

ФЕНОТИПЫ ЛИМФОЦИТОВ, НАИБОЛЕЕ ПОДВЕРЖЕННЫХ АПОПТОЗУ У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ¹

О.А. Ставинская* ORCID: [0000-0002-0022-5387](https://orcid.org/0000-0002-0022-5387)

В.П. Патракеева* ORCID: [0000-0001-6219-5964](https://orcid.org/0000-0001-6219-5964)

*Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаврова Российской академии наук (г. Архангельск)

Цель исследования – выявить фенотипы лимфоцитов, преимущественно подвергающиеся программируемой гибели у практически здоровых людей. Обследованы 138 человек в возрасте от 20 до 60 лет, проживающих и работающих в Архангельской области. Лейкограмму периферической крови определяли на гематологическом анализаторе XS-500i (Sysmex, Япония). Апоптоз лимфоцитов оценивали методом проточной лазерной цитофлюориметрии на приборе Epics XL (Beckman Coulter, США). Концентрации цитокинов и медиаторов апоптоза в крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. С помощью микроскопии (Vision MT5300L, Япония) в мазках крови, окрашенных по Романовскому–Гимзе, изучали лимфоцитограмму. Содержание фенотипов лимфоцитов определяли методом двойной пероксидазной метки с использованием моноклональных антител. Границы нормального распределения количественных показателей определяли при помощи критерия Шапиро–Уилка. Статистическую значимость различий между группами оценивали с помощью параметрического *t*-критерия Стьюдента и критерия Уилкоксона. Анализ результатов исследования проводили в зависимости от содержания в крови апоптотических лимфоцитов AnV+/PI-: 1-я группа обследуемых – с относительно пониженным содержанием, $<0,05 \cdot 10^9$ кл/л ($n = 46$); 2-я группа – с уровнем от 0,05 до $0,1 \cdot 10^9$ кл/л ($n = 35$); 3-я группа – с относительно повышенным уровнем, $>0,1 \cdot 10^9$ кл/л ($n = 57$). Установлено, что у лиц с максимальным содержанием апоптотических клеток выше общее содержание лимфоцитов за счет CD3+, CD8+, CD10+, CD16+, CD23+, CD25+, CD71+, HLADR на фоне сниженной концентрации Т-хелперов (CD4+) и некротизированных лимфоцитов. Таким образом, энергозависимая активизация апоптоза лимфоцитов ассоциирована с активизацией, пролиферацией и дифференцировкой лимфоцитов, программируемой гибели подвергаются в основном Т-хелперы.

Ключевые слова: апоптоз лимфоцитов, фенотипы лимфоцитов, цитокины, практически здоровые люди.

¹Работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований по теме лаборатории экологической иммунологии института физиологии природных адаптаций ФИЦКИА РАН (№ гос. регистрации АААА-А17-117033010124-7).

Ответственный за переписку: Ставинская Ольга Александровна, адрес: 163000, г. Архангельск, просп. Ломоносова, д. 249; e-mail: ifpa-olga@mail.ru

Для цитирования: Ставинская О.А., Патракеева В.П. Фенотипы лимфоцитов, наиболее подверженных апоптозу у практически здоровых людей // Журн. мед.-биол. исследований. 2019. Т. 7, № 4. С. 436–443. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2019.7.4.436

Существуют различные варианты гибели клеток: апоптоз, некроз, антителозависимая цитотоксичность, митотическая катастрофа [1]. Однако именно апоптоз является ведущим вариантом гибели, т. к. планируется и регулируется работой генетического аппарата самой клетки. Апоптоз в норме безопасен для организма и не обуславливает клинических проявлений вследствие отсутствия даже реакции превентивного воспаления. Наряду с другими вариантами гибели клеток апоптоз участвует в регенерации, тем самым стимулируя пролиферативную активность клеток.

В настоящее время в литературе имеются противоречивые данные относительно самого термина программируемой гибели, за апоптоз часто принимают некроз и антителозависимую цитотоксичность [2–4]. Впервые научный смысл термина «апоптоз» (с греч. – опадание листьев) был определен в 1972 году группой английских ученых во главе с J.F. Kerr – как активная, программируемая форма гибели в результате реализации генетической программы клетки в ответ на внешние или внутренние сигналы [5].

