

А.А. Альшевская, Ф.Ф. Васильев, Ю.А. Лопатникова, С.В. Сенников

МЕМБРАНОСВЯЗАННЫЕ И РАСТВОРИМЫЕ РЕЦЕПТОРЫ К ФАКТОРУ НЕКРОЗА ОПУХОЛИ- α В НОРМЕ И ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

TNF α – многофункциональный плейотропный цитокин, которому придается особое значение в иммунопатогенезе ревматоидного артрита. При этом от уровня растворимых и экспрессии мембраносвязанных форм его рецепторов может в значительной степени зависеть эффективность действия иммуномодулирующего цитокина и его роль в развитии патологических состояний организма. По результатам исследования показан ряд достоверных отличий не только в проценте клеток, несущих рецепторы к TNF α , но и в абсолютном количестве экспрессируемых рецепторов на клетках различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток в норме и при ревматоидном артрите, установлены корреляционные взаимосвязи этих показателей с сывороточными уровнями самого цитокина и его растворимых рецепторов. Обсуждаются механизмы и роль изменений в экспрессии рецепторов к TNF α на отдельных субпопуляциях лейкоцитов при иммунопатологическом состоянии и в сравнении с условно-здоровыми донорами.

Ключевые слова: TNF α , мембраносвязанные рецепторы, ревматоидный артрит

TUMOR NECROSIS FACTOR- α MEMBRANE-BOUND AND SOLUBLE RECEPTORS IN NORM AND IN RHEUMATOID ARTHRITIS

A.A. Alshevskaya, F.F. Vasiliev, J.A. Lopatnikova, S.V. Sennikov

Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

TNF α – a multifunctional pleiotropic cytokine, considered to have a special significance in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. Herewith the effectiveness of immunomodulatory cytokine and its role in the development of pathological states of the organism may depend largely on the content of soluble receptors and expression of membrane-bound receptors. The study shows several significant differences not only in the percentage of cells with TNF α receptors, but also in the absolute number of receptors expressed on cells from different subsets of immunocompetent cells in health and in rheumatoid arthritis, establishes correlation relationships of these parameters with serum contents of the cytokine and its soluble receptors. The mechanisms and the role of changes in the expression of TNF α receptors in different subsets of leukocytes in immunopathological state and in compare with healthy donors are discussed.

Key words: TNF α , membrane-bound receptors, rheumatoid arthritis

Система цитокинов представляет собой универсальную полиморфную регуляторную сеть медиаторов, предназначенных для контроля процессов пролиферации, дифференцировки и функциональной активности клеточных элементов в иммунной и других гомеостатических системах организма. Фактор некроза опухоли- α (TNF α) – провоспалительный цитокин, обладающий широким спектром биологической активности, оказывает влияние на различные типы клеток, и, соответственно, необходим в защите организма против бактериальных, грибковых, паразитарных и вирусных инфекций [4].

В силу его важности в развитии иммунологических реакций биологическая активность этого медиатора имеет достаточно сложную регуляцию, включающую в себя два типа мембраносвязанных рецептора, регулирующих различные функции в клетке, и растворимые рецепторы I и II типа, которые ограничивают системные эффекты этого медиатора при выходе цитокина в системную циркуляцию при патологическом процессе. С активацией различных сигнальных путей связано участие TNF α в процессах клеточной пролиферации и дифференцировки, выживания клеток, генерации тканей и тканевого микроокружения.

Рецепторы I типа экспрессируются почти всеми типами клеток и опосредуют главным образом воспалительные и цитотоксические эффекты TNF α . Рецепторы II типа экспрессируются преимущественно клетками крови, лимфоидными и эпителиальными клетками и участвуют в реализации пролиферативных процессов. Считают, что TNFR1 обеспечивает большинство биологических активностей TNF α , он активирует ядерный фактор транскрипции NF- κ B и c-jun N-терминальную киназу; нокаут по гену TNFR1 приводит к выраженному иммунодефициту [12]. Известно, что рецептор I типа, связывая TNF α и передавая сигнал для активации генов TNF α через MAP-киназы (JNK/p38), принимает участие в аутокринной регуляции продукции TNF α . Прямое проведение сигнала через TNFR2 ограничено, по-видимому, только клетками иммунной системы, но были высказаны предположения, что рецептор II типа может приводить к активации рецептора I типа с последующей передачей сигнала в клетку. Известно также участие TNFR2 в восстановлении тканей и ангиогенезе.

