

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕАВТОНОМНЫХ ЭФФЕКТОВ АПОПТОЗА В ПРОЦЕССЕ ИНИЦИАЦИИ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК *IN VITRO* У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Абрамова Т.Я.^{1,2}, Блинова Е.А.¹, Гришина Л.В.¹, Чумасова О.А.¹, Сулутьян А.Э.¹, Сизиков А.Э.¹, Козлов В.А.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

² ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Известно, что процессы апоптоза играют важную роль в клеточном гомеостазе, а нарушение клеточной гибели приводит к развитию патологических состояний. С ослаблением апоптоза, как формы запрограммированной клеточной гибели, ассоциируют развитие аутоиммунных процессов и, в частности, ревматоидного артрита.

Целью настоящего исследования являлось определение экспрессии маркеров активации и пролиферации на Т-лимфоцитах в процессе инициации апоптотической гибели клеток в условиях «клеточного соседства» у здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом.

Объектом исследования являлись образцы крови пациенток с ревматоидным артритом (РА) и здоровых женщин сопоставимого возраста. Проводились эксперименты, направленные на выявление характера влияния индуцированных в апоптоз не стимулированных, а также α CD3 и дексаметазон (Деха)-стимулированных клеток на аутологичные Т-лимфоциты, пролиферирующие в физиологических условиях *in vitro*.

Создание модели «клеточного соседства» – совместное культивирование CFSE⁻ Т-лимфоцитов, подвергнутых наиболее физиологичному варианту активационного апоптоза (инкубации в условиях скученности и обеднения культуральной среды) и CFSE⁺ аутологичных клеток, пролиферирующих в полной культуральной среде, выявило некоторые закономерности. Была установлена возможность вторичной индукции раннего и позднего апоптоза клеток с помощью и гуморальных, и клеточных компонентов аутологичной культуры, подвергнутой активационному апоптозу. Определены особенности апоптоза в нестимулированных и стимулированных культурах относительно контролей. Выявлено отсутствие различий по параметрам апоптоза во всех исследуемых вариантах культур между пациентами с РА и здоровыми людьми. Установлено повышение содержания живых клеток в CFSE⁻ культуре больных РА относительно доноров.

Адрес для переписки:

Абрамова Татьяна Яковлевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и фундаментальной иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 227-01-35.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: tatjana-abramova@mail.ru

Address for correspondence:

Abramova Tatiana Ya.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 227-01-35.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: tatjana-abramova@mail.ru

Образец цитирования:

Т.Я. Абрамова, Е.А. Блинова, Л.В. Гришина, О.А. Чумасова, А.Э. Сулутьян, А.Э. Сизиков, В.А. Козлов «Исследование неавтономных эффектов апоптоза в процессе инициации апоптотической гибели клеток *in vitro* у здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 5. С. 847-866.
doi: 10.15789/1563-0625-SON-1991

© Абрамова Т.Я. и соавт., 2020

For citation:

T. Ya. Abramova, E. A. Blinova, L. V. Grishina, O. A. Chumasova, A. E. Sulutyayn, A. E. Sizikov, V. A. Kozlov "Studies of non-autonomous effects of apoptosis in the course of *in vitro* apoptotic cell death initiation in healthy persons and patients with rheumatoid arthritis", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 847-866.
doi: 10.15789/1563-0625-SON-1991

DOI: 10.15789/1563-0625-SON-1991

Определены более высокие параметры активации CD25⁺ и CD69⁺ лимфоцитов и более низкие маркеров пролиферации Ki-67⁺ в группе доноров относительно пациентов. В отличие от здоровых людей, у пациентов с РА установлено значимое повышение экспрессии Ki-67 на Т-лимфоцитах в динамике совместного культивирования CFSE⁻ и CFSE⁺ культур. Увеличение числа живых клеток в апоптотических культурах больных РА относительно здоровых людей на фоне отсутствия значимых различий по параметрам апоптоза и динамики активационных маркеров, а также характер изменений содержания клеток несущих Ki-67 свидетельствует о вкладе неавтономных эффектов апоптоза в клеточный гомеостаз у пациентов с РА.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, апоптоз, «клеточное соседство», маркеры активации, маркеры пролиферации, неавтономные эффекты апоптоза

STUDIES OF NON-AUTONOMOUS EFFECTS OF APOPTOSIS IN THE COURSE OF *IN VITRO* APOPTOTIC CELL DEATH INITIATION IN HEALTHY PERSONS AND PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Abramova T.Ya.^{a, b}, Blinova E.A.^a, Grishina L.V.^a, Chumasova O.A.^a, Sulutyan A.E.^a, Sizikov A.E.^a, Kozlov V.A.^{a, b}

^a Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

^b Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The process of apoptosis is known that play an important role in cellular homeostasis, and the altered cell death may lead to development of pathological disorders. Evolving autoimmune conditions, in particular, rheumatoid arthritis, are associated with decreased rates of apoptosis as a form of programmed cell death. The aim of this study was to evaluate expression of activation and proliferation markers on T lymphocytes during initiation of apoptotic cell death under the conditions of “cell neighborhood” in healthy individuals and patients with rheumatoid arthritis. Patients and methods. The study was performed with blood samples of the patients with rheumatoid arthritis (RA) and healthy women of comparable age. During the study, we conducted experiments aimed to identify the *in vitro* influence of non-stimulated apoptosis-induced cells, as well as aCD3- and dexamethasone (Dexa)-stimulated apoptosis-induced cells upon autologous T lymphocytes cultured under physiological conditions. Development of a “cell neighborhood” model, i.e., co-cultures of CFSE⁻ T cells subjected to incubation under crowding condition and depletion of the culture medium which is the most physiological variant of apoptosis activation, and CFSE⁺ autologous cells placed in the complete culture medium, has revealed some relationships. We have revealed an opportunity of secondary induction of early and late apoptosis by means of humoral and cellular components of autologous cell culture subjected to activation apoptosis. We determined the features of apoptosis in unstimulated, as well as aCD3- and dexamethasone-stimulated cultures, compared with controls. There were no differences in these parameters of apoptosis between RA patients and healthy people for all variants of cultures. An increased proportion of viable cells was found in the CFSE⁻ culture of patients with RA when compared to donors.

The donor group had more lymphocytes with activation parameters CD25⁺, CD69⁺ and low level of proliferation marker Ki-67 than patients. In contrast to healthy, the RA patients demonstrated a significantly increased expression of Ki 67 in T lymphocytes when co-culturing CFSE⁻ and CFSE⁺ cells. An increased number of living cells in apoptotic cultures of patients with RA relative to healthy people, in absence of significant differences in the parameters of apoptosis and activation markers in dynamics, as well as pattern of changes in the Ki-67⁺ cell contents suggested a contribution of the non-autonomous effects of apoptosis to cellular homeostasis in RA patients.

Keywords: rheumatoid arthritis, apoptosis, cell neighborhood, activation markers, proliferation markers, non-autonomous effects of apoptosis

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научного проекта № 18-44-540012.

Введение

Ревматоидный артрит (РА) — хроническое аутоиммунное заболевание, приводящее к поражению суставов и системным поражениям внутренних органов [17]. Известно, что РА характеризуется выраженным воспалительным статусом в отношении пролиферации, миграции, апоптоза, экспрессии генов и секреции провоспалительных цитокинов [23].

Исходя из важной роли апоптоза в реализации многообразных физиологических процессов, в настоящее время считается доказанным, что ослабление апоптоза в различной степени отражается на формировании аутоотолерантности и развитии аутоиммунных процессов и заболеваний [16]. Нарушение механизмов индукции апоптоза, приводящие к его ингибированию, являются одним из важных звеньев в патогенезе РА. При ревматоидном артрите суставное воспаление связывают с тем, что зрелые иммунные Т-лимфоциты в синовиальных полостях своевременно не подвергаются запрограммированной клеточной гибели, а продолжают продуцировать провоспалительные цитокины. Помимо этого, в синовиальных Т-лимфоцитах патологически усилена экспрессия антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL [7].

Апоптоз — физиологическое явление, поэтому существуют специфические факторы, влияющие на уровень запрограммированной гибели клеток: физиологические активаторы и ингибиторы. К активаторам апоптоза следует отнести: недостаток факторов роста, потерю связи с матриксом, глюкокортикоиды, свободные радикалы, а также некоторые вирусы и ионизирующую радиацию [9].

Известно большое количество ингибиторов апоптоза как экзогенного, так и эндогенного происхождения. К ним, в частности, относятся липополисахариды грамотрицательных бактерий, вирусные белки, эстрогены, андрогены, нейтральные аминокислоты, ингибиторы протеаз, стимуляторы миелопоэза (G-CSF, GM-CSF), интерлейкины (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10), интерфероны, лейкотриены. Значимым в этом многообразии факторов является неоднозначность их влияния. В частности, один и тот же цитокин, гормон и регуляторное вещество может быть и ингибитором, и индуктором апоптоза. Это определяется типом клеток-мишеней, степенью их дифференцированности, а также

особенностями функционирования внутриклеточных механизмов. Так, например, IL-4 и IL-10 ингибируют апоптоз Т- и В-лимфоцитов и индуцируют апоптоз циркулирующих моноцитов [23].

Как известно, клеточный гомеостаз в организме поддерживается процессами пролиферации и гибели клеток. При этом апоптоз, который долгое время считался автономным процессом, не является индифферентным для окружающих клеток. Апоптотические клетки могут генерировать разнообразные сигналы, которые оказывают глубокое влияние на соседние клетки и ткани [36]. В частности, определены неавтономные эффекты апоптоза в отношении соседних клеток, включающие влияние на пролиферацию, миграцию, морфологию, а также гибель клеток в окружающих тканях [16, 19, 24]. Кроме того, механическое воздействие — изменение напряжения и ремоделирования в прилегающих тканях также относят к неавтономным эффектам апоптоза [38].

К сигналам, которые генерируют апоптотические клетки, относятся многие факторы. Так, при распаде клеточных структур на отдельные фрагменты, в конечном итоге, процессов апоптоза и почкования плазматической мембраны образуются апоптотические тельца. Апоптотические тельца, наряду с экзосомами и эктосомами, относят к числу микровезикул, выполняющих значимую роль в транспортировке различных белков, мРНК и микроРНК в клетке [19]. Показано, что микровезикулы играют важную роль в патофизиологии РА: в экспериментальной модели РА было установлено, что они способны индуцировать в Т-клетках резистентность к апоптозу. Известно также, что, наряду с увеличением концентрации фосфатидилсерина во внешнем монослое цитоплазматической мембраны, образование микровезикул повышается на ранней стадии апоптоза, в то время как апоптотические тельца, в отличие от микровезикул, являющихся более крупными частицами (более 1,5 мкм), образуются вследствие фрагментации клетки на финальной стадии апоптоза. Кроме того, в микровезикулах обнаружена высокая концентрация ключевого фермента апоптоза — каспазы-3. Предполагается, что клетка избегает гибели, с помощью микровезикул избавляясь от фермента, поскольку ингибирование фермента приводит к блокаде их высвобождения [4].

Нарушение регуляции микроРНК в мононуклеарных клетках периферической крови или Т-лимфоцитах синовиальной ткани и синовиальных фибробластов (FLS), способствует воспалению, деградации внеклеточного матрикса и инвазивному действию резидентных клеток [18]. Наиболее известные микроРНК, опосредо-

ванные с развитием РА — микроРНК-155 и микроРНК-146а. МикроРНК-155 усиливает свою активность в FLS больных РА, а ингибирование их в FLS приводит к снижению выработки TNF- α , в то время как избыточная экспрессия микроРНК-155 приводит к хроническому воспалительному состоянию с увеличением продукции провоспалительных цитокинов [39].

