



УДК 571.27; 57.083.3

ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ФЕНОТИП CD161⁺ ДВАЖДЫ НЕГАТИВНЫХ Т-КЛЕТОК¹

© 2025 г. И. В. Богданов*, Т. В. Овчинникова*, **, #

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биоорганической химии,
Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1с12

Поступила в редакцию 01.06.2025 г.

После доработки 16.06.2025 г.

Принята к публикации 17.06.2025 г.

Дважды негативные (DN) CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Т-лимфоциты составляют подгруппу неклассических периферических Т-клеток. Хотя представленность этих Т-клеток в периферической крови относительно невысока (3–5%), они играют важную роль при развитии воспалительных реакций, онкологических, аутоиммунных заболеваний и аллергической астмы. Несмотря на их высокую терапевтическую значимость DN Т-клетки по-прежнему представляют собой одну из наименее изученных субпопуляций Т-лимфоцитов, а детальное изучение широкого цитокинового профиля DN Т-клеток до сих пор не проведено. В настоящем исследовании мы охарактеризовали цитокиновый профиль CD3⁺CD4⁻CD8⁻ DN Т-клеток с помощью мультиплексной технологии с использованием широкой панели анализов. Для этого из культуры мононуклеарных клеток периферической крови человека были выделены DN Т-клетки и активированы с помощью магнитных частиц анти-CD3/CD28. Количественную оценку продукции 48 цитокинов, хемокинов и факторов роста проводили с помощью мультиплексной технологии на магнитных частицах xMAP. В настоящей работе нами показано, что цитокиновый профиль провоспалительных $\alpha\beta$ TCR⁺CD161⁺ DN Т-клеток включает цитокины TNF α , IFN γ , IL-3, IL-13 и IL-27, хемокины IL-8/CXCL8, MIG/CXCL9, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4 и RANTES/CCL5, а также факторы роста M-CSF и GM-CSF.

Ключевые слова: *дважды негативные Т-клетки, CD161, хемокины, цитокиновый профиль, цитокины, проточная цитометрия, мультиплексный анализ*

DOI: 10.31857/S0132342325050077

ВВЕДЕНИЕ

Т-лимфоциты человека и мыши, выступающие ключевыми компонентами адаптивной иммунной системы, экспрессируют на своей поверхности Т-клеточный рецептор (TCR). В зависимости от структуры экспрессируемых TCR-комплексов ($\alpha\beta$ TCR или $\gamma\delta$ TCR) различают два типа Т-лимфоцитов, обозначаемые как $\alpha\beta$ T и $\gamma\delta$ T. TCR-комплекс $\alpha\beta$ T-клеток включает в себя α - и β -цепи, кодируемые генами *TRA* и *TRB*, соответственно. Поверхностные молекулы CD4 и CD8 – корецепторы TCR, играющие решающую роль в реализации иммунных функций Т-клеток

in vivo. Дважды негативные (англ. Double Negative или сокращенно DN) клетки – это редкая субпопуляция Т-лимфоцитов, которые имеют корецептор CD3, но на поверхности которых отсутствуют оба корецептора CD4 и CD8. DN Т-клетки могут экспрессировать либо $\alpha\beta$ TCR, либо $\gamma\delta$ TCR, но на их поверхности отсутствуют маркеры, характерные для естественных Т-киллеров (NKT) [1]. Несмотря на невысокую представленность дважды негативные Т-клетки – мощные производители цитокинов, поэтому в последнее время становится все более актуальным изучение их роли в развитии воспалительных процессов и аутоиммунных реакций, а также возможное при-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0132342325050077 для авторизованных пользователей. Сокращения: CD – кластер дифференцировки; DN – дважды негативные Т-клетки; DP – дважды позитивные Т-клетки; NK – естественные киллеры; NKT – естественные Т-киллеры; MACS – магнитно-активированный клеточный сортировщик; PBMC – мононуклеарные клетки периферической крови; PE – фикоэритрин; РНА – фитогемагглютинин; TCR – Т-клеточный рецептор

Автор для связи: (эл. почта: ovch@ibch.ru).

менение этих клеток для лечения аллергических и онкологических заболеваний.

Ранее было показано участие $\alpha\beta$ TCR⁺ DN Т-клеток в патогенезе ряда аутоиммунных заболеваний. Так, например, системная красная волчанка, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром и синдром Шегрена сопровождаются повышением количества DN Т-клеток [1]. В мышевой модели псориаза, а также у пациентов с бляшечным псориазом DN Т-клетки, продуцирующие IL-17, участвуют в развитии воспалительных процессов в коже [2]. В более поздних исследованиях сообщалось, что аутореактивные провоспалительные эффекторные DN Т-клетки принимают участие в системном воспалении и повреждении тканей [3]. Таким образом, эти клетки рассматриваются как перспективная терапевтическая мишень при разработке новых препаратов для лечения аутоиммунных заболеваний в будущем.

Недавние исследования свидетельствуют о том, что DN Т-клетки способны модулировать антиген-специфические реакции иммунной системы [4]. В частности, было показано, что овальбумин (OVA)-специфичные DN Т-лимфоциты, выращенные в процессе клональной экспансии в культуре *ex vivo*, обладают иммуносупрессивным действием на мышевой модели индуцированной аллергической астмы, поскольку они значительно подавляют гиперчувствительный ответ, провоцируемый OVA, снижают аллергическое воспаление в легких и продукцию OVA-специфических IgG и IgE [4]. Подобные исследования открывают путь для разработки на основе DN Т-клеток новых подходов к лечению аллергической астмы.

