

ВЛИЯНИЕ IN VITRO МЕТИЛПРЕДНИЗОЛОНА НА ПРОЦЕССЫ АКТИВАЦИИ Т-КЛЕТОК CD4⁺CD45RO⁺ В НОРМЕ И ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

© Н. М. Тодосенко,¹ О. Г. Хазиахматова,¹ К. А. Юрова,¹
И. П. Малинина,² Л. С. Литвинова^{1,*}

¹Лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта, Калининград, 236016, и

²Отделение ревматологии областной клинической больницы, Калининград, 236019;

* электронный адрес: larisalitvinova@yandex.ru

Методом проточной цитометрии проанализировано изменение числа CD4⁺-клеток, экспрессирующих поверхностные молекулы активации (CD25, CD71, HLA-DR и CD95), в культурах TCR-стимулированных Т-лимфоцитов CD3⁺CD45RO⁺ под действием метилпреднизолон (МП) в разных концентрациях в системе *in vitro*. Т-клетки получали от здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (РА). Выявлено супрессорное влияние МП на экспрессию маркеров активации (CD25) и пролиферации (CD71) Т-клетками CD4⁺ у всех обследованных лиц. На фоне TCR-активации МП повышал число клеток CD4⁺ HLA-DR⁺/CD95⁺ в клетках CD3⁺CD45RO⁺, полученных от больных РА, и напротив, способствовал их снижению у контрольной группы. Выявленные изменения, индуцированные МП на фоне TCR-активации, могут свидетельствовать об относительной резистентности популяции клеток CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺/CD95⁺ больных РА к действию глюкокортикоидов и возможном участии этой субпопуляции в патогенезе РА.

Ключевые слова: Т-клетки памяти, HLA-DR, маркеры активации, пролиферации, метилпреднизолон, ревматоидный артрит.

Принятые сокращения: АИЗ — аутоиммунное заболевание, ГК — глюкокортикоид, МП — метилпреднизолон, РА — ревматоидный артрит, CD — кластер дифференцировки.

Ревматоидный артрит (РА) — хроническое, системное аутоиммунное заболевание (АИЗ), характеризующееся синовиальным воспалением и прогрессирующим разрушением суставных хрящей и костной ткани (Baschant, et al., 2011; Pandya et al., 2016). Аутореактивные Т-клетки CD4⁺CD45RO⁺, как полагают, играют решающую роль в патогенезе РА вследствие стимулирующего влияния на пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов, а также участия в индукции и распространении воспалительных реакций через секрецию провоспалительных медиаторов (цитокинов, факторов роста, интерферонов и др.) (Perng et al., 2014; Pandya et al., 2016).

Глюкокортикоидная терапия, направленная на подавление чрезмерной воспалительной реакции, является одним из наиболее действенных фармакотерапевтических вариантов лечения АИЗ. Однако использование глюкокортикоидов (ГК), особенно в течение длительного времени, чревато развитием серьезных побочных реакций (нарушением метаболизма, снижением резистентности к латентным инфекциям, подавлением активности системы гипоталамус—гипофиз—надпочечники и др.) (Baschant et al., 2011). Несмотря на широкое применение ГК, данные мировой литературы, освещающие влияние конкретного препарата на функциональное состояние аутореактивных Т-клеток иммунной памяти у больных РА, весьма ограничены.

В течение последних лет все большую популярность в биологии и экспериментальной медицине приобретают методы исследования *in vitro*, позволяющие оценить процессы жизнедеятельности клеток при воздействии разнообразных физических и химических факторов. Известно, что в результате активационного процесса на поверхности лимфоцитов последовательно экспрессируются молекулы активации, костимуляции, пролиферации и апоптоза (Shipkova, Wieland, 2012; Литвинова и др., 2014). Становится очевидным, что определение поверхностных биомаркеров, принимающих участие в процессах клеточного гомеостаза лимфоцитов, позволит оценить их функциональную активность в норме и при формировании патологического процесса.

Цель настоящего исследования заключалась в оценке влияния синтетического ГК — метилпреднизолон (МП) — на функциональное состояние Т-лимфоцитов CD4⁺CD45RO⁺ (в эксперименте *in vitro*), ассоциированное с изменением репертуара поверхностных молекул, отражающих процессы активации, в норме и при РА.