Гомеостатическое равновесие в организме поддерживается процессами пролиферации и гибели клеток. Выделяют 12 видов программируемой клеточной гибели. К основным и наиболее распространенным типам, помимо апоптоза, относят аутофагию и некроз. Среди дополнительных форм клеточной гибели известны: аноиксис, параптоз, пироптоз, пиронекроз, энтоз, некроптоз и др. [21].

Некроз, как форма гибели клеток, считается пассивным процессом, сопровождающийся разрушением мембраны клетки и высвобождением клеточного содержимого во внеклеточное пространство. Окружающие клетки в большинстве подвержены воздействию некротического материала, что ведет к возникновению воспалительной реакции и гибели соседних клеток.

Другой формой клеточной смерти является аутофагия, в процессе которой клетка переваривает свое содержимое: клеточные органеллы и макромолекулы. Аутофагия представляет собой механизм выживания и сопровождает жизнедеятельность любой нормальной клетки. Наиболее интересный, шапероновый тип аутофагии, который описан только для млекопитающих и индуцируется стрессом, происходит при участии цитоплазматических белков-шаперонов семейства hsp-70, вспомогательных белков и LAMP-2. При определенных обстоятельствах, таких как повреждение органелл или нехватка питательных веществ, процесс аутофагии приводит к гибели клетки и поглощению макрофагами оставшегося клеточного дебриса [5, 20, 31, 35, 40].

В связи с необходимостью своевременной элиминации разрушенных клеток важную роль в процессах апоптоза выполняет фагоцитарная система [34]. В основном, апоптотические клетки и апоптотические тельца поглощаются и перевариваются макрофагами, дендритными или эндотелиальными клетками. Предполагается, что часть апоптотических телец попадает в кровоток, где они способны циркулировать длительное время и влиять на жизнеспособность и дифференцировку соседних клеток.

Апоптоз, или запрограммированный клиренс клеток, — это строго регламентированный физиологический процесс уничтожения умирающих клеток, который происходит быстро и эффективно у здоровых организмов. Исходя из основ-

ных типов гибели клеток, в процессе каждого из них возможно образование молекул, способных влиять неавтономно на окружающие клетки. В частности, при апоптозе с помощью фрагментированной ДНК, экстернализованного фосфатидилсерина, активированных каспаз на фоне отсутствия воспалительной реакции. При аутофагии — с помощью крупных вакуолей и способностью клеток восстанавливаться на очень поздних стадиях процесса. Некроз же связан с неконтролируемым высвобождением внутриклеточного содержимого клетки, сопровождающимся отеком и разрывом мембраны, обычно вызывающим воспалительный ответ [43].

Таким образом, процессы разрушения клеток связаны с появлением многих вариантов сохранения их жизнеспособности и возможности проявления неавтономных эффектов, обусловленных экспрессией внутриклеточных активных молекул, изменением межклеточного взаимодействия, а также эффективностью работы элиминационной системы. Предваряя исследование механизмов неавтономных эффектов апоптоза, в данной работе мы определяли возможность и особенности процессов активации и пролиферации Т-лимфоцитов в условиях индукции апоптоза *in vitro* у здоровых людей и пациентов с РА.

Целью настоящего исследования являлось определение экспрессии маркеров активации и пролиферации на Т-лимфоцитах в процессе инициации апоптотической гибели клеток в условиях «клеточного соседства» у здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом.

Материалы и методы

Объектом исследования являлась периферическая кровь 6 условно здоровых женщин, не имеющих аутоиммунных, острых и обострения хронических заболеваний, средний возраст группы составил $51,0 \pm 6,5$, а также периферическая кровь 6 женщин больных РА (средний возраст $57,8 \pm 3,3$ лет), находившихся на лечении в клинике ФГБНУ НИИФКИ г. Новосибирска. Верификация диагноза и набор пациентов в группы исследования осуществлялся в отделении ревматологии Клиники «НИИФКИ». Постановка диагноза ревматоидного артрита была выполнена согласно приказу № 21 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным ревматоидным артритом» от 13 января 2006 г. Соответствие принципам этики: протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом при НИИФКИ (выписка из протокола № 107 от 15 июня 2018 года). В соответствии с этическими стандартами участники исследования подписывали информированное согласие.

Выделенная на градиенте плотности (фиколл-верографин, 1,078) (BioClot GmbH, Германия) лимфоцитарная фракция клеток была распределена на 2 варианта культуры (Приложение 1). Первый вариант («нормально пролиферирующая CFSE⁺ культура» (НП)) – 7 лунок по $5,0 \times 10^5$ кл/0,5 мл полной культуральной среды (ПКС), окрашенных флуоресцентным красителем CFSE (4 мкМ, Molecular probes, США), (CFSE⁺). В составе ПКС – среда RPMI-1640 (ООО «Биолот», Санкт-Петербург), тиенам, (ЗАО ОПТАТ, Россия), L-глутамин (Gerbu, Biotechnik, GmbH, Германия), буферный раствор Нерес (GERBU, Biotechnik, GmbH), фетальная телячья сыворотка (FCS), (Hy Clone, США). Второй вариант – «апоптотическая CFSE⁻ культура» (АК) – 3 лунки (нестимулированные клетки, aCD3⁻ (1 мкг/мл, МедБиоСпектр, Москва), и дексаметазон-стимулированные (1×10^{-4} М) клетки) по 2×10^6 кл/150,0 мкл обедненной (1% FCS) ОС среды (CFSE⁻). На 4-е сутки инкубации в термостате (37 °С, 5% CO₂) апоптотическая культура (клетки и супернатант отдельно) была перенесена к лимфоцитам, пролиферирующим в условиях ПКС. Далее проводилось сокультивирование проб, получивших условные названия (Приложение 2): 1 – «Контроль» – контрольное культивирование лимфоцитов в ПКС; 2 – «Контроль апоптоза» – к НП лимфоцитам была добавлена клеточная часть нестимулированных клеток АК; 3 – «Контроль апоптоза супернатант» – сокультивирование НП в ПКС и перенесенного к ней супернатанта от нестимулированной АК; 4 – «aCD3» – НП культура и клетки АК, стимулированные aCD3; 5 – «aCD3 супернатант» – НП лимфоциты и супернатант от АК, стимулированной aCD3; 6 – Деха – сокультивирование НП лимфоцитов в ПКС и АК, обработанной дексаметазоном (1×10^{-4} М); 7 – Деха супернатант – НП лимфоциты и супернатант от АК, обработанной дексаметазоном. На 7-е сутки на цитофлуориметре BD FACS Canto II в популяции Т-лимфоцитов (CD3⁺/CD4⁺; CD3⁺/CD4⁺) с помощью набора с Аннексином V (AnV), меченным PE и интеркалирующим красителем 7AAD (Becton Dickinson, США) определялся уровень раннего (AnV⁺/7AAD⁻, %) и позднего (AnV⁺/7AAD⁺, %) апоптоза в нативных, а также в контрольных, aCD3⁻ и дексаметазон-стимулированных вариантах. Для выявления популяции живых клеток на предварительном этапе по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния отделяли клеточный дебрис и клетки, находящиеся на стадии позднего некроза. В областях гистограмм, представленных живыми и находящимися в инициальных фазах апоптоза лимфоцитами, в каждой пробе устанавливалась категория

(AnV⁻/7AAD⁻) живых клеток [10]. Определение содержания клеток, несущих маркеры активации проводилось на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США) с предварительным мечением Т-лимфоцитов антителами с различными спектрами эмиссии: CD3PE/Cy7; CD4/APC/Cy7; CD25/PE/Cy5; CD 69/PE (все антитела были производства BioLegend, США). Для определения позитивных по маркерам активации клеток использовали соответствующие FMO (Fluorescence minus one)-контроли.

Окрашивание клеток по маркеру пролиферации Ki-67 проводили по протоколу оценки внутриклеточных молекул методом проточной цитометрии. После мечения антителами к поверхностным маркерам клетки фиксировали и пермиабилizировали, используя набор Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Cytofix/CytopermTM, США), затем окрашивали антителами к Ki-67, конъюгированных с APC (BioLegend, США). В качестве контроля использовали Т-клетки, культивированные без стимуляции. Запись проб и анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения FACS Diva 6.1 (Becton Dickinson, США).

Статистическая обработка данных проводилась с применением методов непараметрической статистики в программе Statistica 6.0 (StatSoft, США). В анализе были использованы U-критерий Манна–Уитни, парный критерий Вилкоксона и ранговая корреляция по методу Спирмена. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), возраст представлен в виде M±m. Различия между группами считались статистически значимыми при достигнутом уровне $p \leq 0,05$.

Результаты

Для выявления функционального состояния Т-лимфоцитов, находящихся в процессе совместного культивирования в условиях «клеточного соседства» «апоптотирующих» и «нормально пролиферирующих» клеток, нами были проведены исследования параметров экспрессии наиболее ранних и более поздних маркеров активации (CD69⁺, CD25⁺ соответственно) и пролиферации (Ki-67) у пациентов с РА и здоровых людей. На данном этапе исследования проводились в CFSE⁺ культуре в процессе совместного культивирования клеток через 24, 48 и 72 часа после переноса CFSE⁻ апоптотирующих клеток и супернатантов этих апоптотических культур к аутологичным CFSE⁺ лимфоцитам, находящимся в физиологических условиях культивирования.

В процессе анализа было установлено изменение содержания CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов, экспрессирующих активационные маркеры во всех исследуемых пробах, кроме пробы Деха у пациентов с РА. Полученные результаты свидетельствовали о преимущественном снижении числа клеток, экспрессирующих CD69⁺ (наиболее ранний маркер активации) и CD25⁺/CD69⁺

через 48 часов сокультивирования. А также о преимущественном повышении популяций лимфоцитов, экспрессирующих CD25⁺ и, в меньшей степени, CD25⁺/CD69⁺ и уменьшении CD25⁻/CD69⁻ через 48 и 72 часа сокультивирования в нестимулированных (табл. 1) и стимулированных аCD3 и дексаметазоном (табл. 2) CFSE⁺ культурах у больных с РА.

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ В НЕСТИМУЛИРОВАННОЙ, CFSE⁺ КУЛЬТУРЕ В ПРОЦЕССЕ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА Т-ЛИМФОЦИТОВ КЛЕТОЧНЫМИ И ГУМОРАЛЬНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ АУТОЛОГИЧНОЙ АПОПТОТИЧЕСКОЙ (CFSE⁻) КУЛЬТУРЫ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

TABLE 1. DYNAMICS OF ACTIVATION MARKERS EXPRESSION ON UNSTIMULATED, CFSE⁺ CULTURE DURING THE INDUCTION OF T LYMPHOCYTE APOPTOSIS BY THE CELLULAR AND HUMORAL COMPONENTS OF AN AUTOLOGOUS APOPTOTIC (CFSE⁻) CULTURE IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

CFSE ⁺	24 часа (1) 24 hours (1)	48 часов (2) 48 hours (2)	72 часа (3) 72 hours (3)	p
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (К) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (C)	0,4 (0,1-1,4)	1,05 (0,2-2,2)	1,1 (0,1-1,5)	0,059 ⁽²⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (КА) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (CA)	2,4 (1,5-7,7)	1,55 (0,5-3,5)	2,5 (1,0-4,3)	0,043 ⁽¹⁻²⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁻ /CD25 ⁻ (КА) CD8 ⁺ /CD69 ⁻ /CD25 ⁻ (CA)	96,05 (90,4-98,3)	96,85 (92,2-99,0)	95,8 (95,5-98,7)	0,028 ⁽¹⁻²⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (КА супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (CA super.)	2,5 (1,3-3,5)	1,45 (0,7-1,8)	2,2 (0,2-1,2)	0,043 ⁽¹⁻²⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁻ /CD25 ⁺ (КА супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁻ /CD25 ⁺ (CA super.)	0,85 (0,3-2,1)	0,4 (0,2-2,5)	0,5 (0,2-1,2)	0,06 ⁽¹⁻²⁾
CD4 ⁺ /Ki 67 ⁺ (КА супер.) CD4 ⁺ /Ki 67 ⁺ (CA super.)	0,6 (0,5-0,7)	1,2 (0,7-2,1)	0,9 (0,3-0,9)	0,043 ⁽¹⁻²⁾ 0,07 ⁽²⁻³⁾

Примечание. n = 6; Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}); единицы измерения – %, за 100% принято число CD4⁺ или CD8⁺Т-лимфоцитов (не менее 10000 событий).