Было показано также, что DN Т-клетки оказывают супрессорное действие на реакцию “трансплантат против хозяина” и прогрессию раковых клеток [5]. В настоящее время DN Т-лимфоциты рассматриваются в качестве кандидатов для проведения адоптивной клеточной терапии при лечении ряда раковых заболеваний из-за их выраженного цитотоксического действия на злокачественные клетки и при пересадке органов или тканей для подавления отторжения трансплантата. Более того, было показано, что эти клетки даже после их криоконсервации сохраняют свою цитотоксическую активность, не зависящую от белков главного комплекса гистосовместимости (МНС), в отношении различных клеток, полученных из гемопоэтических злокачественных новообразований [5, 6]. Терапия DN Т-клетками может быть эффективна не только при онкогематологических заболеваниях, но и при

лечении солидных опухолей. Например, было показано, что выращенные в процессе клональной экспансии в культуре *ex vivo* DN Т-клетки, выделенные из фракции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, полученных из резецированной ткани карциномы желудка, подавляют пролиферацию различных опухолевых клеток МНС-независимым путем не только *in vitro*, но и *in vivo* на модели ксеногraftных мышей [7]. Таким образом, использование DN Т-клеток вызывает большой интерес как многообещающий кандидатный метод для адоптивной клеточной терапии из-за их высокой цитотоксической активности в отношении различных раковых клеток.

Несмотря на растущий интерес, эта редкая популяция клеток остается недостаточно изученной, и в настоящее время не существует четкой классификации иммунофенотипов DN Т-клеток. Более глубокое понимание свойств и функций DN Т-лимфоцитов может расширить наши представления о природе воспаления, пролить свет на развитие аутоиммунных заболеваний и помочь в создании потенциального терапевтического инструмента для лечения аллергической астмы и рака. До настоящего момента исследование широкого цитокинового профиля DN Т-клеток с помощью мультиплексной технологии не было проведено. Цель данной работы – характеристика цитокинового профиля дважды негативных CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Т-клеток с помощью мультиплексной технологии с использованием широкой панели, включающей 48 цитокинов, хемокинов и факторов роста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования из фракции PBMC методом магнитно-активируемого клеточного сортирования (MACS) была выделена суммарная фракция клеток, несущих маркер CD161⁺. Для этого целевые клетки были окрашены антителами к CD161, коньюгированными с фикоэритрином (PE), затем помечены магнитными частицами с антителами к PE, а затем выделены на колонке для MACS в соответствии с инструкцией производителя Miltenyi Biotec. Показано, что в случае достаточно представленных популяций клеток технология MACS обеспечивает степень очистки полученной фракции не менее 98% [8, 9]. Клеточная фракция, которая элюировалась с магнитной колонки в проскоке, затем использовалась для выделения Т-хелперных и Т-цитотоксических клеток тем же способом, используя коньюгированные с PE антитела к CD4 и CD8 человека. Выделенные Т-хелперы и Т-цитотоксические клетки культивировали в присутствии маг-

нитных частиц с антителами анти-CD3 и анти-CD28 для их клональной экспансии.

Клеточные фракции культивировали в течение 1–3 недель, а затем иммунофе-нотипировали методом проточной цитометрии (рис. 1). Анализ показал, что чистота Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток составляла 98% и 96%, соответственно (рис. 1 δ, ε). В случае фракции CD161 $^{+}$ было обнаружено увеличение представленности NK-клеток (с 30% в исходной фракции PBMC до 50% в 3-недельной культуре) и NKT-клеток (с 3.2% до 9.5%), что было ожидаемо, поскольку IL-2 и IL-7 обычно используются в качестве ростовых факторов в протоколах проведения клональной экспансии NK-клеток (рис. 1 α, ε) [10]. Однако анализ классических Т-клеток (CD3 $^{+}$ CD56 $^{-}$) в составе фракции CD161 $^{+}$ показал, что дважды негативные (CD3 $^{+}$ CD4 $^{-}$ CD8 $^{-}$) и цитотоксические Т-клетки (CD3 $^{+}$ CD4 $^{-}$ CD8 $^{+}$) в сумме составляют большинство в популяции Т-лимфоцитов (82 и 16%, соответственно). Мы повторили эксперимент с выделением и культивированием клеток CD161 $^{+}$ из PBMC еще одного донора и получили аналогичные результаты. Чтобы выделить DN T-клетки из культуры CD161 $^{+}$, мы провели магнитно-активируемый клеточный сортинг (MACS) с использованием конъюгированных с PE антител к CD56, CD4 и CD8 человека и собрали клеточную фракцию, элюируемую с магнитной колонки в проскоке.

На следующем этапе исследования отдельно активировали DN T-клетки, Т-хелперы и Т-цитотоксические клетки. Все три культуры высевали с одинаковой плотностью клеток в ячейки 48-лучиного планшета в двух биологических повторностях и стимулировали в течение 24 ч магнитными частицами, несущими антитела анти-CD3 и анти-CD28. Активация Т-клеток с помощью антител анти-CD3 и анти-CD28 – стандартная стратегия для имитации активации, опосредованной антиген-презентирующими клетками [11, 12]. Время активации 24 ч обычно используется в протоколах активации Т-клеток [13]. Через 24 ч образцы культуральной жидкости собирали и замораживали. Активацию Т-клеток оценивали по продукции цитокинов после стимуляции магнитными частицами с антителами анти-CD3 и анти-CD28. Для решения этой задачи использовали мультиплексный подход, который позволил одновременно количественно измерить все аналиты на белковом уровне в каждом образце культуральной жидкости. Технология мультиплексного анализа xMAP основана на использовании нескольких типов частиц, обладающих разными спектральными характеристиками и конъюгированных с различными типами первичных антител,

что позволяет одновременно осуществлять связывание частицами различных анализаторов из одного образца. За исключением использования частиц, связанных с первичными антителами, этот подход аналогичен методу иммуноферментного анализа. В результате были получены три различных цитокиновых профиля активированных DN T-клеток, Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток (рис. 2).