Нейроиммуноэндокринная система как одна из регуляторных систем, вероятно, оказывает существенное влияние на активность программируемой клеточной гибели. Предположение о регулирующем влиянии на апоптоз основано на том, что в процессе апоптоза участвуют цитокины, играют роль рецепторная активность клеток, клеточные контакты и микроокружение [6–9]. Так, в литературе показано проапоптотическое действие на лимфоциты цитокина TNF из семейства факторов некроза опухолей. При ассоциации указанного цитокина с рецептором TNFR1 инициируется каспазо-зависимая программируемая гибель [10]. Цитокин IFN γ , синтезируемый активированными Т-лимфоцитами и NK-клетками, стимулирует программируемую гибель лимфоцитов путем усиления экспрессии рецептора Fas на поверхности мембраны [11]. В свою очередь, IL-2 оказывает антиапоптотическое действие, которое осуществляется Foxp3-независимым способом с участием белка Card11 [12].

Цель исследования – определить фенотипы лимфоцитов, преимущественно подвергающихся программируемой гибели у практически здоровых людей.

Материалы и методы. Обследованы 138 человек в возрасте от 20 до 60 лет, проживающих и работающих в Архангельской области. Обследуемые являлись клинически здоровыми добровольцами (средний индекс массы тела составил $23,7 \pm 4,26$ кг/м²), которые не страдали острыми инфекционными заболеваниями и у которых не выявлены признаки аутоиммунных и лимфопролиферативных заболеваний, частота ОРЗ составляла не более 2 раз в год. Исследование проводили с соблюдением норм биомедицинской этики, утвержденных Хельсинкской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации об этических принципах проведения медицинских исследований (2013 г.).

Анализ результатов исследования проводили в зависимости от содержания в крови апоптотических лимфоцитов AnV+/PI-: первая группа обследуемых – с относительно пониженным содержанием, $<0,05 \cdot 10^9$ кл/л ($n = 46$); вторая группа – с уровнем от $0,05$ до $0,1 \cdot 10^9$ кл/л ($n = 35$); третья группа – с относительно повышенным уровнем, $>0,1 \cdot 10^9$ кл/л ($n = 57$). Группы практически не имели различий по возрасту ($26,9 \pm 3,8$; $22,0 \pm 2,1$; $23,1 \pm 3,7$ года) и полу (55 – 65 % женщин и 35 – 45 % мужчин).

Лейкограмму периферической крови определяли на гематологическом анализаторе XS-500i (Sysmex, Япония). Программируемую гибель лимфоцитов периферической крови оценивали с помощью FITC-аннексина-V, специфически связывающегося с участками фосфатидилсерина на мембранах апоптотических клеток, и пропидия йодида, позволяющего дифференцировать клетки с интактной и проницаемой мембраной. Анализ апоптотически измененных лимфоцитов AnV+/PI- проводили на проточном цитофлуориметре Epic XL (Beckman Coulter, США). В мазках крови, окрашенных по Романовскому–Гимзе, методом микроскопии (Vision MT5300L, Япония) определяли лимфоцитограмму с выделением

малых (диаметр клетки до 8 мкм), средних (диаметр 8–12 мкм) и больших (диаметр более 12 мкм) лимфоцитов. Методом твердофазного иммуноферментного анализа в сыворотке крови выявляли концентрации TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17F, TRAIL, цитохрома *c* (Bender MedSystems, Австрия). Данным методом также детектировали уровни трансферрина, IgA, IgG, ЦИК-С1q и ЦИК-С3D в крови, используя реактивы компаний DiaSys и Seramun Diagnostica (Германия). Иммуноферментную реакцию оценивали с помощью фотометра Multiskan MS (Labsystems, Финляндия) при длине волны 450 нм. Содержание фенотипов лимфоцитов определяли методом двойной пероксидазной метки с использованием моноклональных антител (НПЦ «МедБиоСпектр», Россия).

Результаты исследования обработаны с применением пакета прикладных программ Statistica 6 (StatSoft, США). Тип исследования – ретроспективный, выборки случайные, одномоментные. Границы нормального распреде-

ления количественных показателей определяли при помощи критерия Шапиро–Уилка. При анализе полученных результатов использовали среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm \sigma$), медиану и нижний, верхний квартили ($Me (Q1-Q3)$). Статистическую значимость различий между группами оценивали с помощью параметрического *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок и непараметрического критерия Уилкоксона. Статистическая значимость присваивалась при $p < 0,05$.