Растворимые рецепторы являются мощными регуляторами активности цитокина. С одной стороны, они (особенно sTNFR1) могут нейтрализовать TNF α в системной циркуляции и ингибировать его биоло-

гическую активность, блокируя антипролиферативные эффекты цитокина и конкурируя с рецепторами TNF α на поверхности клеток, а также усиливать его паракринные эффекты [1]. С другой стороны, комплексы рецепторов с TNF α можно рассматривать в качестве своеобразного пула связанного рецептора, из которого он постепенно высвобождается [11].

Иммунорегуляторный цитокин TNF α имеет большое значение в патогенезе многих заболеваний, в том числе имеющих иммунологическую основу. Одним из таких заболеваний является и ревматоидный артрит [9]. Ревматоидный артрит (РА) – хроническое системное аутоиммунное заболевание соединительной ткани, сопровождающееся преимущественным поражением периферических суставов с развитием в них эрозивно-деструктивных изменений и анкилозирования [6].

Этиология РА остается не до конца изученной, однако показано, что в его патогенезе принимают активное участие иммунные реакции, преимущественно регулируемые Т-хелперами I типа, и генетически детерминированные аутоиммунные процессы, возникновению которых способствует дефицит Т-супрессорной функции лимфоцитов [2]. Инициальные воспалительные изменения происходят в синовиальной оболочке суставов, куда «рекрутируются» иммунокомпетентные клетки, продуцирующие провоспалительные цитокины, а также антитела к компонентам синовию. При этом активация и агрессивная пролиферация синовиальных клеток, а также суставных макрофагов модулируется различными колониестимулирующими факторами (GM-CSF, G-CSF), цитокинами, продуктами метаболизма арахидоновой кислоты и другими медиаторными субстанциями [5, 6]. В частности, антиген-специфическая активация CD4 + Т-лимфоцитов по Th-1 типу, характерная для ревматоидного артрита, приводит к гиперпродукции интерлейкина IL-2, интерферона- γ , IL-17, а также к дисбалансу между провоспалительными (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 и др.) и противовоспалительными цитокинами (IL-4, IL-10, растворимый антагонист IL-16 и др.) с преобладанием продукции первых над вторыми [5] на системном уровне, что отражается в изменении показателей периферической крови.

Фактору некроза опухоли- α придается особое значение в иммунопатогенезе ревматоидного артрита. Считается, что в дебюте заболевания превалирует синтез именно этого цитокина, который обладает способностью запускать целый каскад иммунопатологических реакций (в том числе, стимулировать продукцию других провоспалительных субстанций) [10, 13], а неконтролируемый синтез TNF α лежит в основе хронизации патологического процесса и прогрессирующих костных деструктивных изменений. В частности, TNF α принимает участие в развитии клинических признаков воспаления (боль, лихорадка, снижение массы тела и др.), индуцирует экспрессию молекул адгезии, стимулирует неоангиогенез, пролиферацию фибробластов, играющих важную роль в формировании ревматоидного паннуса, и т.д. [2].

Исследование экспрессии рецепторов к иммунорегуляторному цитокину TNF α на иммунокомпетентных клетках и выявление корреляций с уровнями растворимых рецепторов и самого медиатора представляется необходимым для понимания роли TNF α в регуляции иммунных реакций в норме и при патологических состояниях. При этом необходимо оценивать не только процентное содержание клеток, несущих рецепторы, но и количество самих экспрессируемых рецепторов – поскольку в условиях сниженной экспрессии рецепторов активность функционирования цитокина может находиться на минимальном уровне; если же экспрессия рецепторов избыточна, то клеточные популяции будут активно реагировать на взаимодействие лиганд/антитело.

