

УДК 616-008.853.2-091.818-092.4:576.5
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-155-163>

Индукция апоптоза лимфоцитов здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом в условиях «клеточного соседства» *in vitro*

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

¹ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)
Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

² Новосибирский государственный медицинский университет (НГМУ)
Россия, 630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

РЕЗЮМЕ

Целью данной работы являлось изучение особенностей апоптоза Т-лимфоцитов в условиях «клеточного соседства» *in vitro* у здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовались образцы крови пациенток с ревматоидным артритом (РА) и здоровых женщин сопоставимого возраста. Нами был разработан протокол, позволивший дифференцированно оценить в «первично» (CFSE⁻) и «вторично» (CFSE⁺) индуцированных в апоптоз культурах Т-лимфоцитов параметры пролиферации, раннего, позднего апоптоза и некроза.

Результаты. Был установлен характер влияния индуцированных в апоптоз в условиях скученности и обеднения культуральной среды клеточных и гуморальных компонентов нестимулированных, аCD3- и дексаметазон-стимулированных клеток на аутологичные лимфоциты, пролиферирующие в физиологических условиях у здоровых людей и пациентов с РА. Сравнительный анализ качественного характера выявил особенности процессов апоптоза Т-лимфоцитов у здоровых и больных людей. Также было определено, что показатели раннего и позднего апоптоза «первично» индуцированной в апоптоз культуры и нормально пролиферирующих клеток после переноса к ним клеточных и гуморальных компонентов апоптогической культуры здоровых людей и пациентов с РА достоверно не различались, ни исходно, ни в динамике культивирования клеток. При этом впервые было установлено значимое повышение содержания живых Т-клеток в «первично» индуцированных, не стимулированных и стимулированных дексаметазоном (1×10^{-4} М) пробах больных относительно аналогичных культур здоровых доноров и отсутствие различий между «вторично» индуцированными культурами и при стимуляции клеток антителами к CD3.

Заключение. Увеличение числа живых клеток в культурах больных РА относительно показателей здоровых людей на фоне отсутствия значимых различий по параметрам активационного апоптоза свидетельствует о вкладе неавтономных эффектов апоптоза в клеточный гомеостаз у пациентов с РА.

Ключевые слова: индукция апоптоза, неавтономные эффекты апоптоза, ревматоидный артрит.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

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

✉ Блинова Елена Андреевна, e-mail: blinovaelena-85@yandex.ru.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом при НИИФКИ (протокол № 107 от 15.06.2018).

Для цитирования: Абрамова Т.Я., Цура В.А., Блинова Е.А., Моренкова А.Ю., Чумасова О.А., Сулутьян А.Э., Сизиков А.Э., Козлов В.А. Индукция апоптоза лимфоцитов здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом в условиях «клеточного соседства» *in vitro*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (1): 155–163. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-155-163>.

УДК 616-008.853.2-091.818-092.4:576.5

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-155-163>

Induction of lymphocyte apoptosis in healthy individuals and patients with rheumatoid arthritis under “cellular neighborhood” *in vitro*

Abramova T.Ya.^{1,2}, Tsura V.A.², Blinova E.A.¹, Morenkova A.Yu.¹,
Chumasova O.A.¹, Sulutian A.E.¹, Sizikov A.E.¹, Kozlov V.A.^{1,2}

¹ *Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI)*
14, Yadrintsevskaya Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation

² *Novosibirsk State Medical University (NSMU)*
52, Krasny Av., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the features of T-lymphocyte apoptosis induced by components of autologous apoptotic cultures *in vitro* in norm and rheumatoid arthritis in the context of «cellular neighborhood».

Materials and methods. Subjects of the study were blood samples of patients with rheumatoid arthritis (RA) and healthy women of comparable age. Developed protocol allowed to differentially evaluate the parameters of proliferation, early and late stages of apoptosis in the «primary» (CFSE⁻) and «secondary» (CFSE⁺) induced apoptotic T-lymphocyte cultures. It was estimated the effect of cellular and humoral components of unstimulated, anti-CD3- and dexamethasone-stimulated cells under the conditions of overcrowding and depleted culture media on autologous lymphocytes, cultured under physiological conditions, in norm and RA.

Results. Comparative qualitative analysis revealed the features of the processes of T-lymphocyte apoptosis in norm and pathology. Also, the parameters of early and late stages of apoptosis of a «primary» induced culture and «secondary» induced cells after transferring the cellular and humoral components of apoptotic cultures did not differ significantly either initially or during culturing in both investigated groups. But it was a significant increase in the amount of living T-cells in «primary»-induced unstimulated and dexamethasone-stimulated RA patients' cultures compared to similar donors' cultures.

