

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛПРЕДНИЗОЛОНА НА СПОСОБНОСТЬ CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ Т-КЛЕТОК В КУЛЬТУРАХ TCR-АКТИВИРОВАННЫХ CD3⁺CD45RO⁺ Т-ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ ПРОДУЦИРОВАТЬ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ МЕДИАТОРЫ

Н.М. Тодосенко¹, О.Г. Хазиахматова¹, К.А. Юрова¹, И.П. Малинина², Л.С. Литвинова^{1*}

¹Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта,
236016, Калининград, ул. Боткина, 3; эл. почта: larisalitinova@yandex.ru

²Отделение ревматологии областной клинической больницы, Калининград

Оценено влияние разных концентраций глюкокортикоида (ГК) метилпреднизолон (МП) на изменение числа CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ Т-клеток и их способность продуцировать провоспалительные медиаторы *in vitro* в культурах TCR-стимулированных CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов. Т-клетки получали от здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (РА). На фоне TCR-активации МП повышал число CD4⁺HLA-DR⁺CD95⁺ клеток в CD3⁺CD45RO⁺ культурах, полученных от больных РА, и не изменял их содержание у контрольной группы. В целом эффекты МП приводили к снижению продукции провоспалительных факторов (IFN- γ , IL-2, IL-17, IL-21 и TNF- α) TCR-активированными CD3⁺CD45RO⁺ клетками здоровых доноров и больных РА, подтверждая общий иммуносупрессорный механизм действия ГК. Выявленные нами корреляции между содержанием CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺CD95⁺ Т-клеток с показателями, отражающими продукцию провоспалительных медиаторов (IL-17, IL-21 и TNF- α) у больных РА, свидетельствуют о сохранении провоспалительного потенциала этой популяции Т-клеток на фоне действия ГК. Мы полагаем, что относительная резистентность CD4⁺CD45RO⁺CD95⁺HLA-DR⁺ Т-клеток больных РА к супрессорному действию ГК приводит к сохранению и усилению функциональных возможностей аутореактивных клеток в патогенезе РА.

Ключевые слова: Т-клетки памяти, ревматоидный артрит, глюкокортикоидные гормоны, CD95, HLA-DR

DOI 10.18097/PBMC20176303255

ВВЕДЕНИЕ

В основе патогенеза ревматоидного артрита (РА) лежит аутоиммунный процесс, опосредуемый аутореактивными синовиально-подобными CD4⁺CD45RO⁺ Т-клетками, которые относятся к Т-хелперам (Th1) I типа [1, 2]. Специфическое распознавание Т-лимфоцитами антигенов, экспрессирующихся на синовиальных суставных поверхностях, запускает каскад событий, опосредующих воспаление и разрушение суставов [3]. Установлено, что косвенным отражением активационного статуса клеток являются их фенотипические особенности, оценка которых позволяет выявить новые популяции, а также обнаружить патогенные (измененные) клетки, ответственные за развитие определённых заболеваний. CD3⁺HLA-DR⁺CD95⁺ Т-клетки активно изучают в контексте формирования противоопухолевого иммунитета [4], патогенеза вирусной инфекции (ВИЧ) [5], сепсиса [6], некоторых аутоиммунных заболеваний [7, 8], при старении и др. [5]. Согласно полученным нами ранее данным, высокая экспрессия зрелыми эффекторными (CD3⁺CD4⁺/CD8⁺CD27⁺CD62L⁺CD45RO⁺) Т-клетками молекул HLA-DR и CD95, могут являться признаками терминальной фазы дифференцировки и созревания Т-клеток [9]. Опираясь на данные научной периодики и результаты собственных исследований, мы предполагаем, что CD4⁺CD45RO⁺CD95⁺HLA-DR⁺ Т-клетки являются вероятной артритогенной субпопуляцией, продуцирующей высокие уровни

провоспалительных молекул, принимающих участие в патогенезе РА.

Стероидные гормоны являются мощными противовоспалительными агентами, осуществляющими регуляцию адаптивных иммунных процессов. В современной литературе основное внимание уделено глюкокортикостероидам (ГК) в связи с их широким применением в клинической практике [10, 11]. Доказано, что стандартная глюкокортикоидная терапия снижает активность воспалительного процесса РА, способствуя установлению временной ремиссии. Несмотря на очевидный факт, что все краткосрочные и долговременные эффекты ГК на иммунитет прямо или косвенно связаны с их влиянием на генерацию, жизнеспособность и функциональную активность Т-клеток, сведений, посвящённых действию ГК на особенности гомеостаза артритогенных клеток, в частности CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺CD95⁺HLA-DR⁺, в литературе очень мало. В связи с этим целью исследования была оценка влияния метилпреднизолон (МП) на способность TCR-активированных CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺CD95⁺HLA-DR⁺ Т-клеток больных РА продуцировать медиаторы с провоспалительным действием (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-21) в условиях *in vitro*.

МЕТОДИКА

Исследование проведено в соответствии с Хельсинской Декларацией ВМА 2000 г. и протоколом

* - адресат для переписки

Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Материалом для исследования служили мононуклеарные лейкоциты, выделенные из венозной крови, взятой из локтевой вены утром натощак с помощью стандартных вакуумных систем "BD VACUTAINER™" ("Greiner-bio-one", Австрия) с гепарином (20 Ед/мл) у 50 больных ревматоидным артритом (РА) (38 женщин и 12 мужчин в возрасте $36,4 \pm 7,2$ лет) и 20 условно здоровых доноров (10 женщин и 10 мужчин в возрасте $35,3 \pm 8,9$ лет). При проведении сравнительного анализа действия МП на исследуемые характеристики $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток, полученных у условно здоровых лиц и больных РА, в зависимости от гендерных критериев, достоверных различий тестируемых параметров выявлено не было.

Верификация диагноза и набор пациентов в группы исследования осуществлялись зав. ревматологическим отделением, заслуженным врачом РФ И.П. Малининой на базе областной клинической больницы г. Калининграда (главный врач – заслуженный врач РФ, К.И. Поляков). Постановка диагноза РА была выполнена согласно приказу №21 "Об утверждении стандарта медицинской помощи больным ревматоидным артритом" от 13 января от 2006 г. Диагностические исследования включали опрос пациентов, рентгенографию, компьютерную и ЯМР-томографию суставов, выявление ревматоидного фактора и титра антител к циклическому цитрулин-содержащему пептиду, оценку скорости оседания эритроцитов и С-реактивного белка. На основании оценки анамнеза болезни в исследование были включены пациенты, отвечающие следующим критериям:

- активность болезни – ремиссия (DAS28 (визуальный калькулятор оценки активности заболевания при ревматоидном артрите) $< 2,6$) (10 человек) или низкая (DAS28 – $2,6-3,2$) (40 человек);
- ревматоидный фактор – серопозитивный;
- антитела к циклическому цитрулин-содержащему пептиду – серопозитивный;
- отсутствие терапии стероидными и цитостатическими препаратами с момента манифестации заболевания (не менее 6 месяцев);
- продолжительность заболевания – не более года с момента постановки диагноза.

Критерием исключения пациентов из исследования явилось получение медикаментозной терапии на момент взятия крови и наличие внесуставных осложнений заболевания. Все обследованные лица дали информированное согласие на исследование. Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете (№2 от 11 ноября 2014 г.).