Целью настоящей работы было оценить изменения в экспрессии мембраносвязанных и растворимых рецепторов к TNF α в норме и при ревматоидном артрите.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – мононуклеарные клетки, выделенные из цельной периферической крови условно-здоровых доноров (24 человека) (ОГУЗ «Новосибирский центр крови») и больных ревматоидным артритом в стадии обострения (7 человек) ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница»). Исследование проводилось с добровольного информированного согласия всех больных и условно-здоровых доноров; одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НИИКИ» СО РАМН (протокол № 52 от 23.06.2010 г.).

Выделение и культивирование фракции МНК ПК

МНК выделяли стандартно [3] из венозной крови путем центрифугирования в градиенте плотности фикола-урографина ($\rho = 1,077$ г/л) (фикола (Pharmacia Fine Chemical, Sweden), урографин (Шеринг АО, Германия)). МНК ПК собирали из интерфазы и отмывали в среде RPMI-1640 (Биолот, Россия) дважды. МНК культивировали в объеме 200 мкл в конечной концентрации 5 млн клеток/мл в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone), гентамицина 80 мкг/мл («Синтез»), 2мМ L-глутамин (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»), HEPES (Sigma), 5×10^{-5} мМ меркаптоэтанол (Sigma) в 96-луночном планшете (TPP, Швейцария) в течение 24 часов в инкубаторе во влажной атмосфере при температуре 37 °С и концентрации CO₂ 5% в отсутствие и присутствии LPS (штамм 055:B5) (в конечной концентрации 200 нг/мл).

Методы проточной цитофлуориметрии

Оценка фенотипических характеристик проводилась методом проточной цитометрии (цитофлуориметр FACSAria (BD, США) с использованием антител anti-hCD3-APC, anti-hCD19 PE Cy7, anti-hCD14 FITC (eBioscience), а также anti-hTNFR1-PE и anti-hTNFR2-PE (R&D Systems), для перевода значений интенсивности флуоресценции клеток,

экспрессирующих соответствующий маркер, в абсолютные показатели количества рецепторов TNF α I и II типов на клетках использовали калибровочные частицы BD Quantibrite™ PE Beads (с учетом проверки работоспособности прибора CST-Beads (BD)).

Определение уровня TNF α и его растворимых рецепторов в сыворотке крови

Уровень продукции медиаторов определяли в сыворотке крови иммуноферментным твердофазным анализом с использованием соответствующих наборов согласно инструкции производителя: sTNFR1, sTNFR2 (RayBiotech, Inc., США) и альфа-TNF (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Статистическая обработка результатов

Результаты обрабатывались с помощью пакета прикладных программ SPSS-11.5. Полученные данные были подвергнуты проверке на нормальность распределения (тест Колмогорова – Смирнова), которая показала, что все распределения являются нормальными. Поэтому результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего ($M \pm m$), а дальнейшее сравнение выборок с определением достоверности различий проводилось с использованием параметрического t-критерия Стьюдента (отличия считались достоверными при $p \leq 0,05$). Корреляции между исследуемыми параметрами устанавливались с использованием коэффициента корреляции Пирсона (при $p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Определение экспрессии мембраносвязанных рецепторов I и II типа к TNF α на субпопуляциях интактных МНК

В ходе работы оценивалось процентное содержание клеток, экспрессирующих рецепторы I и II типа к TNF α (рис. 1) на различных популяциях им-

мунокомпетентных клеток периферической крови, а так же рассчитывалось абсолютное количество рецепторов на клетках (рис. 2).

Как видно из рис. 1 и 2, субпопуляции CD3, CD19 и CD14 позитивных клеток периферической крови различаются как по проценту клеток, экспрессирующих рецепторы, так и по абсолютному числу рецепторов к TNF α на клетках. На всех популяциях и во всех группах обследованных процент TNFR2 позитивных клеток достоверно выше процента клеток, экспрессирующих TNFR1.