Conclusion. There was no difference between stimulated with anti-CD3 antibodies cells and the «secondary» induced cultures. Taking into account the absence of significant differences in the parameters of activation apoptosis, the increased number of living cells in RA patients' cultures relative to donors' is evidence of contribution of non-autonomous apoptosis effects to cellular homeostasis in RA.

Key words: induction of apoptosis, non-autonomous effects of apoptosis, rheumatoid arthritis.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research and the government of Novosibirsk region as part of the research project No. 18-44-540012.

Conformity with the principles of ethics. The study approved by the local ethics committee under Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Protocol No. 107 of 15.06.2018).

For citation: Abramova T.Ya., Tsura V.A., Blinova E.A., Morenkova A.Yu., Chumasova O.A.1, Sulutian A.E., Sizikov A.E., Kozlov V.A. Induction of lymphocyte apoptosis in healthy individuals and patients with rheumatoid arthritis under “cellular neighborhood” *in vitro*. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (1): 155–163. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-1-15-163>.

ВВЕДЕНИЕ

Патогенез ревматоидного артрита (РА) – одного из самых распространенных аутоиммунных воспалительных заболеваний суставов в числе многих причин ассоциирован с ослаблением апоптоза, обуславливающего формирование аутоиммунного воспаления вследствие нарушения процесса выбраковки аутоспецифичных клонов лимфоцитов [1, 2].

Как известно, гомеостатическое равновесие в организме поддерживается процессами пролиферации и гибели клеток, при этом апоптоз является наиболее физиологичной из всех форм клеточной гибели, «тихим» механизмом элиминации клеток [3]. Изначально апоптоз считался автономным процессом, в настоящее время все более очевидными становятся неавтономные эффекты процессов апоптоза на пролиферацию, миграцию, морфологию, а также гибель соседних клеток [4]. Установлено, что апоптотические клетки могут продуцировать и секретировать диффундирующие митогенные сигналы [5]. Кроме того, механическое воздействие – изменение напряжения и ремоделирования – в близлежащих тканях также относят к неавтономным эффектам апоптоза [6].

При распаде клеточных структур на отдельные фрагменты в конечном итоге процессов апоптоза и почкования плазматической мембраны образуются апоптотические тельца. Апоптотические тельца, экзосомы и эктосомы относят к числу микровезикул, выполняющих значимую роль в транспортировке различных белков, мРНК и микроРНК в клетке [7]. 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. Кроме того, было определено, что при ревматологических заболеваниях происходит образование иммунных комплексов на основе микровезикул. Так, было выявлено увеличение количества IgM, связанного с циркулирующими микровезикулами в плазме пациентов с РА по сравнению с контролем. Как известно, отложение иммунных ком-

плексов в суставных тканях является одним из основных патогенетических механизмов воспаления при РА [8].

Таким образом, представление о механизмах развития РА достигло нового уровня, связанного с выяснением ряда патогенетических составляющих аутоиммунного процесса, в частности, значимой роли неавтономных эффектов апоптоза – влияния апоптотирующих клеток и высвобождаемых ими сигналов на клеточное сообщество. В контексте приведенных данных исследование влияния клеточных и гуморальных компонентов культуры клеток, апоптотирующей в условиях скученности и обеднения питательной среды на аутологичные нормально пролиферирующие *in vitro* лимфоциты здоровых людей и пациентов с РА, является перспективным направлением научного поиска, конечная цель которого – определение эффекторных молекул указанных дисфункций.

Целью настоящего исследования являлось изучение особенностей апоптоза Т-лимфоцитов, индуцированных клеточными и гуморальными компонентами аутологичной апоптотической культуры, в условиях «клеточного соседства» *in vitro* у здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась периферическая кровь 11 условно здоровых женщин, не имеющих аутоиммунных, острых и обострения хронических заболеваний, средний возраст группы составил ($40,5 \pm 2,3$) лет, а также периферическая кровь 8 больных РА женщин (средний возраст ($39,0 \pm (30,5-59,5)$ лет), находившихся на лечении в клинике ФГБНУ НИИФКИ г. Новосибирска. У всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на проведение необходимых манипуляций.