Продукция TNF α , GM-CSF и CCL3 увеличивалась при активации во всех трех культурах T-клеток, однако наиболее значительное его повышение наблюдалось в случае DN T-клеток. Например, уровень содержания TNF α увеличивался с 32.69 до 738 пг/мл, $p = 0.0002$, для DN T-клеток, а для CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ T-клеток – с уровня продукций ниже минимального детектируемого значения (< 3.88 пг/мл) до 206 пг/мл, $p = 0.0004$ и с < 3.88 до 19.99 пг/мл, $p = 0.0008$, соответственно. Концентрация некоторых растворимых факторов увеличивалась только при активации клеток, отличных от DN T-клеток. Например, Т-хелперы CD4 $^{+}$ при активации увеличивали продукцию IL-5 с 2.07 до 61.67 пг/мл, $p = 0.0001$, IL-9 с 1.7 до 5.8 пг/мл, $p = 0.037$, IL-10 с уровня содержания ниже минимального детектируемого значения < 1.35 до 15.15 пг/мл, $p = 0.0019$, и IL-17 (с уровня продукций IL-17A ниже минимального детектируемого значения < 0.70 до 66.83 пг/мл, $p = 0.0005$, и IL-17F с < 12.19 до 14.88 пг/мл, $p = 0.0012$). Как DN, так и CD4 $^{+}$ (но не CD8 $^{+}$) клетки продуцировали основной для нейтрофилов хемотактический фактор CXCL8, а также противовоспалительный IL-13. Таким образом, уровень продукции CXCL8 увеличивался с уровня ниже минимального детектируемого значения < 0.19 пг/мл до 15.75 пг/мл, $p = 0.0027$, в культуре Т-хелперов CD4 $^{+}$ и до 21.03 пг/мл, $p = 0.0027$, в культуре DN T-клеток. Аналогично таковому для CXCL8, уровень содержания IL-13 увеличивался при активации CD4 $^{+}$ клеток с < 3.49 до 31.48 пг/мл, $p < 0.05$, и с 5.23 до 18.33 пг/мл, $p < 0.05$, для DN T-клеток. В отличие от CXCL8 и IL-13, продуцируемых активированными DN и CD4 $^{+}$ клетками почти на одном уровне, продукция IFN γ и IL-3 DN T-клетками была значительно более эффективной: концентрация IFN γ увеличивалась с 15.29 до 906 пг/мл, $p = 0.0013$, для DN T-клеток и с 2.08 до 90.93 пг/мл, $p = 0.0001$, для CD4 $^{+}$ клеток. Аналогично таковому у IFN γ , уровень содержания IL-3 в DN T-клетках увеличивался с < 0.55 до 18.65 пг/мл, $p = 0.0007$, по сравнению с повышением его значения с < 0.55 до 1.39 пг/мл, $p = 0.0089$, в культуре CD4 $^{+}$ клеток.

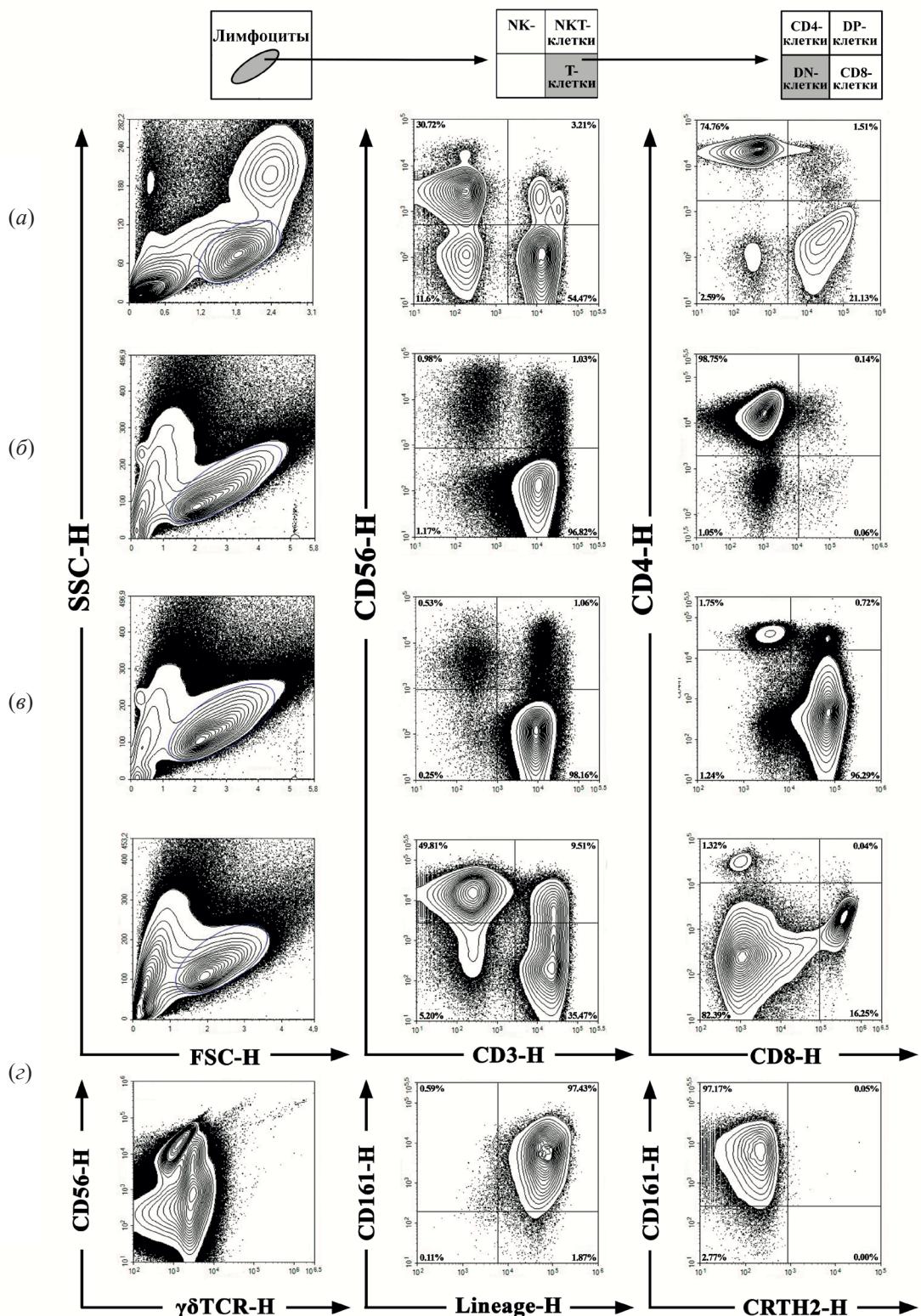


Рис. 1. Стратегия гейтирования для иммунофенотипирования следующих клеточных субпопуляций: (a) – PBMC до магнитной сепарации, а также спустя 3 недели клональной экспансии; (б) – Т-хелперных клеток (CD4⁺CD8⁺); (в) – Т-цитотоксических клеток (CD4⁻CD8⁺) и (г) – DN Т-клеток. DN Т-клетки также были помечены антителами анти-γδTCR, анти-CD161 и анти-CTRH2 после 3 недель клональной экспансии. DN –дважды негативные клетки; DP –дважды позитивные клетки.

