

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛПРЕДНИЗОЛОНА НА АКТИВАЦИЮ TCR-СТИМУЛИРОВАННЫХ CD4⁺CD45RO⁺ Т-ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ В СИСТЕМЕ IN VITRO

Тодосенко Н. М., Юрова К. А., Хазиахматова О. Г.,
Литвинова Л. С.

Балтийский федеральный университет им. И. Канта,
Калининград, Россия

Изучали роль метилпреднизолона (МП) в функциональной активности CD4⁺CD45RO⁺ Т-клеток, полученных у больных ревматоидным артритом (РА) и здоровых доноров в системе *in vitro*. Показано, что МП значительно снижает число TCR-активированных CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺ и CD4⁺CD45RO⁺CD71⁺ Т-лимфоцитов, в культурах больных РА и у здоровых доноров. Снижение числа CD4⁺CD28⁺ Т-клеток в обеих группах под влиянием МП способствует образованию терминально-дифференцированных эффекторных Т-клеток.

Ключевые слова: Т-клетки памяти, метилпреднизолон, CD25, CD71, CD28

Актуальность. Ревматоидный артрит (РА) тяжелое, хроническое аутоиммунное заболевание (АИЗ) опорно-двигательного аппарата, характеризующееся системным воспалением периферических суставов, приводящее к разрушению суставного хряща и кости [1]. Основную роль в патогенезе РА играют активированные CD4⁺ Т-лимфоциты. Стандартным лечением пациентов с РА, несмотря на серьезные побочные эффекты, является терапия глюкокортикоидами (ГК), в связи с непревзойденным противовоспалительным действием ГК. Однако влияние синтетических ГК (в частности, метилпреднизолона, МП) на функциональную активность аутореактивных CD4⁺ Т-клеток памяти, ассоциированную с экспрессией молекул активации, при РА не исследовано.

Цель работы: изучить влияние фармакологических концентраций МП на изменение числа CD4⁺CD45RO⁺ клеток, экспрессирующих молекулы активации (CD25, CD71, CD28) у больных РА (в системе *in vitro*) на фоне TCR-активации.

Методы. Материалом для исследования служила венозная кровь 50 больных РА (36,4 ± 7,2 лет) и 20 условно здоровых доноров (35,3 ± 8,9 лет). Выделенные методом иммуномагнитной сепарации («MiltenyiBiotec», Germany) примированные (CD45RO⁺) Т-лимфоциты

(1×10⁶кл/мл) культивировали в 48-луночном планшете в бессывороточной среде Искова («Sigma», USA), без/ и в присутствии Т-клеточного активатора (T-Cell Activation/Expansion Kithuman (Ac/Exp) («MiltenyiBiotec», Germany)) и метилпреднизолона (МП) («OrionPharma», Россия) в разных концентрациях или без него (контроль) в течение 48 ч при 37°C и 5% CO₂. Варианты культивирования: интактная проба; проба с добавлением Ac/Exp; пробы с добавлением Ac/Exp и МП (10,6; 21,3; 42,6; 85,3; 170,7 мг). Исследование количества Т-лимфоцитов, несущих поверхностные маркеры (CD45RO, CD4, CD25, CD71, CD28) проводили методом проточной цитометрии с помощью МКАТ, конъюгированных с FITC, PE, PE-Cy7 или PerCP («Abcam», Cambridge, UK и «e-Bioscience», USA) на приборе MACSQuant («MiltenyiBiotec», Germany). Результаты цитометрического анализа были проанализированы с помощью программы «KALUZA Analysis Software» (BeckmanCoulter, USA). Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения IBM SPSS Statistics v22.00 (USA).