Выделенная на градиенте плотности (фиколл-верографин, 1,078) (BioClot GmbH, Германия) лимфоцитарная фракция клеток была распределена на два варианта культуры. Первый

вариант (нормально пролиферирующая (НП)) – семь лунок по $5,0 \times 10^3$ кл./0,5 мл полной культуральной среды (ПКС), окрашенных флуоресцентным красителем CFSE (Molecular probes, USA), (CFSE⁺). В составе ПКС – среда RPMI-1640 (ООО «Биолот», г. Санкт-Петербург, Россия), тиенам (ЗАО «ОРТАТ», Россия), L-глутамин (Gerbu, Biotechnik GmbH, Германия), буферный раствор Hepes (Gerbu, Biotechnik GmbH, Германия), фетальная телячья сыворотка (FCS) (Hy Clone, США). Второй вариант культуры (апоптотическая (АК)) – три лунки (нестимулированные клетки aCD3⁻ (1 мкг/мл, МедБиоСпектр, г. Москва, Россия) и дексаметазон-стимулированные (1×10^{-4} М) по 2×10^6 кл./150,0 мкл обедненной (1% FCS) ОС среды (CFSE⁻).

На 4-е сут инкубации в термостате (37 °С, 5%-й CO₂) апоптотическая культура (клетки и супернатант отдельно) была перенесена к лимфоцитам, пролиферирующим в условиях ПКС. Далее проводилось сокультивирование проб, получивших условные названия: 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 – Dexa – сокультивирование НП лимфоцитов в ПКС и АК, обработанной дексаметазоном (1×10^{-4} М); 7 – Dexa супернатант – НП лимфоциты и супернатант от АК, обработанной дексаметазоном.

На 7-е сут на цитофлуориметре BD FACS Canto II в популяции Т-лимфоцитов (CD3⁺) с помощью набора с аннексином V (AnV) и интеркалирующим красителем 7AAD (Becton Dickenson, 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 [9].

Статистическая обработка данных проводилась с применением методов непараметрической статистики Statistica 6.0. В анализе были ис-

пользованы U-критерий Манна – Уитни, парный критерий Вилкоксона и ранговая корреляция по методу Спирмена (r). Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха ($Me (Q_{25} - Q_{75})$). Различия между группами считались статистически значимыми при достигнутом уровне $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На начальном этапе работы нами были проведены исследования, направленные на определение условий индукции апоптотической гибели клеток в условиях скученности и обеднения культуральной среды («первично» индуцированная культура). Оптимизация условий индукции апоптоза позволила определить характер воздействия клеточных и гуморальных компонентов этих апоптотических культур на аутологичные клетки, находившиеся в физиологических условиях («вторично» индуцированная культура). В результате применения данного методологического подхода были оценены параметры раннего и позднего апоптоза субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови здоровых людей и пациентов с РА в модели «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотирующих клеток.

На следующем этапе проводился сравнительный анализ полученных *in vitro* результатов раннего и позднего апоптоза нативных aCD3⁻ и дексаметазон-стимулированных Т-лимфоцитов здоровых людей и пациентов с РА. При этом достоверных различий между группами не выявлено. Уровни раннего и позднего апоптоза «первично» индуцированной в апоптоз культуры и параметры апоптоза нормально пролиферирующих клеток после переноса к ним клеточных и гуморальных компонентов апоптотической культуры достоверно не различались – ни исходно, ни в динамике культивирования клеток. Вместе с тем в процессе анализа обращали на себя внимание внутрigrupповые особенности влияния апоптотических факторов. В связи с этим нами был проведен сравнительный анализ качественного характера для выявления вклада в процессы апоптоза анализируемых факторов у здоровых людей и пациентов с РА (таблица).

В частности, у пациентов с РА было определено наличие прямых корреляционных зависимостей между количеством лимфоцитов, находящихся в стадии раннего апоптоза пробы «Контроль» и содержанием аналогичных клеток во всех вариантах культур, меченных CFSE (культура – реципиент) за исключением группы «aCD3 супернатант».

Параметры раннего и позднего активационного апоптоза в норме и при ревматоидном артрите (РА), $Me (Q_{25}-Q_{75})$
Parameters of early and late stages of activation apoptosis in normal conditions and RA, $Me (Q_{25}-Q_{75})$