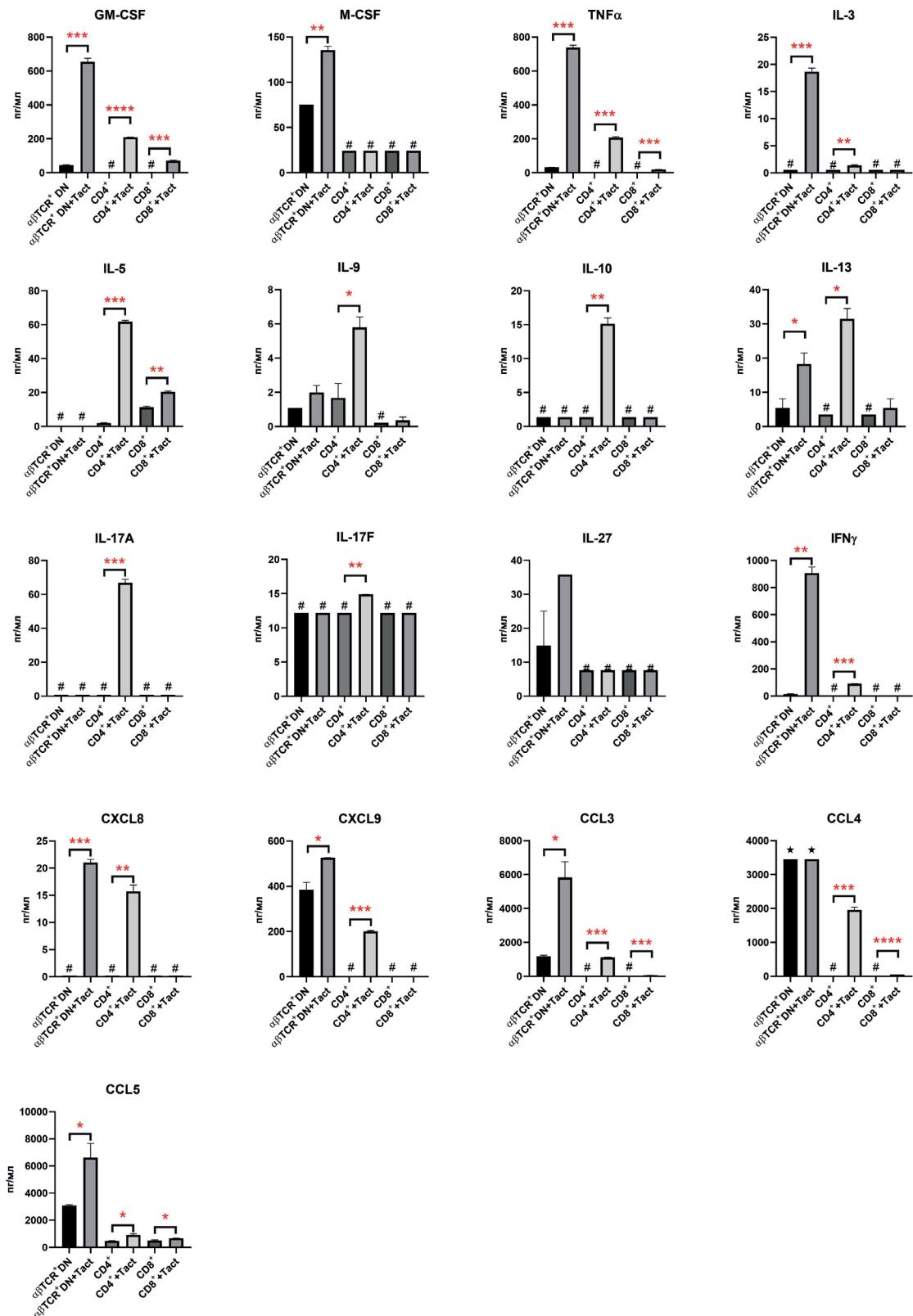


Рис. 2. Цитокиновый профиль DN T-клеток, секретируемых при активации в течение 24 ч частицами с антителами анти-CD3/CD28. Показано стандартное отклонение (\pm SD) между двумя повторностями; уровни цитокинов ниже детектируемого минимума обозначены знаком #; уровни цитокинов выше обнаруживаемого максимального значения обозначены знаком *. Уровни значимости: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$.

Важно отметить, что высокие значения уровней продукции провоспалительных хемокинов CXCL9 (384 ± 22 пг/мл), CCL3 (1183 ± 44 пг/мл) и CCL5 (3069 ± 56 пг/мл) были зарегистрированы в контрольных лунках, содержащих интактные DN Т-клетки. Более того, уровень содержания провоспалительного хемокина CCL4 превышал максимальное обнаруживаемое значение > 3455 пг/мл как в контрольных, так и в культурах после активации (дополнительные материалы, Таблица S1).

Дважды негативные (DN) CD3⁺CD4⁻CD8⁻ Т-клетки представляют собой одну из наименее изученных субпопуляций Т-клеток. Они известны своим высоким цитотоксическим потенциалом и вовлеченностью в патогенез ряда аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром и синдром Шегрена [1, 2]. Кроме того, они проявляют противоопухолевый эффект и оказывают иммуносупрессивное действие в модели аллергической астмы у мышей, а также участвуют в развитии воспаления и защите от инфекций [1, 4, 14]. Учитывая сказанное выше, эти клетки активно исследуются сегодня как возможная мишень для лечения аутоиммунных заболеваний, а также как вероятная основа для разработки новых стратегий адоптивной клеточной терапии. По этой причине углубленная характеристика цитокиновых профилей, которые могут секретироваться при активации DN Т-клеток, имеет большое значение.