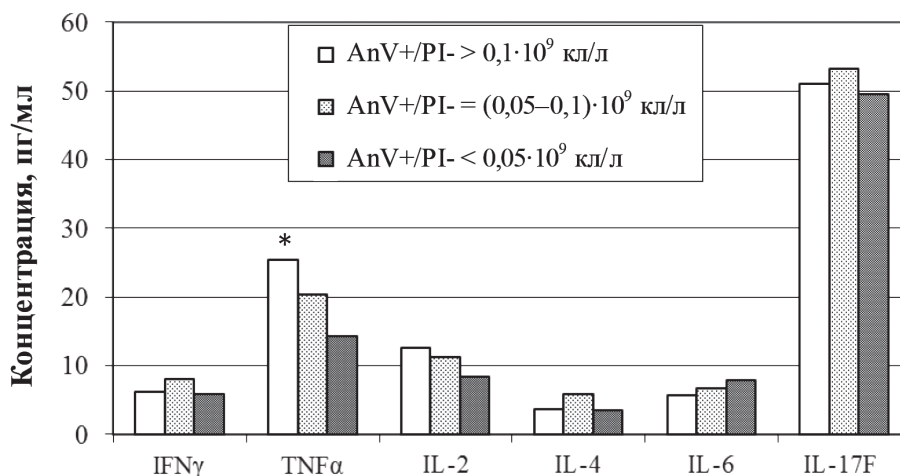
Результаты. Общее число лимфоцитов статистически значимо выше у лиц первой группы с максимальным содержанием апоптотических клеток AnV+/PI- (в сравнении с обследуемыми людьми с более низкими концентрациями клеток AnV+/PI-). Кроме того, в периферической крови у лиц первой группы выявлено повышенное содержание фенотипов лимфоцитов CD3+, CD8+, CD10+, CD16+, CD23+, CD25+, CD71+, HLADR (табл. 1) при сниженной концентрации Т-хелперов (CD4+).

Таблица 1

**СОДЕРЖАНИЕ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ АПОПТОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК AnV+/PI-**

Показатель	Уровень AnV+/PI-, $\cdot 10^9$ кл/л		
	>0,1 (1)	0,05–0,1 (2)	<0,05 (3)
Лимфоциты, $\cdot 10^9$ кл/л	3,02 \pm 0,12 ^{*1-3}	2,12 \pm 0,09 ^{*1-2}	2,31 \pm 0,14
<i>M</i> \pm σ			
CD3+, $\cdot 10^9$ кл/л	0,66 \pm 0,05 ^{*1-3}	0,55 \pm 0,06 ^{*1-2}	0,53 \pm 0,06
CD4+, $\cdot 10^9$ кл/л	0,65 \pm 0,05 ^{**1-3}	0,59 \pm 0,06 ^{*1-2}	0,89 \pm 0,07 ^{**2-3}
CD8+, $\cdot 10^9$ кл/л	0,51 \pm 0,04 ^{*1-3}	0,46 \pm 0,05 ^{*1-2}	0,45 \pm 0,05
CD10+, $\cdot 10^9$ кл/л	0,51 \pm 0,03 ^{*1-3}	0,46 \pm 0,05 ^{*1-2}	0,4 \pm 0,04
CD16+, $\cdot 10^9$ кл/л	0,51 \pm 0,04 ^{*1-3}	0,44 \pm 0,04 ^{*1-2}	0,46 \pm 0,05
CD23+, $\cdot 10^9$ кл/л	0,55 \pm 0,04 ^{*1-3}	0,55 \pm 0,06	0,44 \pm 0,04 ^{*2-3}
CD25+, $\cdot 10^9$ кл/л	0,56 \pm 0,05 ^{**1-3}	0,53 \pm 0,05	0,39 \pm 0,04 ^{*2-3}
CD71+, $\cdot 10^9$ кл/л	0,55 \pm 0,04 ^{*1-3}	0,53 \pm 0,05	0,43 \pm 0,04 ^{*2-3}
HLADR, $\cdot 10^9$ кл/л	0,56 \pm 0,05 ^{*1-3}	0,52 \pm 0,05	0,47 \pm 0,05
<i>Me (Q1-Q3)</i>			
Апоптотические лимфоциты AnV+/PI-, $\cdot 10^9$ кл/л / %	0,18 (0,13–0,25) / 8,0 (6,0–11,1) ^{**1-3}	0,08 (0,06–0,09) / 3,6 (2,9–4,6) ^{**1-2}	0,014 (0,008–0,026) / 0,7 (0,48–1,18) ^{**2-3}
Некротические лимфоциты AnV+/PI+, $\cdot 10^9$ кл/л / %	0,004 (0,003–0,006) / 0,15 (0,1–0,24) ^{**1-3}	0,005 (0,003–0,009) / 0,33 (0,19–1,4) ^{**1-2}	0,008 (0,006–0,012) / 0,4 (0,23–0,6) ^{*2-3}

