

АКТИВАЦИЯ РАННЕЙ СТАДИИ АПОПТОЗА Т-ЛИМФОЦИТОВ *IN VITRO* ПОСРЕДСТВОМ ПЕРЕНОСА КОМПОНЕНТОВ АУТОЛОГИЧНОЙ АПОПТОТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

**Абрамова Т.Я.¹, Цура В.А.², Блинова Е.А.¹, Моренкова А.Ю.¹,
Козлов В.А.¹**

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

² ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Известно, что дефекты программированной гибели лимфоцитов периферической крови могут быть причиной аутоотолерантности и хронической персистенции воспаления при ревматоидном артрите. По последним данным, процесс апоптоза не является автономным — избыточное скопление клеток в совокупности с обедненным составом среды приводит к скученности клеточного сообщества и влиянию уже ушедших в апоптоз клеток на окружающие клетки посредством морфогенетического повреждения в процессе воздействия механических сил. Такие эффекты называют компенсаторной пролиферацией, или апоптоз-индуцированной пролиферацией. Внеклеточные везикулы (экзосомы и апоптотические тельца) также оказывают негативное воздействие на культивируемые клетки, инициируя запуск программы апоптотической гибели. В свою очередь, апоптоз также может не автономно контролироваться соседними клетками.

Нами были проведены исследования, позволившие оптимизировать методы, направленные на инициацию апоптотической гибели клеток и изучение воздействия апоптотического окружения на аутологичные клетки, находящиеся в физиологических условиях. Подбор условий в совокупности с методом флуоресцентного маркирования лимфоцитов и последующим отдельным анализом их на проточном цитофлуориметре позволили оценить параметры раннего апоптоза субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови при ревматоидном артрите. У пациентов с ревматоидным артритом *in vitro* установлена выраженная готовность к раннему апоптозу первично (CFSE⁻) и вторично (CFSE⁺) индуцированных Т-лимфоцитов, стимулированных αCD3-антителами, как относительно исходного уровня апоптоза, так и относительно клеток, находящихся в условиях индукции апоптоза. Полученные данные свидетельствуют о том, что стимуляция Т-лимфоцитов антителами к CD3, и, как следствие, рост пролиферативного процесса клеток *in vitro* привели к увеличению уровня раннего апоптоза не только непосредственно клеток, получивших пролиферативный стимул, но и повышению влияния клеточного и гуморального компонентов αCD3-стимулированной культуры на нормально пролиферирующие лимфоциты.

Адрес для переписки:

Абрамова Татьяна Яковлевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 222-26-74.
Тел./факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: tatjana-abramova@mail.ru, niiki01@online.nsk.su

Address for correspondence:

Abramova Tatiana Ya.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 222-26-74.
Phone/Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: tatjana-abramova@mail.ru, niiki01@online.nsk.su

Образец цитирования:

Т.Я. Абрамова, В.А. Цура, Е.А. Блинова,
А.Ю. Моренкова, В.А. Козлов «Активация ранней
стадии апоптоза Т-лимфоцитов *in vitro* посредством
переноса компонентов аутологичной апоптотической
культуры у пациентов с ревматоидным
артритом» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20,
№ 2. С. 255–262.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-255-262

© Абрамова Т.Я. и соавт., 2018

For citation:

T. Ya. Abramova, V. A. Tsura, E. A. Blinova, A. Yu. Morenkova,
V. A. Kozlov "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)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018,
Vol. 20, no. 2, pp. 255–262.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-255-262

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-255-262

Перенос первично индуцированной в условиях скученности и обеднения среды аутологичной апоптотической «aCD3» и дексаметазон-стимулированной культуры активирует процесс раннего апоптоза нормально пролиферирующих клеток. Как известно, глюкокортикоиды служат исполнителями индуцированной активации клеточной смерти. В фармакологических концентрациях глюкокортикоиды и их синтетические аналоги стимулируют в активированных лимфоцитах эндонуклеазы, разрушающие ДНК в межнуклеосомных участках, что заканчивается апоптозом клеток. Полученные в исследовании результаты свидетельствуют о возможности индукции ранней стадии апоптоза Т-лимфоцитов *in vitro* у пациентов с ревматоидным артритом посредством переноса клеток, подвергнутых активационному апоптозу.

Ключевые слова: ранний апоптоз, аутологичная культура клеток, Т-лимфоциты, ревматоидный артрит

IN VITRO ACTIVATION OF EARLY-STAGE APOPTOSIS OF T LYMPHOCYTES BY TRANSFERRING APOPTOTIC AUTOLOGOUS CELL CULTURE COMPONENTS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Abramova T.Ya.^a, Tsura V.A.^b, Blinova E.A.^a, Morenkova A.Yu.^a, Kozlov V.A.^a

^a *Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

^b *Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation*

Abstract. Defects in programmed death of peripheral blood lymphocytes may result into autotolerance and chronic persistence of inflammatory reaction in rheumatoid arthritis. According to recent data, apoptosis is not an autonomous process, i.e., an excessive accumulation of cells in conjunction with a depleted medium leads to cellular excess, thus causing effect of cells already committed to apoptosis upon surrounding cells, by morphogenetic damage due to mechanical forces. Such effects are called compensatory proliferation or apoptosis-induced proliferation. Extracellular vesicles (ectosomes and apoptotic bodies) also have a negative effect on cultured cells, triggering their programmed apoptotic death. In turn, apoptosis can also be controlled by neighboring cells in non-autonomous manner.

