

УДК 616.72-002.77-085-092.4

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-207-219

Для цитирования: Литвинова Л.С., Тодосенко Н.М., Хазиахматова О.Г., Малинина И.П., Юрова К.А. Клеточные реакции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на дексаметазон в норме и при ревматоидном артрите в системе *in vitro*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 207–219.

## Клеточные реакции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на дексаметазон в норме и при ревматоидном артрите в системе *in vitro*

Литвинова Л.С.<sup>1</sup>, Тодосенко Н.М.<sup>1</sup>, Хазиахматова О.Г.<sup>1</sup>, Малинина И.П.<sup>2</sup>, Юрова К.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта (БФУ им. И. Канта)  
Россия, 236016, г. Калининград, ул. Боткина, 3

<sup>2</sup> Областная клиническая больница Калининградской области (КОКБ)  
Россия, 236019, г. Калининград, ул. Клиническая, 74

### РЕЗЮМЕ

**Целью исследования** явился анализ влияния глюкокортикоида (ГК) дексаметазона (Dex) на изменение числа CD4<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих поверхностные молекулы активации (CD25, CD71, HLA-DR и CD95), и их способности продуцировать провоспалительные медиаторы в культурах TCR-стимулированных Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (РА), в системе *in vitro*. В исследование включены 50 больных и 20 условно здоровых доноров.

**Материал и методы.** Культуры Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) получали из мононуклеарных лейкоцитов методом иммуномагнитной сепарации (технология MACS®). В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали антибиотиновые частицы с биотинилированными антителами против CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> человека, имитирующие процесс костимуляции Т-клеток антиген-презентирующими клетками. В эксперименте использованы следующие концентрации дексаметазона – 2; 8; 16; 32; 64 мг. Методом проточной цитофлуориметрии проанализировано изменение иммунофенотипа Т-лимфоцитов; иммуноферментным анализом оценена секреция Т-клетками CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> провоспалительных цитокинов: IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17 и IL-21.

**Результаты.** Подтвержден общий супрессорный эффект Dex на культуры Т-клеток CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, опосредованный снижением числа Т-клеток CD4<sup>+</sup>, экспрессирующих молекулы активации (CD25) и пролиферации (CD71), а также угнетением продукции медиаторов воспаления: IL-2, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ . Показано, что на фоне TCR-активации Dex повышает число клеток CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> в культурах CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, полученных от больных РА, и не изменяет их содержание в контроле. Корреляции между числом Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> с уровнем провоспалительных факторов (IL-17, IL-21 и TNF $\alpha$ ) в супернатантах клеточных культур у больных РА свидетельствуют о наличии провоспалительного потенциала этой популяции Т-клеток. Предполагается, что резистентность Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> больных РА к супрессорному действию ГК в целом приводит к сохранению и усилению функциональных возможностей аутореактивных клеток в патогенезе РА.

**Ключевые слова:** ревматоидный артрит, молекулы активации, провоспалительные медиаторы, дексаметазон.

✉ Литвинова Лариса Сергеевна, e-mail: larisalitvinova@yandex.ru.

## ВВЕДЕНИЕ

Ревматоидный артрит (РА) характеризуется гиперплазией синовиальной мембраны и ее инфильтрацией клетками с провоспалительным потенциалом [1]. В частности, аутореактивные CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Т-клетки памяти обеспечивают инициацию и пролонгацию воспалительного процесса, лежащего в основе РА, что приводит к разрушению суставов, и как следствие – к инвалидности индивидуума [1]. Известно, что при РА хроническая антигенная стимуляция приводит к гиперактивации иммунной системы, что сопровождается неконтролируемой экспрессией аутореактивными Т-лимфоцитами молекул активации (CD25, CD71, CD95, HLA-DR) [1, 2]. Предполагают, что высокая экспрессия эффекторными (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>) Т-клетками молекул HLA-DR и CD95 может являться признаком терминальной фазы дифференцировки и созревания Т-клеток [2, 3]. Эти процессы тесно ассоциированы с приобретением эффекторными Т-клетками CD4<sup>+</sup> новых свойств (функционала), в частности усиливается продукция медиаторов с провоспалительной активностью (таких как TNF-α, IFN $\gamma$ , IL-17, IL-21, но не IL-2 или IL-4) [3–7].

Основным методом лечения РА по-прежнему является противовоспалительная терапия синтетическими глюкокортикоидами (ГК) [8]. ГК оказывают комплексное воздействие на компоненты иммунной системы, в частности регулируют процессы клеточного гомеостаза Т-лимфоцитов [9–11]. Несмотря на широкое применение ГК, исследований, посвященных их влиянию на функциональную активность аутореактивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, недостаточно, чтобы интерпретировать позитивные и негативные эффекты гормонального лечения этой патологии.

Целью исследования явилась оценка влияния дексаметазона (в системе *in vitro*) на функциональную активность TCR-стимулированных Т-клеток памяти CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, ассоциированную с изменением экспрессии мембранных молекул активации и их цитокинпродуцирующей способности, в норме и при РА.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили мононуклеарные лейкоциты (МНК), выделенные из венозной гепаринизированной крови, полученной от 50 больных ревматоидным артритом (РА) (38 женщин и 12 мужчин в возрасте  $(36,4 \pm 7,2)$  лет) и 20 условно здоровых доноров (10 жен-

щин и 10 мужчин в возрасте  $(35,3 \pm 8,9)$  лет). Верификация диагноза и набор пациентов в группы исследования осуществлялся на базе Областной клинической больницы (г. Калининград). Постановка диагноза ревматоидного артрита была выполнена согласно приказа № 21 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным ревматоидным артритом» от 13 января от 2006 г. Диагностические исследования включали опрос пациентов, рентгенографию, компьютерную и ЯМР-томографию суставов, выявление ревматоидного фактора и титра антител к циклическому цитрулин-содержащему пептиду, оценку скорости оседания эритроцитов и содержания С-реактивного белка в крови. На основании оценки анамнеза болезни в исследование были включены пациенты, отвечающие следующим критериям.

Активность болезни – ремиссия (DAS28 (визуальный калькулятор оценки активности заболевания при ревматоидном артрите) < 2,6) (10 человек) или низкая (DAS28 – 2,6–3,2) (40 человек).

Ревматоидный фактор – серопозитивный.

Антитела к циклическому цитрулин-содержащему пептиду – серопозитивный.

Отсутствие терапии стероидными и цитостатическими препаратами с момента манифестации заболевания (не менее 6 мес).

Продолжительность заболевания – не более 1 года с момента постановки диагноза.

Критерием исключения пациентов из исследования явилось получение медикаментозной терапии на момент взятия крови и наличие внесуставных осложнений заболевания. Со всеми обследованными лицами было подписано добровольное информационное согласие на исследование.

Клетки получали методом центрифугирования в градиенте плотности ( $1,077 \text{ г/см}^3$ ) фиколл-урографина (Schering, Испания и Pharmacia, Швеция) по стандартной методике. Культуры Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) из МНК получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS<sup>®</sup> (MidiMACS Separator, LS Columns, MiltenyiBiotec, Германия) и моноклональных антител к CD3 и CD45RO с парамагнитными частицами (MicroBeads human, Miltenyi Biotec, Германия), согласно протокола фирмы-изготовителя. В эксперименте использовали клеточные культуры, чистота которых после магнитной сепарации составляла в среднем  $(97,5 \pm 2,12)\%$  (фенотип CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>) (далее – CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-клетки). Число живых клеток в культурах составляло не менее 98%.

CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-клетки ( $10^6$  клеток/мл) культивировали в 48-луночном планшете в бессыво-

роточной среде Искова (Sigma, США), содержащей 0,5% сывороточного альбумина человека (Микроген, Россия),  $5 \times 10^{-5}$  М  $\beta$ -меркаптоэтанол (Acros Organic, США) и 30 мкг/мл гентамицина, в присутствии синтетического ГК (МП) (Orion Pharma, Россия) в разных концентрациях или без него (контроль) при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, в течение 48 ч. В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human (Miltenyi Biotec, Германия) – антибиотинные частицы MACSiBead™ с биотинилированными антителами против CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> человека (далее Ас/Ехр). Нагруженные антителами антибиотинные частицы MACSiBead™ используются в качестве имитации антиген-презентирующих клеток (АПК) для активации Т-клеточного рецептора (TCR) покоящихся Т-клеток (TCR-активатор). Реагент Ас/Ехр добавляли в пробы в количестве 5 мкл, которые содержали  $0,5 \times 10^6$  антибиотинных MACSiBead™ частиц, соотношение клеток и активирующих частиц составило 1 : 2.

Регистрацию жизнеспособности и подсчет числа клеток в исследуемых клеточных культурах проводили методом проточной лазерной цитометрии на цитофлуориметре Guava Easy-Cite Plus (Millipore, США) с использованием реагента Guava ViaCount и одноименной программы (Millipore, США) согласно протоколу производителя. Число клеток, несущих поверхностные маркеры (CD45RO, CD3, CD4, CD25, CD71, HLA-DR, CD95), определяли методом проточной лазерной цитометрии с помощью моноклональных антител, конъюгированных с Viablu (CD45RO); аллофикиоцианином (APC; CD3) (Miltenyi Biotec, Германия); флуоресцеином изотиоцианатом (FITC; CD95), фикозритрином (PE; CD4) (Abcam, Cambridge, Великобритания); с конъюгатом PE с цианином (PE-Cy7; CD25, CD71) и конъюгатом PE с пиридинхлорофиллом (PerCP; HLA-DR) (e-Bioscience, США) согласно методикам производителя. Регистрацию результатов проводили на проточном цитофлуориметре MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия).

Все результаты цитометрического анализа анализировали с помощью программы KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США). Выбор срока культивирования (48 ч) исследуемых проб обоснован тем фактом, что изменение фенотипических маркеров, характеризующих состояние активации Т-клеток после стимуляции TCR, реализуется через экспрессию генов с последующим синтезом соответствующих белков и соответствует геномному механизму действия ГК [12].

Варианты культивирования: 1) в среде без добавок (контроль); 2) в среде, содержащей Ас/Ехр ( $0,5 \times 10^6$  MACSiBead™ частиц); 3) в среде, содержащей Ас/Ехр ( $0,5 \times 10^6$  MACSiBead™ частиц) и Dex (2; 8; 16; 32; 64 мг). Дозы ГК, используемые в эксперименте, были определены, исходя из математической фармакокинетической двухкамерной модели, где учитывался расчетный объем распределения ГКС в организме (то есть гипотетический объем жидкости организма ( $V_d$ ), в котором лекарственное вещество распределено равномерно и находится в концентрации, равной концентрации ( $Q$ ) данного вещества в плазме крови ( $C_p$ );  $V_d = Q / C_p$ ; для ГКС величина  $V_d$  составляет 0,35 л/кг). Таким образом, добавляемые концентрации Dex на 1 млн культивируемых Т-клеток/мл, составили ( $10^{-6}$  М;  $2 \times 10^{-6}$  М;  $4 \times 10^{-6}$  М;  $8 \times 10^{-6}$  М;  $1,6 \times 10^{-5}$  М), что соответствует действию Dex в концентрациях 2; 8; 16; 32; 64 мг, распределенных условно в 5 л крови. Содержание цитокинов (IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17 и IL-21) в супернатантах CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> культур оценивали методом иммуноферментного анализа с использованием стандартных наборов реактивов согласно протоколу фирм-производителей («Вектор-Бест», Россия и Cusabio Biotech, США).

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез [13]. Для проверки гипотезы о принадлежности исследуемых выборок к нормальному закону распределения использовали критерий Колмогорова – Смирнова. Учитывая несоответствие выборок нормальному закону распределения для их попарного сравнения применялись непараметрические критерии: Т-критерий Вилкоксона (для зависимых выборок) и U-критерий Манна – Уитни (для независимых выборок). Результаты представляли в виде медианы  $Me$ , первого и третьего квартилей ( $Q_1 - Q_3$ ). С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный (путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена  $r$ ) и регрессионный (с вычислением коэффициента регрессии  $r^2$ ) анализы. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Общее количество клеток ( $10^6$  клеток/мл) в интактных культурах Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> у здоровых доноров и больных РА составляло

1,01 (0,87–1,21) и 0,88 (0,85–0,91) × 10<sup>6</sup> клеток/мл, соответственно (табл. 1). Число живых клеток в интактных пробах CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> здоровых доноров было равным 71,68 (64,44–79,06)%, превышая аналогичный показатель у больных РА в среднем на 30%. На фоне TCR-активации в культурах CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, полученных у здоровых доноров, регистрировалось увеличение общего числа клеток, тогда как содержание живых лимфоцитов значительно снижалось. В культурах клеток от больных РА аналогичные параметры оставались неизменными. Dex не оказывал значимого

действия на изменение общего числа клеток, полученных от здоровых доноров и больных РА.

Низкие концентрации Dex (2–8 мг) достоверно повышали число живых клеток в TCR-активированных CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-культурах контрольной группы, тогда как высокие дозы (64 мг) способствовали снижению исследуемого показателя в сравнении с пробами только с добавлением активатора. Добавление Dex значимо не влияло на изменение числа живых клеток в культурах CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток больных РА (см. табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Общее число клеток (10 <sup>6</sup> клеток/мл) и содержание живых клеток (%) в культурах Т-лимфоцитов CD3 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> , полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, в условиях инкубации с разными концентрациями дексаметазона (Dex) и активатором (Ac/Exp), Me (Q <sub>1</sub> –Q <sub>3</sub> )				
Показатель	Условия культивирования	Здоровые доноры	Больные РА	
Общее число клеток, 10 <sup>6</sup> клеток/мл	Без активации	1,01 (0,88–1,21)	0,88 (0,85–0,91) <sup>◊</sup>	
	Ac/Exp	1,21 (1,05–1,28)*	0,91 (0,80–0,96) <sup>◊</sup>	
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	1,19 (1,16–1,25)	0,93 (0,82–0,99) <sup>◊</sup>
		8	1,22 (1,18–1,27)	0,90 (0,79–0,98) <sup>◊</sup>
		16	1,20 (1,19–1,30)	0,95 (0,86–1,01) <sup>◊</sup>
		32	1,18 (1,15–1,22)	0,92 (0,88–0,98) <sup>◊</sup>
64	1,21 (1,12–1,27)	0,94 (0,81–0,97) <sup>◊</sup>		
Содержание живых клеток, %	Без активации	71,68 (64,44–79,06)	51,33 (41,39–60,08) <sup>◊</sup>	
	Ac/Exp	60,25 (55,73–66,84)*	55,29 (40,29–59,06)	
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	68,72 (59,75–75,78)**	56,82 (48,32–61,97) <sup>◊</sup>
		8	69,11 (63,68–76,23)**	56,56 (41,32–60,42) <sup>◊</sup>
		16	66,34 (60,07–74,64)**	57,20 (38,20–62,87)
		32	64,52 (58,74–76,10)	59,89 (53,44–61,44)
64	48,3 (39,73–52,05)**	53,20 (31,2–55,35)		