Примечание. Установлена статистическая значимость различий между группами 1 и 2, 1 и 3, 2 и 3: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.



Концентрации цитокинов в крови практически здоровых людей при различном содержании апоптотических лимфоцитов AnV+/PI- (* – установлены статистически значимые отличия, $p < 0,05$)

При сравнении иммунологических показателей людей с максимальным и минимальным уровнем апоптоза лимфоцитов выявлены следующие закономерности. Активизация апоптоза влечет за собой снижение уровня средних форм лимфоцитов в составе лимфоцитограммы с $0,84(0,5–1,09)$ до $0,74(0,58–0,89) \cdot 10^9$ кл/л, а также сокращение содержания некротизированных клеток AnV+/PI+. Малые лимфоциты практически не подвергаются программируемой гибели: $1,56(1,07–2,05)$ и $1,56(0,88–1,78) \cdot 10^9$ кл/л; $58,5(50–66)$ и $58(47–68)$ %, $p > 0,01$. Содержание больших

лимфоцитов увеличивается соразмерно активности апоптоза: с $0,25(0,21–0,34)$ до $0,36(0,18–0,51) \cdot 10^9$ кл/л, $p < 0,01$.

У лиц первой группы в условиях максимально выраженной активности программируемой гибели лимфоцитов выше концентрации TNF α , TRAIL, цитохрома *c*, трансферрина, ЦИК-С3D на фоне сниженного содержания иммуноглобулинов А, G и ЦИК-С1q (см. рисунок, табл. 2). Показатели цитокинового профиля (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17F) обследуемых лиц не имели статистически значимых различий.

Таблица 2

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ АПОПТОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК AnV+/PI-, Me (Q1–Q3)

Показатель	Уровень AnV+/PI-, $\cdot 10^9$ кл/л		
	>0,1 (1)	0,05–0,1 (2)	<0,05 (3)
Трансферрин, мг/дл	289 (181–310)** ¹⁻³	216 (198–227)* ¹⁻²	195 (184–211)* ²⁻³
ЦИК-С1q, мкг-экв./мл	11,7 (4,1–17,0)* ¹⁻³	14,4 (2,9–18,8)* ¹⁻²	16,5 (2,8–24,4)* ²⁻³
ЦИК-С3D, мкг-экв./мл	32,6 (7,5–60,7)* ¹⁻³	20,5 (9,5–28,8)** ¹⁻²	20,3 (6,9–27,8)
TRAIL, пг/мл	46,9 (3,1–47,6)* ¹⁻³	40,6 (4,1–56,6)* ¹⁻²	13,3 (11,1–39,4)* ²⁻³
Цитохром <i>c</i> , нг/мл	0,17 (0,06–0,18)** ¹⁻³	0,13 (0,02–0,14)* ¹⁻²	0,07 (0,05–0,09)* ²⁻³
IgA, г/л	1,3 (1,0–2,7)* ¹⁻³	1,4 (1,1–1,8)	2,8 (1,6–3,5)* ²⁻³
IgG, г/л	9,2 (6,3–29,6)** ¹⁻³	14,8 (4,3–22,9)* ¹⁻²	24,4 (8,7–29,1)** ²⁻³