Note. n = 6; measure units – %, the number of CD4⁺ or CD8⁺T lymphocytes was taken as 100% (no less than 10000 events); (C), control; (CA), control of apoptosis with cell transfer; (CA super.), control of apoptosis with supernatant transfer.

В частности, в пробах контроль апоптоза «КА» и контроль апоптоза супернатант «КА супер.» количество CD8⁺/CD69⁺/CD25⁻ клеток достоверно снижается через двое суток инкубации. В то время как число клеток, несущих двойную экспрессию активационных маркеров CD8⁺/CD69⁺/CD25⁺ в пробе «К», имеет тенденцию к повышению через 72 часа,

содержание неактивированных CD8⁺/CD25⁻/CD69⁻ клеток в пробе «КА» через двое суток соответственно и достоверно возрастает. Следует отметить, что в пробе контроль апоптоза супернатант «КА супер.» в популяции CD4⁺ лимфоцитов значительно увеличилось содержание клеток, экспрессирующих маркер пролиферации Ki-67 через 48 часов инкубации.

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ В aCD3- И Деха-СТИМУЛИРОВАННЫХ, CFSE+ КУЛЬТУРАХ В ПРОЦЕССЕ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА Т-ЛИМФОЦИТОВ КЛЕТОЧНЫМИ И ГУМОРАЛЬНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ АУТОЛОГИЧНОЙ АПОПТОТИЧЕСКОЙ (CFSE-) КУЛЬТУРЫ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

TABLE 2. DYNAMICS OF ACTIVATION MARKERS EXPRESSION IN aCD3- AND Dexa-STIMULATED, CFSE+ CULTURES DURING THE INDUCTION OF T LYMPHOCYTE APOPTOSIS BY THE CELLULAR AND HUMORAL COMPONENTS OF AN AUTOLOGOUS APOPTOTIC (CFSE-) CULTURE IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

CFSE+	24 часа (1) 24 hours (1)	48 часов (2) 48 hours (2)	72 часа (3) 72 hours (3)	p
CD4 ⁺ /Ki 67 ⁺ (aCD3)	1,6 (1,2-2,1)	5,9 (1,8-6,7)	3,1 (0,7-6,2)	0,046 ⁽¹⁻²⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3)	7,65 (3,2-10,4)	8,2 (4,3-30,5)	23,8 (7,2-52,6)	0,043 ⁽¹⁻³⁾ 0,043 ⁽²⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3)	17,75 (9,5-55,9)	19,1 (5,2-26,5)	6,0 (3,2-17,2)	0,043 ⁽¹⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (aCD3)	16,2 (10,0-26,7)	10,55 (6,7-19,9)	8,4 (4,2-10,8)	0,028 ⁽¹⁻²⁾
CD8 ⁺ Ki 67 ⁺ (aCD3)	1,3 (1,2-1,4)	2,75 (0,6-5,8)	2,5 (1,8-3,4)	0,079 ⁽¹⁻³⁾
CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 супер.) CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 super.)	6,75 (4,9-8,0)	11,75 (6,1-32,5)	25,4 (11,7-56,7)	0,043 ⁽¹⁻³⁾ 0,043 ⁽²⁻³⁾
CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 супер.) CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 super.)	21,1 (6,7-60,0)	12,15 (7,0-34,0)	9,4 (5,9-14,0)	0,043 ⁽²⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 super.)	5,05 (1,5-8,6)	8,3 (3,6-40,2)	24,2 (7,0-52,0)	0,043 ⁽¹⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 super.)	15,65 (5,4-50,2)	12,3 (3,9-15,9)	10,3 (3,6-15,7)	0,043 ⁽¹⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (aCD3 супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (aCD3 super.)	13,35 (8,2-23,5)	8,4 (4,6-13,2)	7,6 (5,9-10,6)	0,028 ⁽¹⁻²⁾ 0,07 ⁽¹⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (Деха супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁻ (Dexa super.)	1,2 (1,1-2,7)	0,9 (0,2-1,3)	1,6 (1,0-1,7)	0,028 ⁽¹⁻²⁾
CD8 ⁺ /Ki 67 (Деха супер.) CD8 ⁺ /Ki 67 (Dexa super.)	0,25 (0,2-0,3)	0,4 (0,2-0,5)	0,4 (0,3-0,7)	0,079 ⁽¹⁻²⁾ 0,067 ⁽¹⁻³⁾

Примечание. n = 6; Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}); единицы измерения – %, за 100% принято число CD4⁺ или CD8⁺Т-лимфоцитов (не менее 10000 событий).

Note. n = 6; measure units – %, the number of CD4⁺ or CD8⁺T lymphocytes was taken as 100% (no less than 10000 events); (aCD3 super.), cells with aCD3 supernatant transfer; (Dexa super.), cells with dexamethasone supernatant transfer.

Самое значительное изменение активационных маркеров было выявлено в пробах больных РА, стимулированных aCD3, при этом сохранялись закономерности, установленные при исследовании нестимулированных проб. Так, в CD4⁺ лимфоцитах, несущих двойную экспрессию активационных маркеров (25⁺/69⁺), было определено снижение между 48 и 72 часами инкубации, при этом параметры на 24 часа также достоверно отличались от показателей на 72 часа, как в популяции CD4⁺, так и CD8⁺ клеток. В CD4⁺ лим-

фоцитах в «aCD3» пробе к 48 часам инкубации значительно увеличилось число клеток, экспрессирующих маркер пролиферации Ki-67, тогда как в популяции CD8⁺ количество Ki-67⁺ клеток повышалось к 72 часам только на уровне тенденции.

В популяции CD8⁺ клеток, стимулированных «aCD3» и в CD4⁺ лимфоцитах, стимулированных супернатантом от этой пробы, достоверно увеличилось количество CD25⁺ клеток к 48 и 72 часам. При этом в пробах «aCD3 супер.» в популяции CD8⁺Т-лимфоцитов значительно уменьшается

число CD25⁺/CD69⁺ и CD69⁺ клеток. Кроме того, сходные со стимулированной aCD3 клеточной фракцией закономерности экспрессии активационных маркеров на CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитах были выявлены также в пробах, стимулированных супернатантом от данной культуры, но тем не менее значимых изменений маркера пролиферации Ki-67 в этих пробах установлено не было. Не было определено также достоверных изменений активационных маркеров и маркеров пролиферации в динамике совместного культивирования CFSE⁺ и CFSE⁻ культур при переносе клеток, активированных дексаметазоном. В то же время перенос

супернатантов данной культуры к аутологичным клеткам, находящимся в полной культуральной среде привел к снижению содержания CD8⁺/CD69⁺ клеток к 48 часам инкубации по сравнению с 24 часами, а также к достоверному увеличению CD8⁺/Ki-67⁺ через 48 и значимой тенденции к повышению через 72 часа инкубации.

Аналогичный анализ, проведенный в группе здоровых людей, выявил динамику в содержании клеток, экспрессирующих маркеры активации в процессе 24-, 48- и 72-часового совместного культивирования CFSE⁺ и CFSE⁻ культур только в стимулированных пробах (табл. 3).

ТАБЛИЦА 3. ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ В aCD3- И ДЕКСА-СТИМУЛИРОВАННЫХ, CFSE⁺ КУЛЬТУРАХ В ПРОЦЕССЕ ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА Т-ЛИМФОЦИТОВ КЛЕТЧНЫМИ И ГУМОРАЛЬНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ АУТОЛОГИЧНОЙ АПОПТОТИЧЕСКОЙ (CFSE⁻) КУЛЬТУРЫ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

TABLE 3. DYNAMICS OF ACTIVATION MARKERS EXPRESSION IN aCD3- AND Dexa-STIMULATED, CFSE⁺ CULTURES DURING THE INDUCTION OF T LYMPHOCYTE APOPTOSIS BY THE CELLULAR AND HUMORAL COMPONENTS OF AN AUTOLOGOUS APOPTOTIC (CFSE⁻) CULTURE IN HEALTHY PEOPLE

CFSE ⁺	24 часа (1) 24 hours (1)	48 часов (2) 48 hours (2)	72 часа (3) 72 hours (3)	p
CD4 ⁺ /CD25 ⁺ /CD69 ⁺ (aCD3)	32,5 (11,9-34,5)	22,2 (18,6-27,3)	14,5 (4,2-19,8)	0,043 ⁽¹⁻³⁾ 0,043 ⁽²⁻³⁾
CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3)	19,3 (17,3-22,8)	20,1 (9,8-20,2)	5,6 (3,8-14,6)	0,043 ⁽¹⁻³⁾ 0,043 ⁽²⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3)	2,1 (2,0-3,3)	5,9 (5,6-6,1)	11,6 (3,8-30,6)	0,043 ⁽¹⁻²⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3)	17,5 (16,0-28,6)	17,9 (4,9-19,8)	8,3 (1,3-11,4)	0,043 ⁽¹⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3)	23,6 (21,2-31,4)	20,4 (15,7-23,5)	8,6 (7,3-11,6)	0,043 ⁽¹⁻³⁾ 0,043 ⁽²⁻³⁾
CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 супер.) CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 super.)	6,0 (3,7-6,9)	6,0 (5,6-29,5)	17,1 (11,0-47,7)	0,043 ⁽²⁻³⁾
CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 супер.) CD4 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 super.)	17,1 (10,7-18,7)	9,2 (9,0-18,5)	5,6 (4,8-14,7)	0,043 ⁽²⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 super.)	0,6 (0,6-7,4)	2,5 (1,4-6,1)	13,7 (6,4-9,4)	0,043 ⁽¹⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (aCD3 super.)	18,9 (17,3-24,9)	16,6 (13,7-17,5)	9,1 (7,8-15,7)	0,043 ⁽¹⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (Деха супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (Dexa super.)	0,4 (0,2-0,7)	0,2 (0,2-0,5)	1,0 (0,8-2,3)	0,043 ⁽²⁻³⁾
CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (Деха супер.) CD8 ⁺ /CD69 ⁺ /CD25 ⁺ (Dexa super.)	97,5 (97,4-97,6)	97,7 (97,5-98,5)	96,5 (96,2-97,9)	0,043 ⁽¹⁻²⁾ 0,043 ⁽²⁻³⁾

Примечание. n = 6; Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}); единицы измерения – %, за 100% принято число CD4⁺ или CD8⁺Т-лимфоцитов (не менее 10000 событий).

