфоцитов CD8+

счет роста концентрации зрелых дифференцированных клеток с 3 и 4 сегментами ядра (табл. 2). Содержание юных палочкоядерных и фагоцитирующих клеток снижается, количество апоптотических гранулоцитов с 5 и более сегментами ядра не имеет статистически значимых различий.

Таблица 2

Содержание нейтрофилов и фагоцитарное число в крови практически здоровых людей в зависимости от содержания цитотоксических лимфоцитов CD8+, Ме (Q1–Q3), М ± m

Показатель	CD8+ >0,6 ×10 ⁹ кл/л	CD8+ 0,2–0,4 ×10 ⁹ кл/л	Уровень значимости, р
Нейтрофилы, ×10 ⁹ кл/л	4,1±0,19	3,4±0,49	0,013
Нейтрофилы с 1 сегментом ядра, ×10 ⁹ кл/л	0,12±0,03	0,24±0,03	0,004
Нейтрофилы с 2 сегментами ядра, ×10 ⁹ кл/л	1,04±0,11	0,99±0,09	0,182
Нейтрофилы 3 сегментами ядра, ×10 ⁹ кл/л	2,01±0,23	1,53±0,10	0,024
Нейтрофилы 4 сегментами ядра, ×10 ⁹ кл/л	1,16±0,13	0,78±0,08	0,019
Нейтрофилы с 5 и > сегментами ядра, ×10 ⁹ кл/л	0,32±0,05	0,22±0,02	0,011
Активные фагоциты, %	41(28-52)	48(34-58)	0,037

При исследовании системы моноцитов периферической крови практически здоровых людей с повышенным уровнем Т-клеточной цитотоксичности отмечено повышение концентрации апоптотических полиморфноядерных моноцитов с 15 (10–20) до 22 (16–29) % на фоне увеличения пролиферативной активности по содержанию промоноцитов с 41 (27–50) до 49 (35–58) %; абсолютные значения представлены на рис. 2. Общее же содержание моноцитов не изменяется и составляет 0,36 (0,23–0,5) и 0,35 (0,22–0,46) ×10⁹ кл/л.

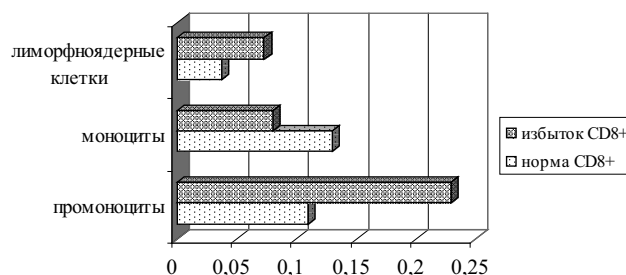


Рис. 2. Структура моноцитограммы крови практически здоровых людей с различным уровнем цитотоксических лимфоцитов

Обсуждение результатов

Многочисленные публикации [12, 18, 20] доказывают, что внешнее перфоринное повреждение, оказываемое цитотоксическими клетками, вызывает каскад ферментативных реакций внутри клеток-мишеней с инициацией их программируемой гибели. Происходит это за счет специфического распознавания молекул HLA I класса, содержащих чужеродные пептиды, с последующим поражением мембраны инфицированной или трансформированной клетки-мишени.

Освобождая активную фракцию перфорина, цитотоксические лимфоциты образуют в мембране клетки-мишени поры и через них запускают внутрь цитоплазмы протеолитические ферменты гранзимы А, В и К, инициирующие митохондриальный апоптоз [17]. Митохондриальную мембрану повреждают протеины семейства Bcl-2: Bid и Mcl-1, которые в нормальном физиологическом состоянии находятся в связанном виде с Bim и нейтрализованы [10]. В результате гранзимовой атаки протеиновые комплексы распадаются

на фрагменты, инициируется снижение энергетического потенциала митохондрий и выход цитохрома *c*. Кроме того, гранзимы расщепляют комплекс *Are/grf-1*, в результате чего образуются высокоактивные кислородные радикалы, повреждающие ядерные ДНК и приводящие к дислокации фосфатидилсерина на поверхности мембраны клетки [13, 14, 25].

