

ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕГУЛЯТОРНЫХ CD4⁺ Т-КЛЕТОК ПРИ НЕКОТОРЫХ ПАТОЛОГИЯХ, СОПРОВОЖДАЮЩИХСЯ РАЗВИТИЕМ ВОСПАЛЕНИЯ

Семакова П. Н., Олейник Е. К., Марусенко И. М.

ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН,
Петрозаводск, Россия.

В работе представлены данные о содержании основных субпопуляций регуляторных Т-лимфоцитов (Трег) периферической крови, полученных методом проточной цитометрии при некоторых воспалительных заболеваниях: остром панкреатите и ревматоидном артрите.

Ключевые слова: регуляторные Т-клетки, проточная цитофлуориметрия, воспалительные патологии, FOXP3

Введение. Цитометрический анализ фенотипов регуляторных CD4⁺ Т-клеток, характеризующихся экспрессией транскрипционного фактора forkhead box P3 (FOXP3) и мембранного маркера CD25 (α-цепь рецептора к интерлейкину 2), представляет значительный интерес в клинической лабораторной диагностике [1-2]. В значительной степени это связано с функциональными особенностями Трег-лимфоцитов. С одной стороны Трег-клетки обеспечивают поддержание гомеостаза на уровне иммунной системы, предотвращая развитие патологических аутоиммунных реакций. С другой стороны Трег-лимфоциты могут влиять на протекание патологических процессов, обеспечивая ингибирование функциональной активности эффекторов иммунного ответа, прежде всего CD4-клеток, CD8-лимфоцитов, цитотоксических Т-клеток и некоторых других типов иммунных клеток. Кроме того, многочисленные исследования свидетельствуют о важной роли Трег-лимфоцитов в патогенезе различных форм онкозаболеваний, развитии аутоиммунных реакций, контроле процессов старения, а также ассоциированных со старением патологий [3-7].

Целью данной работы было изучение субпопуляционного состава Трег-клеток при патологиях, сопровождающихся развитием воспаления: остром панкреатите и ревматоидном артрите. Несмотря на принципиальные различия этиопатогенеза данных заболеваний, значительный интерес представляет изучение

субпопуляции Трег-клеток в контроле воспаления, вызываемого различными молекулярно-биологическими механизмами.

Материалы и методы. Исследование выполнено с применением научного оборудования и приборной базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН. Объектом исследования были периферические Трег-лимфоциты пациентов с острым панкреатитом и ревматоидным артритом, а также здоровых доноров проживающих на территории Республики Карелия.

Оценку содержания основных субпопуляций Трег-лимфоцитов проводили методом многоцветной проточной цитометрии на приборе Cytomics FC 500 («Beckman Coulter», США) с применением программного обеспечения CXP 2.0.

Для окрашивания клеток цельной крови использовали моноклональные антитела CD4, CD25, CD127, CD45RO, CD45RA, FOXP3 («Beckman Coulter», США), а также соответствующие изотипические контроли. После окрашивания применяли буфер для лизиса эритроцитов FACS Lysing Solution (BD, США). Для пермеабилзации клеток и последующего окрашивания антителами к транскрипционному фактору FOXP3 использовали набор буферов компании eBioscience (США). Все процедуры проводили в соответствии со стандартными протоколами производителей.

Анализ данных и статистическую обработку проводили с использованием программ-

ного обеспечения FCS 3.0 (De Novo Software, США) и пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Достоверность различий между группами рассчитывали по критерию Манна-Уитни, для выявления и оценки характера связи между признаками использовали коэффициент корреляции Спирмена. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

Результаты и обсуждение. Всего было исследовано 26 образцов периферической крови больных ревматоидным артритом в возрасте от 32 до 75 лет. Контрольную группу составили 18 образцов крови здоровых доноров в возрасте от 25 до 69 лет.

Определяли содержание субпопуляций $CD4^+$ Трег-лимфоцитов периферической крови с различными фенотипами у больных ревматоидным артритом и у здоровых доноров. По нашим данным в периферической крови при ревматоидном артрите отмечено повышенное содержание общего числа $CD4^+$ клеток, экспрессирующих маркер $FOXP3^+$ ($CD4^+FOXP3^+$; $9,7 \pm 2,8\%$) и лимфоцитов с фенотипом $CD4^+FOXP3^+CD45RO^+$ ($8,0 \pm 2,2\%$) относительно контрольной группы ($6,8 \pm 1,4\%$ и $5,9 \pm 1,3\%$, соответственно; $p < 0,05$). В то же время количество $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Трег-лимфоцитов у больных ревматоидным артритом было на уровне контроля. Кроме того у больных ревматоидным артритом число $CD4^+CD45RA^-CD45RO^+$ клеток было выше ($60,1 \pm 13,1\%$ против $50,1 \pm 4,5\%$ в контроле). При ревматоидном артрите обнаружена положительная корреляция между содержанием клеток памяти и Трег-клетками ($r = 0,55$, $p < 0,02$).

Таким образом, при ревматоидном артрите наблюдалось увеличение содержания $FOXP3^+$ лимфоцитов и клеток, экспрессирующих маркер клеток памяти. Повышенное содержание этих субпопуляций может указывать на системную активацию лимфоцитов при ревматоидном артрите.