П р и м е ч а н и е. Здесь и в таблицах 2, 3: \*  $p < 0,05$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с Т-клетками, культивированными без активационных частиц; \*\*  $p < 0,05$  – по сравнению с Т-клетками, культивированными с активационными частицами; <sup>◊</sup>  $p < 0,05$  – по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров.

Данные, отражающие содержание (%) Т-клеток CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, экспрессирующих поверхностные маркеры активации (CD25, CD71, CD95, HLA-DR), при воздействии на культуры активатора и ГК, представлены в табл. 2.

Инкубация CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-клеток (у здоровых доноров и больных РА) с Ac/Exp приводила к однонаправленному (разной степени выраженности) росту числа лимфоцитов CD4<sup>+</sup>, экспрессирующих поверхностные активационные маркеры (см. табл. 2). Сочетанное внесение Ac/Exp и Dex в культуральную среду способствовало значительному снижению содержания CD25- и CD71-позитивных Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> в контроле и у больных РА. На фоне активации Dex (2–16 мг) способствовал снижению числа Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> и не изменял содержание Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> у здоровых доноров. Высокие дозы Dex (32–64 мг) способ-

ствовали росту числа Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> и снижению лимфоцитов CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>. Добавление Dex (8–64 мг) в TCR-активированные CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> культуры больных РА индуцировало равномерный рост содержания Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> и снижение числа Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>.

Данные о содержании провоспалительных цитокинов (IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17, IL-21) в супернатантах культур Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> представлены в табл. 3. У больных РА в супернатантах клеточных культур в интактных пробах выявлено более высокое содержание цитокинов (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17, IL-21) (по сравнению со значениями контрольной группы), за исключением IL-2. TCR-активация способствовала достоверному повышению содержания провоспалительных медиаторов в пробах как здоровых доноров, так и больных РА.

Т а б л и ц а 2

Содержание Т-лимфоцитов CD4 <sup>+</sup> , несущих поверхностные маркеры активации в культурах Т-клеток CD3 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> , полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, в условиях инкубации с разными концентрациями дексаметазона (Dex) и активатором (Ac/Exp), Me (Q <sub>i</sub> -Q <sub>j</sub> )				
Показатель	Условия культивирования	Здоровые доноры	Больные РА	
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	Без активации	3,11 (2,99–3,14)	1,95 (1,60–2,70) <sup>φ</sup>	
	Ac/Exp	35,22 (30,19–36,29)*	25,13 (15,75–27,52) <sup>*φ</sup>	
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	35,92 (30,79–37,02)	19,75 (13,48–23,08) <sup>**φ</sup>
		8	34,87 (29,89–35,93)	19,48 (12,70–22,18) <sup>**φ</sup>
		16	26,68 (22,87–27,49)**	15,58 (9,85–17,54) <sup>**φ</sup>
		32	21,35 (18,29–21,99)**	16,37 (10,87–19,87) <sup>**φ</sup>
64	22,15 (18,99–22,82)**	12,78 (9,05–15,80) <sup>**φ</sup>		
CD4 <sup>+</sup> CD71 <sup>+</sup>	Без активации	4,70 (4,58–5,43)	0,64 (0,35–0,85) <sup>φ</sup>	
	Ac/Exp	15,04 (12,45–17,38)*	8,04 (5,42–11,02) <sup>*φ</sup>	
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	12,43 (10,29–14,36)**	6,60 (4,02–8,61) <sup>**φ</sup>
		8	10,37 (8,59–11,98)**	5,29 (3,06–6,77) <sup>**φ</sup>
		16	9,77 (8,08–11,28)**	4,73 (2,61–5,37) <sup>**φ</sup>
		32	5,19 (4,29–5,99)**	4,68 (3,14–4,97) <sup>**φ</sup>
64	3,39 (2,80–3,91)**	3,60 (2,53–4,47) <sup>**φ</sup>		
CD4 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup>	Без активации	11,96 (11,19–14,01)	8,18 (7,01–9,87) <sup>φ</sup>	
	Ac/Exp	21,46 (20,07–25,05)*	28,99 (25,75–33,16) <sup>*φ</sup>	
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	18,51 (16,24–22,78)**	17,44 (15,79–21,13)**
		8	17,96 (15,28–21,32)**	19,86 (18,71–22,72)**
		16	18,68 (16,88–20,32)**	19,29 (16,89–22,21)**
		32	26,60 (22,02–27,56)**	19,57 (16,55–21,54) <sup>**φ</sup>
64	28,75 (26,88–33,57)**	22,05 (17,24–23,03) <sup>**φ</sup>		
CD4 <sup>+</sup> CD95 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	Без активации	4,94 (3,95–5,79)	7,52 (6,51–8,95) <sup>φ</sup>	
	Ac/Exp	11,36 (9,08–13,33)*	14,12 (12,83–15,91) <sup>*φ</sup>	
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	11,48 (9,71–13,47)	13,64 (11,96–16,00)
		8	12,38 (9,89–14,53)**	18,21 (13,06–17,39) <sup>**φ</sup>
		16	13,98 (11,17–16,40)**	18,91 (17,97–20,39) <sup>**φ</sup>
		32	9,36 (8,28–12,16)**	19,05 (18,36–20,22) <sup>**φ</sup>
64	8,74 (6,98–10,28)**	21,14 (19,64–21,99) <sup>**φ</sup>		

Изменения носили однонаправленный характер, но имели разную степень выраженности. На фоне активации инкубация с Dex CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-клеток, полученных у здоровых доноров и больных РА, приводила к снижению (в разной степени выраженности) содержания IL-2, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  в супернатантах клеточных культур. Эффект ГК (весь диапазон концентраций) в отношении продукции CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>