Примечание. Установлена статистическая значимость различий между группами 1 и 2, 1 и 3, 2 и 3: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Обсуждение. В ситуации активизации апоптоза лимфоцитов программируемой гибели подвергаются в основном Т-хелперы (CD4+), уровень которых значительно снижается. Гибель клеток инициируется как рецепторным, так и митохондриальным путем. Это подтверждается повышением в крови концентрации цитокинов семейства TNF (TNF α и TRAIL), а также максимально выраженным содержанием цитохрома *c*. Цитокин-опосредованный, рецепторный путь апоптоза включает увеличение локализации на поверхности клетки специализированных рецепторов, передающих сигналы к развитию апоптоза. Цитокин TNF α , связываясь со своим рецептором TNFR1/p55, несущим цитоплазматический домен гибели, обеспечивает формирование белкового комплекса TRADD/FADD и активацию каспазы FLICE. В апоптотических клетках под влиянием TNF α растет уровень киназ IA PI3K и каспазы-3 [13]. Внутренний путь апоптоза управляется протеинами семейства bcl-2 и включается при клеточном стрессе (повышение температуры, повреждение окислителями, тяжелыми металлами, химическими токсинами и т. д.). Протеины этого семейства способствуют нарушению проницаемости митохондриальной мембраны и высвобождению различных соединений: прокаспазы-2, -3, -9, цитохрома *c*, AIF (apoptosis inducing factor). Оказавшись в цитоплазме клетки, цитохром *c* активирует фактор APAF-1, а образовавшийся комплекс запускает процессинг каспазы-9 [14]. Таким образом, реализуется митохондриальная индукторная стадия апоптоза, она переходит в эффекторную стадию и стадию деградации, которые являются едиными для всех вариантов программируемой гибели.

Наше исследование подтвердило энергозатратность процесса апоптоза. Так, при максимальной активности апоптоза установлен наибольший уровень плазменного трансферрина, обеспечивающий поступление ионов железа внутрь митохондрий. В свою очередь, именно митохондрии вырабатывают энергетический ресурс клетки в виде молекул аденозинтрифос-

фата (АТФ). В литературе приводятся следующие сведения. Для активизации каспазы-1 и -3 в ходе реализации программируемой гибели клетке необходимо израсходовать молекулы АТФ, в то время как для протекания гибели в форме некроза затрат АТФ не требуется [15]. Нужно отметить, что некроз, в отличие от апоптоза, наступает при грубых, не совместимых с жизнью нарушениях целостности плазматической мембраны клетки и приводит к выделению во внешнюю среду различных токсичных реактивных метаболитов, в нормальных условиях локально ограниченных безопасным образом. Происходит деградация органелл, вакуолизация и набухание клетки, конденсация молекул ДНК, а в окружающее пространство выделяются стрессиндуцированные цитоплазматические белки-шапероны (gp96, HSP10, HSP60, HSP70, HSP90), фрагменты нуклеиновых кислот (РНК, ДНК), калгранулинов, формилпептидов митохондрий [16].

Нами выявлено, что малые лимфоциты практически не подвергаются программируемой гибели. Можно предположить, что лимфоциты, несущие генетическую информацию и имеющие малый объем цитоплазмы, более жизнеспособны. В то же время усиление апоптоза лимфоцитов сопряжено с процессами активизации (CD25+, CD71+, HLADR), пролиферации (CD10+) и дифференцировки (CD8+, CD16+, CD23+) клеток данного ряда. Вероятно, именно апоптоз ограничивает активизацию иммунных реакций и запускается в ответ на возросшую пролиферацию лимфоцитов. В литературе было найдено и другое объяснение выявленной взаимосвязи: показана трофическая зависимость между апоптотическими лейкоцитами и пролиферирующими клетками в случаях репаративного морфогенеза. Происходит снабжение пролиферирующих клеток различного гистотипа питательными веществами, высвобождаемыми из продуктов распада апоптотических лейкоцитов [17, 18].

Согласно нашему исследованию, концентрация ЦИК-СЗД при высоком уровне апоптоза лимфоцитов вырастает значительно, что

указывает на преимущественную активизацию комплемента по альтернативному пути с участием факторов С3а, С3b, С5b, пропердина. В случае ингибиции апоптоза лимфоцитов нарастает содержание ЦИК-С1q, что свидетельствует об активизации гуморального звена иммунитета за счет IgA и IgG, т. е. происходит инициация системы комплемента по классическому пути.