We conducted studies that allowed us to optimize methods aimed at the initiation of apoptotic cell death and to investigate the effects of apoptotic environment upon autologous cells under physiological conditions. The selected conditions in combination with a fluorescent labeling of lymphocytes and subsequent separate flow cytometric analysis allowed us to evaluate parameters of early apoptosis in subpopulations of peripheral blood T-lymphocytes in rheumatoid arthritis. *In vitro* studies of cells from the patients with rheumatoid arthritis allowed us to reveal a pronounced readiness of primary (CFSE⁻) and secondary (CFSE⁺)-induced T lymphocytes for early apoptosis after stimulation with anti-CD3 antibodies. It was observed both against initial level of apoptosis, and when compared to cells induced for apoptosis. The obtained data suggest that stimulation of T lymphocytes with antibodies against CD3, and, as a result, an *in vitro* rise in cell proliferation rate leading to increased levels of early apoptosis not only among the cells directly receiving a proliferative stimulus, but also to increased effect of cellular and humoral components from anti-CD3-stimulated cultures upon normally proliferating lymphocytes.

The transfer of an autologous apoptotic “aCD3” and dexamethasone-stimulated cultures, which were initially induced under conditions of cell overcrowding and medium exhaustion, was shown to activate the process of early apoptosis among normally proliferating cells. Glucocorticoids are known to serve as agents of cell death induced by activation. At pharmacological concentrations, glucocorticoids and their synthetic analogues stimulate endonucleases in activated lymphocytes. These enzymes destroy DNA in the internucleosomal regions thus resulting into cell apoptosis. The results obtained in present study suggest an opportunity of an *in vitro* early-stage apoptosis induction in T lymphocytes from the patients with rheumatoid arthritis, by means of cells subjected to activation-induced apoptosis.

Keywords: early apoptosis, autologous cell culture, T lymphocytes, rheumatoid arthritis

Введение

Актуальность

По современным представлениям, ревматоидный артрит (РА) является хроническим иммуновоспалительным заболеванием, которое характеризуется преимущественным поражением суставов по типу симметричного эрозивного полиартрита, а развитие аутоиммунного воспаления связано с нарушением супрессорных механизмов, контролирующей толерантность Т- и В-лимфоцитов к аутоантигенам [1, 2]. Накопление функционально активных Т-лимфоцитов с реактивностью в отношении собственных антигенов предполагает нарушение процессов пролиферации и гибели Т-клеток, в связи с чем предпринимаются активные попытки объяснить развитие и поддержание аутоиммунного воспаления при ревматоидном артрите нарушением процессов апоптоза [4, 11].

Апоптоз является общебиологическим механизмом, ответственным в границах иммунной системы за элиминацию выполнивших свою функцию активированных лимфоцитов, с целью предупреждения аутоиммунных реакций [5, 6]. Исследования процессов апоптоза в качестве потенциального механизма развития и поддержания патологического воспаления при РА остаются актуальным направлением, поскольку этиология заболевания остается неизвестной, а патогенез РА изучен не в полной мере [1, 11]. Известно, что при РА в полости пораженных суставов накапливаются клетки, чувствительные к активационному апоптозу, а также лимфоциты, слабо экспрессирующие Bcl-2, однако гибели указанных клеток не происходит, что способствует гиперплазии синовиальных тканей и хронизации процесса.

Также сохраняет актуальность исследование процессов программированной гибели циркулирующих лимфоцитов периферической крови, в которой, как известно, уровень апоптоза лимфоцитов у больных РА относительно высок [2], но ассоциирован с утратой иммунологической толерантности в результате увеличения продолжительности жизни и накопления аутореактивных Т-клеток [1].

На современном этапе изучения данной проблемы одной из перспективных задач является выявление механизмов «клеточного соседства» — взаимодействия апоптотирующих и нормально пролиферирующих клеток в норме и при аутоим-

мунном воспалении. Как известно, контроль клеточного гомеостаза основан на взаимодействии двух разнонаправленных процессов: пролиферации и апоптоза, и, следовательно, их баланс должен быть скоординирован. После того как клетки вступают в процесс апоптоза, окружающее клеточное сообщество способно активно пролиферировать и, таким образом, заполнять оставленные пробелы. Подобное явление называется компенсаторной пролиферацией, или апоптоз-индуцированной пролиферацией [9].

В экспериментальных исследованиях последних лет показано, что апоптотические клетки могут оказывать значительное влияние на ближайшее окружение. Так, было установлено, что при условии сохранения сигнальных возможностей в течение длительного периода времени апоптотические клетки модулируют пролиферацию, активируя эктопическую экспрессию митогенных сигналов, или индуцируют апоптоз в соседних клетках через проапоптотические сигналы (Eiger или TNF). Производство этих сигналов зависит от активации JNK пути [7, 8].