Материал и методика

Материалом для исследования служили мононуклеарные лейкоциты, выделенные из венозной гепаринизированной крови, полученной от 50 больных ревматоид-

ным артритом (РА) (38 женщин и 12 мужчин в возрасте 36.4 ± 7.2 года) и 20 условно здоровых доноров (10 женщин и 10 мужчин в возрасте 35.3 ± 8.9 лет). Клетки получали методом центрифугирования в градиенте плотности (1.077 г/см^3) фиколл-урографина (Schering, Испания; Pharmacia, Швеция) по стандартной методике. Культуры Т-клеток ($\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+$) из мононуклеарных лейкоцитов получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS(r) (MidiMACS Separator, LS Columns, MiltenyiBiotec, Германия) и моноклональных антител к CD14 и CD45RO с парамагнитными частицами (MicroBeads human, Miltenyi Biotec, Германия) согласно протоколу фирмы-изготовителя. Подсчет числа клеток в полученных культурах проводили с помощью автоматического счетчика клеток (Countess™ Automated-CellCounter, Invitrogen, США), используя краситель трипановый синий (0.4 %; Invitrogen, США). Использовали клеточные культуры, чистота которых после магнитной сепарации составляла в среднем 97.5 ± 2.12 % (фенотип $\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+\text{CD14}^-\text{CD19}^+$) (далее $\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+$ -клетки). Число живых клеток в культурах составляло не менее 98 %.

$\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+$ -клетки (10^6 кл./мл) культивировали в 48-луночном планшете в бессывороточной среде Искова (Sigma, США), содержащей 0.5 % сывороточного альбумина человека (Микроген, Россия), $5 \cdot 10^{-5}$ 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) при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO_2 в течение 48 ч.

В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human (Miltenyi Biotec, Германия) — антибиотиновые частицы MACSiBead™ с биотинилированными антителами против CD2^+ , CD3^+ и CD28^+ человека (далее Ас/Ехр). Частицы Ас/Ехр используются в качестве имитации антигенпрезентирующих клеток (АПК) для активации Т-клеточного рецептора (TCR) покоящихся Т-клеток (TCR-активатор). Реагент Ас/Ехр добавляли в среду с клетками в количестве 5 мкл, содержащую $0.5 \cdot 10^6$ антибиотиновых частиц MACSiBead™; соотношение клеток и активирующих частиц составляло 1 : 2.

Варианты культивирования: 1) в среде без добавок (контроль); 2) в среде, содержащей Ас/Ехр; 3) в среде, содержащей Ас/Ехр и МП (10.6, 46.2, 85.3 или 170.7 мг).

Регистрацию жизнеспособности и подсчет 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, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Число клеток, несущих поверхностные маркеры (CD45RO , CD3 , CD4 , CD25 , CD71 , HLA-DR и CD95), определяли методом проточной лазерной цитометрии с помощью моноклональных антител, конъюгированных с Viablu (CD45RO): аллофикоцианином (APC) (CD3) (Miltenyi Biotec, Германия); FITC (CD95), фикоэритрином (PE) (CD4) (Abcam, Cambridge, Великобритания); с конъюгатом PE с цианином (PE-Cy7) (CD25 и CD71) или с пиридинхлорофиллом (PerCP) (CD3 ; HLA-DR) (e-Bioscience, США) согласно методикам производителя. Регистрацию результатов проводили на проточном цитофлуориметре MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия). 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 (Ayroldi et al., 2014; Cheng et al., 2014).

Статистическую обработку результатов проводили 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 средневывборочные характеристики: медиану (М), первый и третий квартили (Q_1 , Q_3). Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали критерий для зависимых выборок Вилкоксона. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный (путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r)) и регрессионный (с вычислением коэффициента регрессии, r^2) анализы. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

Результаты

После культивирования (48 ч), на фоне TCR-активации реагентом Ас/Ехр, в клетках $\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+$, полученных от здоровых доноров, регистрировали увеличение общего числа клеток (в 1 мл) (табл. 1), тогда как содержание живых лимфоцитов значительно снижалось (табл. 1).

В культурах клеток от больных РА аналогичные параметры оставались неизменными (табл. 1). Следует отметить более низкое содержание живых клеток после культивирования в интактных пробах, полученных у больных РА, в сравнении с аналогичными показателями условно здоровых доноров (табл. 1). МП не оказывал значимого влияния на изменение общего числа клеток, полученных от здоровых доноров и больных РА (табл. 1). МП значительно и дозозависимо снижал содержание живых клеток и в клеточных культурах от здоровых доноров (результаты регрессионного анализа: $r^2 = -0.373$, $P = 0.001$) и в культурах от больных РА (но только в случае доз 85.3 и 170.7 мг) по сравнению с вариантом присутствия только одного активатора (табл. 1).