Есть работы, свидетельствующие о различных путях прохождения каспазного сигнала и наличии различных молекул-участников апоптоза и цитолиза [11, 21, 24]. Так, показана возможность отсутствия каспазы-3 в активации цитолиза, в результате чего гранзим В расщепляет комплекс DFF45/ICAD с высвобождением дезоксирибонуклеазы DFF40/CAD, ответственной за фрагментацию ДНК и уплотнение хроматина [23]. В реализации апоптотической гибели участие каспазы-3, выполняющей эффекторные функции по расщеплению белков, обязательно [15]. Действительно, апоптоз как генетически запрограммированное событие может инициироваться митохондриальными и рецепторными путями, однако это не подразумевает летального нарушения целостности плазматической мембраны с возникновением отверстий от атакующего вещества перфорина. То есть сигнал гибели поступает внутрь клетки, но это только биохимический сигнал, который сама клетка улавливает и реагирует на него.

В нашем исследовании у лиц с высоким содержанием цитотоксических клеток на лимфоцитах повышается экспрессия маркеров активации (CD25+, CD71+, HLADR), пролиферации (CD10+) и дифференцировки (CD4+, CD16+, CD23+). На этом фоне растет и уровень апоптоза лимфоцитов в качестве компенсаторной реакции во избежание накопления чрезмерного пула зрелых, функционально активных лимфоцитов. Таким образом, поддерживается иммунный гомеостаз без развития воспалительных и некротических процессов в тканях и органах. Корреляционный анализ ($r = 0,01-0,15$) соотношения относительного уровня апоптоза лимфоцитов *AnV+/PI-* и содержания цитотоксических клеток CD8+ может свидетельствовать об отсутствии прямой причинно-следственной связи между апоптозом и цитолизом. Возможно, клетки-мишени, пораженные цитотоксическими Т-лимфоцитами, гибнут в дальнейшем в результате нарушения целостности клеточной мембраны и аутофагии. Данный механизм включает в себя формирование большого числа вакуолей, снижение количества митохондрий и увеличение площади аппарата Гольджи [16, 19]. По сути, происходит «переваривание» внутриклеточного содержимого с образованием дебриса из остатков аутофагосом; впоследствии дебрис поглощается окружающими макрофагами.

В нашей работе Т-лимфоциты CD8+ выполняют, по-видимому, преимущественно цитотоксическую функцию, направленную на повышение клеточно-опосредованной иммунной защиты. На этом фоне

увеличивается количество циркулирующих антигенных детерминант, связанных в комплексе с иммуноглобулинами класса G, что косвенным образом свидетельствует о наличии не утилизируемых клеточных остатков после осуществления реакции цитолиза. Возможно, этому способствует и сниженная активность фагоцитоза. Активизации супрессорной функции клеток CD8+ на фоновом уровне мы не выявили, так как у практически здоровых людей при увеличении содержания цитотоксических лимфоцитов в крови повышается количество молодых и готовых к апоптозу моноцитов, нарастает общий уровень лейкоцитов, лимфоцитов и зрелых дифференцированных нейтрофилов. Кроме того, цитотоксическая активность не связана с апоптозом и некрозом лимфоцитов.

Ранее нами было установлено, что увеличение средней концентрации CD8+ наблюдается у лиц с сахарным диабетом II типа (с $0,32$ до $0,74 \times 10^9$ кл/л, $p = 0,031$, по сравнению с аналогичным показателем у практически здоровых людей). Увеличение сопровождается ингибцией в системе нейтрофильных гранулоцитов: падает общее количество сегментоядерных форм с $4,1$ до $2,89 \times 10^9$ кл/л ($p = 0,012$), снижается активность фагоцитоза с 48 ($34-58$) до 25 ($19-32$) % ($p = 0,001$). У больных сахарным диабетом II типа не выявлено статистически значимых различий по уровню содержания в крови лейкоцитов и лимфоцитов: соответственно $6,35$ и $6,28 \times 10^9$ кл/л, $p = 0,076$; $2,31$ и $2,22 \times 10^9$ кл/л, $p = 0,16$. В связи с этим можно предположить, что в случае возникновения и развития метаболических нарушений (дислипидемия, накопление в организме свободных кислородных радикалов, снижение содержания гликогена, повреждение клеточных структур, увеличение в крови инсулина) в системе иммунитета реализуется преимущественно супрессорная функция лимфоцитов CD8+, направленная на подавление нейтрофильного сдвига вправо на фоне значительного роста концентрации IL-10. Отмечается повышение уровня данного противовоспалительного цитокина с $0,43$ ($0,11-0,77$) до $21,1$ ($18,41-50,18$) пг/мл (по сравнению с показателем у практически здоровых людей, $p = 0,011$).

Таким образом, лимфоциты CD8+ у практически здоровых людей выполняют в основном цитотоксическую функцию, что связано с реализацией клеточно-опосредованной защиты, и не связано с клеточной гибелью по механизму апоптоза или некроза. У лиц с сахарным диабетом II типа Т-клетки CD8+, напротив, активизируются в супрессорном направлении, препятствуя накоплению в свободной циркуляции зрелых дифференцированных нейтрофилов с участием цитокина IL-10.

Работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований по теме лаборатории экологической иммунологии Института физиологии природных адаптаций ФИЦКИА УрО РАН «Влияние общего охлаждения на нейро-иммуно-эндокринную

регуляцию гомеостаза человека» (№ гос. регистрации АААА-А17-117033010124-7).

Авторство

Ставинская О. А. осуществила обработку материалов обследования, получение, анализ, интерпретацию, статистическую обработку первичных данных, подготовила первый вариант статьи; Добродеева Л. К. организовала обследование, консультации, внесла существенный вклад в интерпретацию полученных данных и переработку важного интеллектуального содержания, утвердила присланную в редакцию рукопись; Патракеева В. П. участвовала в получении и анализе данных, подготовила присланную в редакцию рукопись.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Ставинская Ольга Александровна – ORCID 0000-0002-0022-5387; SPIN 2766-9228

Добродеева Лилия Константиновна – ORCID 0000-0003-3211-7716; SPIN 4518-6925

Патракеева Вероника Павловна – ORCID 0000-0001-6219-5964; SPIN 9573-1094

Список литературы / References

1. Добродеева Л. К. Иммунологическое районирование. Сыктывкар: Изд-во Коми научного центра УрО РАН, 2001. 112 с.
2. Dobrodeeva L. K. *Immunological division into districts*. Syktyvkar, Komi NC Ural Branch of RAS, 2001, 112 p. [In Russian]
3. Добродеева Л. К., Сергеева Е. В. Состояние иммунной системы в процессе старения. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2014. 136 с.
4. Dobrodeeva L. K., Sergeeva E. V. *Sostoyanie immunnioi sistemy v protsesse stareniya* [State of the immune system during aging]. Yekaterinburg, Ural Branch of RAS Publ., 2014, 136 p.
5. Кудрявцев И. В., Борисов А. Г., Волков А. Е., Савченко А. А., Серебрякова М. К., Полевщиков А. В. Анализ уровня экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами различного уровня дифференцировки // Тихоокеанский медицинский журнал. 2015. № 2. С. 30–35.
6. Kudryavtsev I. V., Borisov A. G., Volkov A. E., Savchenko A. A., Serebryakova M. K., Polevshchikov A. V. Analysis of CD56 expression level CD57 cytotoxic T lymphocytes of different levels of differentiation. *Tikhookeanskii meditsinskii zhurnal* [Pacific medical journal]. 2015, 2, pp. 30-35. [In Russian]
7. Кудрявцев И. В., Борисов А. Г., Кробинец И. И., Савченко А. А., Серебрякова М. К. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 6. С. 525–538.
8. Kudryavtsev I. V., Borisov A. G., Krobinec I. I., Savchenko A. A., Serebryakova M. K. Determination of major subpopulations of cytotoxic T lymphocytes by multicolored flow cytometry. *Meditsinskaya immunologiya* [Medical immunology]. 2015, 17 (6), pp. 525-538. [In Russian]
9. Леванюк А. И. Состояние иммунной системы у воспитанников детских домов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Архангельск, 2006. 18 с.
10. Levanyuk A. I. *Sostoyanie immunnioi sistemy u vospitannikov detskikh domov (avtoref. kand. diss.)* [State of the immune system in children 's homes. Author's Abstract of Cand. Diss.]. Arkhangelsk, 2006, 18 p.
11. Пределы физиологического колебания в периферической крови метаболитов, гормонов, лимфоцитов, цитокинов и иммуноглобулинов у жителей Архангельской области: Информационные материалы / сост. и отв. ред. Л. К. Добродеева. Архангельск, 2005. 52 с.
12. Limits of physiological variation in peripheral blood of metabolites, hormones, lymphocytes, cytokines and immunoglobulins in residents of Arkhangelsk region: information materials. Ed. L. K. Dobrodeeva. Arkhangesk, 2005, 52 p. [In Russian]
13. Распопина Н. А., Шуганов Е. Г., Палеев Ф. Н., Салмаси Ж. М., Шуганов А. Е. Роль цитотоксических лимфоцитов в воспалении у больных хронической обструктивной болезнью легких в стадиях обострения и ремиссии // Альманах клинической медицины. 2014. № 35. С. 49–53.
14. Raspopina N. A., Shuganov E. G., Paleev F. N., Salmasi Zh. M., Shuganov A. E. Role of cytotoxic lymphocytes in inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease during exacerbation and remission. *Al'manakh klinicheskoi meditsiny* [Almanac of clinical medicine]. 2014, 35, pp. 49-53. [In Russian]
15. Трушина Э. Н., Мустафина О. К., Гаппарова К. М., Ханферьян Р. А. Состояние клеточного иммунитета у высококвалифицированных спортсменов различных видов спорта // Вопросы питания. 2014. Т. 83, S3. С. 147.
16. Trushina E. N., Mustafina O. K., Gapparova K. M., Khanfer'yan R. A. State of cellular immunity in highly qualified athletes of various sports. *Food questions* [Food questions]. 2014, 83 (S3), p. 147. [In Russian]
17. Штаборов В. А. Соотношение общих и местных реакций иммунной защиты у жителей Севера: автореф. канд. дисс. Архангельск, 2009. 18 с.
18. Shtaborov V. A. Ratio of general and local immune defense reactions in people in the North. Author's Abstract of Cand. Diss. Arkhangelsk, 2009, 18 p. [In Russian]
19. Adrain C., Murphy B. M., Martin S. J. Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, pp. 4663-4673.
20. Andrade F., Roy S., Nicholson D. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity*. 1998, 8, 4, pp. 451-460.
21. Catalfamo M., Henkart P. A. Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity. *Curr. Opin. Immunol.* 2003, 15 (5), pp. 522-527.
22. Fan Z., Beresford P. J., Zhang D. Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nat. Immunol.* 2003, 4, pp. 145-153.
23. Guo Y., Chen J., Zhao T., Fan Z. Granzyme K degrades the redox/DNA repair enzyme Ape1 to trigger oxidative stress of target cells leading to cytotoxicity. *Mol. Immunol.* 2008, 45 (8), pp. 2225-2235.
24. Jacobson M. D., McCarthy N. Apoptosis the molecular biology of programmed cell death. *Oxford University Press*, 2002, 321 p.
25. Kinzler M. N., Zielke S., Kardo S., Meyer N., Kögel D., Sjoerd J. L., Fulda S. STF-62247 and pimozone induce autophagy and autophagic cell death in mouse embryonic fibroblasts. *Scientific Reports*. 2020, 10, pp. 1-15.
26. Lieberman J. Cell death and immunity: the ABCs of granule-mediated cytotoxicity. New weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* 2003, 3, pp. 361-370.
27. Metkar S. S., Wang B., Aguilar-Santelises M., Raja S. M., Uhlin-Hansen L., Podack E., Trapani J. A.,