Таким образом, энергозависимая активизация апоптоза лимфоцитов ассоциирована с активизацией, пролиферацией и дифференци-

ровкой лимфоцитов, программируемой гибели подвергаются в основном Т-хелперы. Инициация апоптоза осуществляется рецепторным и митохондриальным путями, что подтверждается повышением в крови концентрации цитокинов семейства TNF (TNF α и TRAIL) и содержания цитохрома *c*. Увеличение числа апоптотических лимфоцитов AnV+/PI- происходит наряду с повышением уровня ЦИК-С3D и преимущественной инициацией системы комплемента по альтернативному пути.

Конфликт интересов отсутствует.

Список литературы

1. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E.S., Altucci L., Amelio I., Andrews D.W. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 // *Cell Death Differ.* 2018. Vol. 25, № 3. P. 486–541.
2. Узденский А.Б. Управляемый некроз // *Биол. мембраны.* 2010. Т. 27, № 1. С. 7–17.
3. Hitomi J., Christofferson D.E., Ng A., Yao J., Degterev A., Xavier R.J., Yuan J. Identification of a Molecular Signaling Network That Regulates a Cellular Necrotic Cell Death Pathway // *Cell.* 2008. Vol. 135, № 7. P. 1311–1323.
4. Safta T.B., Ziani L., Favre L., Lamendour L., Gros G., Mami-Chouaib F., Martinvalet D., Chouaib S., Thiery J. Granzyme B-Activated p53 Interacts with Bcl-2 to Promote Cytotoxic Lymphocyte-Mediated Apoptosis // *J. Immunol.* 2015. Vol. 194, № 1. P. 418–428.
5. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics // *Br. J. Cancer.* 1972. Vol. 26, № 4. P. 239–257.
6. Уткин О.В., Новиков В.В. Рецепторы смерти в модуляции апоптоза // *Успехи соврем. биологии.* 2012. Т. 132, № 4. С. 381–390.
7. Ibrahim S.A., Kulshrestha A., Katara G.K., Beaman K.D. Delayed Neutrophil Apoptosis Is Regulated by Cancer Associated $\alpha 2$ Isoform Vacuolar ATPase // *J. Immunol.* 2017. Vol. 198, № 1. P. 146–151.
8. Reece S.W., Kilburg-Basnyat B., Madenspacher J.H., Luo B., Capen A., Fessler M.B., Gowdy K.M. Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) Modulates Glucocorticoid Mediated Lymphocyte Apoptosis in Asthma // *J. Immunol.* 2017. Vol. 198, № 1. P. 14–53.
9. Tixeira R., Phan T.K., Caruso S., Shi B., Atkin-Smith G.K., Nedeva C., Chow J.D.Y., Puthalakath H., Hulett M.D., Herold M.J., Poon I.K.H. ROCK1 but Not LIMK1 or PAK2 Is a Key Regulator of Apoptotic Membrane Blebbing and Cell Disassembly // *Cell Death Differ.* 2019. P. 1–15. URL: <https://www.nature.com/articles/s41418-019-0342-5> (дата обращения: 24.05.2019).
10. Hsu H., Xiong J., Goeddel D.V. The TNF Receptor 1-Associated Protein TRADD Signals Cell Death and NF- κ B Activation // *Cell.* 1995. Vol. 81. P. 495–504.
11. Atsumi T., Sato M., Kamimura D., Moroi A., Iwakura Y., Betz U.A., Yoshimura A., Nishihara M., Hirano T., Murakami M. IFN- γ Expression in CD8+ T Cells Regulated by IL-6 Signal Is Involved in Superantigen-Mediated CD4+ T Cells Death // *Int. Immunol.* 2009. Vol. 21, № 1. P. 73–80.
12. Hu D.Y., Wirasinha R.C., Goodnow C.C., Daley S.R. IL-2 Prevents Deletion of Developing T-Regulatory Cells in the Thymus // *Cell Death Differ.* 2017. Vol. 24. P. 1007–1016.
13. Geering B., Gurzeler U., Federzoni E., Kaufmann T., Simon H.U. A Novel TNFR1-Triggered Apoptosis Pathway Mediated by Class IA PI3Ks in Neutrophils // *Blood.* 2011. Vol. 117. P. 5953–5962.
14. Janssen O., Sanzenbacher R., Kabelitz D. Regulation of Activation-Induced Cell Death of Mature T-Lymphocyte Population // *Cell Tissue Res.* 2000. Vol. 301, № 1. P. 85–99.