Добавление Ас/Ехр в среду $\text{CD3}^+\text{CD45RO}^+$ -клеток, полученных как от здоровых доноров, так и от больных РА, сопровождалось ростом числа CD4^+ -Т-клеток, экспрессирующих мембранные молекулы активации (CD25 , CD95 и HLA-DR) и пролиферации (CD71). МП в целом оказывал супрессорное влияние на изменение числа Т-лимфоцитов CD25^+ у здоровых доноров и больных РА (табл. 2). Супрессорное влияние МП на содержание Т-клеток $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ контрольной группы носило дозозависимый характер (результаты регрессионного анализа: $r^2 = -0.588$, $P = 0.001$). Аналогичным образом МП значительно снижал число клеток, экспрессирующих молекулу пролиферации CD71 в исследуемых группах (табл. 2). На фоне стимуляции Ас/Ехр добавление МП (во всем диапа-

Т а б л и ц а 1

**Количественные характеристики Т-лимфоцитов CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺,
отражающие процессы клеточного гомеостаза, при культивировании
в присутствии МП на фоне TCR-активации**

Добавки в среду культивирования	Количество Т-лимфоцитов CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺	
	от здоровых доноров	от больных РА
	Общее число клеток, 10 ⁶ /мл	
Без добавок	1.01 (0.88—1.21)	0.88 (0.85—0.91)
Ас/Ехр (активация)	1.21 (1.05—1.28) ^а	0.91 (0.80—0.96)
Ас/Ехр + МП (мг): Ас/Ехр + МП (10.6)	1.21 (1.05—1.28)	0.86 (0.76—0.91)
Ас/Ехр + МП (46.2)	1.21 (1.05—1.28)	0.88 (0.77—0.93)
Ас/Ехр + МП (85.3)	1.20 (1.04—1.27) ^б	0.91 (0.80—0.96)
Ас/Ехр + МП (170.7)	1.18 (1.02—1.25) ^б	0.91 (0.80—0.95)
	Доля живых клеток, %	
Без добавок	71.68 (64.44—79.06)	51.33 (41.39—60.08)
Ас/Ехр (активация)	60.25 (55.73—66.84) ^а	55.29 (40.29—59.06)
Ас/Ехр + МП (мг): Ас/Ехр + МП (10.6)	54.40 (51.13—59.65) ^б	60.16 (44.84—64.91)
Ас/Ехр + МП (46.2)	47.61 (44.54—52.32) ^б	54.76 (41.10—59.49)
Ас/Ехр + МП (85.3)	36.67 (34.30—40.58) ^б	42.53 (30.99—48.06) ^б
Ас/Ехр + МП (170.7)	18.31 (15.65—25.29) ^б	17.78 (12.95—18.99) ^б

Примечание. Здесь и в табл. 2: различия достоверны при $P \leq 0.05$ по сравнению с Т-клетками в среде без активационных частиц (Ас/Ехр) (^а) и с Т-клетками в среде, содержащей Ас/Ехр (^б). В качестве средней выборочной характеристики использовали медиану (Me), первый и третий квартили (Q1; Q3). Время культивирования составляло 48 ч.

Т а б л и ц а 2

**Содержание Т-лимфоцитов CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺, несущих поверхностные маркеры активации,
при культивировании в присутствии МП на фоне TCR-активации**

Маркер	Добавки в среду культивирования	Содержание клеток (%), полученных от	
		здоровых доноров	больных РА
CD25 ⁺	Без добавок	3.11 (2.99—3.14)	1.95 (1.60—2.70)
	Ас/Ехр (активация)	35.22 (30.19—36.29) ^а	25.13 (15.75—27.52) ^а
	Ас/Ехр + МП (мг): Ас/Ехр + МП (10.6)	24.29 (20.82—25.03) ^б	15.41 (9.67—16.88) ^б
	Ас/Ехр + МП (46.2)	13.55 (11.61—13.96) ^б	14.87 (9.32—16.88) ^б
	Ас/Ехр + МП (85.3)	10.71 (9.18—11.03) ^б	14.76 (9.25—16.16) ^б
	Ас/Ехр + МП (170.7)	5.04 (4.32—5.19) ^б	11.43 (7.16—12.51) ^б
CD71 ⁺	Без добавок	4.70 (4.58—5.43)	0.64 (0.35—0.85)
	Ас/Ехр (активация)	15.04 (12.45—17.38) ^а	8.04 (5.42—11.02) ^а
	Ас/Ехр + МП (мг): Ас/Ехр + МП (10.6)	3.96 (3.28—4.57) ^б	3.39 (2.29—4.65) ^б
	Ас/Ехр + МП (46.2)	3.34 (2.77—3.86) ^б	2.70 (1.82—3.69) ^б
	Ас/Ехр + МП (85.3)	2.84 (2.35—3.28) ^б	2.25 (1.52—3.09) ^б
	Ас/Ехр + МП (170.7)	2.42 (2.00—2.79) ^б	1.79 (1.21—2.46) ^б
CD95 ⁺	Без добавок	11.96 (11.19—14.01)	8.18 (7.01—9.87)
	Ас/Ехр (активация)	21.46 (20.07—25.05) ^а	28.99 (25.75—33.16) ^а
	Ас/Ехр + МП (мг): Ас/Ехр + МП (10.6)	19.76 (18.47—23.07)	38.38 (34.09—43.91) ^б
	Ас/Ехр + МП (46.2)	23.60 (22.07—27.56)	40.29 (35.80—46.09) ^б
	Ас/Ехр + МП (85.3)	24.03 (22.47—28.06)	35.08 (31.16—40.13) ^б
	Ас/Ехр + МП (170.7)	12.06 (11.28—14.07) ^б	25.89 (22.99—29.61) ^б
HLA-DR ⁺	Без добавок	4.94 (3.95—5.79)	7.52 (6.51—8.95)
	Ас/Ехр (активация)	11.36 (9.08—13.33) ^а	14.12 (12.83—15.91) ^а
	Ас/Ехр + МП (мг): Ас/Ехр + МП (10.6)	12.04 (9.62—14.13)	27.54 (25.03—31.03) ^б
	Ас/Ехр + МП (46.2)	12.50 (9.99—14.67)	24.88 (22.61—28.03) ^б
	Ас/Ехр + МП (85.3)	12.84 (10.26—14.19)	29.49 (26.81—33.22) ^б
	Ас/Ехр + МП (170.7)	4.80 (3.83—5.63) ^б	19.76 (17.96—22.27) ^б