Note. n = 6; measure units – %, the number of CD4⁺ or CD8⁺T lymphocytes was taken as 100% (no less than 10000 events); (aCD3 super.), cells with aCD3 supernatant transfer; (Dexa super.), cells with dexamethasone supernatant transfer.

Так, у здоровых людей после переноса апоптотической CFSE⁻ культуры, активированной aCD3 к аутологичным CFSE⁺ клеткам, пролиферирующим в полной культуральной среде, произошло повышение содержания CD25⁺ Т-лимфоцитов, как в популяции CD4⁺, так и СВ8⁺ клеток. При этом указанное повышение произошло не только при культивировании с апоптотическими клетками (пробы «aCD3»), но и при добавлении супернатантов от этих клеток (пробы «aCD3 супер.»). Аналогичные изменения характерны и для экспрессии наиболее раннего маркера активации – CD69⁺, но, в отличие от CD25⁺, при этом произошло снижение его содержания к 48 и 72 часам инкубации. Также произошло снижение количества клеток, несущих двойную экспрессию активационных маркеров (69⁺/25⁺) к 72 часам, как среди CD4⁺, так и CD8⁺Т-лимфоцитов. Следует отметить, что у здоровых людей, также как у пациентов с РА, не было определено значимых изменений в экспрессии активационных маркеров в CFSE⁺ культуре после переноса CFSE⁻ клеток, активированных дексаметазоном (проба Деха), но указанные изменения проявились при переносе супернатанта от этой культуры (проба «Деха супер.»). При этом повышалось число CD25⁺ клеток к 72 часам инкубирования и содержание отрицательных по обоим маркерам активации к 48 часам сокультивирования.

Главным отличием экспрессии маркеров на Т-лимфоцитах пациентов с РА и здоровых людей в динамике 3-дневной инкубации в условиях «клеточного соседства» апоптотирующей и пролиферирующей культуры является отсутствие значимых изменений экспрессии маркера пролиферации Ki-67 у здоровых людей. Кроме того, у доноров динамика изменений в процессе инкубации была определена только после дополнительной стимуляции клеток aCD3 и дексаметазоном, в нестимулированной культуре достоверных изменений не произошло.

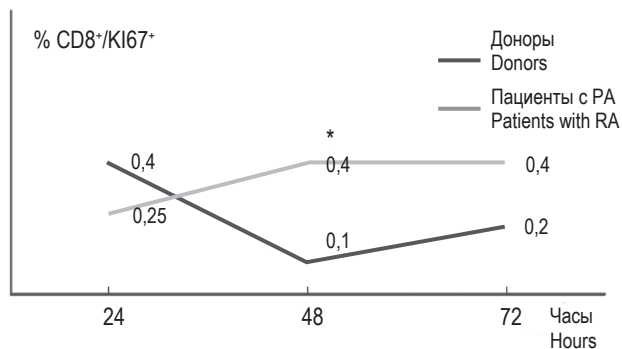
В процессе дальнейшего анализа устанавливался характер изменений проб лимфоцитов в CFSE⁺ культуре в зависимости от времени инкубации с аутологичной CFSE⁻ культурой. Так, у пациентов с РА медиана CD4⁺/CD25⁺/CD69⁺ стала значимо выше после 72 часов инкубации, относительно 24 часов в пробе «aCD3 супер.» $25,4 \pm (11,7 \div 56,7)$ и $6,75 \pm (4,9 \div 8,0)$, соответственно, $p = 0,05$, и значительно понизилась для этой клеточной популяции через 72 часа в пробе «Деха супер.» $2,5 \pm (1,4 \div 3,2)$ и $5,07 \pm (4,0 \div 6,9)$, соответственно, $p = 0,045$. При этом процент Ki-67⁺ лимфоцитов в популяции CD8⁺ в пробе «Деха супер.» был значимо более высок через 72 часа инкубации $0,25 \pm (0,2 \div 0,3)$ и $0,4 \pm (0,3 \div 0,7)$, $p = 0,035$, а медиана Ki-67⁺ клеток среди CD4⁺ лимфоцитов

в пробе aCD3 была достоверно выше через 48 часов инкубации $1,5 \pm (1,2 \div 2,1)$ и $5,9 \pm (1,8 \div 6,7)$ соответственно, $p = 0,05$. Таким образом, в процессе культивирования у пациентов с РА закономерно изменяется количество клеток, экспрессирующих активационные маркеры и повышается число клеток, несущих маркер пролиферации.

Аналогичный анализ культур здоровых людей выявил изменения в экспрессии активационных маркеров в пробах, активированных aCD3. Так, в CFSE⁺ популяции CD4⁺ лимфоцитов, стимулированных антителами к CD3, были выявлены более высокие параметры клеток, экспрессирующих CD25 через 48 часов инкубации с CFSE⁻ культурой – $5,1 \pm (4,6 \div 5,2)$ и $9,7 \pm (8,7 \div 21,6)$ соответственно, $p = 0,021$. При этом в популяции CD8⁺ лимфоцитов, стимулированных aCD3, к 72 часам инкубации $8,6 \pm (7,3 \div 11,6)$ значимо снизилось содержание клеток, несущих ранний маркер активации CD69, как относительно 24 часов $23,6 \pm (21,2 \div 31,4)$, $p = 0,012$, так и относительно 48 часов $20,4 \pm (15,7 \div 23,5)$, $p = 0,036$. Указанные изменения у здоровых людей не сопровождались увеличением экспрессии маркера пролиферации Ki-67.

Помимо анализа динамики активационных и пролиферативных маркеров в культурах доноров и пациентов с РА был проведен сравнительный анализ экспрессии указанных маркеров между группами больных и здоровых людей. Сравнительный анализ между группами пациентов с РА и здоровыми людьми по количеству Т-лимфоцитов, экспрессирующих активационные маркеры в зависимости от времени инкубации, выявил более высокие показатели в культурах здоровых людей. Так, через 48 часов в пробе «КА» содержание CD4⁺/CD25⁺/CD69⁺ лимфоцитов у здоровых людей составило $7,1 \pm (6,7 \div 7,6)$, а у пациентов – $4,4 \pm (3,7 \div 4,9)$, $p = 0,008$, а в пробе «aCD3» содержание CD8⁺/CD25⁺/CD69⁺ у здоровых людей равнялось $20,4 \pm (15,7 \div 23,5)$, в то время как у больных РА $10,6 \pm (6,7 \div 19,9)$, $p = 0,05$. Аналогичные закономерности были установлены и через 72 часа сокультивирования, в частности в пробе «КА» содержание CD4⁺/CD25⁺/CD69⁺ лимфоцитов составило $9,9 \pm (6,9 \div 11,3)$ и $3,2 \pm (3,1 \div 3,9)$, $p = 0,012$, а в пробе «Деха супер.» эта же клеточная популяция составила $8,3 \pm (4,1 \div 9,3)$ и $2,5 \pm (1,4 \div 3,2)$, $p = 0,021$ соответственно. В то же время содержание клеток, несущих маркер пролиферации Ki-67, было значимо выше в культуре пациентов с РА. При этом, если через 24 часа в пробах «К» и «КА супер.» на уровне выраженной тенденции, то через 48 часов достоверно в популяции CD8⁺ (рис. 1А), а через 72 часа среди CD4⁺ лимфоцитов в пробе «Деха супер.» (рис. 1Б).

А (A)



Б (B)

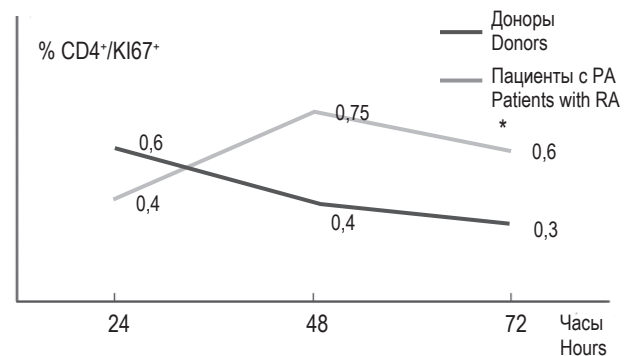


Рисунок 1. Содержание Ki-67⁺ лимфоцитов в культурах после переноса супернатанта от Деха-стимулированных индуцированных в апоптоз клеток

Примечание. А – CD8⁺ клетки. Б – CD4⁺ клетки. n = 12, единицы измерения – %; 24, 48, 72 часа – время инкубации; * – p ≤ 0,05.

Figure 1. Proportion of Ki-67⁺ lymphocytes in cultures after transfer of supernatant of Dexa-stimulated apoptosis-induced cells

Note. A – CD8⁺ cells. B – CD4⁺ cells. n = 12; measure units – %; 24, 48, 72 hours – time of incubation; *, p ≤ 0.05.

Обсуждение

Проведенное исследование является закономерным продолжением нашей работы, посвященной изучению процессов апоптоза при РА. Исходно основанием для исследования послужили данные о нарушении программированной гибели мононуклеарных клеток периферической крови, приводящие к формированию аутоиммунного воспаления у пациентов с ревматоидным артритом вследствие нарушения процесса выбраковки аутоспецифичных клонов лимфоцитов [1, 8].

Как известно, синовиальные клетки больных РА состоят из двух функционально отличимых субпопуляций: пролиферирующие и апоптотические клетки [2]. Нами была разработана модель, по нашему мнению, наиболее приближенная к процессам, происходящим в суставах, – совместное культивирование Т-лимфоцитов, предварительно подвергнутых наиболее физиологичному варианту активационного апоптоза (инкубации в условиях скученности и обеднения культуральной среды) и аутологичных клеток, пролиферирующих в полной культуральной среде. В дальнейшем наша модель стала именоваться «клеточное соседство» (название было позаимствовано из публикации Kawamoto Y. и соавт.) [24].

Созданию модели способствовала возможность изучения функций «апоптотирующих» и «пролиферирующих» аутологичных клеток в одной культуре в процессе сокультивирования, поскольку «вторично-индуцированные» в апоптоз клетки были предварительно окрашены флуоресцентным красителем CFSE (CFSE⁻ и CFSE⁺

культуры, соответственно). Применение указанной модели позволило выявить некоторые новые закономерности. Поскольку полученные в данном исследовании результаты являются логическим продолжением начатой работы, мы сочли возможным вернуться к общим положениям опубликованных ранее данных. Во-первых, ранее была установлена возможность вторичной индукции раннего и позднего апоптоза клеток с помощью гуморальных и клеточных компонентов аутологичной культуры, подвергнутой активационному апоптозу. Определены особенности апоптоза в не стимулированных, а также aCD3- и дексаметазон-стимулированных культурах относительно контролей в группах здоровых и больных людей. При этом не было выявлено значимых различий по параметрам апоптоза во всех исследуемых вариантах культур между пациентами с РА и здоровыми людьми аналогичного пола и возраста. Тем не менее качественный анализ динамики процессов активационного апоптоза Т-лимфоцитов в группах здоровых людей и пациентов с РА свидетельствовал о существовании групповых особенностей в характере ответа на неблагоприятные условия, дополнительную активацию aCD3 пролиферативными стимулами и влияние высоких доз дексаметазона. Учитывая важную роль пролиферации в поддержании клеточного гомеостаза, мы проанализировали соотношение апоптотирующих и живых клеток в исследуемых культурах доноров и пациентов с РА. В результате было установлено значимое повышение живых клеток в CFSE⁻ культуре больных РА относительно доноров.