На сегодняшний день DN Т-клетки считаются гетерогенной клеточной популяцией, хотя они еще не были четко классифицированы по определенным фенотипам [1]. Имеющиеся данные позволяют выделить субпопуляцию регуляторных DN Т-клеток (Tregs), продуцирующих иммуносупрессивные IL-10 и TGF- β , Т-хелпер-подобные DN Т-клетки, секрецирующие TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-4 и играющие роль, аналогичную CD4⁺ Т-хелперам при инфекциях и аутоиммунных заболеваниях, а также провоспалительные DN Т-клетки с цитотоксической активностью, продуцирующие гранулизин B, перфорин и IFN- γ [1]. В то же время, широкий спектр цитокинов и хемокинов, секретируемых DN Т-клетками в ответ на активацию, до настоящего времени не оценен с использованием мультиплексного анализа. Цель данного исследования – количественная оценка с помощью технологии xMAP уровня содержания цитокинов, хемокинов и факторов

роста, продуцируемых на белковом уровне провоспалительными CD161⁺ DN Т-клетками при воздействии на них с помощью Т-активатора CD3/CD28.

Прежде всего мы сосредоточились на выделении представителей группы 2 врожденных лимфоидных клеток (ILC2) из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), которые составляют чрезвычайно редкую ($0.14 \pm 0.10\%$) субпопуляцию PBMC. Поскольку ILC2 определяются как лимфоциты Lineage⁻CD127⁺CD161⁺CRTM2⁺, один из подходов включает обогащение ILC2 из PBMC путем селекции CD161⁺ с использованием антител анти-CD161, меченных PE, и магнитных гранул анти-PE [15]. Этот этап обычно используется перед клеточным сортированием для дальнейшего обогащения ILC2, но вместо этого мы высевали CD161⁺ клетки в культуральную среду, подходящую для клональной экспансии ILC2 (с IL-2, IL-7 и PHA) [16]. Анализ методом проточной цитометрии после культивирования клеточной популяции CD161⁺ показал, что Lineage⁻ клетки были потеряны из фракции CD161⁺, вероятно, из-за высокой скорости роста Lineage⁻ клеток (рис. 1 σ). Интересно, что большинство популяции составляли NK-клетки (CD3⁻CD56⁺) вместе с DN Т-клетками.

На сегодняшний день информация о происхождении DN Т-клеток весьма ограничена. Считается, что они могут происходить из следующих клеток: (1) незрелых DN тимоцитов, (2) дважды позитивных тимоцитов путем снижения экспрессии обоих корецепторов CD4⁺ и CD8⁺ или (3) из активированных CD8⁺ Т-клеток, которые избегают активационно-индуцированной клеточной смерти (AICD) без соответствующих апоптотических сигналов [3]. Ранее было показано, что человеческие $\alpha\beta$ TCR⁺ DN Т-клетки могут происходить из CD8⁺ Т-клеток *in vitro* и продуцировать определенный набор провоспалительных медиаторов, включая IFN- γ , IL-17, IL-1 β , CXCL3 и CXCL2 [10]. В указанном исследовании авторы стимулировали CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки в течение 5 дней в лунках планшета, покрытых антителами к факторам активации Т-клеток CD3 и CD28 без дополнительных стимулов. Мы также наблюдали переход небольшой части клеток из области CD4⁻CD8⁺ в область CD4⁻CD8⁻ после 3 недель культивирования с активирующими частицами с анти-CD3/CD28 (рис. 1 σ). По-видимому, потеря корецептора CD8

при стимуляции антителами анти-CD3/CD28 *in vitro* происходит с низкой эффективностью, иначе процент DN T-клеток был бы значительно выше 1.2% после 3 недель культивирования CD8⁺ клеток. Ранее утверждалось, что большинство DN T-клеток обладают признаками терминально дифференцированных клеток, и пул периферических DN T-клеток утрачивает способность к пролиферации и поддерживается, по-видимому, за счет генерации *de novo*, преимущественно из CD8⁺ T-лимфоцитов [2]. Доминирующая модель расширения популяции патогенных DN T-клеток при аутоиммунных заболеваниях предполагает, что аутореактивные T-цитотоксические CD8⁺ клетки способны избегать активационно-индуцированной клеточной смерти путем потери CD8. Однако вопрос о том, как активированные CD8⁺ T-клетки избегают активационно-индуцированной клеточной смерти и развивают фенотип DN T-клеток, остается открытым [3].

Интересно отметить, что в нашем исследовании DN T-клетки происходили не из фракции CD8⁺ клеток, а из гетерогенной субпопуляции CD161⁺ клеток (рис. 1 ε). CD161 (NKR-P1A) – кластер дифференцировки, преимущественно ассоциированный с NK- и NKT-клетками. Однако, недавно было установлено, что его экспрессия определяет фенотип, общий для различных популяций T-клеток, включая CD4⁺, CD8⁺, DN клетки, $\gamma\delta$ TCR⁺ и мукозо-ассоциированные инвариантные T-клетки (MAIT) [17]. Таким образом, на первом этапе мы выделили из PBMC все эти субпопуляции CD161⁺ T-клеток вместе с NK- и NKT-клетками и культивировали их вместе в течение 3 недель. Вероятно, одна из них (с или без других клеточных субпопуляций или их цитокиновой поддержки) дала начало $\alpha\beta$ TCR⁺CD161⁺ DN T-клеткам. Стоит отметить, что в культуре CD161⁺ не было активирующих гранул антител CD3/CD28, так как предполагалось, что будут пролиферировать ILC2 клетки, не имеющие TCR; при этом в культуральной среде содержались только IL-2, IL-7 и PHA. Наряду с DN T-клетками, субпопуляции NK, NKT, CD8⁺ и CD4⁺ T-клеток также расширялись в течение 3 недель. После анализа клеточных субпопуляций с помощью проточной цитометрии NK, NKT, CD8⁺ и CD4⁺ T-клетки были удалены с использованием коктейля антител против CD4⁺, CD8⁺, CD56⁺, меченных фикоэритрином, магнитных частиц анти-PE и магнитной колонки LS. Иммуно-

фенотипом полученной клеточной субпопуляции был $\alpha\beta$ TCR⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻CD161⁺CRTH2⁻. Важно отметить, что через 3 недели культура показывала признаки истощения, и дальнейшее культивирование было невозможно.