зоне исследуемых доз) способствовало росту числа Т-клеток CD95⁺ и HLA-DR⁺ в CD4⁺CD45RO⁺-культурах, полученных от больных РА, по сравнению с клетками, к которым добавляли только Ас/Ехр. Добавки МП в дозах 10.6 и 46.2 мг не оказывали значимого влияния на аналогичные параметры в культурах от здоровых доноров, тогда как в высоких дозах (85.3—170.7 мг) он значимо снижал число CD4⁺CD95⁺/HLA-DR⁺-клеток (табл. 2).

Обсуждение

Согласно представленным данным, стимуляция введением Ас/Ехр в культуры клеток CD3⁺CD45RO⁺ от здоровых доноров и больных РА сопровождалась односторонним ростом числа Т-лимфоцитов CD4⁺, экспрессирующих фенотипические маркеры, характеризующие состояние активации клетки (ранней — CD25 и поздней — HLA-DR и CD95) и пролиферации (CD71) (табл. 2). Как уже упоминалось ранее, имитируя действие АПК, используемые нами анти-CD2/CD3/CD28-частицы стимулируют Т-клеточный рецептор (TCR) и корецепторные молекулы (CD28 и CD58) на Т-лимфоцитах, что способствует формированию иммунного синапса, активации клетки и экспрессии многих генов, способствующих пролиферации лимфоцитов, в частности генов IL-2 и его рецептора — IL-2R (CD25) (Zhang et al., 2001; Sallusto, Lanzavecchia, 2009; Spreafico et al., 2016b). Т-клетки памяти находятся в фазе G₁, что способствует их быстрому входу в IL-2-зависимую стадию иммунного ответа (Spreafico et al., 2016a). Появление на мембране Т-лимфоцита рецептора к трансферрину (CD71/TfR1) характеризует стадию пролиферации, менее зависимую от IL-2 (Marsee et al., 2010; Литвинова и др., 2014). Установлено, что экспрессия TfR1 значительно увеличивается через 48—60 ч после неспецифической стимуляции лимфоцитов митогенами (ФГА и конканавалином) и антигенами. Рецептор CD71 связывает комплекс железа с трансферрином на клеточной мембране, после чего образовавшийся комплекс поглощается клеткой путем эндоцитоза и тем самым обеспечивает входные в активированную клетку ионы железа, необходимые для дальнейшего процесса пролиферации (Li et al., 2010; Литвинова и др., 2014).

Выявленное нами повышение общего числа клеток в CD3⁺CD45RO⁺-культурах здоровых доноров при действии Ас/Ехр ассоциируется с содержанием CD4⁺-Т-клеток, экспрессирующих молекулы CD71 и CD25 ($r = 0.675$ и $r = 0.489$, $P < 0.05$ соответственно). В свою очередь, индуцированный добавлением Ас/Ехр рост числа CD4⁺-Т-клеток, несущих мембранные молекулы поздней активации и апоптоза (CD95 и HLA-DR) в клетках от здоровых и больных РА, может свидетельствовать о развитии клеточной гибели, индуцированной активацией (activation-induced cell death, AICD). Она является важным механизмом, обеспечивающим толерантность на периферии за счет устранения аутореактивных лимфоцитов (Krueger et al., 2003). Вышесказанное подтверждается отрицательными корреляциями между содержанием живых клеток и числом CD4⁺-Т-клеток, позитивных по маркерам CD95 и HLA-DR, в клетках от здоровых доноров, выявляемых при действии на клетки Ас/Ехр ($r = -0.367$ и $r = -0.452$, $P < 0.05$).

Согласно данным литературы, индуцированное действие Ас/Ехр повышение числа мертвых Т-клеток в культурах от здоровых доноров может быть связано с вы-

сокой чувствительностью Т-клеточных эффекторов к дисбалансу инициирующих сигналов, усиленных аутопродукцией IL-2 (Самуилов, 2000; Krueger et al., 2003; Bouillet, O'Reilly, 2009). Показано (Libri et al., 2011), что стимуляция Т-клеточного рецептора антителами против CD3 в условиях *in vitro* сопровождается массовой гибелью CD4⁺CD45RO⁺-эффекторов (Libri et al., 2011). Кроме того, экспрессия Т-клетками молекул CD95 и HLA-DR может свидетельствовать о вступлении клеток в фазу терминальной дифференцировки (Сохоневич, 2015).

Следует отметить меньшую чувствительность CD3⁺CD45RO⁺-клеток больных РА к пролиферативному и апоптогенному действию Ас/Ехр, что может быть связано с изменением их функциональной активности, опосредованной непрерывной стимуляцией TCR аутоантигенами *in vivo* (Tsubaki et al., 2015).

Глюкокортикоиды (ГК) характеризуются как мощные иммуносупрессивные агенты, которые оказывают комплексное воздействие на клетки иммунной системы. Их основные эффекты: индукция апоптоза, ингибирование высвобождения провоспалительных медиаторов и стимуляция продукции противовоспалительных цитокинов, снижение миграции лимфоцитов и др. (Gruver-Yates, Cidlowski, 2013; Ayroldi et al., 2014; Cheng et al., 2014).

МП во всем диапазоне исследованных доз значимо не изменял число в CD3⁺CD45RO⁺-клеток от здоровых доноров и больных РА, что вполне согласуется с антипролиферативным действием ГК (Gruver-Yates, Cidlowski, 2013; Ayroldi et al., 2014; Cheng et al., 2014). Известно, что наиболее чувствительными к воздействию ГК являются гены, обеспечивающие переход из фазы G₁ в S (Miesfeld 1990). Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что под влиянием ГК повышается экспрессия кальмодулина, снижается продукция IL-2, увеличивается концентрация внутриклеточного цАМФ и резко возрастает уровень образования активных форм кислорода (Гуцол и др., 2013).

МП также дозозависимо и значимо снижал содержание живых клеток в культурах и от здоровых доноров ($r^2 = -0.373$, $P = 0.001$) и от больных РА (только в дозах 85.3 и 170.7 мг) по сравнению с действием одного активатора (табл. 1). Полученные нами результаты согласуются с данными научной периодики. ГК индуцируют апоптоз в Т-лимфоцитах, способствуя, таким образом, прекращению воспалительного ответа (Cheng et al., 2014). Интересно, что наиболее чувствительными к ГК-индуцированной клеточной гибели являются наивные Т-клетки и зрелые Th1-лимфоциты, тогда как наиболее устойчивыми являются Т-клетки Th2 и Th17 (Gruver-Yates, Cidlowski, 2013).

Выявленное нами супрессорное влияние МП на экспрессию молекул активации (CD25) и пролиферации (CD71) CD4⁺CD45RO⁺-Т-клетками, полученными от здоровых доноров и больных РА, вполне укладывается в эффекты, вызываемые МП. Прямая связь между ингибирующим влиянием МП на продукцию IL-2 и зависимым от IL-2 снижением маркеров CD25 и CD71 на активированных CD4⁺-лимфоцитах подтверждена многими исследованиями (Braitch et al., 2009; Baschant, Tuckermann, 2010; Shipkova, Wieland, 2012; Гуцол и др., 2013). Реакция TCR-активированных CD4⁺CD45RO⁺-Т-клеток больных РА на действие МП была сопоставима с аналогичными параметрами контроля.

Согласно данным литературы, конститутивная экспрессия молекулы CD95 на эффекторных лимфоцитах и

Т-клетках памяти является не только признаком, определяющим готовность к запуску активационного апоптоза, но и маркером их созревания и дифференцировки (Хайдуков и др., 2003). Выявлена способность ГК опосредованно снижать экспрессию молекулы CD95 через взаимодействие лигированного ядерного рецептора ГК с промоторной областью CD95L, содержащей негативные ГР-элементы ответа (nGRE) (Baumann et al., 2005). Полученные нами данные относительно ингибирующего влияния МР (в дозе 170.7 мг) на экспрессию молекулы CD95 клетками CD4⁺ здоровых доноров, вполне укладываются в геномный механизм действия ГК (табл. 2). Напротив, добавление МР (во всем спектре доз) в TCR-активированные CD3⁺CD45RO⁺-клетки, полученные от больных РА, сопровождалось ростом числа CD4⁺CD95⁺-клеток (табл. 2). Исследование функциональной активности Т-лимфоцитов при протеогликан-индуцированном артрите (ПГИА) у животных (Zhang et al., 2001), позволило констатировать наличие дефекта в механизмах клеточной гибели CD4⁺-лимфоцитов, опосредованной активацией системы Fas/FasL. По мнению авторов, этот механизм лежит в основе генерации аутореактивных периферических CD4⁺-Th1-лимфоцитов (Zhang et al., 2001). Этот тезис подтверждается отсутствием обратных корреляций между числом CD95⁺-Т-клеток и числом живых лимфоцитов в культурах, полученных от больных РА, подвергшихся действию Ас/Ехр, а также сочетанному влиянию Ас/Ехр и МР. Клетки, полученные от здоровых доноров, напротив, демонстрировали реципрокные отношения между содержанием живых клеток и числом CD4⁺CD95⁺-лимфоцитов, выявляемые при действии на клетки Ас/Ехр ($r = -0.367$, $P < 0.05$) и сочетанном добавлении Ас/Ехр и МР в дозе 85.3 и 170.7 мг ($r = -0.423$ и $r = -0.392$, $P < 0.05$ соответственно).

HLA-DR является маркером не только поздней, но и длительной активации Т-клеток (Bertho et al., 2000; Хаитов, 2009; Imamichi et al., 2012). В развитии РА ключевую роль отводят аутореактивным синовиальноподобным CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺-Т-лимфоцитам, рециркулирующим через воспаленную синовиальную оболочку (Spreafico et al., 2016a, 2016b). Отличительной особенностью этих клеток является способность продуцировать высокие уровни провоспалительных медиаторов, таких как IFN- γ , IL-17 и TNF- α (Spreafico et al., 2016a). Прямая связь между HLA-DR-чувствительным гаплотипом и развитием РА подтверждает роль CD4⁺ в патогенезе АИЗ (Wang et al., 2017).

Согласно полученным результатам, добавление МП в культуральную среду TCR-активированных Т-клеток способствовало увеличению (в сравнении с контролем) числа CD4⁺-лимфоцитов с фенотипом HLA-DR⁺ только у больных РА (табл. 2). Учитывая однонаправленные изменения экспрессии молекул HLA-DR и CD95 (повышение), индуцируемые МП, на CD4⁺-Т-клетках больных РА, логично предположить существование единой популяции CD4⁺ Т-лимфоцитов с фенотипом HLA-DR⁺CD95⁺, что также подтверждается выявленными корреляциями между содержанием HLA-DR- и CD95-позитивных CD4⁺CD45RO⁺ Т-клеток ($r = 0.36$ при действии активатора Ас/Ехр; $r = 0.45$, 0.32 и 0.29 при сочетанном действии Ас/Ехр и МР в дозах 46.2, 85.3 и 170.7 мг соответственно). Экспрессия молекул HLA-DR и CD95 эффекторными (CD3⁺CD4⁺/CD8⁺CD62L⁻) популяциями является фенотипическим признаком терминальной фазы дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов (Сохоневич, 2015).

В то же время однонаправленное снижение числа HLA-DR⁺/CD95⁺-Т-лимфоцитов в активированных действием Ас/Ехр CD4⁺CD45RO⁺-культурах от здоровых доноров, индуцированное МП (170.7 мг), может быть результатом их гибели, вследствие низких уровней экспрессии Bcl-2 (Di Mitri et al., 2011; Imamichi et al., 2012). Согласно данным из литературы (Bertho et al., 2000), экспрессия HLA-DR является одним из механизмов реализации апоптотической (независимой от каспаз) гибели активированных Т-лимфоцитов, утративших способность к экспрессии Fas-антигена (Bertho et al., 2000). В подтверждение этого нами были выявлены обратные корреляции содержания живых клеток и числа Т-лимфоцитов HLA-DR⁺ в культурах, среда которых содержала Ас/Ехр вместе с 170.7 мг МП ($r = -0.453$, $P < 0.05$) в пробах от здоровых доноров.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что МП, подавляя активацию и пролиферацию CD4⁺CD45RO⁺ Т-клеток при РА, ограничивает их избыточный рост на периферии. В то же время индуцированное МП повышение числа 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 с дефектами апоптоза, способствуя тем самым созданию необходимых предпосылок для реализации агрессивного функционального потенциала аутореактивных клеток в патогенезе РА.

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности («дорожной карты») и при финансовой поддержке программы «Организация проведения научных исследований» (20.4986.2017/БУ) Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Список литературы

- Гуцол А. А., Сохоневич Н. А., Селедцов В. И., Литвинова Л. С. 2013. Влияние дексаметазона на активацию и пролиферацию Т-клеток иммунной памяти. Бюл. эксперим. биол. и мед. 155 (4): 468—470. (Gutsol A. A., Sokhonevich N. A., Seledtsov V. I., Litvinova L. S. 2013. Dexamethasone effects on activation and proliferation of immune memory T cells. Bull. Exp. Biol. Med. 155 (4): 468—470.)
- Кремер Н. Ш. 2004. Теория вероятностей и математическая статистика. М.: ЮНИТИ-ДАНА. 573 с. (Kremer N. S. 2004. Theory of probability and mathematical statistics. Moscow: UNITY-DANA. 573 p.)
- Литвинова Л. С., Гуцол А. А., Сохоневич Н. А., Кофанова К. А., Хазиахматова О. Г., Шуплецова В. В., Кайгородова Е. В., Гончаров А. Г. 2014. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов. Мед. иммунол. 16 (1): 7—26. (Litvinova L. S., Gutsol A. A., Sokhonevich N. A., Kofanova K. A., Khaziakhmatova O. G., Shupletsova V. V., Kaigorodova E. V., Goncharov A. G. 2014. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. Med. Immunol. 16 (1): 7—26.)
- Самуилов В. Д., Олескин А. В., Лагунова Е. М. 2000. Программируемая клеточная смерть. Биохимия. 65 (8): 1029—1046. (Samuilov V. D., Oleskin A. V., Lagunova E. M. 2000. Programmed cell death. Biochemistry (Moscow). 65 (8): 1029—1046.)
- Сохоневич Н. А. 2015. Роль цитокинов, имеющих общую ү-цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15), в регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов: Автореф. канд. дис. Томск. 24 с. (Sokhonevich N. A. 2015. Effects of immunoregulatory cytokines (IL-2, IL-7, IL-15) on functional activity T-cell. PhD Thesis. Tomsk. 24 p.)

- Хаитов Р. М. 2009. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа. 320 с. (Khaïtov R. M. 2009. Immunology. Moscow: GEOTAR-Media. 320 p.)
- Хайдуков С. В., Холоденко И. В., Литвинов И. С. 2003. Ионмицин-резистентная субпопуляция CD4⁺ Т-лимфоцитов периферической крови человека. Функциональная характеристика. Биол. мембраны: журн. мембранной и клеточной биол. 20 (4): 333—340. (Khaidukov S. V., Kholodenko I. V., Litvinov I. S. 2003. The ionomycin-resistant subset of CD4⁺ T cells within human peripheral blood. A functional features. Biochemistry (Moscow). Supplement. Ser. A: Membrane Cell Biol. 20 (4): 333—340.)
- Ayrolldi E., Macchiarulo A., Riccardi C. 2014. Targeting glucocorticoid side effects: selective glucocorticoid receptor modulator or glucocorticoid-induced leucine zipper? A perspective. FA-SEB J. 28 (12): 5055—5070.
- Baschant U., Frappart L., Rauchhaus U., Bruns L., Reichardt H. M., Kamradt T., Bräuer R., Tuckerman J. P. 2011. Glucocorticoid therapy of antigen-induced arthritis depends on the dimerized glucocorticoid receptor in T cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 108: 19 317—19 322.
- Baschant U., Tuckermann J. 2010. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 120: 69—75.
- Baumann S., Dostert A., Novac N., Bauer A., Schmid W., Fas S. C., Krueger A., Heinzl T., Kirchhoff S., Schutz G., Krammer P. H. 2005. Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer. Blood. 106: 617—625.
- Bertho N., Drénou B., Laupeze B., Berre C. L., Amiot L., Grosset J. M., Fardel O., Charron D., Mooney N., Fauchet R. 2000. HLA-DR-mediated apoptosis susceptibility discriminates differentiation stages of dendritic/monocytic APC. J. Immunol. 164: 2379—2385.
- Bouillet P., O'Reilly L. A. 2009. CD95, BIM and T cell homeostasis. Nat. Rev. Immunol. 9 (7): 514—519.
- Braitch M., Harikrishnan S., Robins R. A., Nichols C., Fahey A. J., Showe L., Constantinescu C. S. 2009. Glucocorticoids increase CD4⁺CD25⁺ cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis. Acta Neurol. Scand. 119: 239—245.
- Cheng Q., Morand E., Yang Y. H. 2014. Development of novel treatment strategies for inflammatory diseases-similarities and divergence between glucocorticoids and GILZ. Front Pharmacol. 5: 169.
- Di Mitri D., Azevedo R. I., Henson S. M., Libri V., Riddell N. E., Macaulay R., Kipling D., Soares M. V., Battistini L., Akbar A. N. 2011. Reversible senescence in human CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺-memory T cells. J. Immunol. 187: 2093—2100.
- Gruver-Yates A. L., Cidowski J. A. 2013. Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword. Cells. 2 (2): 202—223.
- 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. The CD8⁺HLA-DR⁺ T cells expanded in HIV-1 infection are qualitatively identical to those from healthy controls. Eur. J. Immunol. 42: 2608—2620.
- Krueger A., Fas S. C., Baumann S., Krammer P. H. 2003. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. Immunol Rev. 193: 58—69.
- Li L., Fang C. J., Ryan J. C., Niemi E. C., Lebron J. A., Bjorkman P. J., Arase H., Torti F. M., Torti S. V., Nakamura M. C., Seaman W. E. 2010. Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 107 (8): 3505—3510.
- Libri V., Azevedo R. I., Jackson S. E., Di Mitri D., Lachmann R., Fuhrmann S., Vukmanovic-Stejić M., Yong K., Battistini L., Kern F., Soares M. V., Akbar A. N. 2011. Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cells: the potential involvement of interleukin-7 in this process. Immunology. 132 (3): 326—339.
- Marsee D. K., Pinkus G. S., Yu H. 2010. CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. Amer. J. Clin. Pathol. 134: 429—435.
- Miesfeld R. L. 1990. Molecular genetics of corticosteroid action. Amer. Rev. Respir. Dis. 141 (2): 511—517.
- Pandya J. M., Lundell A. C., Hallström M., Andersson K., Nordström I., Rudin A. 2016. Circulating T helper and T regulatory subsets in untreated early rheumatoid arthritis and healthy control subjects. J. Leukoc. Biol. 100: 823—833.
- Perng O. A., Aitken M., Rankin A. L., Garcia V., Kropf E., Erikson J., Garlick D. S., Caton A. J. 2014. The degree of CD4⁺ T cell autoreactivity determines cellular pathways underlying inflammatory arthritis. J. Immunol. 192: 3043—3056.
- Sallusto F., Lanzavecchia A. 2009. Heterogeneity of CD4⁺ memory T cells: functional modules for tailored immunity. Eur. J. Immunol. 39: 2076—2082.
- Shipkova M., Wieland E. 2012. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. Clin. Chim. Acta. 413: 1338—1349.
- Spreafico R., Rossetti M., van Loosdregt J., Wallace C. A., Massa M., Magni-Manzoni S., Gattorno M., Martini A., Lovell D. J., Albani S. 2016a. A circulating reservoir of pathogenic-like CD4⁺ T cells shares a genetic and phenotypic signature with the inflamed synovial micro-environment. Ann. Rheum. Dis. 75: 459—465.
- Spreafico R., Rossetti M., Whitaker J. W., Wang W., Lovell D. J., Albani S. 2016b. Epipolymorphisms associated with the clinical outcome of autoimmune arthritis affect CD4⁺ T cell activation pathways. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 113: 13 845—13 850.
- Tsubaki M., Takeda T., Kino T., Itoh T., Imano M., Tanabe G., Muraoka O., Satou T., Nishida S. 2015. Mangiferin suppresses CIA by suppressing the expression of TNF- α , IL-6, IL-1 β , and RANKL through inhibiting the activation of NF- κ B and ERK1/2. Amer. J. Transl. Res. 7 (8): 1371—1381.
- Wang Q., Drouin E. E., Yao C., Zhang J., Huang Y., Leon D. R., Steere A. C., Costello C. E. 2017. Immunogenic HLA-DR-Presented Self-peptides identified directly from clinical samples of synovial tissue, synovial fluid, or peripheral blood in patients with rheumatoid arthritis or Lyme arthritis. J. Proteome Res. 16: 122—136.
- Zhang J., Bárdos T., Mikecz K., Finnegan A., Glant T. T. 2001. Impaired Fas signaling pathway is involved in defective T cell apoptosis in autoimmune murine arthritis. J. Immunol. 166: 4981—4986.

INFLUENCE OF METHYLPREDNISOLONE *IN VITRO* DURING ACTIVATION OF CD4⁺CD45RO⁺ T-CELLS IN NORM AND CHRONIC RHEUMATOID ARTHRITIS

N. M. Todosenko,¹ O. G. Khaziakhmatova,¹ K. A. Yurova,¹
I. P. Malinina,² L. S. Litvinova^{1, *}

¹ Laboratory for Immunology and Cell Biotechnologies of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236016, and

² Department of Rheumatology Regional Clinical Hospital, Kaliningrad, 236019;
*e-mail: larisalitinova@yandex.ru

Change of CD4⁺ cells expressing the surface molecule activation (CD25, CD71, HLA-DR и CD95) in cultures TCR-stimulated CD3⁺CD45RO⁺ T cells under the effect of different concentrations of methylprednisolone (MP) in the *in vitro* system was analyzed by flow cytometry. T cells were obtained from healthy donors and patients with rheumatoid arthritis (RA). Suppressive effect of methylprednisolone on the expression of activation (CD25) and proliferation (CD71) markers of T cells in all examined persons has been identified. Methylprednisolone increased number of CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺/CD95⁺ cells of patients with rheumatoid arthritis and, in contrast, has contributed to their reduction in the control group. The revealed changes induced by methylprednisolone on the background of the TCR-activation, may be indicative of the relative resistance of populations CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺/CD95⁺ cells of patients with rheumatoid arthritis to glucocorticoid action and possible involvement of this subpopulation in pathogenesis rheumatoid arthritis.

Key words: rheumatoid arthritis, methylprednisolone, memory T cells, HLA-DR, markers of activation, proliferation.