Полученные результаты свидетельствовали о необходимости изучения функционального состояния первично- и вторично- индуцированных в апоптоз Т-лимфоцитов. Поэтому на данном этапе работы мы определяли экспрессию маркеров активации ($CD69^+$, $CD25^+$) и пролиферации (Ki-67) CFSE⁺ Т-лимфоцитов, находящихся *in vitro* в условиях «клеточного соседства» с CFSE⁻ клетками, у пациентов с РА и здоровых людей.

В наших экспериментах была использована возможность раздельного переноса апоптотирующих клеток и супернатантов от этих культур к аутологичным лимфоцитам с целью предварительной дифференциации клеточных (контактных) и гуморальных (растворимых) факторов, вызывающих возможные неавтономные эффекты в процессе индукции апоптоза. Кроме того, мы применяли 2 варианта контролей — проба «К» — клетки, находившиеся в течение 7 дней в ПКС (на 4 сутки объем пробы доводился до 1 мл ПКС) и проба «КА», в которой к «нормально пролиферирующим» клеткам переносились клетки и супернатант от не стимулированной «апоптотической» культуры. Были также использованы клетки и супернатанты от проб, стимулированных $aCD3$ и дексаметазоном. В процессе подготовки экспериментов был проведен подбор оптимальной дозы дексаметазона, вызывающей апоптоз.

В научной литературе активация Т-лимфоцитов активно обсуждается с позиций физиологической и иммунопатологической модуляции активности иммунного ответа. На основании исследований *in vitro* в настоящее время маркеры активации Т-лимфоцитов классифицированы как очень ранние ($CD69$), ранние ($CD25$) и поздние (HLA-DR) в зависимости от времени их экспрессии после активации [32] $CD69$ (другие названия — activation inducer molecule, AIM; early activation antigen, EA-1) — трансмембранный белок типа I. Этот белок вовлечен в ранние механизмы активации Т-клеток, NK-, В-клеток, моноцитов и тромбоцитов. $CD69$ экспрессируется в повышенных количествах на Т-клетках из воспалительных инфильтратов при ревматоидном артрите, вирусных гепатитах, аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы.

Поскольку известно, что $CD69$ не экспрессируется на покоящихся лимфоцитах периферической крови, появляясь в течение 3 часов после антигенной стимуляции и достигая максимальной экспрессии между 18 и 24 часами [42], первой фиксированной точкой определения экспрессии активационных маркеров мы выбрали 24 часа от начала сокультивирования CFSE⁻ и CFSE⁺ культур. В процессе анализа было установлено преимущественное снижение числа Т-

лимфоцитов, экспрессирующих $CD69^+$ и клеток с двойной экспрессией — $CD25^+/CD69^+$ через 48 часов со культивирования. Полученная закономерность проявилась изменением содержания $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов, экспрессирующих активационные маркеры во всех исследуемых пробах при переносе и клеток, и супернатантов от этих культур, кроме пробы Dexa, как у здоровых людей, так и пациентов с РА. Как правило, в крови здоровых лиц обнаруживается не более чем 1-4% $CD4^+CD69^+$ Т-клеток [42], В наших исследованиях экспрессия $CD69$ на Т-лимфоцитах, пролиферирующих в ПКС, после переноса к ним апоптотирующих клеток и супернатантов от этих культур превышала указанные показатели, в частности, в пробах, стимулированных $aCD3$.

Как известно, пролиферация и апоптоз взаимосвязаны — наиболее интенсивно апоптоз реализуется в процессе дифференцировки лимфоцитов. Покоящиеся зрелые клетки апоптозу не подвержены, они становятся чувствительными к индукции апоптоза после активации [3]. В связи с этим, наиболее интересным результатом при определении экспрессии маркеров активации в апоптотической культуре является выявленная нами динамика активационных маркеров в нестимулированных культурах у пациентов с РА, что является косвенным подтверждением хронической воспалительной активации Т-лимфоцитов у пациентов [44]. Экспрессия указанных маркеров у здоровых людей была выявлена только после дополнительной стимуляции антителами к $CD3$ и дексаметазоном.

Молекула $CD25$ — α -цепь рецептора к IL-2. Повышение количества $CD25^+$ -лимфоцитов свидетельствует о воспалительном процессе любой этиологии, в том числе и аутоиммунной [45]. В работе [6] в ПК здоровых доноров количество $CD4^+$ Т-лимфоцитов, экспрессирующих на своей мембране активационную молекулу $CD25$, составило $3,19 \pm 0,5\%$. У пациентов с РА — $1,6 \pm 0,3\%$ ($p < 0,05$) Авторы связывают это понижение с истощением популяции при хроническом воспалении и постоянной активацией иммунной системы. В экспериментальной модели повреждения печени было показано, что содержание $CD69^+$ снижается, а количество $CD25^+$ лимфоцитов повышается в течение 3-6-12 часов после стимуляции повреждающим фактором — Con-A [22]. А в работе Motamedi M. и соавт. была определена кинетика указанных маркеров активации — повышение к 24 часам и снижение к 72 инкубации [33].

В наших исследованиях в группах здоровых людей и пациентов с РА значимое снижение числа «НП» CFSE⁺ клеток, несущих молекулу $CD69$, происходило преимущественно через 48 часов, а число лимфоцитов, экспрессирующих молекулу

CD25, повышалось через 48 и 72 часа после переноса к ним CFSE⁻ клеток, подвергнутых апоптозу. При этом перенос супернатанта от CFSE⁻ культур, стимулированных дексаметазоном, выявил более низкие параметры медианы CD4⁺/CD69⁺ к 72 часам совместного культивирования относительно 24 часов.

Полученные результаты свидетельствовали о том, что, во-первых, не только непосредственный контакт с апоптотизирующими клетками вызывает повышение экспрессии маркеров активации с дальнейшим снижением уровней, динамика которых подтверждается в других исследованиях, но и, во-вторых, о том, что эффекторные молекулы, провоцирующие эти процессы, могут быть растворимыми. Результаты были получены, как в пробах больных, так и здоровых людей, у которых показатели активации были выше, чем у пациентов с РА, что в любом случае свидетельствует о неавтономных эффектах апоптоза, воспроизводимых в процессе со культивирования независимо от наличия или отсутствия аутоиммунного заболевания.

Использование в нашей работе дексаметазона — синтетического глюкокортикоида (ГС) — было обусловлено его значимой ролью в механизмах апоптоза. Апоптоз клеток, вызванный влиянием глюкокортикоидов, реализуется через митохондриальный путь [11]. Глюкокортикоиды действуют через внутриклеточный глюкокортикоидный рецептор (GR), который экспрессируется большинством ядродержащих клеток и способен вызывать широкий спектр эффектов через трансактивацию и трансрепрессию, регулируя экспрессию генов-мишеней. Помимо геномных механизмов, ГС также вызывают быстрые эффекты, опосредованные через клеточную мембрану, посредством регуляции сигнальных путей. ГС могут влиять как на врожденный, так и на адаптивный иммунитет [28].

В настоящее время установлено, что субпопуляции Т-лимфоцитов демонстрируют различную чувствительность к ГС [12].

Эффекты ГС на Т-лимфоциты включают индукцию апоптоза и подавление продукции цитокинов, участие в дифференцировке Т-хелперных (Th) клеток и влияние на структуру цитокинов, регулирующих дифференцировку подмножеств Т-клеток, а также подавление секреции цитокинов Th типа 2 Т-клетками человека [15].

Дексаметазон вмешивается не только в процессы апоптоза, но и в процессы аутофагии, в частности дексаметазон-индуцированная аутофагия защищает клетки мениска от дексаметазон-индуцированного апоптоза с помощью сигналов рецептора к инозитолтрифосфату [41].

Глюкокортикоиды влияют на различные подгруппы Т-клеток, вызывая, как правило, иммуносупрессивные эффекты,

В исследовании, посвященном изучению Т-клеток селезенки при лечении дексаметазоном в мышинной модели, было установлено зависимое от дозы снижение CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD44⁺ и CD8⁺/CD122⁺Т-клеток, но стимулирующее действие на CD4⁺/CD25⁺ регуляторные Т-клетки [15].

В экспериментальной работе *in vitro* лимфоциты периферической крови крупного рогатого скота (CD25^{hi}, CD25^{lo} и CD25⁻ WC1⁺ γδ Т-клетки) обрабатывались ГС в концентрациях, отражающих их уровни в плазме, достигнутые *in vivo*, от терапевтических доз (дексаметазон 1×10^{-7} М). Было установлено, что процентное содержание и абсолютное количество клеток CD25^{hi} WC1⁺ и CD25^{lo} WC1⁺ увеличивалось в присутствии дексаметазона. По мнению авторов, этот эффект был, по крайней мере частично, обусловлен более низкой смертностью этих клеток, чей апоптоз был подавлен воздействием дексаметазона [29].

На предыдущем этапе работы нами также было установлено увеличение числа живых Т-лимфоцитов у пациентов с РА в культурах, стимулированных дексаметазоном (1×10^{-4} М) и подвергнутых апоптозу. Мы склонились к выводу о другом, неавтономном механизме пролиферации, приводящему к увеличению живых клеток, поскольку уровень апоптоза в данных пробах у пациентов с РА не отличался от показателей аналогичных проб здоровых людей. В то же время в группе доноров количество живых клеток не увеличилось.

Отсутствие активирующего эффекта апоптотических клеток, стимулированных дексаметазоном (проба Деха) и вместе с тем выявленное влияние супернатанта от данной культуры (проба «Деха супернатант») является важным результатом, полученным после стимуляции апоптоза высокой дозой дексаметазона. Эти данные могут свидетельствовать об отсутствии контактного механизма активации и о наличии растворимых стимулирующих структур. Известно, что противоспалительный эффект дексаметазона обусловлен стимуляцией продукции IL-10 [28]. Возможно, именно этим обусловлено полученное нами снижение медианы стимулированных Деха CD4⁺/CD25⁺ лимфоцитов к 72 часам инкубации у пациентов с РА. В то же время в уже упоминаемой работе [29] процент клеток, продуцирующих IFN γ , увеличивался в присутствии дексаметазона, тогда как количество клеток, секретирующих ключевой противовоспалительный и иммуносупрессивный цитокин IL-10, снижалось. В любом случае, полученный результат позволяет сузить

дальнейший поиск эффекторных молекул иммунных дисфункций.

Ключевые различия между исследуемыми группами здоровых людей и пациентов с РА в проведенных экспериментах заключались в значимом повышении клеток, несущих маркер Ki-67 на Т-лимфоцитах пациентов с РА, экспрессия которого свидетельствует о запуске пролиферации. Известно, что цикл пролиферации клеток разделяют на две основные точки (checkpoints) S и M и две подготовительные точки – G1 и G2. Во время G1 и G2 фаз происходит синтез клеточных белков, необходимых для осуществления соответствующей фазы клеточного деления. S точка определяется как момент репликации ДНК, а в точке M полностью дублированные хромосомы разделяются в ядрах каждой из двух дочерних клеток во время митоза [13].

Активация Т-клеток представляет собой жестко регулируемый каскад событий, которые приводят к индукции цитокинов и экспрессии молекул активации, что в конечном итоге приводит к дивергентным иммунным ответам [33]. Молекула Ki-67 является универсальным маркером пролиферации, что обусловлено ее присутствием в клетке только во время процесса деления – она обнаруживается в ядрах клеток во все активные фазы клеточного цикла: G1, S, G2, M и разрушается в течение 1,5-2 часов после окончания митоза [33].