Клетки получали методом центрифугирования в градиенте плотности ($1,077 \text{ г/см}^3$) фиколл-урографина ("Schering", Испания и "Pharmacia", Швеция) по стандартной методике. Культуры Т-клеток ($CD3^+CD45RO^+$) из мононуклеарных лейкоцитов получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS® (MidiMACS

Separator, LS Columns, "MiltenyiBiotec", Германия) и моноклональных антител к $CD14$ и $CD45RO$ с парамагнитными частицами MicroBeads human ("Miltenyi Biotec"), согласно протоколу фирмы-изготовителя. Подсчёт числа клеток в полученных культурах проводили с помощью автоматического счётчика клеток Countess™ AutomatedCellCounter ("Invitrogen", США), используя краситель трипановый синий (0,4%, "Invitrogen"). Использовали клеточные культуры, чистота которых после магнитной сепарации составляла в среднем $97,5 \pm 2,12\%$ (фенотип $CD3^+CD45RO^+CD14^-CD19^-$) (далее, $CD3^+CD45RO^+$ -клетки). Число живых клеток в культурах составляло не менее 98%.

$CD3^+CD45RO^+$ -клетки (10^6 кл/мл) культивировали в 48-луночном планшете в бессывороточной среде Искова ("Sigma", США), содержащей 0,5% сывороточный альбумин человека ("Микроген", Россия), 5×10^{-5} М β -меркаптоэтанол ("Acros Organic", США) и 30 мкг/мл гентамицина, в присутствии синтетического ГК (МП) ("Orion Pharma", Россия) в разных концентрациях или без него (контроль) в течение 48 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 .

В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human ("Miltenyi Biotec") – антибиотинные частицы MACSiBead™ с биотинилированными антителами против $CD2^+$, $CD3^+$, $CD28^+$ человека (далее Ас/Exp). Нагруженные антителами анти-биотинные частицы MACSiBead™ использовали в качестве имитации антиген-презентирующих клеток (АПК) для активации Т-клеточного рецептора (TCR) покоящихся Т-клеток (TCR-активатор). Реагент Ас/Exp добавляли в пробы в количестве 5 мкл, которые содержали – $0,5 \times 10^6$ анти-биотинных MACSiBead™ частиц; соотношение клеток и активирующих частиц составило 1:2.

Регистрацию жизнеспособности и подсчёт числа клеток в исследуемых клеточных культурах проводили методом проточной лазерной цитометрии на цитофлуориметре Guava EasyCite Plus ("Millipore", США) с использованием реагента Guava ViaCount и одноименной программы ("Millipore") согласно протоколу производителя. Число клеток, несущих поверхностные маркеры ($CD45RO$, $CD3$, $CD4$, HLA-DR, $CD95$), определяли методом проточной лазерной цитометрии с помощью моноклональных антител, конъюгированных с Viabluе ($CD45RO$); аллофикоцианином (APC) ($CD3$) ("Miltenyi Biotec"); FITC ($CD95$), фикоэритрином (PE) ($CD4$) ("Abcam", Великобритания); с конъюгатом PE с пиридинхлорофиллом (PerCP) (HLA-DR) ("e-Bioscience") согласно методикам производителя. Регистрацию результатов проводили на проточном цитофлуориметре MACSQuant ("Miltenyi Biotec"). Все результаты цитометрического анализа анализировали с помощью программы KALUZA Analysis Software ("Beckman Coulter", США).

Выбор срока культивирования (48 ч) исследуемых проб обоснован тем фактом, что изменение фенотипических маркеров, характеризующих

состояние активации Т-клеток после стимуляции TCR, реализуется через экспрессию генов с последующим синтезом соответствующих белков и соответствует геномному механизму действия ГК [11]. Варианты культивирования: 1) в среде без добавок (контроль); 2) в среде, содержащей Ас/Ехр ($0,5 \times 10^6$ MACSiBeadTM частиц); 3) в среде, содержащей Ас/Ехр ($0,5 \times 10^6$ MACSiBeadTM частиц) и МП (10,6; 21,3; 46,2; 85,3; 170,7 мг). Спектр концентраций МП, используемый в эксперименте был определен, исходя из математической фармакокинетической двухкамерной модели (центральная камера – плазма крови и хорошо кровоснабжаемые органы, периферическая камера – плохо кровоснабжаемые ткани), где учитывался расчётный объём распределения ГК в организме (то есть гипотетический объём жидкости организма (Vd), в котором лекарственное вещество распределено равномерно и находится в концентрации, равной концентрации (Q) данного вещества в плазме крови (C_p ; $V_d = Q/C_p$; для ГКС величина Vd составляет $\approx 0,35$ л/кг) [12]. Таким образом, добавляемые нами концентрации МП на 1 млн. культивируемых Т-клеток/мл, составили (10^{-6} М; 2×10^{-6} М; 4×10^{-6} М; 8×10^{-6} М; $1,6 \times 10^{-5}$ М), что соответствует действию МП в концентрациях 10,6; 21,3; 46,2; 85,3; 170,7 мг, распределённых, условно, в 5 л крови.

После инкубации клеточных культур выделяли тотальную РНК с использованием набора реагентов ExtractRNA kit (“Евроген”, Россия) согласно протоколу производителя. Степень очистки препаратов РНК определяли с использованием спектрофотометрического анализа (Nanovue Plus, “GE Healthcare Bio-Sciences”, Швеция) по соотношению A260/A280. Качество препаратов РНК оценивали с использованием электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле и окрашивания бромистым этидием.

Реакцию обратной транскрипции проводили на образцах суммарной РНК с использованием набора реагентов MMLV RT kit (“Евроген”). кДНК синтезировали согласно протоколу производителя. В качестве затравки использовали oligo(dT)23-primer (20 мкМ) (“Beagle”, Россия). Качество кДНК оценивали с использованием электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле и окрашивания бромистым этидием. Уровень экспрессии *мРНК генов провоспалительных цитокинов* оценивали с помощью ПЦР с использованием реагентов qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”) и праймеров (см. таблицу 1) в концентрации 10 пМ (“Beagle”, Россия). В качестве матрицы использовали 5 мкл кДНК, в качестве референсного гена – α -tubulin.

Предварительную оценку специфичности праймеров проводили с помощью on-line программы BLAST. Для каждой пары праймеров была подобрана оптимальная температура отжига с использованием градиентной ПЦР (Bio-Rad T-100, Bio-Rad C-1000, “BioRad”, США). ПЦР в реальном времени проводили в трех повторностях с использованием планшетной системы LightCycler 480 (“Roche”, Швейцария) в следующем режиме: 95°C, 3 мин; 95°C, 20 с; 58-62°C

Таблица 1. Последовательности прямых (for) и обратных (rev) олигонуклеотидных праймеров (“Beagle”), использованных в работе

IFN- γ _for: 5'-CCTGCAATCTGAGCCAGTGC-3'
IFN- γ _rev: 5'-TGGAAGCACCAGGCATGAAA-3'
IL-21_for: 5'-GGTCAAGATCGCCACATGATTA-3'
IL-21_rev: 5'-GCATTTGTGGAAGGTGGTTTC-3'
IL-2_for: 5'-AGACCCAGGGACTTAATCAGCAA-3'
IL-2_rev: 5'-ACAATGGTTGCTGTCTCATCAGC-3'
TNF- α _for: 5'-AGAGGGAGAGAAGCAACTACAG-3'
TNF- α _rev: 5'-TGGGTCAGTATGTGAGAGGAAG-3'
IL-17_for: 5'-TCAACGCTGATGGGAACGTG-3'
IL-17_rev: 5'-TCTCCAGCCGGAAGGAGTTG-3'
α -tubulin_for: 5'-TTACCTCGACTCTTAGCTTGTCG-3'
α -tubulin_rev: 5'-GGATGGAGATGCACTCACG-3'