Т-клетками здоровых доноров IL-17 и IL-21 был супрессорным. Dex не оказывал значимого влияния на секрецию активированными Т-клетками CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> у больных РА цитокинов – IL-17 (2–16 мг) и IL-21 (весь диапазон концентраций). Только высокие дозы ГК (32–64 мг) достоверно снижали секрецию IL-17 активированными Т-клетками CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> у больных РА (см. табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Уровень провоспалительных цитокинов (пг/мл) в супернатантах культур CD3 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> Т-лимфоцитов, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, в условиях инкубации с разными концентрациями дексаметазона (Dex) и активатором (Ac/Exp), Me (Q <sub>i</sub> -Q <sub>j</sub> )				
Показатель	Условия культивирования	Здоровые доноры	Больные РА	
IL-2	Без активации	88,14 (79,05–89,84)	61,84 (61,04–63,79) <sup>φ</sup>	
	Ac/Exp	741,3 (672,95–869,30)*	421,55 (396,60–430,96) <sup>*φ</sup>	
	Ac/Exp + Dex, мг	2	720,30 (675,80–803,63)	281,03 (264,40–287,31) <sup>**φ</sup>
		8	765,30 (692,78–786,03)	135,98 (127,94–139,02) <sup>**φ</sup>
		16	680,35 (655,80–765,45)	102,07 (96,03–104,35) <sup>**φ</sup>
		32	550,40 (485,33–597,90)**	77,35 (72,77–79,07) <sup>**φ</sup>
64	410,80 (305,53–446,78)**	57,59 (54,18–58,87) <sup>**φ</sup>		

Окончание табл. 3

Показатель	Условия культивирования	Здоровые доноры	Больные РА	
TNF $\alpha$	Без активации	44,38 (38,22–51,29)	55,89 (48,39–61,29) <sup>o</sup>	
	Ас/Ехр	279,59 (240,79–323,13)*	1100,70 (885,05–1120,99)* <sup>o</sup>	
	Ас/Ехр + Дех, мг	2	93,20 (80,26–115,20)**	163,79 (131,70–166,81)** <sup>o</sup>
		8	50,84 (50,39–58,75)**	118,23 (95,06–120,41)** <sup>o</sup>
		16	55,48 (47,78–64,11)**	121,79 (97,93–124,03)** <sup>o</sup>
		32	41,12 (35,41–47,52)**	128,89 (103,64–131,26)** <sup>o</sup>
64	31,42 (27,05–36,31)**	105,48 (84,82–107,43)** <sup>o</sup>		
IFN $\gamma$	Без активации	18,66 (16,92–20,95)	25,32 (24,42–28,13) <sup>o</sup>	
	Ас/Ехр	365,32 (332,07–400,30)*	632,88 (610,50–703,13)* <sup>o</sup>	
	Ас/Ехр + Дех, мг	2	341,48 (335,30–373,35)	540,92 (512,79–600,97)** <sup>o</sup>
		8	319,88 (312,58–343,13)	349,66 (337,29–388,47)** <sup>o</sup>
		16	311,62 (298,71–321,31)**	405,69 (391,35–450,72)** <sup>o</sup>
		32	303,37 (278,39–315,12)**	381,25 (367,78–423,57)** <sup>o</sup>
64	281,43 (266,72–293,58)**	314,86 (303,73–349,81)** <sup>o</sup>		
IL-17	Без активации	2,9 (2,38–3,18)	1,93 (1,58–2,11) <sup>o</sup>	
	Ас/Ехр	17,98 (14,76–19,73)*	54,04 (44,31–59,08)*	
	Ас/Ехр + Дех, мг	2	19,78 (16,23–21,70)**	48,60 (41,65–52,20) <sup>o</sup>
		8	16,21(13,3–17,79)**	49,78 (47,93–56,93) <sup>o</sup>
		16	11,24 (9,22–13,33)**	49,52 (45,94–57,92) <sup>o</sup>
		32	3,28 (1,74–3,78)**	43,36 (27,35–36,47)** <sup>o</sup>
64	1,77 (0,32–2,55)**	42,82 (24,89–33,19)** <sup>o</sup>		
IL-21	Без активации	1,2 (0,00–1,23)	1,40 (1,37–1,60)	
	Ас/Ехр	7,11 (5,11–7,20)*	13,97 (13,67–15,97)* <sup>o</sup>	
	Ас/Ехр + Дех, мг	2	6,45 (4,65–6,55)**	12,45 (11,21–13,09) <sup>o</sup>
		8	5,46 (3,93–5,54)**	11,92 (11,00–12,57) <sup>o</sup>
		16	5,38 (3,87–5,45)**	12,75 (11,50–13,43) <sup>o</sup>
		32	4,73 (3,41–4,80)**	11,03 (10,79–12,60) <sup>o</sup>
64	4,39 (3,19–4,44)**	12,94 (11,69–13,65) <sup>o</sup>		

## ОБСУЖДЕНИЕ

Стимуляция Ас/Ехр CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-клеток здоровых доноров и больных РА сопровождалась ростом числа CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры активации, пролиферации и апоптоза (CD25, CD71, HLA-DR и CD95) (см. табл. 2). Выявленные изменения вполне согласуются с данными мировой литературы, отражающими реакцию Т-клеток на TCR-стимуляцию [2, 14]. Так, IL-2-зависимая стадия иммунного ответа ассоциирована с экспрессией молекулы CD25 ( $\alpha$ -цепь рецептора IL-2). Т-клетки памяти находятся в фазе G1, что способствует их быстрому вхождению в IL-2-зависимую стадию иммунного ответа. Появление на мембране Т-лимфоцита рецептора к трансферрину (CD71/TfR1) характеризует стадию пролиферации, менее зависимую от IL-2 [10]. Установленное повышение общего числа клеток, мл, в CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> -культурах здоровых доноров при действии Ас/Ехр имело ассоциацию с содержанием Т-клеток CD4<sup>+</sup>, экспрессирующих молекулы CD71 и CD25 (соответственно  $r = 0,675$ ;  $r = 0,489$ ;  $p < 0,05$ ). В свою очередь индуцированный добавлением Ас/Ехр рост числа Т-клеток CD4<sup>+</sup>, несущих мембранные молекулы

поздней активации и апоптоза – CD95 и HLA-DR, в культурах здоровых доноров и больных РА может свидетельствовать о развитии клеточной гибели, индуцированной активацией, которая является важным механизмом, обеспечивающим толерантность на периферии за счет устранения аутореактивных лимфоцитов [15]. Отрицательные корреляции между содержанием живых клеток и числом Т-клеток CD4<sup>+</sup> (см. табл. 1) с фенотипом CD95<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> в культурах здоровых доноров, выявляемые при действии на клетки Ас/Ехр (соответственно  $r = -0,367$ ;  $r = -0,452$ ;  $p < 0,05$ ) подтверждают вышесказанное. Следует отметить меньшую чувствительность Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> больных РА к пролиферативному и апоптогенному действию Ас/Ехр, что может быть связано с изменением их функциональной активности, опосредованной непрерывной стимуляцией Т-клеточного рецептора аутоантигенами *in vivo* [1, 16]. Выявленное супрессорное действие Дех на экспрессию молекул активации (CD25) и пролиферации (CD71) TCR-активированными Т-клетками CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, полученными от здоровых доноров и больных РА (см. табл. 2), вполне укладывается в эффекты, оказываемые ГК [8]. Прямая связь между негативными эффектами

Dex на продукцию (экспрессию гена IL-2 и его секрецию) IL-2 и зависимым от IL-2 подавлением экспрессии молекул CD25 и CD71 на активированных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитах подтверждена в исследованиях других авторов [8, 10, 17–19].