Поскольку Ki-67 является универсальным маркером для оценки пролиферативного потенциала, и прогноз пациентов может быть точно предсказан, данный маркер является сигнальной молекулой для диагностики, лечения и основой для прогноза исхода опухолей [30].

В работе [33] была оценена кинетика маркеров активации Т-клеток (CD4⁺ и CD8⁺), таких как CD25, CD38, CD69, CD71 и Ki-67, после стимуляции анти-CD3/CD28. Данные показали, что кинетика экспрессии этих маркеров следует точному и последовательному времени. Так, процент Т-клеток человека, экспрессирующих CD69 и CD25, при стимуляции достигал максимума в течение 24 часов и более высокий процент клеток, коэкспрессирующих CD71 и Ki-67, был очевиден для CD8⁺Т-клеток по сравнению с CD4⁺Т-клетками через 24 часа стимуляции. После 72 ч все протестированные маркеры активации оставались на максимальных уровнях, но процент клеток, экспрессирующих CD69, был значительно снижен в Т-лимфоцитах. В нашем исследовании CD8⁺Т-лимфоциты чаще отвечали на стимуляцию и экспрессировали маркер пролиферации. Возможно, это связано с преимущественно Th1 обусловленностью хронического воспалительно-

го процесса при РА, функциональным истощением данной клеточной популяции.

Полученные нами на данном этапе исследования результаты свидетельствуют о том, что выраженная в процессе индукции апоптоза экспрессия активационных маркеров на Т-лимфоцитах периферической крови здоровых людей, в отличие от пациентов с РА, не приводит к запуску процессов пролиферации. В свою очередь это может свидетельствовать о различиях в механизмах активации и о различных эффекторных молекулах, принимающих участие в автономных и неавтономных процессах апоптоза у здоровых людей и пациентов с РА. Неизвестный на данном этапе механизм неавтономного влияния апоптоза может лежать в основе избыточной пролиферации синовиоцитов, являющийся базисным проявлением патогенеза РА.

В связи с несомненной важностью изучения влияния апоптоза на особенности процессов восстановления клеточной популяции, мы приводим основные из известных на настоящее время механизмов его неавтономного влияния. Поскольку в предложенной нами модели не исключены другие варианты гибели клеток, мы обращаемся также к данным о влиянии аутофагии и некроза не только в «обсуждении», но и во «введении».

В настоящее время известно, что процессы апоптоза оказывают неавтономное воздействие на соседние клетки, включающее в себя влияние на пролиферацию, миграцию, морфологию, а также гибель клеток в окружающих тканях и морфогенетические изменения клеточного сообщества [19, 24].

По литературным данным, существует несколько ключевых механизмов, посредством которых апоптотирующие клетки могут неавтономно оказывать влияние на окружение: во-первых, механическое воздействие [16, 36].

Проведение экспериментов в условиях «клеточного соседства», при котором клетки крови (диффузной ткани) были подвергнуты апоптозу в условиях скученности и обеднения питательной среды, усиливающих межклеточный контакт и механическое давление, позволяет предположить возможным наличие данного механизма неавтономного влияния апоптоза. Данный вариант особенно возможен после трансплантации aCD3-стимулированных лимфоцитов, при котором происходит наиболее выраженная пролиферация. Логично также предположить, что увеличение числа живых клеток в CFSE⁻ культуре, в которой были созданы условия максимального механического давления, является закономерным. Механическое давление и апоптоз тесно связаны между собой в клеточном сообществе

служат морфогенетическим регулятором гомеостатического механизма. Предполагается, что указанное усиление давления индуцирует апоптотическую гибель клеток в культуре эпителиальных клеток млекопитающих посредством активации p53 [14]. В условиях полярно-дефицитной конкуренции клеток механическое напряжение активизирует регулятор цитоскелета ROCK, что приводит к повышению активности p53 через активацию p38 [14].

К клеточным, контактными механизмам неавтономного влияния апоптотирующих клеток можно отнести участие фосфатидилсерина. Известно, что экстернализация анионного фосфолипидного фосфатидилсерина (PS) контролируется фосфолипидными транслоказами и скрамблазами, а его экспозиция на апоптотических клетках является маркером раннего апоптоза. Вместе с тем появляются свидетельства того, что экспозиция PS происходит не только при других формах гибели клеток, включая некроз, но она также является важным сигналом «съешь меня» для фагоцитов и может действовать как сигнал «спаси меня», в частности во время регенерации аксонов [26].

Экспериментально доказано, что апоптоз-индуцированная пролиферация функционирует в качестве основы для регенерации органов. Несколько факторов, обнаруженных в этой экспериментальной системе, играют важную роль в регенерирующих процессах. Секреторные белки из апоптотических клеток запускают пролиферацию клеток и их соседей, и хотя эти белки отличаются между организмами, Wnt, Notch, FGF, TGF- β , и производство простагландина E2 (ПЭГ2), были идентифицированы в качестве кандидатов. В целом, эти сообщения поддерживают идею о том, что компенсационная пролиферация инициируется секреторными факторами из апоптотических клеток и усиливает значимость активного участия апоптоза в регенерации ткани [24]. В то же время тесная связь между пролиферацией и апоптозом может быть двунаправленной, и, действительно, апоптоз не автономно может индуцироваться пролиферирующими клетками. Одним из самых известных примеров является конкурентное клеточное взаимодействие, в котором медленно растущие клетки устраняются быстро растущими клетками [24].

Недавние исследования показали, что каспазы, известные своей ролью в апоптозе, помимо летальных функций, также обладают митогенными функциями. Каспазы могут способствовать пролиферации посредством регуляции клеточного цикла, а также посредством индукции секретуемых сигналов, которые оказывают влияние на соседние ткани [37].

В последние годы активно изучается роль микровезикул в процессе межклеточного взаимодействия. Так, при изучении роли miR-20a в регуляции пролиферации фибробластоподобных синовиоцитов и апоптозе при ревматоидном артрите было установлено, что экспрессия miR-20a была снижена в синовиальной ткани пациентов с РА с повышенным уровнем STAT3. Подавление miR-20a способствовало экспрессии STAT3, p-STAT3 и Bcl-2, облегчало пролиферацию клеток FLS, уменьшало апоптоз и, таким образом, играло критическую роль в РА. Сходные результаты были получены при исследовании роли и MicroRNA-29a и микровезикул, несущих церамид C24:1 [25, 27, 46]. Несомненно, важным фактором своевременной элиминации апоптотировавших клеток является эффективная работа фагоцитарной системы – избирательность, скорость и безопасность их удаления в процессе фагоцитоза [34]. Проведенное исследование позволяет полностью согласиться с высказыванием авторов работы [33]: «Анализ качественного и количественного характера активации Т-клеток в различных иммунологических условиях, "при апоптозе" дает ценную информацию об иммунных реакциях, опосредованных различными агентами, способствующую разработке более эффективных методов прогнозирования, мониторинга и лечения заболевания».

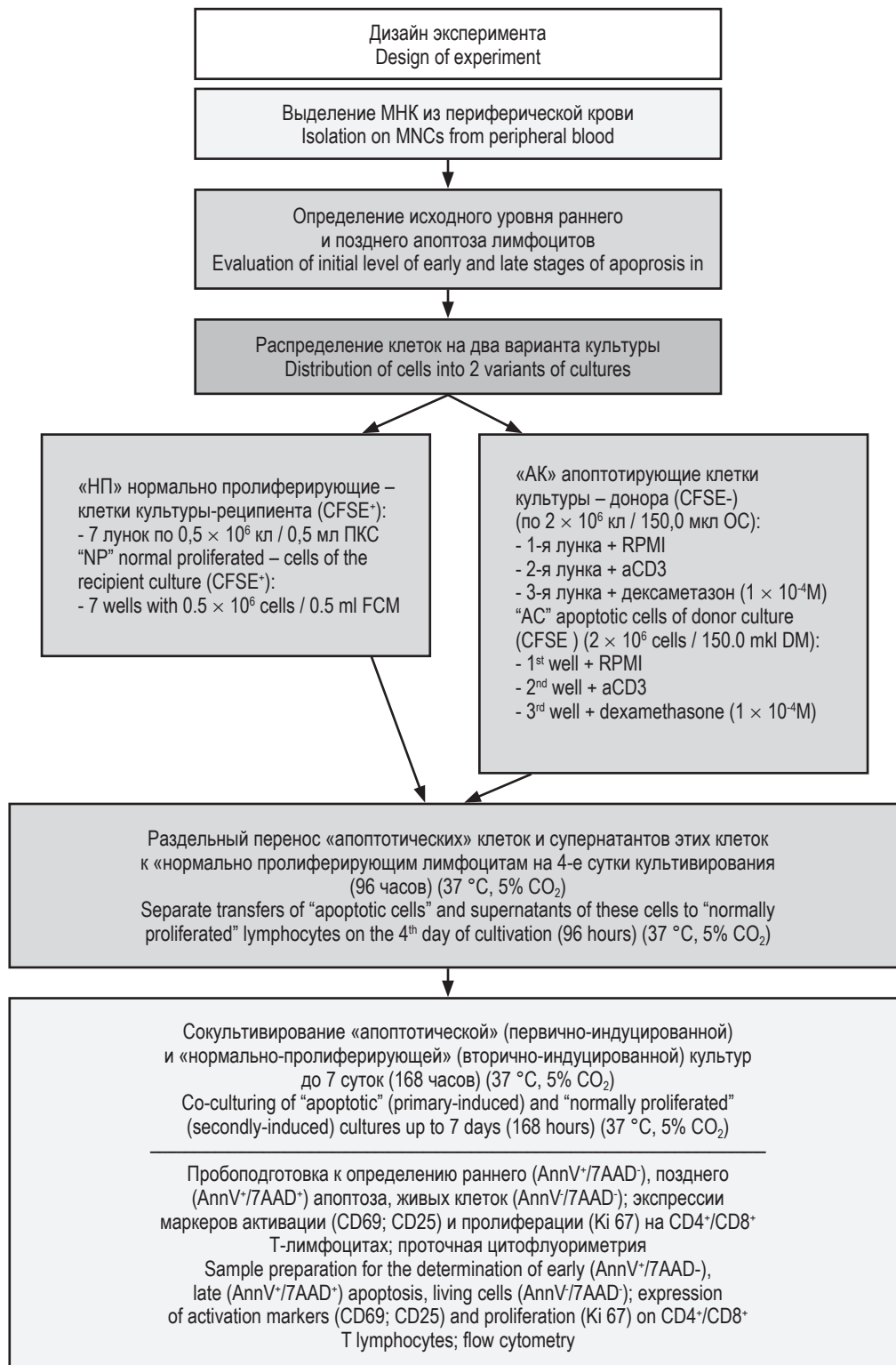
Таким образом, применение модели «клеточного соседства», в которой совместно культивировались клеточные и гуморальные компоненты CFSE⁻ культуры, подвергнутой наиболее физиологичному варианту активационного апоптоза (инкубации в условиях скученности и обеднения культуральной среды) и аутологичные CFSE⁺ клетки, пролиферирующие в полной культуральной среде, выявило на Т-лимфоцитах CFSE⁺ культуры более высокие параметры активации CD25⁺ и CD69⁺ и более низкие маркеры пролиферации Ki-67⁺ у здоровых людей относительно пациентов. В отличие от здоровых людей, у пациентов с РА установлено значимое повышение экспрессии Ki-67 на Т-лимфоцитах в динамике совместного культивирования CFSE⁻ и CFSE⁺ культур.