(в зависимости от гена), 30 с; 72°C, 60 с – 45 циклов; 72°C, 5 мин. Специфичность продуктов реакции определяли с использованием кривых плавления. Результаты ПЦР анализировали с помощью метода максимума второй производной (Second Derivative Maximum method). Расчеты уровней относительной экспрессии исследуемых генов производили с помощью модифицированной формулы Пфаффа для разных эффективности амплификации:

$$\text{Относительный уровень экспрессии} = \frac{\text{Еиссл}^{\text{АСРиссл(контр - иссл)}}}{\text{Ереф}^{\text{АСРреф(контр - иссл)}}}$$

Содержание цитокинов (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-17 и IL-21) в супернатантах CD3⁺CD45RO⁺ культур оценивали методом иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов согласно протоколам фирм-производителей (“Вектор-Бест”, Россия и “Cusabio Biotech”, США). Для наборов IL-2, TNF- α и IL-17 диапазон измеряемых концентраций 0-500 пг/мл, чувствительность – 2 пг/мл; для IFN- γ диапазон измеряемых концентраций 0-1000 пг/мл, чувствительность – 5 пг/мл; IL-21 – диапазон измеряемых концентраций 0-200 пг/мл, чувствительность – 0,78 пг/мл.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез (Кремер, 2004). При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова-Смирнова). Для каждой выборки вычисляли средневыворочные характеристики: медиану (М), первый и третий квартили (Q₁, Q₃). Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали критерий для зависимых выборок Вилкоксона, для независимых – Манна-Уитни. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный (путём вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r))

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛПРЕДНИЗОЛОНА НА СПОСОБНОСТЬ Т-КЛЕТОК ПРОДУЦИРОВАТЬ МЕДИАТОРЫ

и регрессионный (с вычислением коэффициента регрессии – r^2) анализы. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Статистическую обработку данных ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени осуществляли с помощью специализированной программы REST 2009 v. 2.0.12. Уровень экспрессии исследуемых генов в контрольной группе принят за 1 усл. ед.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В интактных пробах $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток, полученных от здоровых доноров, число мёртвых клеток составило 27,89 (25,11-29,13)%. ТCR-активация $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток здоровых доноров способствовала статистически значимому ($p < 0,01$) росту исследуемого показателя в сравнении с интактной пробой (табл. 2). Содержание мёртвых клеток в нестимулированных культурах Т-клеток, полученных от больных РА, было значительно ниже аналогичных значений контроля ($p < 0,05$) и значимо не изменялось при добавлении активатора (табл. 2). МП достоверно повышал содержание мертвых клеток в культурах $CD3^+CD45RO^+$ лимфоцитов контрольной группы (весь диапазон концентраций) и у больных РА (только дозы 85,3-107,7 мг) (табл. 2).

Таблица 2. Содержание мертвых клеток (%) в культурах $CD3^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, в условиях инкубации с разными концентрациями метилпреднизолона (МП) и активатором (Ас/Ехр)

Показатель	Условия культивирования	Здоровые доноры	Больные РА
Содержание мёртвых клеток (%)	Без активации	27,89 (25,11-29,13)	46,87 (44,38-49,39) $^{\diamond}$
	Ас/Ехр	39,75 (34,32-42,29)*	45,33 (43,21-48,78)
	Ас/Ехр + МП (мг)	10,6	42,34 (38,29-46,43)
		21,3	41,30 (39,29-43,28)
		42,6	45,24 (41,32-48,39)
		85,3	53,92 (49,21-58,32)**
		170,7	57,47 (54,67-61,67)**

Примечание: здесь и таблицах 2-6: * - $p < 0,05$ - в сравнении с Т-клетками, культивированными без активационных частиц; ** - $p < 0,05$ - в сравнении с Т-клетками, культивированными с активационными частицами; $^{\diamond}$ - $p < 0,05$ - достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров. В качестве средней выборочной характеристики использовали медиану (Me), первый и третий квартили (Q_1 - Q_3).

Таблица 3. Содержание $CD95^+$ и $HLA-DR^+$ Т-клеток (%) в культурах $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитов, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, в условиях инкубации с разными концентрациями метилпреднизолона (МП) и активатором (Ас/Ехр)

Показатель	Условия культивирования	Здоровые доноры	Больные РА
$CD95^+$	Без активации	11,96 (11,19-14,01)	8,18 (7,01-9,87)
	Ас/Ехр	21,46 (20,07-25,05)*	28,99 (25,75-33,16)*
	Ас/Ехр + МП (мг)	10,6	33,63 (29,88-38,47)** $^{\diamond}$
		21,3	38,38 (34,09-43,91)** $^{\diamond}$
		42,6	40,29 (35,80-46,09)** $^{\diamond}$
		85,3	36,82 (32,71-42,12)** $^{\diamond}$
		170,7	35,08 (31,16-40,13)** $^{\diamond}$
$HLA-DR^+CD95^+$	Без активации	4,94 (3,95-5,79)	7,52 (6,51-8,95) $^{\diamond}$
	Ас/Ехр	11,36 (9,08-13,33)*	14,12 (12,83-15,91)*
	Ас/Ехр + МП (мг)	10,6	22,73 (20,66-25,61)** $^{\diamond}$
		21,3	27,54 (25,03-31,03)** $^{\diamond}$
		42,6	24,88 (22,61-28,03)** $^{\diamond}$
		85,3	26,54 (24,12-29,90)** $^{\diamond}$
		170,7	29,49 (26,81-33,22)** $^{\diamond}$

Данные о содержании провоспалительных цитокинов (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-21) в супернатантах культур CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов и сведения об уровне относительной экспрессии мРНК их генов в Т-клетках, представлены в таблицах 4 и 5. У больных РА выявлено более высокое содержание цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-21) в супернатантах клеточных культур в интактных пробах (по сравнению с контрольной группой), за исключением IL-2 (табл. 4). TCR-активация способствовала достоверному повышению уровня экспрессии мРНК генов провоспалительных цитокинов (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-21) и их содержания в супернатантах клеточных культур как здоровых доноров, так и больных РА. Изменения носили однонаправленный характер, но имели разную степень выраженности (табл. 4, 5).

На фоне TCR-активации, добавление МП в CD3⁺CD45RO⁺ культуры сопровождалось снижением уровня экспрессии мРНК генов цитокинов (IL-2 и TNF- α) в Т-клетках и их содержания в супернатантах клеточных культур здоровых доноров и больных РА (табл. 4, 5). МП снижал экспрессию мРНК гена IFN- γ и его секрецию Т-клетками больных РА; внесение МП в культуры TCR-активированных клеток здоровых доноров тоже приводило к снижению секреции Т-клетками IFN- γ , однако уровень экспрессии гена IFN- γ значимо не изменялся (табл. 4, 5).