Молекула CD95 обладает рядом функций, среди которых не только участие в процессах апоптоза, но и в пролиферации, канцерогенезе, созревании Т-лимфоцитов и др. [20, 21]. Добавление Dex в TCR-активированные культуры CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> больных РА (весь диапазон концентраций ГК) и здоровых доноров (2–16 мг) способствовало значимому снижению числа клеток CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> (см. табл. 2), что согласуется со способностью ГК ингибировать активационно-индуцированную гибель клеток с помощью прямой ДНК-зависимой репрессии гена CD95L [22, 23]. Обнаруженное увеличение числа клеток CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> в CD45RO<sup>+</sup>-культурах здоровых доноров (но не у больных РА) в результате сочетанного действия активатора и Dex (32–64 мг) отрицательно коррелировало с содержанием живых клеток в культурах ( $r = -0,563$ ;  $r = -0,861$ ;  $p < 0,05$ ), что подтверждает проапоптогенный эффект высоких концентраций ГК [24]. В то же время отсутствие таких ассоциаций при действии ГК в пробах больных РА (весь диапазон доз) и при добавлении низких доз Dex (2–16 мг) в культуры здоровых доноров может свидетельствовать об участии гликопротеина CD95 в процессах активации и созревания Т-клеток [3, 10].

Экспрессия молекулы HLA-DR Т-клетками отражает их длительную активацию. Кроме того, предполагают, что CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> представляют собой зрелые регуляторные Т-клетки с высокой супрессорной активностью [1, 16]. Как уже упоминалось ранее, высокая экспрессия зрелыми эффекторными (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) Т-клетками здоровых доноров молекул HLA-DR и CD95 может являться признаком терминальной фазы дифференцировки и созревания Т-клеток [3]. При этом выявлено, что все CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-лимфоциты здоровых доноров экспрессируют гликопротеин CD95, однако не все CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>-клетки являются HLA-DR-позитивными.

Инкубация TCR-активированных CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-культур с Dex (2–16 мг) значимо не влияла на изменение числа Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> у здоровых доноров (см. табл. 2). Только максимальные концентрации Dex (32–64 мг) способствовали снижению содержания CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-лимфоцитов. Выявленные отрицательные взаимосвязи между числом

CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Т-клеток и содержанием живых лимфоцитов в пробах с добавлением Dex (32–64 мг) и активатора может быть доказательством регуляторной активности Т-клеток CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, механизмы которой опосредованы контактными взаимодействиями между соседними клетками (включая CTLA-4-сигнализацию) [1, 16]. В то же время, согласно N. Bertho и соавт. (2000), сигналы, генерируемые с помощью HLA-DR, приводят к гибели зрелых профессиональных АПК и активированных Т- и В-лимфоцитов, утративших способность к экспрессии Fas-антигена (каспаз-независимый механизм) [26].

Напротив, в TCR-активированных CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-культурах больных РА добавление Dex (8–64 мг) индуцировало равномерный рост содержания Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> (см. табл. 2). Отсутствие взаимосвязей между содержанием HLA-DR-позитивных клеток и числом живых и мертвых лимфоцитов (см. табл. 1) в культурах может свидетельствовать о нарушении супрессорных функций этой популяции клеток. Полученные результаты согласуются с опубликованными ранее данными о наличии в периферической крови больных РА популяции активированных Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> с выраженными провоспалительными свойствами, способных рециркулировать через воспаленную синовиальную оболочку сустава, численность которых возрастает на периферии во время активной фазы заболевания [1, 25–28].

Основываясь на предположении, что Т-клетки CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> являются вероятной артритогенной субпопуляцией, далее нами была предпринята попытка оценить влияние Dex на секрецию активированными Т-клеточными культурами CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> основных провоспалительных цитокинов (IL-2, IL-17, IL-21, TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$ ), принимающих участие в патогенезе РА. Так, IL-17 и IFN $\gamma$  играют ключевую роль в инициации РА, приводя к появлению первичных симптомов заболевания, усиливая воспалительный ответ [29, 30], тогда как IL-21 и TNF $\alpha$  в большей степени участвуют в пролонгации заболевания, способствуя инфильтрации клеток в синовиальные ткани с последующим разрушением суставного хряща при РА [31, 32].

Нами был обнаружен ряд интересных зависимостей между содержанием клеток CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> в культурах CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> и показателями, отражающими секрецию провоспалительных медиаторов. Так, в Ac/Exp-активированных пробах больных РА число Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> позитивно коррелировало с содержанием

провоспалительных цитокинов в супернатантах клеточных культур: IL-17 ( $r = 0,617$ ;  $p < 0,05$ ), IL-21 ( $r = 0,430$ ;  $p < 0,05$ ). Все эти взаимосвязи подтверждают роль Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>H-LA-DR<sup>+</sup> в продукции провоспалительных медиаторов у больных РА при TCR-активации. Более низкая (в сравнении с контрольной группой) продукция Т-клетками CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> у больных РА IL-2 в ответ на TCR-стимуляцию (см. табл. 3) в целом может свидетельствовать об ослаблении у них пролиферативных иммунных реакций, что может приводить к нарушению механизмов, ответственных за формирование Т-клеточной памяти [28, 33]. У здоровых доноров такие зависимости отсутствовали.

Инкубация TCR-активированных клеток CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, полученных у больных РА с Dex (весь диапазон концентраций), приводила к снижению содержания IL-2 в супернатантах клеточных культур (дозозависимый эффект  $r^2 = -0,616$ ,  $p < 0,05$ ) (см. табл. 3). У здоровых доноров статистически значимый супрессорный эффект ГК ( $p \leq 0,05$ ) отмечался только при действии высоких концентраций гормона (16–64 мг). Многие исследования подтверждают негативную регуляцию ГК генной экспрессии IL-2 в иммунных клетках [10, 34]. Выявлено, что Dex ингибирует транскрипцию гена IL-2, снижая стабильность его мРНК [34]. Кроме того, ГК способны связывать транскрипционные факторы (NFAT, AP-1), индуцирующие экспрессию гена IL-2, препятствуя образованию димерных комплексов (NFAT+AP-1) и предотвращая их прямое взаимодействие с промоторными областями гена [16, 31]. Выявленный нами супрессорный эффект Dex на экспрессию CD25-молекулы Т-клетками CD4<sup>+</sup> может быть опосредован снижением аутопродукции IL-2 [10, 34].

В культурах, полученных у больных РА и здоровых доноров, Dex оказывал умеренный супрессорный эффект ( $p < 0,05$ ) в отношении секреции TCR-активированными клетками CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> IFN $\gamma$  (см. табл. 3). Результаты опубликованных исследований свидетельствуют об ингибирующем эффекте ГК на продукцию IFN $\gamma$  стимулированными Th1-лимфоцитами человека [11], предполагаемым механизмом которого может быть непрямая транскрипция [16, 24, 34, 36], реализуемая через белок-белковые взаимодействия ГКР с транскрипционными факторами (AP-1/CREB/ATF). Установлено, что фармакологические дозы ГК, подавляя активность T-bet зависимого фактора STAT4, снижают синтез и секрецию IFN $\gamma$  [8, 36].