Froelich C. J. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity*. 2002, 16, pp. 417-428.

19. Rienzo M. D., Romagnoli A., Antonioli M., Piacentini M., Fimia G. M. TRIM proteins in autophagy: selective sensors in cell damage and innate immune responses. *Cell Death and Differentiation*. 2020, 178, pp. 1-16.

20. Shi L., Keefe D., Durand E. Granzyme B binds to target cells mostly by charge and must be added at the same time as perforin to trigger apoptosis. *J. Immunol.* 2005, 174, pp. 5456-5461.

21. Shresta S., Graubert T., Thomas D., Raptis S. Z., Ley T. J. Granzyme A initiates an alternative pathway for granule-mediated apoptosis. *Immunity*. 1999, 10 (5), pp. 595-605.

22. Sperling A. I., Auger J. A., Ehst B. D., Rulifson I. C., Thompson C. B., Bluestone J. A. CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation. *J. Immunol.* 1996, 157, pp. 3909-3917.

23. Thomas D. A., Du C., Xu M., Wang X., Ley T. J. DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the

induction of apoptosis. *Immunity*. 2000, 12 (6), pp. 621-632.

24. Waterhouse N. J., Sutton V. R., Sedelies K. A., Ciccone A., Jenkins M., Turner S. J., Bird P. I., Trapani J. A. Cytotoxic T lymphocyte-induced killing in the absence of granzymes A and B is unique and distinct from both apoptosis and perforin-dependent lysis. *J. of Cell Biol.* 2006, 173 (1), pp. 133-144.

25. Zhao T., Zhang H., Guo Y., Fan Z. Granzyme K directly processes bid to release cytochrome c and endonuclease G leading to mitochondria-dependent cell death. *J. Biol. Chem.* 2007, 282 (16), pp. 12104-12111.

Контактная информация:

Патракеева Вероника Павловна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией экологической иммунологии Института физиологии природных адаптаций ФГБУН «Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н. П. Лавёрова» Уральского отделения Российской академии наук

Адрес: 163000, г. Архангельск, пр. Ломоносова, д. 249
E-mail: patrakeeva.veronika@yandex.ru