МП недостоверно повышал уровень относительной экспрессии мРНК генов IL-17 и IL-21 в активированных Т-клетках обеих групп (за исключением высоких концентраций ГК – 85,3 и 170,7 мг). МП (весь диапазон концентраций) способствовал

Таблица 4. Уровень провоспалительных цитокинов (пг/мл) в супернатантах культур CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, в условиях инкубации с разными концентрациями метилпреднизолона (МП) и активатором (Ас/Exp)

Показатель	Условия культивирования		Здоровые доноры	Больные РА
IL-2	Без активации		88,14 (79,05-89,84)	61,84 (61,04-63,79) [°]
	Ас/Exp		741,3 (672,95-869,30)*	421,55 (396,60-430,96)* [°]
	Ас/Exp + МП (мг)	10,6	733,97 (666,29-866,69)**	169,98 (159,92-173,78)** [°]
		21,3	726,77 (659,76-852,25) **	142,90 (134,44-146,09)** [°]
		42,6	537,18 (487,65-629,93)**	120,10 (112,99-122,78)** [°]
		85,3	392,23 (356,06-459,95)**	101,58 (95,57-103,85)** [°]
		170,7	353,00 (320,45-413,95)**	86,21 (81,11-88,13)** [°]
TNF- α	Без активации		44,38 (38,22-51,29)	55,89 (48,39-61,29)
	Ас/Exp		279,59 (240,79-323,13)*	1100,70 (885,05-1120,99)* [°]
	Ас/Exp + МП (мг)	10,6	279,82 (189,32-288,74)	201,96 (162,40-205,69)** [°]
		21,3	151,03 (102,19-155,85)**	104,23 (83,81-106,15)** [°]
		42,6	123,20 (83,35-127,12)**	50,05 (40,25-50,98)** [°]
		85,3	106,17 (71,83-109,55)**	43,44 (34,93-44,24)** [°]
		170,7	72,34 (48,94-74,64)**	28,09 (22,59-28,61)** [°]
IFN- γ	Без активации		18,66 (16,92-20,95)	25,32 (24,42-28,13) [°]
	Ас/Exp		365,32 (332,07-400,30)*	632,88 (610,50-703,13)* [°]
	Ас/Exp + МП (мг)	10,6	68,25 (65,00-78,75)**	439,50 (423,96-488,28)** [°]
		21,3	61,31 (58,34-68,01)**	218,23 (210,52-242,46)** [°]
		42,6	57,88 (55,07-64,95)**	200,92 (193,81-223,22)** [°]
		85,3	57,48 (54,69-64,95)**	146,17 (140,99-162,39)** [°]
		170,7	59,98 (57,07-67,31)**	70,24 (67,76-78,04)** [°]
IL-21	Без активации		1,2 (0,00-1,23)	1,40 (1,37-1,60) [°]
	Ас/Exp		7,11 (5,11-7,20)*	13,97 (13,67-15,97)* [°]
	Ас/Exp + МП (мг)	10,6	2,35 (2,18-2,54)**	11,00 (10,77-12,57) [°]
		21,3	2,2 (2,04-2,38)**	12,83 (11,60-13,38) [°]
		42,6	2,05 (1,90-2,22)**	11,21 (10,82-12,30)** [°]
		85,3	1,94 (1,79-2,09)**	8,22 (8,04-9,39)** [°]
		170,7	1,87 (1,81-2,11)**	7,72 (7,55-8,82)** [°]
IL-17	Без активации		2,9 (2,38-3,18)	1,93 (1,58-2,11) [°]
	Ас/Exp		17,98 (14,76-19,73)*	54,04 (44,31-59,08)* [°]
	Ас/Exp + МП (мг)	10,6	16,50 (13,54-18,10)	42,89 (35,17-46,89)** [°]
		21,3	16,65 (13,66-18,27)	38,88 (31,88-42,50)** [°]
		42,6	14,86 (12,20-16,31)**	29,69 (24,35-32,46)** [°]
		85,3	13,62 (11,18-14,95)**	24,34 (19,96-26,61)** [°]
		170,7	12,40 (10,18-13,61)**	21,53 (17,65-23,54)** [°]

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛПРЕДНИЗОЛОНА НА СПОСОБНОСТЬ Т-КЛЕТОК ПРОДУЦИРОВАТЬ МЕДИАТОРЫ

Таблица 5. Уровень относительной экспрессии мРНК генов цитокинов (IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-21, IL-17) (усл. ед.) в CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитах, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, в условиях инкубации с разными концентрациями метилпреднизолон (МП) и активатором (Ac/Exp)

Показатель	kont/Ac/Exp	Ac/Exp/МП 10,6 мг	Ac/Exp/МП 21,3 мг	Ac/Exp /МП 42,6 мг	Ac/Exp/МП 85,3 мг	Ac/Exp/МП 170,7 мг
Здоровые доноры						
IL-2	22,1 (21,9-22,7)	1,40 (1,34-1,43) **	1,92 (1,88-1,95) **	0,41 (0,39-0,42) **	0,36 (0,35-0,37) **	0,17 (0,16-0,18) **
TNF- α	6,3 (5,9-6,5)	0,76 (0,71-0,79) **	0,40 (0,37-0,43) **	0,33 (0,32-0,34) **	0,30 (0,29-0,32) **	0,19 (0,18-0,20) **
IFN- γ	7,22 (7,15-7,30)	1,10 (0,99-1,18) **	1,01 (0,99-1,11) **	1,30 (1,25-1,34) **	1,20 (1,15-1,26) **	1,30 (1,25-1,34) **
IL-21	2,30 (2,20-2,39)	1,50 (1,45-1,56) **	1,23 (1,19-1,26) **	1,34 (1,29-1,39) **	1,11 (1,09-1,16) **	1,27 (1,22-1,31) **
IL-17	5,4 (5,3-5,5)	1,85 (1,79-1,91) **	1,20 (1,15-1,28) **	1,32 (1,28-1,35) **	0,77 (0,75-0,79) **	0,18 (0,17-0,19) **
Больные РА						
IL-2	4,12 (4,09-4,19) \diamond	0,05 (0,045-0,051) ** \diamond	0,07 (0,067-0,073) ** \diamond	0,04 (0,038-0,042) ** \diamond	0,04 (0,038-0,043) ** \diamond	0,03 (0,028-0,032) ** \diamond
TNF- α	9,82 (9,78-9,91) \diamond	0,03 (0,029-0,031) ** \diamond	0,03 (0,028-0,031) ** \diamond	0,02 (0,019-0,023) ** \diamond	0,01 (0,009-0,012) ** \diamond	0,01 (0,009-0,014) ** \diamond
IFN- γ	10,81 (9,98-10,98) \diamond	0,26 (0,25-0,27) ** \diamond	0,19 (0,18-0,21) ** \diamond	0,16 (0,15-0,17) ** \diamond	0,12 (0,11-0,13) ** \diamond	0,04 (0,038-0,042) ** \diamond
IL-21	5,91 (5,88-6,01) \diamond	1,60 (1,52-1,68) ** \diamond	1,23 (1,20-1,27) **	1,20 (1,15-1,24) **	1,34 (1,30-1,38) ** \diamond	1,28 (1,24-1,32) **
IL-17	123,2 (120,3-126,5) \diamond	3,40 (3,31-3,52) ** \diamond	1,60 (1,54-1,63) **	1,28 (1,25-1,32) **	0,63 (0,61-0,64) ** \diamond	0,21 (0,19-0,23) **