На следующем этапе цитокиновый профиль DN T-клеток оценивали после стимуляции гранулами анти-CD3/CD28. Два провоспалительных цитокина, IFN γ и TNF α , обычно связаны с функциями DN T-клеток и могут считаться их основными цитокинами [1]. Действительно, в нашем исследовании продукция IFN γ DN T-клетками была в 10 раз выше (в абсолютных значениях) при активации, чем продукция CD4⁺ T-клеток (907 пг/мл для DN T-клеток по сравнению с 91 пг/мл для CD4⁺ T-клеток). Аналогично, DN T-клетки секретировали 739 пг/мл TNF α по сравнению с 207 пг/мл, продукцией CD4⁺ T-клетками при активации. Таким образом, наши данные совпадают с выводами предыдущих исследований [1], оценивающими IFN γ и TNF α как два основных провоспалительных цитокина, секрецируемых DN T-клетками.

IL-4 и IL-17 считаются цитокинами, продуцируемыми T-хелпер-подобными DN T-клетками [1]. Интересно отметить, что в нашем исследовании два члена семейства IL-17 (IL-17A и IL-17F) производились только T-хелперами CD4⁺, но не CD161⁺ DN T-клетками, хотя ранее предлагалось, что CD161 служит маркером всех подгрупп T-клеток, производящих IL-17 у человека [18]. Однако, в последующих исследованиях эта гипотеза не была подтверждена [19], и наши результаты также не подтверждают ее, поскольку IL-17 производился CD4⁺ T-клетками (после удаления CD161⁺ клеток), но не CD161⁺ DN T-клетками. В нашем исследовании увеличение уровня продукции IL-4 DN T-клетками при их активации было доказуемым, но относительно мало выраженным (дополнительные материалы, Таблица S1).

В текущем исследовании мы также оценили содержание цитокинов и хемокинов, которые секретировались исключительно или преимущественно CD161⁺ DN T-клетками. Было показано, что они производят IL-3 и IL-27 при активации, однако статистическая значимость не была достигнута в случае IL-27 (рис. 2). Ранее было показано, что IL-3 усиливает пролиферацию и выживание человеческих T- и B-клеток, а также гемопоэтических клеток-предшественников [20].

Таким образом, IL-3 может также обладать провоспалительными и иммуностимулирующими свойствами при аутоиммунных заболеваниях человека. IL-27 играет двойственную роль в иммунитете с участием CD4⁺ Т-клеток: IL-27 индуцирует экспансию провоспалительных Th1-клеток и подавляет иммунный ответ путем ингибирования развития Th17-клеток и индукции продукции IL-10 [21]. При активации CD161⁺ DN T-клетки продуцируют провоспалительные хемокины: (1) CXCL9, привлекающий активированные Т-лимфоциты, преимущественно фенотипа Th1; (2) CCL3, привлекающий Т-клетки, В-клетки, базофилы, эозинофилы, тучные клетки и NK-клетки; и (3) CCL5, привлекающий и рекрутирующий Т-клетки, дендритные клетки, эозинофилы, NK-клетки, тучные клетки и базофилы [22–24]. Следует отметить, что CCL4, привлекающий моноциты, Т-клетки и NK-клетки, продуцировался конститутивно, поскольку его абсолютные уровни превышали максимальный обнаруживаемый предел >3455 пг/мл даже без активации (рис. 2 и дополнительные материалы – Таблица S1), хотя CXCL9, CCL3 и CCL5 также секретировались интактными DN T-клетками в значительно более высоких концентрациях, чем CD4⁺ или CD8⁺ T-клетками. Полученные данные наряду с отсутствием IL-4, IL-10 и IL-17 в профиле продукции цитокинов свидетельствуют о провоспалительном фенотипе DN T-клеток.

Таким образом, наше исследование показало, что CD161⁺ DN T-клетки характеризуются выраженным провоспалительным цитокиново-хемокиновым профилем, который включает цитокины IFN γ и TNF α , а также хемокины CXCL9, CCL3, CCL4 и CCL5. Этот профиль также включает плеиотропный цитокин IL-27 и IL-3.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Магнитная сепарация и клональная экспансия CD4⁺ T-хелперов, CD8⁺ T-цитотоксических клеток и дважды негативных CD3⁺CD4[−]CD8[−] T-клеток. Первичные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) от здорового донора были приобретены у STEMCELL Technologies (кат. #70025).

Клетки, экспрессирующие CD161 (рецептор KLRB1), выделяли из 8×10^7 PBMC путем положительной селекции. Для этого PBMC сначала

окрашивали антителами анти-CD161, коньюгированными с фикоэритрином (PE) (клон REA631, Miltenyi Biotec), затем клетки метили частицами анти-PE (кат. #130-048-801, Miltenyi Biotec) и загружали на разделительную колонку LS (кат. #130-042-401, Miltenyi Biotec); разделение клеток проводили в соответствии с инструкциями производителя с использованием гранул анти-PE. Положительно выделенные CD161⁺ клетки высевали в 10 мл среды RPMI-1640, дополненной 10% FBS (кат. #FBS-HI-11A, Capricorn Scientific), 1X раствором антибиотика-антимикотика (Gibco), 100 Ед/мл rhIL-2 (Gibco), 5 нг/мл rhIL-7 (Sci-Store, Россия) и 1 мкг/мл фитогемагглютинина (PHA, Gibco) в матрасе объемом 25 см², а затем культивировали в увлажненном CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂). На 5-й день культивационную среду заменяли свежей, перенося растущие клетки из матраса объемом 25 см² в матрас объемом 75 см². CD161⁺ клетки культивировали 21 день с обновлением среды дважды в неделю. После анализа методом проточной цитометрии (см. раздел Проточная цитофлуориметрия) дважды негативные CD3⁺CD4[−]CD8[−] T-клетки очищали путем отрицательной селекции. Удаление CD4⁺, CD8⁺ и CD56⁺ клеток проводили, как описано выше, с использованием коктейля антител анти-CD56-PE (клон 5.1H11, Elabscience), анти-CD4-PE (клон 13B8.2, Beckman Coulter), CD8-PE (клон REA734, Miltenyi Biotec), частиц анти-PE и разделительной колонки LS.