Проба Sample	Здоровые доноры, $n = 11$ Healthy donors, $n = 11$		Больные РА, $n = 8$ Patients with RA, $n = 8$	
	Ранний апоптоз, % Early stage of apoptosis, %	Поздний апоптоз, % Late stage of apopto- sis, %	Ранний апоптоз, % Early stage of apopto- sis, %	Поздний апоптоз, % Late stage of apoptosis, %
Начальный уровень Initial level	15,7 (13,1–17,9)	0,0 (0–0,35)	14,15 (7,0–17,8)	0 (0–0,1)
Контроль Control	12,4 (7,5–13,5)	2,2 (0,4–9,7)	9,6 (8,1–33,0)	1,7 (0,6–23,7)
Контроль апоптоза (CFSE ⁺) Control of apoptosis (CFSE ⁺)	18,0 (5,1–25,5)	7,0 (3,3–22,4)	15,8 (10,6–35,7)	1,2 (0,6–28,9)
Контроль апоптоза (CFSE ⁻) Control of apoptosis (CFSE ⁻)	20,0 (6,5–43,7)	21,6 (1,9–55,3)	8,6 (7,2–19,8)	0,3 (0,1–25,6)
Контроль апоптоза супер- натант Control of apoptosis super- natant	19,0 (13,2–24,1)	2,9 (1,9–49,4)	15,1 (8,0–43,0)	2,1 (0,8–28,7)
aCD3 (CFSE ⁺) aCD3 (CFSE ⁺)	20,4 (17,3–38,6)	13,3 (8,0–58,3)	37,0 (19,9–43,5)	4,9 (3,2–27,7)
aCD3 (CFSE ⁻) aCD3 (CFSE ⁻)	17,0 (8,4–59,6)	17,1 (1,2–76,4)	27,7 (19,2–47,1)	5,8 (0,2–37,5)
aCD3 супернатант aCD3 supernatant	36,0 (25,5–47,0)	3,4 (2,2–28,5)	24,3 (15,6–33,0)	2,7 (1,0–30,4)
Dexa (CFSE ⁺) Dexa (CFSE ⁺)	18,0 (17,6–21,9)	10,9 (3,5–77,7)	15,8 (11,8–40,5)	3,7 (2,8–44,3)
Dexa (CFSE ⁻) Dexa (CFSE ⁻)	14,3 (14,2–16,7)	1,0 (0–19,3)	13,9 (11,2–44,6)	2,65 (0,2–30,4)
Dexa супернатант Dexa supernatant	13,8 (11,2–15,0)	3,4 (2,7–69,0)	20,2 (14,7–38,4)	5,5 (3,8–40,1)

Также положительные связи были установлены между параметрами раннего апоптоза всех видов контроля и содержанием аналогичных апоптотирующих клеток в дексаметазон-стимулированных культурах (при переносе клеток и супернатанта) как раннего, так и позднего апоптоза и, в частности, положительный характер связи между пробами «Контроль» и Dexa (CFSE⁺) ($r = 0,9$; $p = 0,037$). Тогда как в группе здоровых доноров была определена только одна корреляционная зависимость между содержанием Т-лимфоцитов, находящихся в стадии раннего апоптоза, проб «Контроль» и Dexa (CFSE⁺), и она носила отрицательный характер ($r = -0,9$; $p = 0,037$).

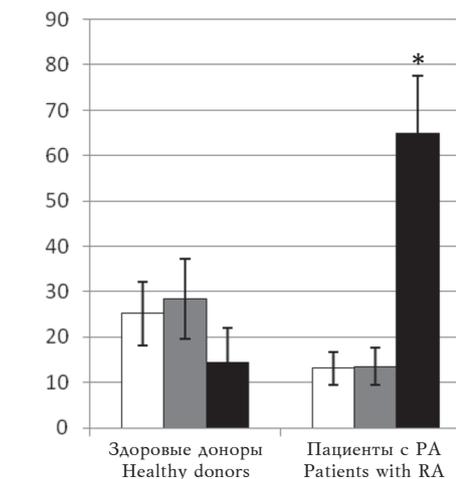
В ходе анализа особенностей раннего апоптоза CFSE⁻ лимфоцитов (культура – донор) было отмечено значимое увеличение показателей aCD3-стимулированных проб у больных РА относительно параметров исходного уровня апоп-

тоза и пробы «Контроль апоптоза (CFSE⁻)»: 27,7 (19,2–47,1)% vs. 8,6 (7,2–19,8)% ($p = 0,034$), в то время как у здоровых людей аналогичные параметры достоверно не изменились 17,0 (8,4–59,6)% vs. 20,0 (6,5–43,7)%, $p > 0,05$).

После переноса клеток культуры – донор к культуре-реципиенту («вторичная» индукция) было определено повышение показателей раннего апоптоза пробы «aCD3» (CFSE⁺) vs. «Контроль апоптоза (CFSE⁺)» у больных РА: 37,0 (19,9–43,5)% vs 15,8 (10,6–35,7)%, $p = 0,05$ и не выявлено у здоровых людей: 20,4 (17,3–38,6)% vs. 18,0 (5,1–25,5)%, $p > 0,05$.