При сравнении группы больных и условно-здоровых доноров достоверные отличия выявлены только по процентному содержанию клеток, экспрессирующих рецепторы к TNF α (рис. 1). Было показано, что в популяции моноцитов условно-здоровых доноров отмечается достоверно более высокий процент клеток, экспрессирующих рецепторы I и II типа, по сравнению с больными ревматоидным артритом.

Кроме того, в популяции В-лимфоцитов условно-здоровых доноров отмечается достоверно меньший процент клеток, несущих рецепторы II типа, по сравнению с больными ревматоидным артритом.

2. Определение экспрессии мембраносвязанных рецепторов I и II типа к TNF α на CD14⁺ клетках в спонтанных и стимулированных культурах мононуклеарных клеток

Для изучения изменений в экспрессии рецепторов при стимуляции мононуклеарных клеток митогеном оценивалось процентное содержание позитивных клеток и абсолютное количество экспрессируемых рецепторов на моноцитах (CD14⁺) в культурах МНК человека: спонтанной и стимулированной LPS 055:B5 (обладающего повышенной активностью в отношении клеток моноцитарно-макрофагального ряда). Выбор для исследования популяции моноцитов обусловлен тем, что TNF α

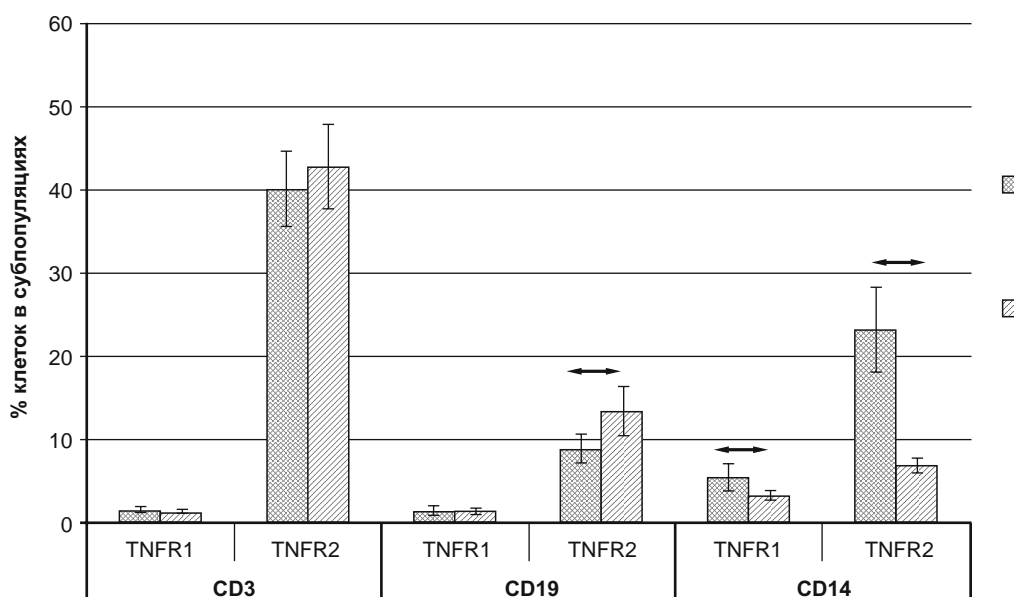


Рис. 1. Процент экспрессирующих TNFR1 и TNFR2 среди CD3, CD19 или CD14 позитивных клеток периферической крови условно-здоровых доноров ($n = 24$) и больных ревматоидным артритом ($n = 7$). Данные представлены как среднее и ошибка среднего ($M \pm m$). Стрелками на рисунке указана достоверность отличий, $p \leq 0,05$.