Добавление Dex (весь диапазон концентраций) в TCR-активированные культуры CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>,

полученные у здоровых доноров и больных РА, приводило к значимому снижению содержания TNF $\alpha$  в супернатантах клеточных культур (см. табл. 3). Более выраженные изменения регистрировались в пробах, полученных у больных РА. Известно, что ГК способствуют деградации мРНК гена TNF $\alpha$  и снижают его экспрессию за счет белок-белковых взаимодействий (ГК-NFkB), предотвращая связь внутриклеточных сигнальных гликопротеинов (мессенджеров) с промоторными областями провоспалительных генов [36].

Влияние Dex (весь диапазон концентраций ГК) на Т-клетки CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> здоровых доноров в отношении их секреции IL-17 и IL-21 носило угнетающий характер, при этом снижение содержания IL-17 в супернатантах клеточных культур было дозозависимым ( $r^2 = -0,672$ ,  $p < 0,05$ ). Данные литературы в отношении эффектов ГК на продукцию IL-17 Т-клетками крайне противоречивы. Согласно одним источникам, клоны Th17 устойчивы к супрессорному влиянию ГК; более того, ГК опосредуют дифференцировку клеток Th17 *in vitro* [24, 37]. Тогда как другими исследователями были получены прямо противоположные данные [38]. ГК-опосредованное угнетение секреции IL-17 Т-лимфоцитами ассоциируют с белок-белковыми взаимодействиями, при которых ГКР изолирует транскрипционные факторы (такие как STAT3, NFkB и AP-1) от промотора его гена [24]. В источниках научной периодики данных, освещающих влияние ГК на продукцию Т-клетками памяти IL-21, крайне мало. В целом снижение уровня секреции IL-21 Т-клетками связывают с прямым блокированием экспрессии гена IL-21 за счет взаимодействия ГК с транскрипционным фактором AP-1/NFAT [34, 39].

Интересно, что Т-клетки CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> больных РА были не чувствительны к супрессорному действию Dex в отношении секреции цитокинов IL-17 (2–16 мг) и IL-21 (весь диапазон концентраций). Лишь максимальные дозы ГК (32–64 мг) достоверно снижали секрецию IL-17 активированными Т-клетками CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>. Данные настоящего исследования не противоречат литературным. M. Noack (2016) описан ингибиторный эффект ГК в отношении продукции IL-17 *in vitro* в смешанной культуре периферических клеток крови и синовиоцитов, полученной у больных РА [40]. Также выявлено супрессорное действие ГК на содержание Th17-клеток на периферии и их секрецию IL-17 при активной фазе РА [37]. В эксперименте с использованием нокаутных мышей было показано, что IL-17 является одним из основных таргетных медиаторов воспаления (при



моделировании РА) для действия ГК [41]. Проведенный нами корреляционный анализ позволил обнаружить взаимосвязь числа CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> с содержанием IL-17 в супернатантах TCR-активированных CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>-культур больных РА при действии Dex ( $r = 0,563$ ;  $r = 0,470$ ;  $r = 0,783$ ;  $r = 0,873$ ;  $p < 0,05$  при добавлении в среду активатора и Dex в дозе 8, 16, 32 и 64 мг соответственно); с IL-21 ( $r = 0,352$ ;  $r = 0,465$ ;  $p < 0,05$  при добавлении в среду активатора и Dex в дозе 16 и 32 мг соответственно) и IFN $\gamma$  ( $r = 0,673$ ;  $r = 0,782$ ;  $r = 0,820$ ;  $p < 0,05$  при добавлении в среду активатора и Dex в дозе 16, 32 и 64 мг соответственно). Выявленные ассоциации могут свидетельствовать о резистентности TCR-активированной популяции Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> больных РА к противовоспалительному действию синтетического ГК Dex и сохранению высокого провоспалительного потенциала.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ограничивая процессы активации и пролиферации Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> при РА, Dex подавляет их чрезмерный рост. Индуцированное ГК повышение числа CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у больных РА может свидетельствовать об относительной резистентности этих клеток, возможно связанной с дефектами их апоптоза, к противовоспалительному супрессорному действию Dex. Эффекты Dex на секрецию TCR-активированными клетками CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, полученными у больных РА, провоспалительных факторов (IFN $\gamma$ , IL-2 и TNF $\alpha$ ) в целом носят угнетающий характер, подтверждая общий иммуносупрессорный механизм действия ГК, реализуемый через инактивацию основных транскрипционных факторов воспалительного ответа.

Наряду с этим CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Т-клетки больных РА оказались не чувствительны к супрессорному действию Dex в отношении продукции IL-17 и IL-21. Выявленные нами ассоциации между числом Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> и содержанием провоспалительных медиаторов (IL-17, IL-21 и IFN $\gamma$ ) у больных РА свидетельствуют о сохранении провоспалительного потенциала TCR-активированной популяции Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> у больных РА на фоне действия ГК. Мы предполагаем, что резистентность Т-клеток CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> у больных РА к супрессорному действию Dex приводит к сохранению и усилению функциональных возможностей аутореактивных клеток в патогенезе РА.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

## СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Перед включением в исследование от каждого пациента и их законных представителей было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование проводилось согласно Хельсинкской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Исследования одобрено локальным этическим комитетом (№ 2 от 11 ноября 2014 г.).

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Matsuki F., Saegusa J., Miyamoto Y., Misaki K., Kumagai S., Morinobu A. CD45RA-Foxp3(high) activated/effector regulatory T cells in the CCR7+CD45RA-CD27+CD28+ central memory subset are decreased in peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 438 (4): 778–783. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.05.120.
2. Sava F., Toldi G., Treszl A., Hajdú J., Harmath Á., Tulasay T., Vásárhelyi B. Expression of lymphocyte activation markers of preterm neonates is associated with perinatal complications // *BMC Immunol.* 2016; 17 (1): 19. DOI: 10.1186/s12865-016-0159-7.
3. Сохоневич Н.А. Роль цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15), в регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2015: 24.  
Sohonevich N.A. Rol' citokinov, imeyushchih obshchuyu  $\gamma$ -cep' receptorov (IL-2, IL-7, IL-15), v regulyacii funkcional'noj aktivnosti T-limfocitov [The role of cytokines, contains a common  $\gamma$ -chain of receptors (IL-2, IL-7, IL-15), in the regulation of the functional activity of T-lymphocytes]: avtoref. ... dis. kand. med. nauk. Tomsk, 2015: 24 (in Russian).
4. Cho B.A., Sim J.H., Park J.A., Kim H.W., Yoo W.H., Lee S.H., Lee D.S., Kang J.S., Hwang Y.I., Lee W.J., Kang I., Lee E.B., Kim H.R. Characterization of effector memory

- CD8+ T cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis // *J. Clin. Immunol.* 2012; 32 (4): 709–720. DOI: 10.1007/s10875-012-9674-3.
5. Van Amelsfort J.M., Jacobs K.M., Bijlsma J.W., Lafaber F.P., Taams L.S. CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid // *Arthritis Rheum.* 2004; 50 (9): 2775–2785. DOI: 10.1002/art.20499.
  6. Gattorno M., Prigione I., Morandi F., Gregorio A., Chiesa S., Ferlito F., Favre A., Uccelli A., Gambini C., Martini A., Pistoia V. Phenotypic and functional characterisation of CCR7+ and CCR7- CD4+ memory T cells homing to the joints in juvenile idiopathic arthritis // *Arthritis. Res. Ther.* 2005; 7 (2): R256–257. DOI: 10.1186/ar1485.
  7. Okada R., Kondo T., Matsuki F., Takata H., Takiguchi M. Phenotypic classification of human CD4+ T cell subsets and their differentiation // *Int. Immunol.* 2008; 20 (9): 1189–1199. DOI: 10.1093/intimm/dxn075.
  8. Baschant U., Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2010; 120 (2–3): 69–75. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2010.03.058.
  9. Bischof F., Melms A. Glucocorticoids inhibit CD40 ligand expression of peripheral CD4+ lymphocytes // *Cell Immunol.* 1998; 187 (1): 38–44. DOI: 10.1006/cimm.1998.1308.
  10. Gutsol A.A., Sokhnevich N.A., Iurova K.A., Haziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Litvinova L.S. Dose-dependent effects of dexamethasone on functional activity of T-lymphocytes different grade of differentiation // *Mol. Biol. (Mosk).* 2015; 49 (1): 149–157.
  11. Pandolfi J., Baz P., Fernández P., Discianni Lupi A., Payaslián F., Billordo L.A., Fainboim L., Arruvito L. Regulatory and effector T-cells are differentially modulated by dexamethasone // *Clin. Immunol.* 2013; 149 (3): 400–410. DOI: 10.1016/j.clim.2013.09.008.
  12. Ayroldi E., Macchiarulo A., Riccardi C. Targeting glucocorticoid side effects: selective glucocorticoid receptor modulator or glucocorticoid-induced leucine zipper? A perspective // *Faseb. J.* 2014; 28 (12): 5055–5070. DOI: 10.1096/fj.14-254755.
  13. Кремер Н.Ш. Теория вероятностей и математическая статистика. М.: ЮНИТИ-ДАНА, 2004: 573.
  - Kremer N.Sh. Teoriya veroyatnostej i matematicheskaya statistika [Theory of Probability and Mathematical Statistics]. М.: YUNITI-DANA Publ., 2004: 573 (in Russian).
  14. Reddy M., Eirikis E., Davis C., Davis H.M., Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function // *J. Immunol. Methods.* 2004; 293 (1–2): 127–142. DOI: 10.1016/j.jim.2004.07.006.
  15. Tang X., Yocum D.E., Dejonghe D., Nordensson K., Lake D.F., Richard J. Increased activation-induced cell death in peripheral lymphocytes of rheumatoid arthritis patients: the mechanism of action // *Immunology.* 2004; 112 (3): 496–505. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01888.x.
  16. Matsuki F., Saegusa J., Nishimura K., Miura Y., Kurosaka M., Kumagai S., Morinobu A. CD45RA-Foxp3(low) non-regulatory T cells in the CCR7-CD45RA-CD27+CD28+ effector memory subset are increased in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis // *Cell Immunol.* 2014; 290 (1): 96–101. DOI: 10.1016/j.cellimm.2014.05.011.
  17. Boumpas D.T., Anastassiou E.D., Older S.A., Tsokos G.C., Nelson D.L., Balow J.E. Dexamethasone inhibits human interleukin 2 but not interleukin 2 receptor gene expression *in vitro* at the level of nuclear transcription // *J. Clin. Invest.* 1991; 87 (5): 1739–1747. DOI: 10.1172/JCI115192.
  18. Liberman A.C., Druker J., Perone M.J., Arzt E. Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis. Cytokine Growth // *Factor Rev.* 2007; 18 (1–2): 45–56. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2007.01.005.
  19. Shipkova M., Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation // *Clin. Chim. Acta.* 2012; 413 (17–18): 1338–1349. DOI: 10.1016/j.cca.2011.11.006.
  20. Paulsen M., Janssen O. Pro- and anti-apoptotic CD95 signaling in T-cells // *Cell. Commun. Signal.* 2011; 9: 7. DOI: 10.1186/1478-811X-9-7.
  21. Paulsen M., Valentin S., Mathew B., Adam-Klages S., Bertsch U., Lavrik I., Krammer P.H., Kabelitz D., Janssen O. Modulation of CD4+ T-cell activation by CD95 co-stimulation // *Cell. Death. Differ.* 2011; 18 (4): 619–631. DOI: 10.1038/cdd.2010.134.
  22. Liberman A.C., Refojo D., Antunica-Noguerol M., Holsboer F., Arzt E. Underlying mechanisms of cAMP- and glucocorticoid-mediated inhibition of FasL expression in activation-induced cell death // *Mol. Immunol.* 2012; 50 (4): 220–235. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.01.008.
  23. Baumann S., Dostert A., Novac N., Bauer A., Schmid W., Fas S.C., Krueger A., Heinzel T., Kirchhoff S., Schütz G., Krammer P.H. Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer // *Blood.* 2005; 106(2): 617–625. DOI: 10.1182/blood-2004-11-4390.
  24. Banuelos J., Lu N.Z. A gradient of glucocorticoid sensitivity among helper T-cell cytokines // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016; 31: 27–35. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2016.05.002.
  25. Spreafico R., Rossetti M., Whitaker J.W., Wang W., Lovell D.J., Albani S. Epi polymorphisms associated with the clinical outcome of autoimmune arthritis affect CD4+ T-cell activation pathways // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016; 113 (48): 13845–13850. DOI: 10.1073/pnas.1524056113.
  26. Bertho N., Drénou B., Laupeze B., Berre C.L., Amiot L., Grosset J.M., Fardel O., Charron D., Mooney N., Fau-