резкому (равномерному) снижению содержания IL-21 в супернатантах клеточных культур здоровых доноров (по сравнению с действием только активатора). На CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетки больных РА угнетающее действие оказывали только высокие дозы МП (85,3 и 170,7 мг). Сочетанное добавление МП и активатора приводило к однонаправленному снижению содержания IL-17 в супернатантах клеточных культур контрольной группы и больных РА (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Относительно недавно установлено, что CD3⁺HLA-DR⁺ Т-клетки периферической крови здоровых доноров, несут, в основном, короткую изоформу рецептора CD45 – CD45RO (до 78-88%); характеризуются отсутствием маркеров недавней TCR-активации и низким уровнем экспрессии белков семейства Bcl-2 [5]. Предполагают, что CD3⁺HLA-DR⁺ представляют собой зрелые регуляторные Т-клетки с высокой супрессивной активностью и участвуют в процессах нормальной иммунорегуляции [5, 13]. В то же время молекула CD95 обладает рядом функциональных свойств, среди которых не только участие в процессах апоптоза, но и в пролиферации, канцерогенезе, созревании Т-лимфоцитов и др. [14]. Ранее нами было показано, что все CD3⁺HLA-DR⁺ лимфоциты здоровых доноров экспрессируют гликопротеин CD95, однако не все CD3⁺CD95⁺ клетки являются HLA-DR-позитивными [9].

Согласно полученным нами данным, содержание CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ Т-клеток в интактных CD3⁺CD45RO⁺-культурах больных РА почти в 2 раза превышало аналогичные показатели здоровых доноров (табл. 3). В последнее время в литературе появляются данные, свидетельствующие, что в развитии РА ключевую роль играют аутореактивные CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺ Т-лимфоциты, рециркулирующие через воспаленную синовиальную оболочку [1]. В то же время Т-лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD95⁺, выделенные от больных РА, демонстрируют высокую экспрессию поверхностной молекулы CCR7, что опосредует рост активированных клеток во вторичных лимфоидных органах, лимфатических узлах и синовии, обеспечивая высокую продукцию воспалительных цитокинов [15]. Высокое содержание CD4⁺CD95⁺CCR7⁺ клеток на периферии при РА способствует сверхпрезентации апоптотических телец лимфоцитам и сопровождается усилением аутоиммунного ответа [16].

Добавление анти-CD2/CD3/CD28 частиц в CD3⁺CD45RO⁺-культуры, полученные как у здоровых доноров, так и больных РА, сопровождалось достоверным ростом числа CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ Т-клеток. Реакция CD4 Т-клеток здоровых доноров и больных РА на активатор, в целом, была сопоставимой (табл. 3).

Как уже упоминалось ранее, молекулы HLA-DR и CD95 являются маркерами не только поздней, но и длительной активации Т-клеток [5, 17]. Увеличение числа Т-клеток, экспрессирующих

маркеры ранней и поздней активации (CD69, CD25, HLA-DR и CD95), регистрируется в периферической крови больных с аутоиммунной патологией (гранулематозом Вегенера, РА) [18], микозом [19], вирусом Эбола [20], системной красной волчанкой [15]. Кроме того, хроническая АГ-стимуляция при РА приводит к снижению разнообразия TCR-репертуара на Т-клетках, что сопровождается ограничением притока наивных Т-лимфоцитов на периферию, вследствие нарушения механизма обратной связи. В связи с этим, для поддержания общего количества клеток в пуле, аутореактивные Т-лимфоциты пролиферируют, пополняя количество клеток с агрессивным потенциалом [21].

Выявленное нами повышение числа CD4⁺CD95⁺ и CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ Т-клеток в культурах здоровых доноров и больных РА также может свидетельствовать о запуске индуцированной активацией клеточной гибели (activation-induced cell death, AICD), которая является важным механизмом, обеспечивающим толерантность на периферии, за счёт устранения

аутореактивных лимфоцитов [22]. Однако корреляции между содержанием мертвых клеток и числом CD4⁺CD95⁺ и CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ Т-лимфоцитов были обнаружены только в TCR-активированных культурах здоровых доноров ($r=0,372$; $r=0,573$, $p<0,05$), но не у больных РА (табл. 6). По мнению Bertho и соавт., сигналы, генерируемые с помощью HLA-DR, приводят к гибели зрелых профессиональных АПК и активированных Т- и В-лимфоцитов, утративших способность к экспрессии Fas-антигена (каспаз-независимый механизм), обеспечивая тем самым, ограничение иммунного ответа [17]. С другой стороны, учитывая данные о регуляторной активности CD3⁺HLA-DR⁺ Т-клеток, механизмы которой опосредованы контактными взаимодействиями между соседними клетками (включая CTLA-4-сигнализацию) [5, 13], можно предположить, что TCR-индуцированное повышение числа CD4⁺HLA-DR⁺CD95⁺ Т-лимфоцитов в культурах здоровых доноров, ассоциированное с числом мёртвых клеток может быть механизмом, предотвращающим чрезмерную

Таблица 6. Статистически значимые ($p<0,05$) корреляционные взаимосвязи (r) между исследуемыми показателями, выявляемыми в CD3⁺CD45RO⁺ культурах Т-лимфоцитов здоровых доноров и больных ревматоидным артритом,

Показатель	Без активации	Ас/Ехр	Ас/Ехр + 10,6 мг МП	Ас/Ехр + 21,3 мг МП	Ас/Ехр + 42,6 мг МП	Ас/Ехр + 85,3 мг МП	Ас/Ехр + 170,7 мг МП
Здоровые доноры							
Количество мёртвых клеток – содержание CD4 ⁺ CD95 ⁺ клеток		$r=0,372$		$r=0,421$	$r=0,460$	$r=0,578$	$r=0,570$
Количество мёртвых клеток – содержание CD4 ⁺ CD95 ⁺ HLA-DR ⁺ клеток		$r=0,573$			$r=0,567$	$r=0,667$	$r=0,490$
Содержание CD4 ⁺ CD95 ⁺ HLA-DR ⁺ клеток – экспрессия TNF- α		$r=0,348$					
Содержание CD4 ⁺ CD95 ⁺ HLA-DR ⁺ клеток – секреция IL-2		$r=-0,781$					
Больные РА							
Содержание CD4 ⁺ CD95 ⁺ HLA-DR ⁺ клеток – экспрессия TNF- α		$r=0,430$					
Содержание CD4 ⁺ CD95 ⁺ HLA-DR ⁺ клеток – экспрессия IL-21		$r=0,372$					
Содержание CD4 ⁺ CD95 ⁺ HLA-DR ⁺ клеток – экспрессия IL-17		$r=0,592$					
Содержание CD4 ⁺ CD95 ⁺ HLA-DR ⁺ клеток – секреция IL-17		$r=0,617$	$r=0,563$	$r=0,362$		$r=0,471$	
Содержание CD4 ⁺ CD95 ⁺ HLA-DR ⁺ клеток – секреция IL-21		$r=0,430$	$r=0,732$	$r=0,785$		$r=0,761$	
Содержание CD4 ⁺ CD95 ⁺ HLA-DR ⁺ клеток – секреция TNF- α				$r=0,341$		$r=0,298$	
IL-2 секреция – TNF- α секреция					$r=0,900$	$r=0,637$	$r=0,452$

активацию реактивированных лимфоцитов в отсутствие антигенной стимуляции. В то же время, отсутствие ассоциаций $CD4^+CD95^+$ и $CD4^+CD95^+HLA-DR^+$ лимфоцитов с количеством мертвых клеток в культурах TCR-активированных клеток, полученных у больных РА, может свидетельствовать о дефектах апоптоза этой популяции клеток, в частности, опосредованной активацией системы Fas/FasL, что находит подтверждение в литературе [23].