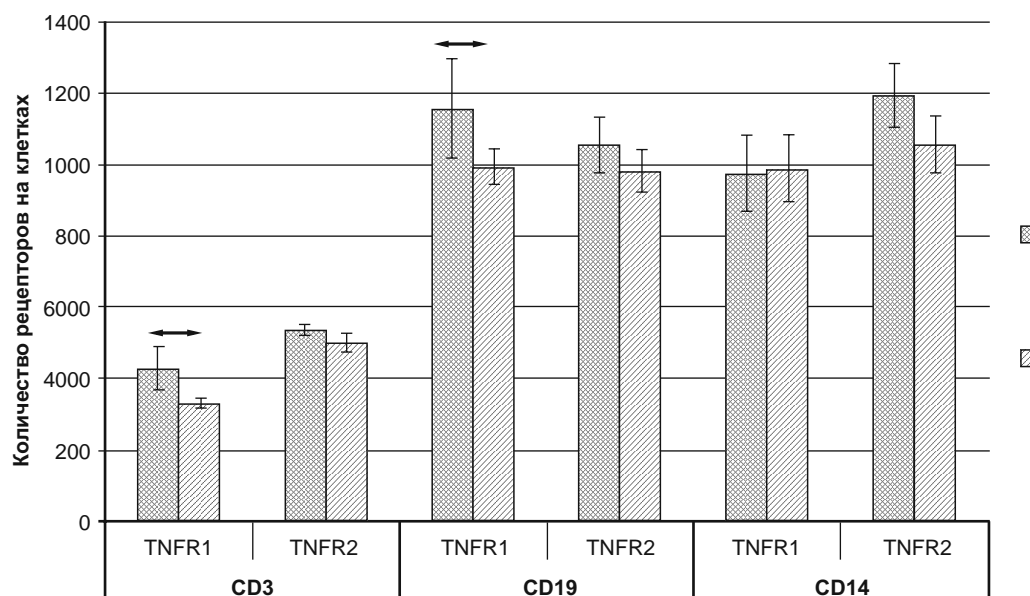


Рис. 2. Абсолютное содержание рецепторов TNFR1 и TNFR2 на субпопуляциях CD3, CD19 или CD14 позитивных клеток периферической крови условно здоровых доноров ($n = 24$) и больных РА ($n = 7$). Данные представлены как среднее и ошибка среднего ($M \pm m$). Стрелками на рисунке указана достоверность отличий, $p \leq 0,05$.

наиболее активно действует на клетки именно моноцитарно-макрофагального ряда, и регуляция рецепторного аппарата на этой популяции имеет большое значение для развития иммунных реакций. Данные представлены в таблице 1.

Была показана достоверная стимуляция экспрессии рецепторов на моноцитах под действием LPS в культурах МНК условно-здоровых доноров и больных РА при 24-часовом культивировании по сравнению со спонтанными культурами, с увеличением как процента клеток, несущих рецепторы, так и абсолютного количества экспрессируемых рецепторов к TNF α . По проценту позитивных клеток в популяции моноцитов LPS-стимулированных культур не отмечалось значимых различий между группами условно-здоровых доноров и больных РА. Однако при этом наблюдаются достоверно более высокий уровень абсолютного количества рецепторов как I, так и II типа, в стимулированных культурах больных РА по сравнению со здоровыми донорами.

3. *Определение TNF и растворимых рецепторов*

По результатам сравнения показателей между условно-здоровыми донорами и больными ревматоидным артритом, была выявлена тенденция ($0,05 < p < 0,1$) к более высокому содержанию TNF α в сыворотке крови больных РА (2,492 пг/мл) по сравнению со здоровыми донорами (0,836 пг/мл). При сравнении уровней растворимых рецепторов, в группах исследуемых показаны достоверно более высокие уровни сывороточного содержания растворимого рецептора II типа по сравнению с рецептором I типа как у больных РА (3450,4 и 1031,4 пг/мл соответственно), так и у условно-здоровых доноров (2291 и 844,3 пг/мл соответственно). Так же показан достоверно более высокий уровень растворимого рецептора II типа в сыворотке крови больных РА по сравнению с условно-здоровыми донорами.