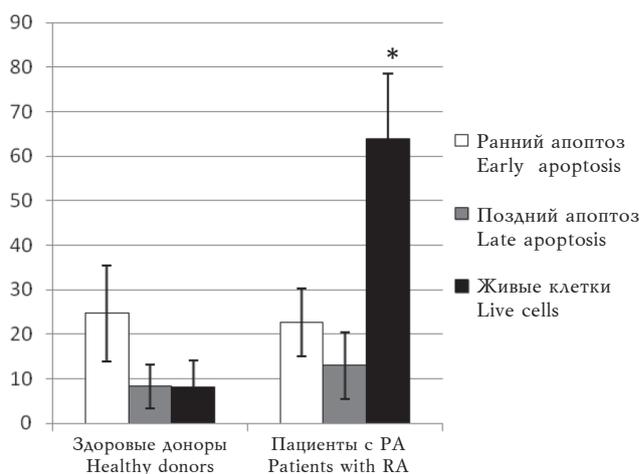
При анализе особенностей индукции апоптоза, опосредованного переносом супернатантов, было определено повышение содержания Т-лимфоцитов, находящихся в стадии раннего апоптоза в пробе, стимулированной супернатантом от дексаметазон-индуцированной культуры, отно-

сительно пробы «Контроль апоптоза (CFSE⁺)» у пациентов с РА и не установлено в аналогичных пробах здоровых доноров: 20,2 (14,7–38,4)% vs 15,8 (10,6–35,7)%, $p = 0,05$; 13,8 (11,2–15,0)% vs 18,0 (5,1–25,5)%, $p > 0,05$. Качественный анализ динамики процессов активационного апоптоза Т-лимфоцитов у здоровых людей и пациентов с РА свидетельствовал о существовании различий в характере ответа на неблагоприятные условия, дополнительную активацию aCD3 пролиферативными стимулами и влияние дексаметазона.



a

Учитывая важную роль пролиферации в поддержании клеточного гомеостаза, мы проанализировали соотношение апоптотирующих и живых клеток в исследуемых культурах доноров и пациентов с РА. Полученные результаты свидетельствовали о значимом повышении содержания живых клеток в культурах пациентов с РА относительно здоровых доноров в пробе «Контроль апоптоза (CFSE⁻)»: (64,8 ± 12,75)% vs (14,3 ± 7,6)%, $p = 0,038$ (рис., a) и Dexa (CFSE⁻): (63,8 ± 14,7)% vs (8,2 ± 3,9)%, $p = 0,038$ (рисунок, b).



b

Рисунок. Соотношение живых и апоптотирующих клеток CD3⁺ у здоровых доноров и пациентов с РА, %: a – проба «Контроль апоптоза (CFSE⁻)», b – проба Dexa (CFSE⁻). За 100% приняты все CD3⁺ лимфоциты. * достоверные отличия между группами доноров и пациентов с РА, $p < 0,05$

Figure. Proportion of live and apoptotic CD3⁺ cells from healthy individuals and patients with RA, %: a – a sample «Control of apoptosis (CFSE⁻)», b – a sample of «Dexa (CFSE⁻)». All CD3⁺ lymphocytes are taken for 100%. * significant differences between groups of donors and patients with RA, $p < 0.05$

Таким образом, исследование динамики процессов апоптоза в «первично» (CFSE⁻) и «вторично» (CFSE⁺) индуцированных культурах, выявили различия между группами здоровых доноров и пациентов с РА по содержанию живых клеток в (CFSE⁻) культуре и отсутствие значимых различий по параметрам раннего и позднего активационного апоптоза нативных, aCD3⁻ и дексаметазон-стимулированных Т-клеток периферической крови.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основанием для проведения данной работы послужили публикации о неавтономных эффектах апоптотирующих и пролиферирующих клеток [3, 10]. Во избежание нарушения целостности или гиперплазии тканей количество и качество клеток в тканях контролируются несколькими механизмами. В частности, неавтономный апоптоз может индуцироваться различными скоростями

пролиферации или метаболического статуса [11], а развитие деструктивного пролиферативного синовита ассоциировано с нарушением баланса процессов пролиферации и апоптоза [2]. Такие конкурентные клеточные взаимодействия выявлены в экспериментах на животных, в том числе млекопитающих и у человека [12–16].

В нашем исследовании, несмотря на выявленные в процессе качественного анализа внутригрупповые особенности активационного апоптоза, при проведении сравнительного анализа параметров раннего и позднего апоптоза нативных, контрольных, aCD3⁻ и дексаметазон-стимулированных Т-лимфоцитов здоровых людей и пациентов с РА достоверных различий между группами не выявлено – ни в «первично» индуцированной культуре, ни в результате сокультивирования после переноса апоптотирующей культуры к нормально пролиферирующим клеткам. Произошло увеличение числа живых клеток в «первично» индуциро-

ванных культурах, находящихся в условиях скученности и обеднения среды в пробах «Контроль апоптоза» и Деха у пациентов с РА, расцененное нами как неавтономный эффект апоптоза.

По литературным данным, существуют два ключевых механизма, посредством которых апоптотирующие клетки могут неавтономно оказывать влияние на окружение: 1) механическое воздействие – изменение напряжения и ремоделирование близлежащих тканей; 2) высвобождение сигналов отмирающими клетками [3, 10]. Как правило, нежелательные клетки устраняются путем апоптоза и удаляются. Однако недавние исследования показали, что скученность и увеличение механического давления являются триггером экстрюзии клеток, при котором апоптотические раздражители нуждаются в передаче сигналов SIP и вызывают опосредованное актомиозином сужение апикальной части, а дефекты надлежащей экстрюзии клеток способствуют опухолевой прогрессии [17]. Предполагается, что усиление скученности индуцирует апоптотическую гибель клеток в культуре эпителиальных клеток млекопитающих посредством активации p53 [11]. В условиях полярно-дефицитной конкуренции клеток механическое напряжение активизирует регулятор цитоскелета ROCK, что приводит к повышению активности p53 через активацию p38 [11, 17].

Вторым из известных факторов неавтономного влияния апоптоза является способность апоптотирующих клеток к продукции и секреции диффундирующих митогенных сигналов [5]. Характер данных сигналов варьирует в зависимости от ткани и организма, но в качестве кандидатов, запускающих пролиферацию в соседних клетках, были идентифицированы такие сигнальные молекулы, как Wnt, Notch, FGF, TGF β , простагландин E2. Известно, что нарушение клеточного гомеостаза при РА связано с балансом процессов пролиферации и апоптоза. Известно также, что основными медиаторами, приводящими к развитию синовита при РА, являются цитокины, секретируемые Т-лимфоцитами (IFN γ , IL-17), стимулирующие синовиоциты и макрофаги, которые, в свою очередь, продуцируют такие молекулы, как IL-1, IL-6, IL-23, TNF, простагландин E2, оксид азота, колониестимулирующий FGF и TGF β . Таким образом, в процессе аутоиммунного воспаления нарабатываются молекулы, многие из которых определяют неавтономные эффекты апоптоза, являясь кандидатами в факторы, запускающими пролиферацию в соседних клетках.

Следует отметить, что увеличение числа живых клеток в культуре Т-лимфоцитов больных

людей может быть обусловлено как апоптоз-индуцированной пролиферацией, так и процессами анастаза (от греч. – возрождение), выявленной недавно возможностью восстановления поздних стадий апоптоза, включая этапы митохондриального высвобождения цитохрома С, активацию каспаз, фрагментацию ядер и образования апоптотических телец [18].

В нашем исследовании обращало на себя внимание достоверное увеличение живых клеток в «первично» индуцированной в апоптоз культуре и отсутствие значимых различий по уровню живых лимфоцитов в «культуре-реципиенте» после трансплантации. Следует отметить также высокую долю живых клеток в пробах, активированных дексаметазоном, в то время как в культуре, стимулированной CD3-антителами, у пациентов с РА повышения содержания живых клеток не произошло. В литературе имеются данные о стимулирующем влиянии дексаметазона на пролиферативную активность Т-лимфоцитов после недельного культивирования [19]. Поскольку в наших исследованиях во вторичной культуре, индуцированной посредством переноса апоптотических клеток, сохраняется способность Т-лимфоцитов к активационному апоптозу на фоне ослабления способности к пролиферации, с позиций трансляционной медицины представляется перспективным изучение возможности воздействия активированных *in vitro (ex vivo)* аутологичных клеток, подвергнутых активационному апоптозу в условиях скученности и обеднения культуральной среды на течение воспаления и процессы апоптоза в пораженных суставах у больных РА. Учитывая отсутствие различий по параметрам активационного апоптоза в условиях «клеточного соседства» между здоровыми людьми и пациентами с РА, по нашим предположениям, возможно, важную роль в патогенезе ревматоидного артрита играет не ослабление процессов апоптоза, а его неавтономные эффекты, обуславливающие развитие деструктивного пролиферативного синовита – центрального звена патогенеза РА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, создание модели активационного апоптоза в условиях скученности и обеднения культуральной среды, а также трансплантация клеток и перенос супернатанта апоптотирующей культуры к аутологичным пролиферирующим клеткам и дальнейшее сокультивирование в условиях «клеточного соседства» позволили не только установить особенности апоптоза нативных, аCD3- и дексаметазон-стимулированных клеток здоровых

людей и пациентов с РА, но и выявить некоторые неавтономные эффекты апоптоза. Впервые установлено увеличение числа живых клеток в культурах больных РА относительно показателей здоровых людей на фоне отсутствия значимых различий по параметрам апоптоза. Указанные особенности выявлены в «первично» индуцированных (CFSE⁻) культурах нестимулированных и стимулированных дексаметазоном клеток и не определены во «вторично» стимулированных (CFSE⁺) культурах и при активации клеток антителами к CD3.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Панафидина Т.А., Кондратьева Л.В., Герасимова Е.В. Коморбидность при ревматоидном артрите. *Научно-практическая ревматология*. 2014; 52 (3): 283–289. [Panafidina T.A., Kondratyeva L.V., Gerasimova E.V., Novikova D.S., Popkova T.V. Comorbidity in rheumatoid arthritis. *Rheumatology Science and Practice*. 2014; 52 (3): 283–289 (in Russ.)]. DOI: 10.14412/1995-4484-2014-283-289.
2. Арефьева А.С. Роль апоптоза в развитии системных аутоиммунных заболеваний. *Иммунология*. 2014; 35 (2): 103–107. [Arefeva A.S. Role of apoptosis in the development of systemic autoimmune diseases. *Immunology*. 2014; 35 (2): 103–107 (in Russ.)].
3. Pérez-Garijo A., Steller H. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development*. 2015; 142: 3253–3262. DOI: 10.1242/dev.127878.
4. Fuchs Y., Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*. 2011; 147 (4): 742–758. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.033.
5. Morata G., Shlevkov E., Pérez-Garijo A. Mitogenic signaling from apoptotic cells in *Drosophila*. *Dev. Growth Differ.* 2011; 53: 168–176. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2010.01225.x.
6. Pérez-Garijo A., Fuchs Y., Steller H. Apoptotic cells can induce non-autonomous apoptosis through the TNF pathway. *Elife*. 2013; 2: 18. DOI: 10.7554/eLife.01004.
7. Титов В.Н. Микрочастицы плазмы крови, микровезикулы, экзосомы, тельца апоптоза и макрофаги Купфера в печени – поздняя в филогенезе система реализации биологической функции эндоэкологии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59 (7): 29–39. [Titov V.N. The micro-particles of blood plasma, micro-vesicles, exosomes, apoptotic bodies and Kupffer macrophage in liver: late in phylogenesis system of realization of biological function of endoecology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2014; 59 (7): 29–39 (in Russ.)].
8. Withrow J., Murphy C., Liu Y. Extracellular vesicles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2016; 18: 12. DOI: 10.1186/s13075-016-1178-8.
9. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. Цитометрический анализ в клинической иммунологии. Екатеринбург: УрО РАН, 2011: 220. [Khaydukov S.V., Zurochka A.V., Chereshnev V.A. Cytometric analysis in the clinical immunology. Ekaterinburg: UrO RAN Publ., 2011: 220 (in Russ.)].
10. Eroglu M., Derry W.B. Your neighbours matter – Non-autonomous control of apoptosis in development and disease. *Cell Death Differ.* 2016; 23: 1110–1118. DOI: 10.1038/cdd.2016.41.
11. 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; 31 (5): 682–685. PMID: 25940298 [Indexed for MEDLINE].
12. Сепиашвили Р.И., Шубич М.Г., Колесникова Н.В., Славянская Т.А., Ломтатидзе Л.В. Апоптоз в иммунологических процессах. *Аллергология и иммунология*. 2015; 16 (1): 101–107. [Sepiashvili R.I., Shubich M.G., Kolesnikova N.V., Slavyanskaya T.A., Lomtadidze L.V. Apoptosis in the immunological processes. *Allergology and Immunology*. 2015; 16 (1): 101–107 (in Russ.)].
13. Сергеева Т.Ф., Ширманова М.В., Загайнова Е.В. Современные методы исследования апоптотической гибели клеток. *Современные технологии в медицине*. 2015; 7 (3): 172–182. [Sergeeva T.F., Shirmanova M.V., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A. Modern Research Techniques of Apoptotic Cell Death. *Modern Technologies in Medicine*. 2015; 7 (3): 172–182]. DOI: 10.17691/stm2015.7.3.21.
14. Brakus S.M., Govorko D.K., Vukojevic K., Jakus I.A., Carev D., Petricevic J., Saraga-Babic M. Apoptotic and anti-apoptotic factors in early human mandible development. *Eur. J. Oral. Sci.* 2010; 118 (6): 537–546. DOI: 10.1111/j.1600-0722.2010.00777.
15. Абрамова Т.Я., Цура В.А., Блинова Е.А., Козлов В.А. Влияние аутологических апоптотических клеточных культур на показатели ранней и поздней стадии апоптоза Т-лимфоцитов у здоровых доноров. *Российский иммунологический журнал*. 2017; 11 (2): 236–238. [Abramova T.Ya., Tsura V.A., Blinova E.A., Kozlov V.A. Effect of autologous apoptotic cell cultures on the parameters of early and late apoptosis of T lymphocytes from healthy donors. *Russian Journal of Immunology*. 2017; 11 (2): 236–238 (in Russ.)].
16. Абрамова Т.Я., Цура В.А., Блинова Е.А., Моренкова А.Ю., Козлов В.А. Активация ранней стадии апоптоза Т-лимфоцитов *in vitro* посредством переноса компонентов аутологичной апоптотической культуры у пациентов с ревматоидным артритом. *Медицинская иммунология*. 2018; 20 (2): 255–262. [Abramova T.Ya., Tsura V.A., Blinova E.A., Morenkova A.Yu., Kozlov V.A. *In vitro* activation of early-stage apoptosis of T lymphocytes by transferring apoptotic autologous cell culture components in patients with rheumatoid arthritis. *Medical Immunology (Russia)*. 2018; 20 (2): 255–262 (in Russ.)].
17. Chen G.Y., Tang J., Zheng P. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune re-

- sponses. *Science*. 2009; 323: 1722–1725. DOI: 10.1126/science.1168988.
18. Tang H.L., Tang H.M., Hardwick J.M., Chiu Fung M. Strategies for tracking anastasis, a cell survival phenomenon that reverses apoptosis. *Journal of Visualized Experiments*. 2015; 96: 1–13. PMID: 25742050. DOI: 10.3791/51964.
19. Gutsol A.A., Sokhonevich N.A., Yurova K.A., Kha-ziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Litvinova L.S. Dose-dependent effects of dexamethasone on functional activity of T-lymphocytes with different grades of differentiation. *Molecular Biology*. 2015; 49 (1): 130–137. DOI: 10.1134/S0026893314060065.

Вклад авторов

Абрамова Т.Я. – разработка концепции и дизайна; анализ и интерпретация данных; обоснование рукописи или проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Цура В.А. – анализ и интерпретация данных. Блинова Е.А. – разработка концепции и дизайна; анализ и интерпретация данных; обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания. Моренкова А.Ю. – анализ и интерпретация данных. Чумасова О.А. – анализ и интерпретация данных; Сулутьян А.Э. – анализ и интерпретация данных. Сизиков А.Э. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Козлов В.А. – обоснование рукописи, окончательное утверждение для публикации рукописи.

Сведения об авторах

Абрамова Татьяна Яковлевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-6947-2212.

Цура Василина Александровна, студент VI курса, медико-профилактический факультет, НГМУ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-2394-7187.

Блинова Елена Андреевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-3327-3630.

Моренкова Анастасия Юрьевна, клинический ординатор, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-0980-1157.

Чумасова Оксана Александровна, канд. мед. наук, врач-ревматолог, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-3797-6392.

Сулутьян Анна Эдуардовна, канд. мед. наук, врач-ревматолог, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-8487-1094.

Сизиков Алексей Эдуардович, канд. мед. наук, врач-ревматолог, зав. отделением ревматологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-7213-7482.

Козлов Владимир Александрович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель НИИФКИ, зав. лабораторией клинической иммунопатологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-1756-1782.

(✉) Блинова Елена Андреевна, e-mail: blinovaelena-85@yandex.ru.

Поступила в редакцию 29.06.2018
Подписана в печать 17.12.2018

Authors contribution

Abramova T.Ya. – conception and design; analysis and interpretation of data; justification of the manuscript and critical revision of the manuscript for important intellectual content, final approval of the manuscript for publication. Tsura V.A. – analysis and interpretation of data. Blinova E.A. – conception and design; analysis and interpretation of data; justification of the manuscript and critical revision of the manuscript for important intellectual content. Morenkova A.Yu. – analysis and interpretation of data. Chumasova O.A. – analysis and interpretation of data. Sulutian A.E. – analysis and interpretation of data. Sizikov A.E. – critical revision of the manuscript for important intellectual content. Kozlov V.A. – justification of the manuscript, final approval of the manuscript for publication.

Authors information

Abramova Tatiana Ya., DM, Leading Researcher, Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-6947-2212.

Tsura Vasilina A., VI course Student, Department of Biochemistry, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-2394-7187.

Blinova Elena A., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3327-3630.

Morenkova Anastasia Yu., Clinical Intern, Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-0980-1157.

Chumasova Oksana A., PhD, Rheumatologist, Rheumatology Department, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-3797-6392.

Sulutian Anna Ed., PhD, Rheumatologist, Rheumatology Department, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-8487-1094.

Sizikov Alexey Ed., PhD, Head of the Rheumatology Department, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-7213-7482.

Kozlov Vladimir A., DM, Professor, Academician of RAS, Scientific Supervisor of RIFCI, Head of the Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-1756-1782.

(✉) Blinova Elena A., e-mail: blinovaelena-85@yandex.ru.

Received 29.06.2018
Accepted 17.12.2018