Как уже упоминалось ранее, аутореактивным $CD4^+CD45RO^+$ Т-лимфоцитам памяти отводят ключевую роль в патогенезе РА. Участие этих клеток в индукции и поддержании воспалительных реакций осуществляется за счёт высокой продукции ими провоспалительных медиаторов (цитокинов, факторов роста, интерферонов и др.), опосредованной усилением активности ядерного фактора NF- κ B, вследствие непрерывной стимуляции Т-клеточного рецептора $CD4$ Т-лимфоцитов [1, 24]. Играя роль мессенджеров при активации иммунной системы в результате индукции аутоиммунитета, развитием хронического воспалительного процесса и деструкцией суставов, медиаторы с провоспалительным действием (IL-17, IL-21, TNF- α , IFN- γ) опосредуют патологические изменения при РА [25]. Так, IL-17 и IFN- γ играют ключевую роль в инициации РА, приводя к появлению первичных симптомов заболевания, усиливая воспалительный ответ [26, 27], тогда как IL-21 и TNF- α играют ключевую роль в пролонгации заболевания, способствуя инфильтрации клеток в синовиальные ткани с последующим разрушением суставного хряща при РА [28].

Согласно полученным нами данным, у больных РА отмечено более высокое содержание цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-21) в супернатантах клеточных культур в интактных пробах (по сравнению с контрольной группой), за исключением секреции Т-клетками IL-2 (табл. 4). Добавление активатора способствовало достоверному повышению уровня экспрессии мРНК генов провоспалительных цитокинов (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-21), и, как следствие, увеличению их содержания в супернатантах клеточных культур, как у здоровых доноров, так и больных РА. Изменения носили односторонний характер, но имели разную степень выраженности (табл. 5).

Мы полагаем, что $CD4^+CD45RO^+CD95^+HLA-DR^+$ Т-клетки являются вероятной артритогенной субпопуляцией, продуцирующей высокие уровни провоспалительных медиаторов, принимающих участие в патогенезе РА. В подтверждение вышесказанному нами был обнаружен ряд интересных зависимостей между содержанием $CD4^+CD95^+HLA-DR^+$ клеток и показателями, отражающими продукцию провоспалительных медиаторов. Так, в Ас/Ехр-активированных пробах больных РА, число $CD4^+CD95^+HLA-DR^+$ Т-клеток позитивно коррелировало с уровнем относительной экспрессии генов TNF- α ($r=0,430$, $p<0,05$), IL-17 ($r=0,592$, $p<0,05$), IL-21 ($r=0,372$, $p<0,05$), а также с содержанием провоспалительных цитокинов в супернатантах клеточных культур: IL-17 ($r=0,617$,

$p<0,05$), IL-21 ($r=0,430$, $p<0,05$). Все эти взаимосвязи подтверждают роль $CD4^+CD95^+HLA-DR^+$ Т-клеток в продукции провоспалительных медиаторов у больных РА при TCR-активации.

У здоровых доноров зависимости были выявлены только между содержанием $CD4^+CD95^+HLA-DR^+$ Т-клеток и уровнем относительной экспрессии гена TNF- α ($r=0,348$, $p<0,05$). Кроме того, у здоровых доноров обнаружена отрицательная взаимосвязь между содержанием $CD4^+CD95^+HLA-DR^+$ Т-клеток и с уровнем IL-2 в супернатантах клеточных культур в пробах с добавлением активатора ($r=-0,781$, $p<0,05$). Вышесказанное подтверждает тезис, что уникальная роль IL-2 в регуляции иммунитета, в большей степени, связана с контролем за гиперактивацией иммунной системы или индукцией толерантности за счёт стимуляции дифференцировки Treg лимфоцитов *in vivo*, а не с выполнением функции ростового фактора лимфоцитов, где его действие дублируется другими цитокинами [29]. Доказано, что дефицит компонентов системы IL-2-CD25 (или IL-2R β) приводит к полиорганному воспалению и системному аутоиммунитету у животных и человека [30].

Более низкая (в сравнении с контрольной группой) продукция IL-2 $CD3^+CD45RO^+$ Т-клетками больных РА в ответ на TCR-стимуляцию может свидетельствовать об ослаблении у них пролиферативных иммунных реакций, что может приводить к нарушению механизмов, ответственных за формирование Т-клеточной памяти [31].

Интересные результаты были получены нами при культивировании TCR-активированных $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток с синтетическим ГК – МП. Как уже упоминалось ранее, ГК широко используются при лечении аутоиммунных заболеваний. Являясь противовоспалительными агентами, ГК оказывают комплексное воздействие на клетки иммунной системы: регулируют апоптоз, ингибируют высвобождение провоспалительных медиаторов, оказывают влияние на пролиферативную, миграторную и функциональную активность Т-лимфоцитов [32, 33].

Мы обнаружили, что на фоне TCR-активации, МП значимо не влиял на изменение числа $CD4^+CD95^+HLA-DR^+$ Т-клеток в культурах здоровых доноров по сравнению с пробами только с добавлением активатора (табл. 3). Напротив, МП (весь диапазон исследуемых концентраций) способствовал достоверному росту числа $CD4^+CD95^+HLA-DR^+$ Т-клеток в $CD3^+CD45RO^+$ культурах, полученных у больных РА, по сравнению с пробой с добавлением только активатора (табл. 3).

Полученные нами результаты указывают на относительную резистентность $CD4^+CD95^+HLA-DR^+$ Т-клеток к супрессивному действию МП как у здоровых доноров, так и больных РА. Выявленные нами взаимосвязи между содержанием мертвых клеток и числом $CD4^+CD95^+HLA-DR^+$ и $CD4^+CD95^+$ Т-лимфоцитов могут свидетельствовать как об проапоптогенном действии МП на Т-клетки, так и об супрессивных свойствах $CD4^+CD95^+HLA-DR^+$ Т-лимфоцитов, ограничивающих чрезмерную

активацию CD3⁺CD45RO⁺ лимфоцитов у здоровых доноров. Повышение числа CD4⁺CD95⁺ и CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ Т-клеток в культурах, полученных от больных РА и инкубированных в присутствии в среде активатора и МП (весь диапазон концентраций), и отсутствие ассоциаций с содержанием мёртвых клеток, может отражать процесс их непрерывной неспецифической активации и/или постоянное присутствие активированных лимфоцитов, вследствие дефектов апоптоза [23].

Интересные результаты были получены при изучении сочетанного влияния МП и активатора на уровень относительной экспрессии мРНК генов провоспалительных цитокинов (IL-2, IL-17, IL-21 и TNF- α и IFN- γ) и их секрецию CD3⁺CD45RO⁺ Т-культурами, полученными у здоровых доноров и больных РА. Сочетанное добавление активатора и МП в CD3⁺CD45RO⁺ культуры сопровождалось дозозависимым снижением уровня экспрессии мРНК генов цитокинов (IL-2 и TNF- α) и их секреции Т-клетками как здоровых доноров ($r^2=-0,456$, $r^2=-0,598$ – уровень экспрессии мРНК генов IL-2 и TNF- α ; $r^2=-0,684$, $r^2=-0,670$ – содержание IL-2 и TNF- α в супернатантах клеточных культур), так и больных РА ($r^2=-0,623$, $r^2=-0,490$ – уровень экспрессии мРНК генов IL-2 и TNF- α ; $r^2=-0,478$, $r^2=-0,530$ – содержание IL-2 и TNF- α в супернатантах клеточных культур). Этот эффект вполне укладывается в рамки геномного механизма действия МП, который приводит к блокированию транскрипционных факторов – белков AP-1 и NFAT и предотвращает их связывание с промоторной областью ДНК генов IL-2 и TNF- α , а также способствует деградации мРНК их генов [34]. Обнаруженная нами корреляционная взаимосвязь между содержанием IL-2 и TNF- α в супернатантах TCR-активированных CD3⁺CD45RO⁺ клеточных культур больных РА под влиянием МП ($r=0,900$, $r=0,637$, $r=0,452$ при действии МП в дозах 46,2; 85,3 и 170,7 мг, соответственно, во всех случаях, $p<0,05$) подтверждает единый механизм геномного действия МП.

Влияние МП на уровень экспрессии мРНК гена IFN- γ и его секрецию Т-клетками больных РА носило дозозависимый угнетающий характер (дозозависимый эффект – $r^2=-0,476$, $r^2=-0,673$, $p<0,05$). Полученные нами данные согласуются с данными литературы [35]. Интересно отметить, что при добавлении МП в культуры TCR-активированных клеток, полученных от здоровых доноров, отмечено резкое снижение секреции Т-клетками IFN- γ , тогда как уровень экспрессии мРНК гена IFN- γ значимо не изменялся (табл. 4, 5).

Согласно данным литературы, фармакологические дозы ГК снижают синтез и секрецию IFN- γ , ингибируя активность T-bet зависимого фактора STAT4 [36]. Описан также механизм ингибирования гена IFN- γ за счёт влияния ГК на комплекс транскрипционных факторов (AP-1/CREB/ATF), взаимодействующих с целевой промоторной областью исследуемого гена, известный как непрямая транскрепрессия [34]. Кроме того, не исключается участие МП в механизмах постраскрипционной модификации мРНК гена IFN- γ

(снижение стабильности мРНК гена) и в процессах трансляции этого фактора.

Интересно, что МП незначительно повышал уровень относительной экспрессии мРНК генов IL-17 и IL-21 активированными Т-клетками в обеих группах (за исключением высоких концентраций ГК – 85,3 и 170,7 мг). Влияние МП (весь диапазон концентраций) на Т-клетки здоровых доноров в отношении секреции IL-21 носило резкий (равномерный) угнетающий характер, снижая содержание IL-21 в супернатантах клеточных культур, в среднем, в 3 раза (по сравнению с действием только активатора). Тогда как на CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетки больных РА супрессивное действие оказывали только высокие дозы МП (85,3 и 170,7 мг). МП-индуцированное снижение секреции IL-17 Т-клетками в культурах контрольной группы (дозозависимый эффект: $r^2=-0,415$, $p=0,011$) и больных РА ($r^2=-0,512$, $p=0,001$) вполне согласуется с данными литературы [35]. Noack с соавт. был описан ингибиторный эффект МП в отношении продукции IL-17 *in vitro* в смешанной культуре периферических клеток крови и синовиоцитов больных РА [35].

Выявленные нами противоположные эффекты МП на уровень экспрессии мРНК и секрецию Т-клетками провоспалительных цитокинов IL-17 и IL-21 вполне согласуются с геномным действием ГК, опосредованным ранее описанным механизмом непрямого транскрепрессии, реализуемым через белок-белковые взаимодействия рецептора к ГК с транскрипционными факторами [34].

Обнаруженные нами сильные корреляционные взаимосвязи между числом CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов и уровнем IL-21 в супернатантах клеточных культур при сочетанном действии активатора и МП (все коэффициенты корреляции $r>0,700$, $p<0,05$), а также с содержанием IL-17 ($r=0,563$, $r=0,362$, $r=0,471$, $p<0,05$ при добавлении в среду активатора и МП в дозе 10,6, 21,3 и 85,3 мг, соответственно) и TNF- α ($r=0,341$, $r=0,298$, $p<0,05$ при добавлении в среду активатора и МП в дозе 21,3 и 85,3 мг, соответственно) в группе больных РА могут свидетельствовать о сохранении провоспалительного потенциала TCR-активированной популяции CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺ Т-клеток на фоне действия ГК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Индукционное МП повышение числа CD4⁺ Т-лимфоцитов с маркерами терминальной дифференцировки и созревания (CD95 и HLA-DR) у больных РА может свидетельствовать об их относительной устойчивости к супрессивному действию МП, связанной, вероятно, с дефектами их апоптотической гибели. Эффекты МП на продукцию TCR-активированными CD3⁺CD45RO⁺ клетками, полученными у здоровых доноров и больных РА, провоспалительных факторов (IFN- γ , IL-2, IL-17, IL-21 и TNF- α), в целом, носят угнетающий характер, подтверждая общий иммуносупрессорный механизм действия ГК,

реализуемый через инактивацию основных транскрипционных факторов воспалительного ответа. Выявленные нами ассоциации между содержанием CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺CD95⁺ Т-клеток с показателями, отражающими продукцию провоспалительных медиаторов у больных РА свидетельствуют о сохранении провоспалительного потенциала TCR-активированной популяции CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺ Т-клеток больных ревматоидным артритом на фоне действия ГК (табл. 6). Возможно, резистентность CD4⁺CD45RO⁺CD95⁺HLA-DR⁺ Т-клеток больных РА к супрессорному действию МП приводит к сохранению и усилению функциональных возможностей аутореактивных клеток в патогенезе РА. Мы предполагаем, что наличие CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ Т-клеток на периферии у больных РА может быть связано с активностью воспалительного процесса, а также может выступать в качестве критерия оценки эффективности лечения. Вероятно, таргетная терапия, направленная на эту субпопуляцию клеток, может потенциально способствовать снижению воспалительного ответа и агрессивности РА.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности (“дорожной карты”) и субсидии “Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/6.7” Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта

ЛИТЕРАТУРА

1. Spreafico R., Rossetti M., van Loosdregt J., Wallace C.A., Massa M., Magni-Manzoni S., Gattorno M., Martini A., Lovell D.J., Albani S. (2016) Ann. Rheum. Dis., **75**(2), 459-465.
2. Taneja V. (2015) Cytokine, **75**(2), 216-221.
3. VanderBorghet A., Geusens P., Raus J., Stinissen P. (2001) Semin. Arthritis Rheum., **31**, 160-175.
4. Starska K., Glowacka E., Kulig A., Lewy-Trenda I., Bryś M., Lewkowicz P. (2011) Folia Histochem. Cytobiol., **49**(4), 579-592.
5. Imamichi H., Lempicki R.A., Adelsberger J.W., Hasley R.B., Rosenberg A., Roby G., Rehm C.A., Nelson A., Krishnan S., Pavlick M., Woods C.J., Baseler M.W., Lane H.C. (2012) Eur. J. Immunol., **42**(10), 2608-2620.
6. Moon H., Lee S., Huh J., Chung W.S. (2007) Korean J. Lab. Med., **27**(5), 313-317.
7. Weitz M., Kiessling C., Friedrich M., Prösch S., Höuflich C., Kern F., Volk H.D., Sterry W., Asadulh K., Döcke W.D. (2011) Exp. Dermatol., **20**(7), 561-567.
8. Nada A.M., Hammouda M. (2014) Indian J. Endocrinol. Metab., **18**(4), 574-581.
9. Сохоневич Н.А. (2015) Роль цитокинов, имеющих общую γ-цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15), в регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов. Автореф. дисс. канд. наук. Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 23 с.
10. Ayroldi E., Macchiarulo A., Riccardi C. (2014) FASEB J., **28**(12), 5055-5070.
11. Cheng Q., Morand E., Yang Y.H. (2014) Front. Pharmacol., **17**(5), 1-10.
12. Справочник Видаль. Лекарственные препараты России. 20-е изд. ЮБМ Медика Рус, 2014, 1600 с.
13. Arruvito L., Payaslian F., Baz P., Podhorzer A., Billordo A., Pandolfi J., Semeniuk G., Arribalzaga E., Fainboim L. (2014) J. Immunol., **193**, 4469-4476.
14. Gajate C., Mollinedo F. (2015) J. Leukoc. Biol., **98**(5), 739-759.
15. Aldahlawi A.M., Elshal M.F., Ashgan F.T., Bahlas S. (2015) Saudi J. Biol. Sci., **22**(4), 453-458.
16. Lorenz H.M., Herrmann M., Winkler T., Gaipl U., Kalden J.R. (2000) Apoptosis, **5**, 443-449.
17. Bertho N., Drénou B., Laupeze B., Berre C.L., Amiot L., Grosset J.M., Fardel O., Charron D., Mooney N., Fauchet R. (2000) J. Immunol., **164**(5), 2379-2385.
18. Abdulahad W.H., van der Geld Y.M., Stegeman C.A., Kallenberg C.G. (2006) Kidney Int., **70**(5), 938-947.
19. Du-Thanh A., Serre-Cousiné A., Portalus P., Girard C., Guillot B., Dereure O. (2017) Acta Derm. Venereol., DOI:10.2340/00015555-2632.
20. Agrati C., Castilletti C., Casetti R., Sacchi A., Falasca L., Turchi F., Tumino N., Bordini V., Cimini E., Viola D. et al. (2016) Cell Death Dis., **7**, e2164, 1-8.
21. Matsuki F., Saegusa J., Nishimura K., Miura Y., Kurosaka M., Kumagai S., Morinobu A. (2014) Cell Immunol., **290**(1), 96-101.
22. Krueger A., Fas S.C., Baumann S., Krammer P.H. (2003) Immunol. Rev., **193**, 58-69.
23. Mancebo E., Castro M.J., Allende L.M., Talayero P., Brunet M., Millán O., Guirado L., López-Hoyos M., San Segundo D., Rodrigo E., Muñoz P., Boix Giner F., Llorente Vicas S., Muro-Amador M., Paz-Artal E. (2016) Transpl. Immunol., **34**, 33-41.
24. Pandya J.M., Lundell A.C., Hallström M., Andersson K., Nordström I., Rudin A. (2016) J. Leukoc. Biol., **100**(4), 823-833.
25. Симбирцев А.С. (2013) Мед. академ. журнал, **13**(3), 18-42.
26. Mathew A.J., Ravindran V. (2015) Best Pract. Res. Cl. Rh., **28**(6), 1-25.
27. Kerr J.R. (2016) J. Clin. Pathol., **69**(4), 279-291.
28. Gharibi T., Majidi J., Kazemi T., Dehghanzadeh R., Motalebnezhad M., Babaloo Z. (2016) Immunobiology, **221**(2), 357-367.
29. Malek T.R., Bayer A.L. (2004) Nat. Rev. Immunol., **4**(9), 665-674.
30. Cénit M.C., Márquez A., Cordero-Coma M., Fonollosa A., Adán A., Martínez-Berriotxo A., Llorenç V., Díaz Valle D., Blanco R., Cañal J. et al. (2013) BMC Med. Genet., **15**, 14-52.
31. Gomez J., Gonzalez A., Martinez A., Rebollo A. (1988) Crit. Rev. Immunol., **18**, 185-220.
32. Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Селедцов В.И., Литвинова Л.С. (2013) Бюл. эксп. биол. мед., **4**, 468-470.
33. Шуплецова В.В. (2015) Стероидная регуляция функциональной активности Т-клеток разной степени дифференцировки. Автореф. дисс. канд. наук. Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 23 с.
34. Liberman A.C., Druker J., Perone M.J., Arzt E. (2007) Cytokine Growth Factor Rev., **18**(1-2), 45-56.
35. Noack M., Ndongo-Thiam N., Miossec P. (2016) Front. Immunol., **7**, 509.
36. Ratman D., Vanden Berghe W., Dejager L., Libert C., Tavernier J., Beck I.M., De Bosscher K. (2013) Mol. Cell. Endocrinol., **380**(1-2), 41-54.

Поступила: 23. 03. 2017.
Принята к печати: 25. 05. 2017.

THE INFLUENCE OF METHYLPREDNISOLONE ON THE ABILITY OF CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ T-CELLS TO PRODUCE PROINFLAMMATORY MEDIATORS IN CULTURES OF TCR-ACTIVATED CD3⁺CD45RO⁺ T-LYMPHOCYTES FROM PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

N.M. Todosenko¹, O.G. Khaziakhmatova¹, K.A. Yurova¹, I.P. Malinina², L.S. Litvinova¹

¹Immanuel Kant Baltic Federal University,
3 Botkina str., Kaliningrad, 236019 Russia; e-mail: larisalitvinova@yandex.ru

²Department of Rheumatology Regional Clinical Hospital, Kaliningrad, Russia

The effect of different concentrations of the glucocorticoid (GC) methylprednisolone (MP) on CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ T-cells and their ability to produce proinflammatory mediators in cultures of TCR-stimulated CD3⁺CD45RO⁺ T-lymphocytes in the in vitro system was investigated. T cells were obtained from healthy donors and patients with rheumatoid arthritis (RA). Under conditions of TCR-activation, MP increased the number of CD4⁺HLA-DR⁺CD95⁺ cells in CD3⁺CD45RO⁺ cultures obtained from RA patients and did not change their content in the control group. In general, MP decreased production of proinflammatory factors (IFN- γ , IL-2, IL-17, IL-21 and TNF- α) by TCR-activated CD3⁺CD45RO⁺ cells from healthy donors and RA, consistent with the overall immunosuppressive mechanism of GC action. The correlation between CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺CD95⁺ T-cell contents and parameters reflecting production of proinflammatory mediators (IL-17, IL-21 and TNF- α) in RA patients indicates maintenance of the pro-inflammatory potential of this T-cell population exposed to GC action. We suggest that relative resistance of CD4⁺CD45RO⁺CD95⁺HLA-DR⁺ T-cells of RA patients to the suppressor effect of GC leads to maintenance and even enhancement in the functional capacities of autoreactive cells in the pathogenesis of RA.

Key words: memory T cell, rheumatoid arthritis, glucocorticoid hormones, CD95, HLA-DR