15. Eguchi Y., Shimizu S., Tsujimoto Y. Intracellular ATP Levels Determine Cell Death Fate by Apoptosis or Necrosis // *Cancer Res.* 1997. Vol. 57, № 10. P. 1835–1840.
16. Потапнев М.П. Аутофагия, апоптоз, некроз клеток и иммунное распознавание своего и чужого // *Иммунология.* 2014. № 2. С. 95–102.
17. Bryant B.J. Reutilization of Leukocyte DNA by Cells of Regenerating Liver // *Exp. Cell Res.* 1962. Vol. 27, № 1. P. 70–79.
18. Бабаева А.Г. Регенерация: факты и перспективы. М.: Изд-во РАМН, 2009. 336 с.

References

1. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E.S., Altucci L., Amelio I., Andrews D.W. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.*, 2018, vol. 25, no. 3, pp. 486–541.
2. Uzdensky A.B. Controlled Necrosis. *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. A: Membr. Cell Biol.*, 2010, vol. 4, no. 1, pp. 3–11.
3. Hitomi J., Christofferson D.E., Ng A., Yao J., Degterev A., Xavier R.J., Yuan J. Identification of a Molecular Signaling Network That Regulates a Cellular Necrotic Cell Death Pathway. *Cell*, 2008, vol. 135, no. 7, pp. 1311–1323.
4. Safta T.B., Ziani L., Favre L., Lamendour L., Gros G., Mami-Chouaib F., Martinvalet D., Chouaib S., Thiery J. Granzyme B-Activated p53 Interacts with Bcl-2 to Promote Cytotoxic Lymphocyte-Mediated Apoptosis. *J. Immunol.*, 2015, vol. 194, no. 1, pp. 418–428.
5. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer*, 1972, vol. 26, no. 4, pp. 239–257.
6. Utkin O.V., Novikov V.V. Retseptory smerti v modulyatsii apoptoza [Death Receptors in Modulation of Apoptosis]. *Uspekhi sovremennoy biologii*, 2012, vol. 132, no. 4, pp. 381–390.
7. Ibrahim S.A., Kulshrestha A., Katara G.K., Beaman K.D. Delayed Neutrophil Apoptosis Is Regulated by Cancer Associated $\alpha 2$ Isoform Vacuolar ATPase. *J. Immunol.*, 2017, vol. 198, no. 1, pp. 146–151.
8. Reece S.W., Kilburg-Basnyat B., Madenspacher J.H., Luo B., Capen A., Fessler M.B., Gowdy K.M. Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) Modulates Glucocorticoid Mediated Lymphocyte Apoptosis in Asthma. *J. Immunol.*, 2017, vol. 198, no. 1, pp. 14–53.
9. Tixeira R., Phan T.K., Caruso S., Shi B., Atkin-Smith G.K., Nedeva C., Chow J.D.Y., Puthalakath H., Hulett M.D., Herold M.J., Poon I.K.H. ROCK1 but Not LIMK1 or PAK2 Is a Key Regulator of Apoptotic Membrane Blebbing and Cell Disassembly. *Cell Death Differ.*, 2019, pp. 1–15. Available at: <https://www.nature.com/articles/s41418-019-0342-5> (accessed: 24 May 2019).
10. Hsu H., Xiong J., Goeddel D.V. The TNF Receptor 1-Associated Protein TRADD Signals Cell Death and NF- κ B Activation. *Cell*, 1995, vol. 81, no. 4, pp. 495–504.
11. Atsumi T., Sato M., Kamimura D., Moroi A., Iwakura Y., Betz U.A., Yoshimura A., Nishihara M., Hirano T., Murakami M. IFN- γ Expression in CD8+ T Cells Regulated by IL-6 Signal Is Involved in Superantigen-Mediated CD4+ T Cells Death. *Int. Immunol.*, 2009, vol. 21, no. 1, pp. 73–80.
12. Hu D.Y., Wirasinha R.C., Goodnow C.C., Daley S.R. IL-2 Prevents Deletion of Developing T-Regulatory Cells in the Thymus. *Cell Death Differ.*, 2017, vol. 24, no. 6, pp. 1007–1016.
13. Geering B., Gurzeler U., Federzoni E., Kaufmann T., Simon H.U. A Novel TNFR1-Triggered Apoptosis Pathway Mediated by Class IA PI3Ks in Neutrophils. *Blood*, 2011, vol. 117, no. 22, pp. 5953–5962.
14. Janssen O., Sanzenbacher R., Kabelitz D. Regulation of Activation-Induced Cell Death of Mature T-Lymphocyte Population. *Cell Tissue Res.*, 2000, vol. 301, no. 1, pp. 85–99.
15. Eguchi Y., Shimizu S., Tsujimoto Y. Intracellular ATP Levels Determine Cell Death Fate by Apoptosis or Necrosis. *Cancer Res.*, 1997, vol. 57, no. 10, pp. 1835–1840.
16. Потапнев М.П. Аутофагия, апоптоз, некроз клеток и иммунное распознавание своего и чужого [Autophagy, Apoptosis, Necrosis and Immune Recognition of Self and Nonself]. *Immunologiya*, 2014, no. 2, pp. 95–102.
17. Bryant B.J. Reutilization of Leukocyte DNA by Cells of Regenerating Liver. *Exp. Cell Res.*, 1962, vol. 27, no. 1, pp. 70–79.
18. Бабаева А.Г. *Регенерация: факты и перспективы* [Regeneration: Facts and Prospects]. Moscow, 2009. 336 p.

DOI: 10.17238/issn2542-1298.2019.7.4.436

*Ol'ga A. Stavinskaya** ORCID: [0000-0002-0022-5387](https://orcid.org/0000-0002-0022-5387)
*Veronika P. Patrakeeva** ORCID: [0000-0001-6219-5964](https://orcid.org/0000-0001-6219-5964)

*N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research, Russian Academy of Sciences
(Arkhangelsk, Russian Federation)

LYMPHOCYTE PHENOTYPES ESPECIALLY PRONE TO APOPTOSIS IN APPARENTLY HEALTHY PEOPLE

This research aimed to identify lymphocyte phenotypes that are particularly susceptible to programmed death in apparently healthy people. We examined 138 subjects aged from 20 to 60 years living and working in the Arkhangelsk Region (Russia). Peripheral blood leukograms were determined using the Sysmex XS-500i haematology analyser (Japan). Lymphocyte apoptosis was assessed on the Epics XL Flow Cytometer (Beckman Coulter, USA). The concentrations of cytokines and mediators of apoptosis in the blood were estimated using the solid-phase enzyme immunoassay. Lymphocytograms were studied by means of microscopy (Vision MT5300L, Japan) in blood film stains according to the Romanovsky–Giemsa method. The lymphocyte phenotypes content was estimated by double peroxidase staining using monoclonal antibodies. The limits of normal distribution of quantitative indices were determined by means of the Shapiro–Wilk test. Statistical significance of the differences between the groups was estimated by means of the Student's *t*-test and the Wilcoxon signed-rank test. The results were analysed by comparing the levels of responses depending on the count of apoptotic lymphocytes AnV+/PI- in the blood: group 1 had a rather low count, $<0.05 \cdot 10^9$ kl/l ($n = 46$); group 2 had a count ranging between 0.05 and $0.1 \cdot 10^9$ kl/l ($n = 35$); group 3 had a rather high count, $>0.1 \cdot 10^9$ kl/l ($n = 57$). It was established that in subjects with the maximum count of apoptotic cells, the total lymphocyte count is higher due to CD3+, CD8+, CD10+, CD16+, CD23+, CD25+, CD71+ and HLA-DR against the background of decreased concentration of T helper cells (CD4+) and necrotized lymphocytes. Thus, energy-dependent activation of lymphocyte apoptosis is associated with lymphocyte activation, proliferation and differentiation, while programmed death primarily affects T helper cells.

Keyword: *lymphocyte apoptosis, lymphocyte phenotypes, cytokines, apparently healthy people.*

Поступила 29.04.2019
Принята 09.09.2019
Received 29 April 2019
Accepted 9 September 2019

Corresponding author: Ol'ga Stavinskaya, address: prosp. Lomonosova 249, Arkhangelsk, 163000, Russian Federation; e-mail: ifpa-olga@mail.ru

For citation: Stavinskaya O.A., Patrakeeva V.P. Lymphocyte Phenotypes Especially Prone to Apoptosis in Apparently Healthy People. *Journal of Medical and Biological Research*, 2019, vol. 7, no. 4, pp. 436–443. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2019.7.4.436