- chet R. HLA-DR-mediated apoptosis susceptibility discriminates differentiation stages of dendritic/monocytic APC // *J. Immunol.* 2000; 164 (5): 2379–2385.
27. Muehling L.M., Mai D.T., Kwok W.W., Heymann P.W., Pomés A., Woodfolk J.A. Circulating Memory CD4+ T-cells target conserved epitopes of rhinovirus capsid proteins and respond rapidly to experimental infection in humans // *J. Immunol.* 2016; 197 (8): 3214–3224. DOI: 10.4049/jimmunol.1600663.
  28. Spreafico R., Rossetti M., van Loosdregt J., Wallace C.A., Massa M., Magni-Manzoni S., Gattorno M., Martini A., Lovell D.J., Albani S. A circulating reservoir of pathogenic-like CD4+ T cells shares a genetic and phenotypic signature with the inflamed synovial micro-environment // *Ann. Rheum. Dis.* 2016; 75 (2): 459–465. DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-206226.
  29. Astry B, Harberts E, Moudgil KD. A cytokine-centric view of the pathogenesis and treatment of autoimmune arthritis // *J. Interferon Cytokine Res.* 2011; 31 (12): 927–940. DOI: 10.1089/jir.2011.0094.
  30. Konya C., Paz Z., Apostolidis S.A., Tsokos G.C. Update on the role of Interleukin 17 in rheumatologic autoimmune diseases // *Cytokine.* 2015; 75 (2): 207–215. DOI: 10.1016/j.cyto.2015.01.003.
  31. Elshabrawy H.A., Chen Z., Volin M.V., Ravella S., Virupannavar S., Shahrara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis // *Angiogenesis.* 2015; 18 (4): 433–448. DOI: 10.1007/s10456-015-9477-2.
  32. Gharibi T., Majidi J., Kazemi T., Dehghanzadeh R., Motallebnezhad M., Babaloo Z. Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases // *Immunobiology.* 2016; 221 (2): 357–367. DOI: 10.1016/j.imbio.2015.09.021.
  33. Koetz K., Bryl E., Spickschen K., O'Fallon W.M., Goronzy J.J., Weyand C.M. T-cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97 (16): 9203–9208.
  34. Liberman A.C., Refojo D., Druker J., Toscano M., Rein T., Holsboer F., Arzt E. The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction // *Faseb. J.* 2007; 21 (4): 1177–1188. DOI: 10.1096/fj.06-7452com.
  35. Ratman D., Vanden Berghe W., Dejager L., Libert C., Tavernier J., Beck I.M., De Bosscher K. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013; 380 (1–2): 41–54. DOI: 10.1016/j.mce.2012.12.014.
  36. Altonsy M.O., Sasse S.K., Phang T.L., Gerber A.N. Context-dependent cooperation between nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and the glucocorticoid receptor at a TNFAIP3 intronic enhancer: a mechanism to maintain negative feedback control of inflammation // *J. Biol. Chem.* 2014; 289 (12): 8231–8239. DOI: 10.1074/jbc.M113.545178.
  37. Banuelos J., Cao Y., Shin S.C., Lu N.Z. Immunopathology alters Th17 cell glucocorticoid sensitivity // *Allergy.* 2016; 72 (3): 331–341. DOI: 10.1111/all.13051.
  38. Glass C.K., Saijo K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells // *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10 (5): 365–376. DOI: 10.1038/nri2748.
  39. Hermann-Kleiter N., Baier G. NFAT pulls the strings during CD4+ T helper cell effector functions // *Blood.* 2010; 115 (15): 2989–2997. DOI: 10.1182/blood-2009-10-233585.
  40. Noack M., Ndongo-Thiam N., Miossec P. Evaluation of anti-inflammatory effects of steroids and arthritis-related biotherapies in an in vitro coculture model with immune cells and synoviocytes // *Front Immunol.* 2016; 7: 509. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00509.
  41. Baschant U., Frappart L., Rauchhaus U., Bruns L., Reichardt H.M., Kamradt T., Bräuer R., Tuckermann J.P. Glucocorticoid therapy of antigen-induced arthritis depends on the dimerized glucocorticoid receptor in T-cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108 (48): 19317–19322. DOI: 10.1073/pnas.1105857108.

Поступила в редакцию 23.05.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

**Литвинова Лариса Сергеевна**, д-р мед. наук, зав. лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград.

**Тодосенко Наталья Михайловна**, аспирант, мл. науч. сотрудник, лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград.

**Хазиахматова Ольга Геннадьевна**, канд. биол. наук, науч. сотрудник, лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград.

**Юрова Кристина Алексеевна**, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград.

**Малинина Ирина Петровна**, врач высшей категории, заслуженный врач РФ, главный внештатный ревматолог МЗ Калининградской области, зав. отделением ревматологии, КОКБ, г. Калининград.

(✉) Литвинова Лариса Сергеевна, e-mail: larisalitvinova@yandex.ru.

УДК 616.72-002.77-085-092.4

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-207-219

For citation: Litvinova L.S., Todosenko N.M., Khaziakhmatova O.G., Malinina I.P., Yurova K.A. Cellular reactions of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-lymphocytes on dexamethason in normal patients and in patients with with rheumatoid arthritis *in vitro*. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 207–219.

## Cellular reactions of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-lymphocytes on dexamethason in normal patients and in patients with with rheumatoid arthritis *in vitro*

Litvinova L.S.<sup>1</sup>, Todosenko N.M.<sup>1</sup>, Khaziakhmatova O.G.<sup>1</sup>, Malinina I.P.<sup>2</sup>, Yurova K.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Immanuel Kant Baltic Federal University (IKBFU)

3, Botkina Str., Kaliningrad, 236016, Russian Federation

<sup>2</sup> Regional Clinical Hospital of the Kaliningrad Region

74, Klinicheskaya Str., Kaliningrad, 236019, Russian Federation

### ABSTRACT

**The aim of the study** was to analyze the influence of glucocorticoid (GC) dexamethasone (Dex) on changes in CD4<sup>+</sup> T-cells expressing the surface molecule of activation (CD25, CD71, HLA-DR and CD95) and their ability to produce proinflammatory mediators in cultures of TCR-stimulated CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-lymphocytes obtained from healthy donors and patients with rheumatoid arthritis *in vitro*.

**Materials and methods.** The study included 50 patients and 20 healthy donors. T-cell cultures (CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) were obtained from mononuclear leukocytes of immunomagnetic separation (MACS<sup>®</sup> technology). As an activator of T-lymphocytes, antibiotic particles with biotinylated antibodies against CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>, which simulate the process of costimulation of T cells by antigen-presenting cells, were used. The following concentrations of dexamethasone (2, 8, 16, 32, 64 mg) were used in the experiment. The change in the immunophenotype of T-lymphocytes was analyzed by flow cytometry. The secretion of CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-cells of proinflammatory cytokines IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17 and IL-21 was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results.** The general suppressor effect of Dex on CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-cell cultures mediated by a decrease in the number of CD4<sup>+</sup> T cells expressing activation molecules (CD25) and proliferation (CD71), as well as inhibition of the production of inflammatory mediators: IFN $\gamma$ , IL-2 and TNF $\alpha$ . It is shown that against the background of TCR activation Dex increases the number of CD4<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> cells in CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cultures obtained from RA patients and does not change their content in the control. The correlations between the number of proinflammatory factors (IL-17, IL-21 and TNF $\alpha$ ) in CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> T cells in supernatants of cell cultures in RA patients indicate the presence of a pro-inflammatory potential of this population of T cells. We assume that the resistance of CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> T cells in RA patients to the suppressor effect of GC generally leads to the preservation and enhancement of the functionality of autoreactive cells in the pathogenesis of RA.

**Key words:** rheumatoid arthritis, activation molecules, proinflammatory mediators, dexamethasone.

Received May 23.2017  
Accepted November 08.2017

Litvinova Larisa S., DM, Head of the Laboratory Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation.

**Todosenko Natalia M.**, Postgraduate Student, Junior Researcher, Laboratory Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation.

**Khaziakhmatova Olga G.**, PhD, Researcher, Laboratory Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation.

**Yurova Kristina A.**, PhD, Researcher, Laboratory Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation.

**Malinina Irina P.**, Honored Doctor of the Russian Federation, Doctor of the Highest Category, Chief Freelance Rheumatologist of the Ministry of Health of Kaliningrad Region, Head of the Department of Rheumatology of the Regional Clinical Hospital of the Kaliningrad Region, Kaliningrad, Russian Federation.

(✉) **Litvinova Larisa S.**, e-mail: [larisalitvinova@yandex.ru](mailto:larisalitvinova@yandex.ru).