Увеличение числа живых клеток в апоптотических культурах больных РА относительно показателей здоровых людей на фоне отсутствия значимых различий по параметрам апоптоза и динамики активационных маркеров, а также характер изменений содержания клеток несущих Ki-67 свидетельствует о вкладе неавтономных эффектов апоптоза в клеточный гомеостаз у пациентов с РА.

ТАБЛИЦА 4. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ (РА)

TABLE 4. CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS (RA)

№	Возраст Age	Диагноз Diagnosis	Длительность Duration of the disease	Лечение Treatment
1	48	РА, поздняя стадия, активность умеренная, DAS28 3.09, эрозивный III-VI, стадия, ФКII RA, late stage, moderate activity, DAS28 3.09, erosive III-VI stage, functional class (FC) II	> 19 лет > 19 years	Замена Сульфасалазина на Метотрексат 10 мг 1 р/нед. Replacing Sulfasalazine with Methotrexate 10 mg 1/week
2	66	РА, развернутая стадия, активность высокая DAS 28 5,76, аСРР (-), МСВ (-), Rg I ст., ФК II RA, extended stage, high activity, DAS28 5.76, aCCP (-), MCV (-), Rg I stage, FC II	> 13 лет > 13 years	Метотрексат 10 мг/нед., преднизолон 5 мг в сутки Methotrexate 10 mg/week, prednisolone 5 mg per day
3	63	РА, развернутая стадия, активность высокая, DAS28-5,2, АЦЦП (+), Rg II ст., эрозивный, ФКII RA, extended stage, high activity, DAS28 5.2, aCCP (+), Rg II stage, erosive, FC II	< 14 лет < 14 years	Метотрексат 15 мг/нед. пульс-терапия препаратом Солумедрол 500 мг в/в кап № 3 Methotrexate 15 mg/week pulse therapy with Solumedrol 500 mg intravenous drip N3
4	49	РА, развернутая стадия, активность умеренная (DAS28 – 3,74), АЦЦП (+), (Rg-II) неэрозивный, ФК-II RA, extended stage, moderate activity, DAS28 3.74, aCCP (+), Rg II stage, nonerosive, FC II	< 20 лет < 20 years	Арава 20 мг Arava 20 mg
5	56	РА, развернутая стадия, активность высокая (DAS 28 = 6,4), Rg III, эрозивный, ФКII RA, extended stage, high activity, DAS28 6.4, Rg III stage, erosive, FC II	< 8 лет < 8 years	Метилпреднизолон 500 мг в/в кап. № 3 Метотрексат 20 мг Methylprednisolone 500 mg intravenous drip N3, Methotrexate 20 mg
6	65	РА, развернутая стадия, активность умеренная (DAS28 = 4,88) с системными проявлениями (в анамнезе анемия, полинейропатия), RIII, эрозивный, ФКIII RA, extended stage, moderate activity, DAS28 4.88, with systemic manifestations (anemia, polyneuropathy), Rg III stage, erosive, FC III	> 13 лет > 13 years	Метотрексат, Ацеллбия 500 мг в/в капельно Methotrexate, Acellbia 500 mg intravenous drip

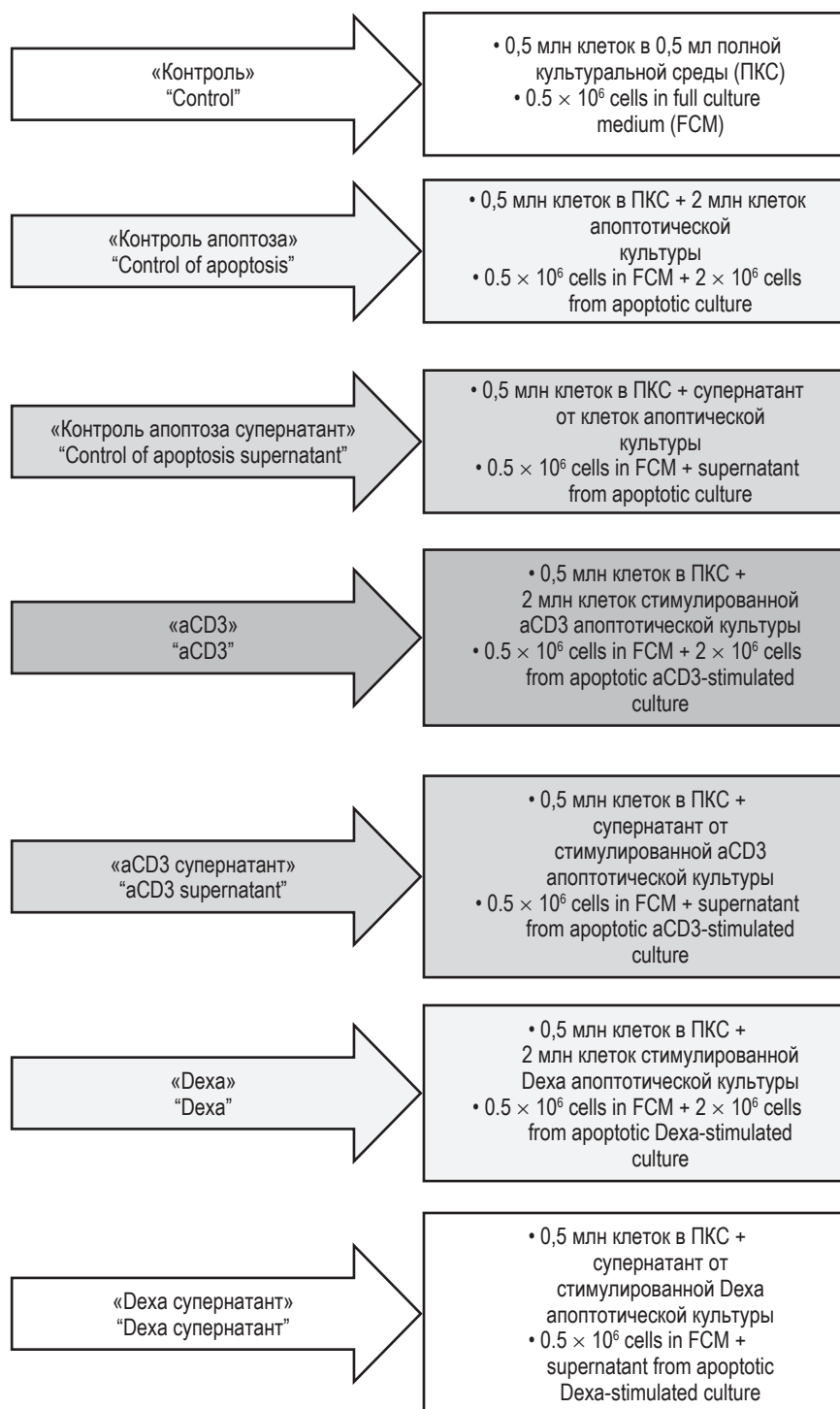


Примечание. «НП» – нормально пролиферирующая культура клеток (CFSE⁺); «АК» – апоптотическая культура клеток (CFSE⁻); «ПКС» – полная культуральная среда; «ОС» – обедненная среда; (CFSE⁻) – клетки культуры-донора; (CFSE⁺) – клетки культуры-реципиента

Note. “NP”, normally proliferated cell culture (CFSE⁺); “AC”, apoptotic cell culture (CFSE⁻); “FCM”, full culture medium; “DM”, depleted culture medium; (CFSE⁻), cells of the donor-culture; (CFSE⁺), cells of the recipient-culture.

НОМИНАЛЬНЫЕ НАЗВАНИЯ СОВМЕСТНО КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРОБ КЛЕТОК ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ В ПОЛНОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ (НП) И АУТОЛОГИЧНЫХ АПОПТОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК (АК)

NOMINAL NAMES OF CO-CULTURED SAMPLES OF CELLS, PROLIFERATED IN A FULL CULTURE MEDIUM (NP), AND AUTOLOGOUS APOPTOTIC CELLS (AC)



Примечание. Объемы переносимых клеток и супернатантов были доведены ПКС до равных объемов – 0,5 мл.

Note. The volumes of transferred cells and supernatants were equalized by FCM to 0.5 ml.

Список литературы / References

1. Арефьева А.С. Роль апоптоза в развитии системных аутоиммунных заболеваний // Иммунология, 2014. Т. 35, № 2. С. 103-107. [Arefyeva A.S. Role of apoptosis in the development of systemic autoimmune diseases. *Immunologiya = Immunology*, 2014, Vol. 35, no 2, pp 103-107. (In Russ.)].
2. Богданов А.Н., Камилова Т.А., Цыган В.Н., Цыган Е.Н. Роль апоптоза в патогенезе ревматоидного артрита (сообщение 2) // Научно-практическая ревматология, 2006. № 1. С. 40-48. [Bogdanov A.N., Kamilova T.A., Tsygan V.N., Tsygan E.N. The role of apoptosis in pathogenesis of rheumatoid arthritis report. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2006, no. 1, pp. 40-48. (In Russ.)]
3. Боровкова Н.В., Александрова И.В., Валетова В.В., Кобзева Е.Н. Апоптоз лимфоцитов крови в норме и при патологии // Молекулярная медицина, 2013. № 4. С. 41-45. [Borovkova N.V., Aleksandrova I.V., Valetova V.V., Kobzeva E.N. Blood lymphocyte apoptosis in norm and pathology. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2013, no. 4, pp. 41-45. (In Russ.)]
4. Гомзикова М.О., Гайфуллина Р.Ф., Мустафин И.Г., Чернов В.М., Мифтахова З.Р., Галявич А.С., Ризванов А.А. Мембранные микровезикулы: биологические свойства и участие в патогенезе заболеваний // Гены и Клетки, 2013. Т. 8, № 1. С. 6-11. [Gomzikova M.O., Gaifullina R.F., Mustafin I.G., Chernov V.M., Miftahova Z.R., Galyavich A.S., Rizvanov A.A. Membrane microvesicles: biological properties and involvement in pathogenesis of diseases. *Geny i Kletki = Genes and Cells*, 2013, Vol. 8, no. 1, pp. 6-11. (In Russ.)]
5. Ковалева О.В., Шитова М.С., Зборовская И.Б. Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания // Клиническая онкогематология, 2014. Т. 7, № 2. С. 103-113. [Kovaleva O.V., Shitova M.S., Zborovskaya I.B. Autophagy: cell death or survival strategy? *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology*, 2014, Vol. 7, no. 2, pp. 103-113. (In Russ.)]
6. Костоломова Е.Г., Суховой Ю.Г., Унгер И.Г., Акунеева Т.В., Кривоносова О.А., Зенкова Т.В., Макеева О.В., Швец О.Ю. Цитометрический анализ экспрессии маркеров активации на CD4 Т-лимфоцитах при ревматоидном артрите // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 2. С. 332-334. [Kostolomova E.G., Sukhovei Yu.G., Unger I.G., Akuneeva T.V., Korotkevich O.A., Zenkova T.V., Makeeva O.V., Shvets O.Yu. Flow cytometric analysis expression markers of activation on CD4 T-lymphocytes at rheumatoid arthritis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, Vol. 13 (22), no. 2, pp. 332-334. (In Russ.)]
7. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Кайгородова Е.В., Гончаров А.Г. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 1. С. 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. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 7-26. (In Russ.)]. doi:10.15789/1563-0625-2014-1-7-26.
8. Панафидина Т.А., Кондратьева Л.В., Герасимова Е.В. Коморбидность при ревматоидном артрите // Научно-практическая ревматология, 2014. Т. 52, № 3. С. 283-289. [Panafidina T.A., Kondratyeva L.V., Gerasimova E.V., Novikova D.S., Popkova T.V. Comorbidity in rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2014, Vol. 52, no. 3, pp. 283-289. (In Russ.)]
9. Фомченко Н.Е., Воропаев Е.В. Биологические аспекты апоптоза (обзор литературы) // Проблемы здоровья и экологии, 2013. Т. 35, № 1. С. 39-45. [Fomchenko N.E., Voropayev E.V. Biological aspects of apoptosis (literature review). *Problemy zdorovya i ekologii = Problems of Health and Ecology*, 2013, Vol. 35, no. 1, pp. 39-45. (In Russ.)]
10. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. Цитометрический анализ в клинической иммунологии. Екатеринбург: УрО РАН, 2011. 220 с. [Khaydukov S.V., Zurochka A.V., Chereshevnev V.A. Cytometric analysis in the clinical immunology]. Ekaterinburg: Ural Branch, Russian Academy of Sciences. 2011, 220 p.
11. Чубарова С.В., Чернова И.А., Крапошина А.Ю., Соловьева И.А., Демко И.В., Салмина А.Б., Малиновская Н.А. Апоптоз лимфоцитов периферической крови при бронхиальной астме различной степени тяжести // Бюллетень физиологии и патологии дыхания, 2013. № 48. С. 28-32. [Chubarova S.V., Chernova I.A., Kraposhina A.Yu., Solovyeva I.A., Demko I.V., Salmina A.B., Malinovskaya N.A. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes at bronchial asthma of a different severity degree. *Byulleten fiziologii i patologii dykhaniya = Bulletin of Respiratory Physiology and Pathology*, 2013, no. 48, pp. 28-32. (In Russ.)]
12. Banuelos J., Shin S., Cao Y., Bochner B.S., Morales-Nebreda L., Budinger G.R., Zhou L., Li S., Xin J., Lingen M.W., Dong C., Schleimer R.P., Lu N.Z. BCL-2 protects human and mouse Th17 cells from glucocorticoid-induced apoptosis. *Allergy*, 2016, Vol. 71, no. 5, pp. 640-650.
13. Bussari S., Jeergal P.A., Sarode M., Namazi N.A., Kulkarni P.G., Deshmukh A., Kulkarni D. Evaluation of proliferative marker Ki-67 in adenoid cystic carcinoma: A retrospective study. *J. Contemp. Dent. Pract.*, 2019, Vol. 20, no. 2, pp. 211-215.
14. Cao Y., Liu J. Impaired apoptosis of peripheral blood CD4⁺ T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2015, Vol. 31, no. 5, pp. 682-685.
15. Chen L., Jondal M., Yakimchuk K. Regulatory effects of dexamethasone on NK and T cell immunity. *Inflammopharmacology*, 2018, Vol. 26, no. 5, pp. 1331-1338.

16. Eroglu M., Derry W.B. Your neighbours matter – non-autonomous control of apoptosis in development and disease. *Cell Death Differ.*, 2016, Vol. 23, pp. 1110-1118.
17. Feng F.B., Qiu H.Y. Effects of Artesunate on chondrocyte proliferation, apoptosis and autophagy through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rat models with rheumatoid arthritis. *Biomed. Pharmacother.*, 2018, Vol. 102, pp. 1209-1220.
18. Filková M., Jüngel A., Gay R.E., Gay S. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy. *BioDrugs*, 2012, Vol. 26, no. 3, pp. 131-141.
19. Fuchs Y., Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 2011, Vol. 147, no. 4, pp. 742-758.
20. Galluzzi L., Pietrocola F., Bravo-SanPedro J.M., Amaravadi R.K., Baehrecke E.H., Cecconi F., Codogno P., Debnath J., Gewirtz D.A., Karantza V., Kimmelman A., Kumar S., Levine B., Maiuri M.C., Martin S.J., Penninger J., Piacentini M., Rubinsztein D.C., Simon H.U., Simonsen A., Thorburn A.M., Velasco G., Ryan K.M., Kroemer G. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.*, 2015, Vol. 34, no. 7, pp. 856-880.
21. Galluzzi L., Vitale I., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., Dawson T.M., Dawson V.L., El-Deiry W.S., Fulda S., Gottlieb E., Green D.R., Hengartner M.O., Kepp O., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Lu X., Madeo F., Malorni W., Mehlen P., Nuñez G., Peter M.E., Piacentini M., Rubinsztein D.C., Shi Y., Simon H. U., Vandenabeele P., White E., Yuan J., Zhivotovsky B., Melino G., Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.*, 2012, Vol. 19, no. 1, pp. 107-120.
22. Hao X., Liu R., Zhang Y., Li Y., He Q., Huang Y., Jiang Y., Ma J., Li P., Wei H. Glt25d2 knockout directly increases CD25⁺CD69⁻ but decreases CD25⁺CD69⁺ subset proliferation and is involved in concanavalin-induced hepatitis. *Cell Physiol. Biochem.*, 2018, Vol. 50, no. 3, pp. 1186-1200.
23. Huang W., Zhang L., Cheng C., Shan W., Ma R., Yin Z., Zhu C. Parallel comparison of fibroblast-like synoviocytes from the surgically removed hyperplastic synovial tissues of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord.*, 2019, Vol. 20, no. 1, 591. doi: 10.1186/s12891-019-2977-2.
24. Kawamoto Y., Nakajima Y., Kuranaga E. Apoptosis in cellular society: communication between apoptotic cells and their neighbors. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 12, 2144. doi: 10.3390/ijms17122144.
25. Khayrullin A., Krishnan P., Martinez-Nater L., Mendhe B., Fulzele S., Liu Y., Mattison J.A., Hamrick M.W. Very long-chain C24:1 ceramide is increased in serum extracellular vesicles with aging and can induce senescence in bone-derived mesenchymal stem cells. *Cells*, 2019, Vol. 8, no. 1, 37. doi: 10.3390/cells8010037.
26. Klöditz K., Chen Y.Z., Xue D., Fadeel B. Programmed cell clearance: From nematodes to humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2017, Vol. 482, no. 3, pp. 491-497.
27. Liu J., Fei D., Xing J., Du J. MicroRNA-29a inhibits proliferation and induces apoptosis in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by repressing STAT3. *Biomed. Pharmacother.*, 2017, Vol. 96, pp. 173-181.
28. Mann E.H., Gabryšová L., Pfeffer P.E., O'Garra A., Hawrylowicz C.M. High-dose IL-2 skews a glucocorticoid-driven IL-17⁺IL-10⁺ memory CD4⁺ T cell response towards a single IL-10-producing phenotype. *J. Immunol.*, 2019, Vol. 202, no. 3, pp. 684-693.
29. Mašlanka T., Jaroszewski J.J. *In vitro* studies on the influence of dexamethasone and meloxicam on bovine WC1⁺γδ T cells. *Vet. ImmunolImmunopathol.*, 2013, Vol. 151, no. 3-4, pp. 248-262.
30. Menon S.S., Guruvayoorappan C., Sakthivel K.M., Rasmi R.R. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clin. Chim. Acta*, 2019, Vol. 491, pp. 39-45.
31. Mijaljica D., Nazarko T.Y., Brumell J.H., Huang W.P., Komatsu M., Prescott M., Simonsen A., Yamamoto A., Zhang H., Klionsky D.J., Devenish R.J. Receptor protein complexes are in control of autophagy. *Autophagy*, 2012, Vol. 8, no. 11, pp. 1701-1705.
32. Moore T.L. Immune complexes in juvenile idiopathic arthritis. *Front Immunol.*, 2016, Vol. 7, 177. doi: 10.3389/fimmu.2016.00177.
33. Motamedi M., Xu L., Elahi S. Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers. *J. Immunol. Methods*, 2016, Vol. 437, pp. 43-52.
34. Nonaka S., Shiratsuchi A., Nagaosa K., Nakanishi Y. Mechanisms and significance of phagocytic elimination of cells undergoing apoptotic death. *Biol. Pharm. Bull.*, 2017, Vol. 40, no. 11, pp. 1819-1827.
35. Parzych K.R., Klionsky D.J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal.*, 2014, Vol. 20, no. 3, pp. 460-473.
36. Pérez-Garijo A., Steller H. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development*, 2015, Vol. 142, no. 19, pp. 3253-3262.
37. Pérez-Garijo A. When dying is not the end: apoptotic caspases as drivers of proliferation. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2018, Vol. 82, pp. 86-95.
38. Perez-Garijo A., Fuchs Y., Steller H. Apoptotic cells can induce non-autonomous apoptosis through the TNF pathway. *Elife*, 2013, Vol. 2, e01004. doi: 10.7554/eLife.01004.
39. Rajasekhar M., Olsson A.M., Steel K.J., Georgouli M., Ranasinghe U., Brender Read C., Frederiksen K.S., Taams L.S. MicroRNA-155 contributes to enhanced resistance to apoptosis in monocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.*, 2017, Vol. 79, pp. 53-62.

40. Schläfli A.M., Adams O., Galván J.A., Gugger M., Savic S., Bubendorf L., Schmid R.A., Becker K.F., Tschan M.P., Langer R., Berezowska S. Prognostic value of the autophagy markers LC3 and p62/SQSTM1 in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 26, pp. 39544-39555.
41. Shen C., Gu W., Cai G.Q., Peng J.P., Chen X.D. Autophagy protects meniscal cells from glucocorticoids-induced apoptosis via inositol trisphosphate receptor signaling. *Apoptosis*, 2015, Vol. 20, no. 9, pp. 1176-1186.
42. Shipkova M., Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin. Chim. Acta*, 2012, Vol. 413, no. 17-18, pp. 1338-1349.
43. Suzanne M., Steller H. Shaping organisms with apoptosis. *Cell Death Differ.*, 2013, Vol. 20, no. 5, pp. 669-675.
44. Veale D.J., Orr C., Fearon U. Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis. *Semin. Immunopathol.*, 2017, Vol. 39, pp. 343-354.
45. Wieland E., Shipkova M. Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers. *Clin. Biochem.*, 2016, Vol. 49, no. 4-5, pp. 347-354.
46. Wei X.J., Li X.W., Lu J.L., Long Z.X., Liang J.Q., Wei S.B., Lu C.X., Lu W.Z. MiR-20a regulates fibroblast-like synoviocyte proliferation and apoptosis in rheumatoid arthritis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2017, Vol. 21, no. 17, pp. 3886-3893.

Авторы:

Абрамова Т.Я. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии; ассистент кафедры клинической иммунологии, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Блинова Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Гришина Л.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Чумасова О.А. — к.м.н., врач-ревматолог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Сулутьян А.Э. — к.м.н., врач-ревматолог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Сизиков А.Э. — к.м.н., заведующий отделением ревматологии — врач-ревматолог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии, научный консультант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии; заведующий кафедрой клинической иммунологии, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Authors:

Abramova T.Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; Assistant, Department of Clinical Immunology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Blinova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Grishina L.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Chumasova O.A., PhD (Medicine), Clinical Rheumatologist, Immune Pathology Clinic, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sulutyan A.E., PhD (Medicine), Clinical Rheumatologist, Immune Pathology Clinic, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sizikov A.E., PhD (Medicine), Head, Rheumatology Department, Clinical Rheumatologist, Immune Pathology Clinic, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical Immunopathology, Scientific Advisor, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology; Head, Department of Clinical Immunology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 01.04.2020
Отправлена на доработку 23.04.2020
Принята к печати 29.06.2020

Received 01.04.2020
Revision received 23.04.2020
Accepted 29.06.2020