4. *Определение корреляций между компонентами системы TNF α*

Проводился анализ корреляций между данными по уровням экспрессии мембраносвязанных рецепторов обоих типов, уровню содержания

Таблица 1
Относительное количество клеток, экспрессирующих TNFR1 и TNFR2, в субпопуляции моноцитов и абсолютное содержание рецепторов на моноцитах в спонтанной и стимулированной культурах МНК условно-здоровых доноров ($n = 24$) и больных РА ($n = 7$)

		TNFR1		TNFR2	
		% клеток	число рецепторов на клетке	% клеток	число рецепторов на клетке
Условно-здоровые доноры	Спонтанная культура	3,6 ± 0,4	1660,4 ± 155,8	25,3 ± 4,6	2314,5 ± 196,9
	LPS-стимулированная культура	8,2 ± 1,8	2451 ± 386,5	82,6 ± 3,8	4192,2 ± 410,7
Больные ревматоидным артритом	Спонтанная культура	3,63 ± 0,8	1893,466 ± 234,2	27,9 ± 2,9	2461,4 ± 191,5
	LPS-стимулированная культура	5 ± 0,8*	3831,2 ± 571,8*	87,7 ± 3,1	6319,6 ± 708,4*

Примечание: данные представлены как среднее и ошибка среднего ($M \pm m$). * – достоверные отличия в группе больных ревматоидным артритом по сравнению с показателями условно-здоровых доноров, $p \leq 0,01$.

растворимых рецепторов и содержанию TNF α с использованием коэффициента Пирсона, значимыми считались корреляции при $p \leq 0,05$.

У здоровых доноров содержание растворимых рецепторов I типа положительно коррелирует с количеством рецепторов I типа на интактных клетках в субпопуляции моноцитов. Была установлена корреляция между процентным содержанием клеток, экспрессирующих рецепторы I и II типа, в популяции интактных моноцитов, и также в спонтанной культуре МНК между I и II типом рецепторов, как по их абсолютному количеству, так и по проценту клеток, экспрессирующих данные рецепторы.

У больных РА повышенный уровень содержания TNF α связан отрицательной корреляцией с уровнем экспрессии TNFR1 на интактных В-лимфоцитах и процентным содержанием моноцитов, экспрессирующих TNFR2. Установлено, что уровни растворимых рецепторов I и II типа положительно коррелируют между собой, что согласуется с литературными данными [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При анализе клеток в условиях поликлональной активации митогеном абсолютное количество рецепторов обоих типов на клетках LPS-стимулированных культур моноцитов у больных достоверно больше по сравнению со здоровыми донорами. Это свидетельствует о том, что иммунокомпетентные клетки больных ревматоидным артритом более активно реагируют на введение в культуру липополисахарида, увеличивая абсолютное количество экспрессируемых рецепторов к TNF α , что обусловлено их скомпрометированностью в отношении развития провоспалительных реакций.

При сравнении показателей содержания растворимых и экспрессии мембраносвязанных форм рецепторов был выявлен ряд взаимосвязей. Так как одним из способов образования растворимых рецепторов является слушивание с мембраны внеклеточной части мембраносвязанных рецепторов, можно предположить, что высокий уровень sTNFR2 у больных РА и низкие уровни процентного содержания моноцитов, экспрессирующих рецепторы II типа, связаны с усилением процесса shedding рецепторов, которые в растворимой форме могут нейтрализовать повышенный уровень TNF α в сыворотке крови больных РА, снижая системные эффекты этого медиатора.

При анализе корреляционных взаимосвязей между медиатором и уровнями мембраносвязанных и растворимых рецепторов было показано, что у больных РА и условно-здоровых доноров отмечаются корреляции с противоположным знаком. У здоровых доноров отмечена положительная корреляция между растворимым рецептором I типа и уровнем экспрессии его же на моноцитах, тогда как у больных ревматоидным артритом показана отрицательная корреляция между медиатором TNF α и мембраносвязанными рецепторами: для I типа по уровню экспрессии на В-лимфоцитах, а

для рецептора II типа — по проценту позитивных клеток среди моноцитов. Таким образом, обнаруженные различия в корреляционных взаимосвязях между больными ревматоидным артритом и условно-здоровыми донорами свидетельствуют об изменениях в системе регуляции иммуномодулирующего цитокина TNF α при протекании патологических реакций.