Также было исследовано 24 образца периферической крови больных острым панкреатитом. Диагноз был поставлен на основе классификации, принятой на IX Всероссийском съезде хирургов в 2000 году. Среди обследованных 11 человек имели деструктивную форму острого панкреатита. Средний возраст больных составил $47,4 \pm 16,2$ лет. Забор крови осуществляли на 1-10 сутки после поступления на лечение, до оперативного вмешательства.

При изучении субпопуляционного состава Трег-клеток при остром панкреатите наблю-

далось увеличение содержания $CD4^+CD25^{high}$ клеток ($10,3 \pm 3,5\%$, против $6,1 \pm 1,2\%$ в контроле; $p < 0,05$), $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ лимфоцитов ($8,9 \pm 1,9\%$ и $5,3 \pm 1,2\%$; $p < 0,05$). В отличие от результатов исследования субпопуляции с фенотипом $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ при ревматоидном артрите, у больных с острым панкреатитом число $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ клеток было выше относительно контрольной группы ($7,7 \pm 1,6\%$ и $3,4 \pm 1,2\%$ соответственно; $p < 0,05$). Содержание субпопуляций клеток памяти, экспрессирующих маркер $CD45RO$ было на уровне контроля.

При остром панкреатите, в отличие от ревматоидного артрита, отмечено более существенное увеличение содержания $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Трег-клеток. Мы предполагаем, что увеличение численности периферических Трег-клеток при панкреатите может быть проявлением компенсаторной реакции организма, приводящей к активации иммунной супрессии и обеспечивающей предотвращение развития чрезмерного патологического воспалительного процесса.

Определение содержания отдельных субпопуляций Трег-клеток, а также отдельных маркеров Т-клеток и Трег-лимфоцитов может быть использовано в качестве дополнительного критерия в оценке состояния иммунной системы у больных с заболеваниями, сопровождающимися развитием острого или хронического воспаления.

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема № 0221-2014-0040) и при поддержке РФФИ (проект № 16-04-00567).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moradi B, Schnatzer P, Hagmann S. et al. $CD4^+CD25^+/highCD127^{low/-}$ regulatory T cells are enriched in rheumatoid arthritis and osteoarthritis joints-analysis of frequency and phenotype in synovial membrane, synovial fluid and peripheral blood // *Arthritis Res Ther.* – 2014. – Vol.16: R97.
2. Kawashiri S.Y., Kawakami A., Okada A. et al. $CD4^+CD25^{(high)}CD127^{(low/-)}$ Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis // *J Rheumatol.* – 2011. – Vol.38. – P. 2517-21.
3. Чуров А.В., Олейник Е.К., Олейник В.М. Роль трансформирующего фактора роста- β в формировании иммуносупрессии в онкогенезе // *Цитокины и воспаление.* – 2009. – Т. 8. – № 3, С. 11-15. [Churov A. V., Oleinik E. K., Oleinik V. M. The role of transforming growth factor β in oncogenesis. *Cytokines and Inflammation* 2009, 8, 11-15].

4. Чуров А. В., Олейник Е. К., Олейник В. М. TGF- β 1 и регуляторные Т-клетки в формировании иммунной супрессии у онкологических больных // Цитокины и воспаление.– 2009.– Т. 8.– № 2, С. 27-30. [Churov A. V., Oleinik E. K., Oleinik V. M. The role of TGF- β 1 and regulatory T cells in immune suppression in cancer. *Cytokines and Inflammation* 2009, 8, 27-30].
5. Кравченко П. Н., Жулай Г. А., Чуров А. В. и др. Субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови больных ревматоидным артритом // Вестник РАМН.– 2016.– Т. 71.– № 2, С. 148-153. [Kravchenko P. N., Zhulai G. A., Churov A. V., Oleinik E. K. et al. Subpopulations of regulatory T-lymphocytes in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk* 2016, 71, 148-153].
6. Чуров А. В. Регуляторные Т-клетки и старение организма // Успехи геронтологии.– 2013.– Т. 26.– № 4., С. 603-609. [Churov A. V. Regulatory T cells and aging. *Advances in Gerontology* 2013, 26, 603-609].
7. Олейник Е. К., Чуров А. В., Олейник В. М. Экспрессия молекулярных маркеров иммунной супрессии FOXP3, TGF β и TGF β -RII в лимфоцитах периферической крови у больных различными иммунными патологиями // Медицинская иммунология.– 2009.– Т. 11.– № 4-5., С. 430-431. [Oleinik E. K., Churov A. V., Oleinik V. M. Expression of immune suppression molecular markers FOXP3, TGF β and TGF β -RII in lymphocytes of peripheral blood of patients with various immune pathologies. *Medical immunology* 2009, 11, 430-431].

TREG CELLS AND INFLAMMATORY DISEASES

Semakova P. N., Zhulai G. A., Oleinik E. K.

Federal State Budgetary Institution of Science "Institute of Biology of the Karelian Research Centre" of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia

This work highlights the flow cytometry data about the level of several regulatory T cell (Treg) subpopulations in inflammatory diseases: acute pancreatitis and rheumatoid arthritis.

Key words: regulatory T-cells, flow cytometry, inflammatory pathologies, FOXP3