Т-цитотоксические и Т-хелперные клетки, экспрессирующие корецепторы CD8⁺ и CD4⁺, соответственно, выделяли из CD161-деплелированной фракции PBMC путем положительной магнитной сепарации с использованием антител анти-CD8-PE (клон REA734) и анти-CD4-PE (клон 13B8.2), частиц анти-PE и разделительных колонок LS. Затем выделенные Т-цитотоксические и Т-хелперные клетки подвергали клональной экспансии с использованием магнитных частиц с анти-CD3/CD28 (DynabeadsTM human T-Activator, кат. #11132D, Gibco) в среде RPMI-1640, дополненной 10% FBS, 1X раствором антибиотика-антимикотика и 100 Ед/мл rhIL-2, в увлажненном CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂). После клональной экспансии частицы удаляли в магнитном поле, клетки промывали PBS и криоконсервировали в 90% FBS, 10% DMSO в жидким азоте.

Проточная цитофлуориметрия. Анализ PBMC методом многоцветной проточной цитометрии до разделения и клональной экспансии CD161⁺ клеток, а также через 3 недели после этого, проводили на проточном цитометре Novocyte 2060R (ACEA Biosciences Inc), оснащенном синим лазером (488 нм) и красным лазером (620 нм).

Клетки окрашивали следующими человеческими моноклональными антителами: анти-CD56-PE-Cy7, анти-CD3-APC, анти-CD8-FITC и анти-CD4-PE (все от Beckman Coulter Diagnostics). CD161⁺ клетки после 3 недель клональной экспансии также окрашивали антителами анти-CD161-PE (Miltenyi Biotec), коктейлем антител против человеческой гемопоэтической линии: анти-CD2 (RPA-2.10), анти-CD3 (OKT3), анти-CD14 (61D3), анти-CD16 (CB16), анти-CD19 (HIB19), анти-CD56 (TULY56), анти-CD235a (HIR2), все конъюгированные с FITC (eBioscience), и анти-CD294(CRTH2)-APC (клон REA598, Miltenyi Biotec) или анти-CD56-PE-Cy7 и антителами анти- $\gamma\delta$ TCR-FITC (Elabscience).

Полученные данные обрабатывали и представляли с использованием программного обеспечения NovoExpress Software v. 1.2.4 (ACEA Biosciences Inc).

Активация субпопуляций Т-клеток. После удаления CD56⁺, CD4⁺ и CD8⁺ клеток их промывали и высевали в ячейки 48-луночного планшета с плотностью 4×10^5 клеток/лунка в 400 мкл полной среды RPMI-1640, дополненной 10% FBS и 1X раствором антибиотика-антибиотика.

После клональной экспансии CD4⁺ и CD8⁺ клетки размораживали, промывали и высевали в ячейки 48-луночного планшета в той же среде и в тех же условиях. Через 24 ч среду заменяли свежей, и клетки стимулировали магнитными частицами Dynabeads human T-Activator (Gibco), несущими моноклональные антитела к CD3 и CD28 человека, в течение 24 ч в увлажненном CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂). Через 24 ч культуральные жидкости собирали и замораживали при -70°C.

Мультиплексный анализ для оценки продукции цитокинов DN T-клетками при активации. Широкий спектр цитокинов, хемокинов и факторов роста, секрецииемых активированными T-клетками на белковом уровне, оценивали с помощью мультиплексной технологии xMAP (Luminex). Используемый набор (кат. #HCYTA-60K-PX48, Merck)

включал 48 следующих цитокинов, хемокинов и факторов роста: SCD40L, CX3CL1 (Fractalkine), Flt-3 ligand, CCL11 (Eotaxin-1), GRO α , FGF-2, EGF, G-CSF, GM-CSF, TNF α , TNF β , TGF α , IFN γ , IFN α 2, IL-1RA, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, CXCL8 (IL-8), IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A (CTLA8), IL-17E (IL-25), IL-17F, IL-18, IL-22, IL-27, CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CCL22 (MDC), CCL5 (RANTES), PDGF-AA, PDGF-AB/BB, M-CSF и VEGF-A. Мультиплексный анализ проводили в соответствии с инструкциями производителя, а затем флуоресцентный сигнал от магнитных частиц детектировали на мультиплексной системе MAGPIX (Merck) с использованием программного обеспечения xPONENT 4.2 (Merck). Финальный анализ полученных флуоресцентных данных проводили с помощью программного обеспечения MILLIPLEX Analyst v5.1 (Merck). Количественное сравнение анализов в контрольных и экспериментальных образцах выполняли с использованием непарного двухвыборочного *t*-теста в GraphPad Prism v.8.0.1 (GraphPad Software). Значения *p* ≤ 0.05 считались статистически значимыми.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы выделили клетки с иммуногенотипом $\alpha\beta$ TCR⁺CD161⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻CRTH2⁻ из культуры *in vitro* общей популяции CD161⁺ клеток, выделенных из культуры первичных PBMC путем положительной сепарации. Выделенные DN T-клетки активировали частицами с анти-CD3/CD28 антителами, и методом мультиплексной технологии впервые определили широкий спектр цитокинов, хемокинов и факторов роста клеток, секрецииемых при активации DN T-клеток. Было показано, что $\alpha\beta$ TCR⁺CD161⁺ DN T-клетки не продуцируют цитокин IL-17 и характеризуются выраженным провоспалительным фенотипом. Профиль секреции этих клеток включает цитокины TNF α , IFN γ , IL-3, IL-13 и IL-27, хемокины CXCL8, CXCL9, CCL3, CCL4 и CCL5, а также факторы роста M-CSF и GM-CSF. Полученные результаты предоставляют собой новые данные, которые позволяют пролить свет на функции DN T-клеток в иммунной системе и могут быть полезны для разработки клеточных терапий в будущем.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-75-10116; <https://rscf.ru/project/23-75-10116/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равнозначный вклад в написание статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wu Z., Zheng Y., Sheng J., Han Y., Yang Y., Pan H., Yao J.* // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. P. 816005. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.816005>
2. *Brandt D., Hedrich C.M.* // *Autoimmun. Rev.* 2018. V. 17. P. 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.02.001>
3. *Li H., Tsokos G.C.* // *Curr. Opin. Rheumatol.* 2021. V. 33. P. 163. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000778>
4. *Tian D., Yang L., Wang S., Zhu Y., Shi W., Zhang C., Jin H., Tian Y., Xu H., Sun G., Liu K., Zhang Z., Zhang D.* // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 4246. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12243-0>
5. *Chen X., Wang D., Zhu X.* // *Biomark. Res.* 2022. V. 10. P. 11. <https://doi.org/10.1186/s40364-022-00360-w>
6. *Lee J.B., Kang H., Fang L., D'Souza C., Adeyi O., Zhang L.* // *Clin. Cancer Res.* 2019. V. 25. P. 2241–2253. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2291>
7. *Lu J., Huang C., He R., Xie R., Li Y., Guo X., Zhang Q., Xu Q.* // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2023. V. 149. P. 9007–9016. <https://doi.org/10.1007/s00432-023-04823-x>
8. *Miltenyi S., Muller W., Weichel W., Radbruch A.* // *Cytometry*. 1990. V. 11. P. 231–238. <https://doi.org/10.1002/cyto.990110203>
9. *Weiss R., Gerdes W., Berthold R., Sack U., Koehl U., Hauschildt S., Grahnert A.* // *Cells*. 2021. V. 10. P. 2824. <https://doi.org/10.3390/cells10112824>
10. *Cho D., Campana D.* // *Ann. Lab. Med.* 2009. V. 29. P. 89–96. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.2.89>
11. *Crispín J.C., Tsokos G.C.* // *J. Immunol.* 2009. V. 183. P. 4675–4681. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901533>
12. *Lee H.-S., Jeong G.-S.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 6122. <https://doi.org/10.3390/ijms21176122>
13. *Poltorak M.P., Graef P., Tschulik C.* // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 17832. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74595-8>
14. *Newman-Rivera A.M., Kurzhaugen J.T., Rabb H.* // *Kidney Int.* 2022. V. 102. P. 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2022.02.035>
15. *Krabbendam L., Nagasawa M., Spits H., Bal S.M.* // *Curr. Protoc. Immunol.* 2018. V. 122. P. e55. <https://doi.org/10.1002/cpim.55>
16. *Falquet M., Ercolano G., Jandus P., Jandus C., Trabanelli S.* // *J. Asthma Allergy*. 2021. V. 14. P. 773–783. <https://doi.org/10.2147/JAA.S304126>
17. *Fergusson J.R., Smith K.E., Fleming V.M., Rajoriya N., Newell E.W., Simmons R., Marchi E., Björkander S., Kang Y.-H., Swadling L., Kurioka A., Sahgal N., Lockstone H., Baban D., Freeman G.J., Sverremark-Ekström E., Davis M.M., Davenport M.P., Venturi V., Ussher J.E., Willberg C.B., Klenerman P.* // *Cell Rep.* 2014. V. 9. P. 1075–1088. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.045>
18. *Maggi L., Santarlasci V., Capone M., Peired A., Frosali F., Crome S.Q., Querci V., Fambrini M., Liotta F., Levings M.K., Maggi E., Cosmi L., Romagnani S., Annunziato F.* // *Eur. J. Immunol.* 2010. V. 40. P. 2174–2181. <https://doi.org/10.1002/eji.200940257>
19. *Fergusson J.R., Fleming V.M., Klenerman P.* // *Front. Immunol.* 2011. V. 2. P. 36. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00036>
20. *Renner K., Metz S., Metzger A.-M., Neumayer S., Schmidbauer K., Talke Y., Buchtler S., Halbritter D., Mack M.* // *Cell Immunol.* 2018. V. 334. P. 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.09.005>
21. *Iwasaki Y., Fujio K., Okamura T., Yamamoto K.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. P. 2851–2863. <https://doi.org/10.3390/ijms16022851>
22. *Hasegawa T., Yoshida M., Watanabe S., Kondo T., Asada H., Nakagawa A., Tomii K., Kameda M., Otsuka M., Kuronuma K., Chiba H., Katayanagi S., Miyazaki Y., Mori A.* // *Sci. Rep.* 2023. V. 13. P. 5342. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32513-8>
23. *Keane M.P., Strieter R.M., Belperio J.A.* // *Macrophage Inflammatory Protein* / Eds. Laurent G.J., Shapiro S.D. Oxford: Academic Press, 2006. P. 1–5. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00229-5>
24. *Marques R.E., Guabiraba R., Russo R.C., Teixeira M.M.* // *Expert Opin. Ther. Targets.* 2013. V. 17. P. 1439–1460. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.837886>

Proinflammatory Phenotype of CD161⁺ Double-Negative T Cells

I. V. Bogdanov* and T. V. Ovchinnikova*, **, #

E-mail: ovch@ibch.ru

* *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia*

** *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Bioorganic Chemistry,
Leninskiye Gory, 1/12, Moscow, 119234 Russia*

Double-negative (DN) CD3⁺CD4⁻CD8⁻ T lymphocytes represent a subgroup of unconventional peripheral T cells. Although their presence in peripheral blood is relatively low (3–5%), they play an important role in the development of inflammatory responses, oncological, autoimmune diseases, and allergic asthma. Despite their high therapeutic significance, DN T cells remain one of the least studied T lymphocyte subpopulations, and a detailed analysis of their broad cytokine profile has not yet been performed. In the present study, we characterized the cytokine profile of CD3⁺CD4⁻CD8⁻ DN T cells using multiplex technology with a wide panel of analytes. For this purpose, DN T cells were isolated from human peripheral blood mononuclear cell cultures and activated using anti-CD3/CD28 magnetic beads. Quantitative assessment of the production of 48 cytokines, chemokines, and growth factors was performed using xMAP multiplex technology on magnetic beads. Our results demonstrate that the cytokine profile of proinflammatory $\alpha\beta$ TCR⁺CD161⁺ DN T cells includes the cytokines TNF α , IFN γ , IL-3, IL-13, and IL-27; the chemokines IL-8/CXCL8, MIG/CXCL9, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, and RANTES/CCL5; as well as the growth factors M-CSF and GM-CSF.

Keywords: *double-negative T cells, CD161, chemokines, cytokine profile, cytokines, flow cytometry, multiplex analysis*