Основные результаты. На момент окончания срока инкубации (48 ч), общее число клеток (10⁶ кл/мл) в интактных CD3⁺CD45RO⁺ культурах у здоровых доноров составило 1,01

(0,87-1,21)%, а у больных РА – 0,88 (0,85-0,91)%. После TCR-активации, в контроле регистрировалось увеличение ($p < 0,05$) общего числа клеток на 22%; у больных РА данный показатель не изменялся. Сочетанное действие активатора и МП сопровождалось снижением ($p < 0,05$) общего числа Т-клеток в пробах здоровых доноров и оставалось без изменений в культурах Т-клеток больных РА. Полученные данные подтверждают антипролиферативное действие ГК [1]. Жизнеспособность Т-клеток в интактных пробах CD45RO⁺ клеток у здоровых доноров составила 71,68 (64,44-79,06)%, у больных РА – 51,33 (41,39-60,08)%. TCR-активация приводила к снижению числа живых клеток в культурах здоровых доноров ($p < 0,05$) до 60,25 (55,73-66,84)%, тогда как у больных РА эти цифры были сопоставимы с интактными значениями. МП снижал жизнеспособность клеток в культурах от здоровых доноров (дозозависимый эффект МП: результаты регрессионного анализа $r^2 = -0,373$, $p = 0,001$) и от больных РА (только концентрации 85,3 и 170,7 мг) по сравнению с пробами только с добавлением активатора. Наши результаты подтверждают способность МП индуцировать апоптоз Т-клеток (в большей степени в культурах здоровых доноров), снижая воспалительный ответ [1]. После 48 ч инкубации количество CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺ клеток в интактных пробах здоровых доноров составляло 3,11 (2,99-3,14)%, у больных РА – 1,95 (1,60-2,70)%. Добавление активатора способствовало росту числа CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в CD3⁺CD45RO⁺ культурах, в среднем в 12 раз в обеих группах ($p < 0,05$). Инкубация активированных Т-клеток памяти с МП сопровождалась уменьшением ($p < 0,05$) количества CD4⁺CD25⁺ лимфоцитов в обеих группах (здоровые доноры – $r^2 = 0,860$, $p = 0,001$; больные РА – $r^2 = 0,195$, $p = 0,001$). В интактных CD3⁺CD45RO⁺ культурах здоровых доноров (через 48 ч) число CD71-позитивных клеток составило 4,70 (4,58-5,43)%, а у больных РА 0,64 (0,35-0,85)%. Культивирование с активатором привело к увеличению числа CD4⁺CD71⁺ клеток ($p < 0,05$) в обеих группах (в контроле – в 3 раза, при РА – в 13 раз), по сравнению с пробами без Ac/Exp. Сочетанное действие активатора и МП на CD45RO⁺ клетки сопровождалось дозозависимым снижением (здоровые: $r^2 = 0,640$, $p = 0,001$; больные РА: $r^2 = 0,479$, $p = 0,001$) количества CD4⁺CD45RO⁺CD71⁺

лимфоцитов в обеих группах. Наши результаты подтверждают ингибирующее действие ГК на экспрессию IL-2-зависимых молекул (CD25 и CD71) активированными CD4⁺ Т-клетками [2]. В конце 48-часового периода инкубации, количество CD4⁺CD28⁺ лимфоцитов в CD3⁺CD45RO⁺ культурах составило 48,53 (47,02-49,41)% в контроле, а у больных РА – 33,31 (32,65-33,84)%. Добавление Ac/Exp сопровождалось снижением ($p < 0,05$) числа CD28-позитивных клеток в обеих группах. На фоне TCR-активации, внесение МП приводило к снижению количества CD28-позитивных клеток в обеих группах (здоровые – $r^2 = 0,749$, $p = 0,001$; больные РА – $r^2 = 0,691$, $p = 0,001$). Снижение экспрессии молекулы CD28 на CD4⁺CD45RO⁺ клетках под действием МП указывает на способность ГК угнетать функциональную активность Т-клеток, а также способствовать их переходу в терминально-дифференцированную стадию созревания [3].

Выводы:

1. МП не влияет на общее количество активированных CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток у больных РА, но снижает данный показатель в группе контроля.