Полученные данные свидетельствуют о различиях в экспрессии рецепторов к TNF α на различных субпопуляциях иммунокомпетентных клеток в норме и при патологии, и о вовлеченности в патологический процесс при ревматоидном артрите не только самого медиатора, но и его рецепторов. Результаты исследования позволяют говорить, что разная способность отдельных субпопуляций иммунокомпетентных клеток реагировать на медиатор TNF α связана как с разным процентом клеток этой субпопуляции, несущих рецепторы к TNF α , так и с разным количеством рецепторов, экспрессирующихся на клетках. Кроме того полученные данные по экспрессии рецепторов к TNF α в ответ на стимуляцию LPS свидетельствуют о значимой роли моноцитов в реакциях клеточной культуры в ответ на поликлональную активацию. При этом моноцитарные клетки больных РА имели достоверно более высокий уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов по сравнению со здоровыми донорами, что подтверждает активную вовлеченность иммунокомпетентных клеток больных ревматоидным артритом в TNF-опосредованные процессы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова Ю.Н. О системе цитокинов // Педиатрия. — 2007. — Т. 86, № 3. — С. 10–15.
2. Мазуров В.И. Болезни суставов. — СПб.: СпецЛит, 2008. — 408 с.
3. Bøyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow // Scand. J. Clin. Lab. Invest. — 1968. — Vol. 21. — P. 97.
4. Camussi G., Albano E., Tetta C., Bussolin F. The molecular action of tumor necrosis factor- α // Eur. J. Biochem. — 1991. — Vol. 202. — P. 3–14.
5. Dayer J.M. The process of identifying and understanding cytokines: from basic studies to treating rheumatic diseases // Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. — 2004. — Vol. 18, N 1. — P. 31–45.
6. Distler O., Müller-Ladner U., Schölmerich J., Gay R.E. et al. Rheumatoid arthritis: new molecular and cellular aspects // Med Klin (Munich). — 1999. — Vol. 94, N 12. — P. 673–680.
7. Engelmann H., Novick D., Wallach D. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors // J. Biol. Chem. — 1990. — Vol. 265, N 3. — P. 1531–1536.
8. Fiers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level // FEBS Lett. — 1991. — Vol. 285, N 2. — P. 199–212.

9. Furst D.E. Development of TNF inhibitor therapies for the treatment of rheumatoid arthritis // Clin. Exp. Rheumatol. – 2010. – Vol. 28, N 3. – P. 5–12.

10. Kokkonen H., Söderström I., Rocklöv J., Hallmans G. et al. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis // Arthritis Rheum. – 2010. – Vol. 62, N 2. – P. 383–391.

11. Kwiatkowski D., Hill A.V., Sambou I., Twumasi P. et al. TNF concentration in fatal cerebral,

non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria // Lancet. – 1990. – Vol. 336. – P. 1201–1204.

12. Lotz M., Setareh M., von Kempis J., Schwarz H. The nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family // J. Leukoc. Biol. – 1996. – N 60. – P. 1–7.

13. Song Y.W., Kang E.H. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies // QJM. – 2010. – Vol. 103, N 3. – P. 139–146.

Сведения об авторах

Альшевская Алина Анатольевна – аспирант ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН (630099, г. Новосибирск, пр. Димитрова, д. 14, кв. 20; тел.: (383) 222-06-16)

Васильев Филипп Филиппович – младший научный сотрудник, аспирант ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН
Лопатникова Юлия Анатольевна – старший научный сотрудник, кандидат биологических наук ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН

Сенников Сергей Витальевич – заведующий лабораторией молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор