

ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ НА CD4 T-ЛИМФОЦИТАХ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

© 2019 г. Е. Г. Костоломова^{1,2*}, Ю. Г. Суховой¹, И. Г. Унгер¹, Т. В. Акунеева¹,
О. А. Кривоносова², Т. В. Зенкова², О. В. Макеева², О. Ю. Швец²

*E-mail: lenakost@mail.ru

¹ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

²ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Тюмень, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 26.03.2019

В исследовании изучена коэкспрессия CD69 и HLA-DR на синовиальных T-лимфоцитах при ревматоидном артрите. Полученные результаты позволяют предполагать, что в синовиальной жидкости происходит постоянная активация T-клеток, приводящая к экспрессии маркера CD69 на поверхности хронически стимулированных лимфоцитов только в месте воспаления.

Ключевые слова: проточная цитометрия, активационные маркеры, T-лимфоциты, ревматоидный артрит

DOI: 10.31857/S102872210006618-4

Адрес: 625027, Тюмень, ул. Котовского, 5. ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Костоломова Елена Геннадьевна, Тел. +79044930674 (моб.)
E-mail: lenakost@mail.ru

Авторы:

Костоломова Е. Г., к.б.н., ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Тюмень, Россия;
Суховой Ю. Г., д.м.н., профессор, директор ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

Унгер И. Г., к.м.н., в.н.с. ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

Акунеева Т. В., с.н.с. ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

Кривоносова О. А., студент ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Тюмень, Россия;

Зенкова Т. В., студент ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Тюмень, Россия;

Макеева О. В., студент ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Тюмень, Россия;

Швец О. Ю., студент ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Тюмень, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Предполагают, что сценарий формирования ревматоидного артрита (РА) начинается с развития аутоиммунных реакций и продолжается

местным воспалением. CD4⁺ T-клетки участвуют в распространении воспаления и повреждения тканей при РА. При РА регистрируется усиленная инфильтрация синовиальной полости T-лимфоцитами, преимущественно, аутореактивными CD4⁺ T-клетками [1]. В научной литературе факт активации T-лимфоцитов активно обсуждается с позиций физиологической и иммунопатологической модуляции активности иммунного ответа. На основании исследований *in vitro* маркеры активации T-лимфоцитов были классифицированы как очень ранние (CD69), ранние (CD25) и поздние (HLA-DR) в зависимости от их экспрессии во времени после активации [2]. В связи с этим, логичным является выяснение роли активированных CD4⁺ T-лимфоцитов в патогенезе РА.

Цель исследования. Оценить экспрессию мембранных молекул очень ранней (CD69), ранней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации на CD4⁺ T-лимфоцитах периферической крови и синовиальной жидкости у пациентов с впервые выявленным РА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы крови и синовиальной жидкости были получены от 10 пациентов с диагнозом

ревматоидный артрит (впервые выявлен) (5 женщин, средний возраст $35,2 \pm 7,4$ лет и 5 мужчин в средний возраст $37,4 \pm 8,1$ лет). Верификация диагноза и набор пациентов в группы исследования осуществлялся в отделении ревматологии ГБУЗ ТО «ОКБ № 1». Постановка диагноза ревматоидного артрита была выполнена согласно приказу № 21 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным ревматоидным артритом» от 13 января от 2006 г. Группу контроля составили 10 здоровых доноров (5 женщин, средний возраст $34,5 \pm 6,1$ лет и 5 мужчин, средний возраст $36,3 \pm 8,3$ лет). Образцы синовиальной жидкости (СЖ) и периферической (ПК) крови отбирали в вакуумные пробирки с добавлением КЗЭДТА. СЖ обрабатывали гиалуронидазой (Sigma Chemical Co, США) в течение 20 мин при 37°C для снижения вязкости, затем смешивали с равным объемом среды RPMI 1640. Выделение мононуклеарных клеток (МНК) лейкоцитов из ПК и СЖ проводили стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин («Pharmacia», Швеция) ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). МНК ПК и СЖ окрашивали моноклональными антителами против CD69, CD25, HLA-DR, CD3, CD4 (Beckman Coulter, США). После окрашивания образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора при 1500 об/мин в течение 7 мин. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ «Excel» и «Statistica 7.0» для WinXP. Статистическую достоверность различий между двумя группами данных оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни при выбранном уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

CD69 – интегральный трансмембранный гликопротеин II типа, относится к лектинам С-типа. CD69 не экспрессируется на покоящихся лимфоцитах периферической крови, но появляется после активации лимфоцитов в течение 3 часов после антигенной стимуляции и достигает максимальной экспрессии между 18 и 24 часами. Как правило, в крови здоровых лиц обнаруживается не более чем 1–4% $\text{CD4}^+\text{CD69}^+$ Т-клеток [3]. В рамках проведенного исследования CD69 был обнаружен на $0,9 \pm 0,1\%$ Т-хелперов, находящихся в кровотоке здоровых доноров. В периферической крови и синовиальной жидкости экспрессия CD69 составила ($2,9 \pm 0,3\%$, $p < 0,001$ и $54,5 \pm 3,2\%$ соответственно). Молекула CD25

является α -цепью рецептора IL-2, экспрессируется на ранних этапах активации лимфоцитов [4]. В ПК здоровых доноров количество CD4^+ Т-лимфоцитов, экспрессирующих на своей мембране активационную молекулу CD25, составило $3,19 \pm 0,5\%$. В группе интереса наблюдалось незначительное снижение количества Т-хелперов $1,6 \pm 0,3\%$ ($p < 0,05$). В СЖ данная субпопуляция составила $6,8 \pm 0,6\%$. HLA-DR – поверхностный маркер лимфоцитов, принадлежащий к молекулам гистосовместимости МНС II. HLA-DR является маркером не только поздней, начинает экспрессироваться на мембране клеток примерно с третьих суток после активации, но и длительной активации клеток, т.е. HLA-DR-позитивные лимфоциты продолжительно циркулируют в крови, а экспрессия этого маркера наиболее полно отражает активационное состояние клеток [4]. Число $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{HLA-DR}^+$ в ПК здоровых доноров составляло $4,91 \pm 0,79\%$. У пациентов с РА этот показатель возрастал до $15,0 \pm 1,8\%$ при $p < 0,001$, в СЖ $74,2 \pm 2,9\%$. Нами были изучены все возможные коэкспрессии трех маркеров активации на Т-хелперах $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD69}^+\text{HLA-DR}^+$; $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{HLA-DR}^+$; $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD69}^+\text{CD25}^+$. Число данных субпопуляций у больных с РА в ПК не отличалось от контрольных значений. В СЖ количество $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD69}^+\text{HLA-DR}^+$ клеток в группе интереса составило $71,74 \pm 1,9\%$; $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{HLA-DR}^+$ ($5,51 \pm 0,4\%$); $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD69}^+\text{CD25}^+$ ($4,70 \pm 0,8\%$) соответственно. Согласно представленным нами данным коэкспрессия маркеров CD69 и HLA-DR активации на синовиальных CD4^+ Т-лимфоцитах от пациентов с РА, достигает высокой степени позитивности. В то же время не было обнаружено параллельного увеличения маркера ранней CD25 на Т-хелперах в СЖ. Это может свидетельствовать о ранней стадии истощения резервов данной популяции клеток при хроническом воспалении и постоянной активации иммунной системы [5]. Фактически, среди подгрупп, оцененных в настоящем исследовании, $\text{CD4}^+\text{CD69}^+\text{HLA-DR}^+$ Т-клетки были наиболее представлены в СЖ. Наши данные согласуются с данными, полученными другими авторами [6]. Возможно, что при РА активация синовиальных Т-лимфоцитов следует альтернативным путем. Помимо посредничества притока Ca^{++} , CD69 избирательно активирует цитозольную фосфолипазу A2 (PLA2) с последующим образованием окисленных метаболитов арахидоновой кислоты [7].

Полученные нами результаты позволяют предполагать, что в СЖ при РА происходит постоян-

ная активация Т-клеток, что приводит к экспрессии очень раннего активационного маркера на поверхности хронически стимулированных лимфоцитов только в месте воспаления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Veale D.J.* Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis / D.J. Veale, C. Orr, U. Fearon // *Semin Immunopathol.*— 2017. doi: 10.1007/s00281-017-0633-1.
2. *Moore T.L.* Immune Complexes in Juvenile Idiopathic Arthritis / T.L. Moore // *Front Immunol.*— 2016.— Vol.7.— P. 177. doi: 10.3389/fimmu.2016.00177.
3. *Shipkova M., Wieland E.* Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin.Chim. Acta.*, 2012, vol. 413, no. 17–18, pp. 1338–1349.
4. *Wieland E., Shipkova M.* Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers // *Clin Biochem.*— 2016.— Vol.49(4–5).— P. 347–354.
5. *Череев Н.А., Горлина Н.К., Козлов И.Г.* CD-маркеры в практике клинико-диагностических лабораторий // *Клиническая лабораторная диагностика.*— 1999, № 6. С. 24–31. [*Cheredeev A. N., Gorlina N. K., Kozlov I. G.* CD-markers in the practice of clinical diagnostic laboratories]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*— *Clinical Laboratory Diagnostics*, 1999, no. 6, pp. 25–31.]
6. *Yamada H., Nakashima Y., Okazaki K., Mawatari T., Fukushi J., Oyamada A., Fujimura K., Iwamoto Y., Yoshikai Y.* Preferential Accumulation of Activated Th1 Cells Not Only in Rheumatoid Arthritis But Also in Osteoarthritis Joints // *The Journal of Rheumatology.*— 2011.— Vol. 38, № 8.— P. 1569–1575.
7. *Testi R., Pulcinelli F.M., Cifone M.G., Trotta R., Torelli G., Demaria R., Frati L., Santoni A.* Signaling in T lymphocytes: a possible accessory pathway initiated at the CD69 receptor. *J. Immunol. Res.* 1992, 4, 111–117.

FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS EXPRESSION MARKERS OF ACTIVATION ON CD4 T-LYMPHOCYTES AT RHEUMATOID ARTHRITIS

© 2019 E. G. Kostolomova^{1,2*}, U. G. Suhovej¹, I. G. Unger¹, T. V. Akuneeva¹, O. A. Krivonosova², T. V. Zenkova², O. V. Makeeva², O. J. Shvets²

*E-mail: lenakost@mail.ru

¹«Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia;

²FSBEI of Higher Education «Tyumen state medical university» of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Tyumen, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 26.03.2019

In research, it is studied coexpression CD69 and HLA-DR on sinovial T-lymphocytes at rheumatoid arthritis. The received results allow to assume, that in sinovial fluid there is a constant activation of T-cell that leads expression a marker CD69 on a surface chronically it stimulates lymphocytes only at the location the inflammation.

Key words: the activation markers, flow cytometry, T-lymphocytes, rheumatoid arthritis

Authors:

Kostolomova E. G., ☒ PhD (Biology), the assistant to faculty of pathological physiology FSBEI of Higher Education «Tyumen state medical university» of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Tyumen, Russia. **E-mail:** lenakost@mail.ru;

Suhovej J. G., MD (Medicine), Professor, Director «Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia;

Unger I. G., PhD (Medicine), leading research associate «Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia;

Akuneeva T. V., senior research associate «Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia;

Krivonosova O. A. student FSBEI of Higher Education «Tyumen state medical university» of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Tyumen, Russia;

Zenkova T. V., student FSBEI of Higher Education «Tyumen state medical university» of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Tyumen, Russia;

Makeeva O. V., student FSBEI of Higher Education «Tyumen state medical university» of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Tyumen, Russia;

Shvets O. J., student FSBEI of Higher Education «Tyumen state medical university» of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Tyumen, Russia.