2. МП однонаправленно подавляет активацию (CD25) и пролиферацию (CD71) CD4⁺ Т-клеток в CD3⁺CD45RO⁺ культурах, полученных у больных РА и в контроле.

3. МП ингибирует экспрессию молекулы CD28 на TCR-активированных CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитах в норме и при РА, способствуя их терминальной дифференцировке и созреванию в клетки с высоким эффекторным потенциалом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Development of novel treatment strategies for inflammatory diseases-similarities and divergence between glucocorticoids and GILZ /Q. Cheng, E. Morand, Y. H. Yang// Front Pharmacol.– 2014.– № 5 – p. 169.
2. Влияние дексаметазона на активацию и пролиферацию Т-клеток иммунной памяти /А.А. Гуцол, Н.А. Сохоневич, В.И. Селедцов и др.// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.– 2013.– Т. 155, № 4.– с. 468-470.
3. 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. /F. Matsuiki, J. Saegusa, Y. Miyamoto et. al.//Biochem Biophys Res Commun.– 2013.– Vol 6; № 438 – p. 778-83.

INFLUENCE OF METHYLPREDNISOLON ON THE ACTIVATION OF TCR-STIMULATED CD4⁺CD45RO⁺ T-LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS IN THE SYSTEM *IN VITRO*

Todosenko N. M., Yurov C. A., Haziahmatova O. G., Litvinova L. S.

Baltic Federal University. Kant, Kaliningrad, Russia

The effect of methylprednisolone (MP) on the functional activity of CD4⁺ CD45RO⁺ T cells obtained in patients with rheumatoid arthritis (RA) and healthy donors in the in vitro system was studied. It has been shown that MP significantly reduces the number of TCR-activated CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺ and CD4⁺CD45RO⁺CD71⁺ T-lymphocytes in cultures of RA patients and in healthy donors. MP, reducing the number of CD4⁺CD28⁺ T cells, promotes the formation of terminal-differentiated memory effector T-cells.

Key words: Memory T-cells, methylprednisolone, CD25, CD71, CD28

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ БОВГИАЛУРОНИДАЗЫ АЗОКСИМЕРА В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИТА У ЖЕНЩИН С МИОМОЙ МАТКИ

Трошина Н. А., Надвикова Т. В., Смольникова Л. А.

*ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Челябинск, Россия*

Целью нашего исследования было оценить клиничко-иммунологическую эффективность Бовгиалуронидазы азоксимера («Лонгидаза») в лечении активной стадии хронического неспецифического эндометрита у женщин с миомой матки. Включение Бовгиалуронидазы азоксимера в комплексное лечение ХЭ неспецифической этиологии у женщин с миомой матки повышает клиническую эффективность и способствует улучшению показателей врожденного иммунитета.

Ключевые слова: хронический эндометрит, миома матки, врожденный иммунитет, бовгиалуронидаза азоксимер

В последние годы проведены многочисленные исследования, посвященные хроническому эндометриту, обсуждаются вопросы этиологии, целесообразности антибактериальной и иммунокорректирующей терапии [1, 2, 3]. При этом в клинической практике нередко имеет место сочетание воспалительного процесса в эндометрии с другими патологическими состояниями половых органов, в частности, с миомой матки. Большинство исследователей рассматривают хронический эндометрит как первично-инфекционный воспалительный процесс [4], поэтому первой линией защиты при попадании микроорганизмов в эндометрий являются факторы врожденного имму-

нитета, которые определяют развитие и течение воспалительной реакции [5].

В связи с этим, нами была поставлена цель: оценить клиничко-иммунологическую эффективность использования Бовгиалуронидазы азоксимера («Лонгидаза») в комплексном лечении активной стадии неспецифического хронического эндометрита у женщин с миомой матки.

Материалы и методы. Проведено проспективное клиническое исследование, в которое были, согласно критериям включения и исключения, включены 38 женщин, давших информированное согласие на участие в исследовании. Критерии включения: наличие активного