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния клеточных и гуморальных факторов апоптотирующих клеток на аутологичную культуру лимфоцитов *in vitro* у пациентов с ревматоидным артритом

Материалы и методы

В основу работы положены результаты исследования периферической крови 8 женщин, больных РА (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.

Методы исследования

Выделенная на градиенте плотности (фиколл-верографин, 1,078) (BioClot GmbH, Германия) лимфоцитарная фракция клеток была распределена на 2 варианта культуры. Первый вариант («нормально пролиферирующая» [НП]) — 7 лунок по $5,0 \times 10^5$ кл./0,5 мл полной культуральной среды (ПКС), в составе ПКС — среда RPMI (ООО «Биолот», Санкт-Петербург), тиенам, (ЗАО ОПТАТ, Россия), L-глутамин (Gerbu, Biotechnik, GmbH, Германия), буферный раствор Hepes (GERBU, Biotechnik, GmbH), фетальная телячья сыворотка (FCS), (Hy Clone, США), покрашенных флуо-

ресцентным красителем CFSE (Molecular probes, США). Второй вариант культуры («апоптотическая» [АК]) – 3 лунки (нестимулированные клетки, aCD3 (МедБиоСпектр, Москва), и дексаметазон (1×10^{-4} М) – стимулированные клетки по 2×10^6 кл/150,0 мкл обедненной (1% FCS) ОС среды. На 4-е сутки инкубации апоптотическая культура (клетки и супернатант отдельно) была перенесена к лимфоцитам, пролиферирующим в условиях ПКС. Далее до 7 суток проводилось сокультивирование проб (37°C , 5%CO₂), получивших условные названия: 1 – «Контроль» – контрольное культивирование лимфоцитов в ПКС; 2 – «Контроль апоптоза» – к НП лимфоцитам была добавлена клеточная часть АК; 3 – «Контроль апоптоза супернатант» – сокультивирование НП в ПКС и перенесенного к ней супернатанта от АК; 4 – «aCD3» – НП культура и клетки АК, стимулированные aCD3; 5 – «aCD3 супернатант» – НП лимфоциты и супернатант от АК, стимулированной aCD3; 6 – «Деха» – сокультивирование НП лимфоцитов в ПКС и АК, обработанной дексаметазоном (1×10^{-4} М); 7 – «Деха супернатант» – НП лимфоциты и супернатант от АК, обработанной дексаметазоном. На 7-е сутки сокультивирования на цитофлуориметре BD FACS Canto II в популяции Т-лимфоцитов (CD3⁺/PC7) (Beckman Coulter, США) определялся уровень раннего (аннексин V, Vecton Dickenson, США, %) апоптоза в нативных, а также в aCD3 и дексаметазон (1×10^{-4} М) стимулированных вариантах.

Статистическая обработка данных проводилась с применением методов непараметрической статистики (Statistica 6.0). (U-критерия Манна–Уитни, парного критерия Вилкоксона и ранговой корреляции Спирмена). Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха ($Me \pm [lower \text{ upper quartile}]$). Различия между группами считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Данные о нарушении апоптотических реакций мононуклеарных клеток периферической крови [4, 11] послужили основанием для изучения у пациентов с РА особенностей ответа нормально пролиферирующих Т-клеток (культура-реципиент), подвергнутых активационному апоптозу *in vitro* посредством переноса к ним клеточных и гуморальных компонентов апоптозирующей

культуры – аутологичных нативных, а также aCD3 и дексаметазон-стимулированных лимфоцитов периферической крови (культура-донор), находящихся в условиях скученности и обеднения среды.

На этапе оптимизации метода, направленного на инициацию апоптотической гибели клеток и исследование воздействия апоптотического окружения на аутологичные клетки, находящиеся в физиологических условиях, были определены условия, которые в совокупности с методом флуоресцентного маркирования лимфоцитов и последующим отдельным анализом их на проточном цитофлуориметре, позволили оценить параметры раннего апоптоза Т-лимфоцитов периферической крови при ревматоидном артрите.

В частности, для исследования раннего апоптоза лимфоцитов пациентов с ревматоидным артритом проводился подбор наиболее физиологичных условий получения апоптотических клеток. С этой целью лимфоциты культивировались с различными концентрациями фетальной телячьей сыворотки (FCS): 1%, 3%, 7,5% и 10%, а также определялось оптимальное количество клеток на единицу объема культуральной среды. Наиболее выраженный уровень апоптоза был установлен при добавлении лимфоцитов в обедненную культуральную среду (ОС), с минимальным количеством питательных веществ – 1% FCS и концентрацией клеток 2×10^6 в 0,15 мл ОС в 96-луночных планшетах, с объемом лунки 0,2 мл.

Рядом исследователей установлено, что глюкокортикоиды вызывают апоптоз лимфоцитов больных аутоиммунными заболеваниями, и особенно чувствительны к индукции апоптоза Т-лимфоциты [3]. На этапе оптимизации метода нами было проведено исследование особенностей влияния на Т-клетки глюкокортикоида дексаметазона, поскольку принято считать, что он является одним из основных индукторов апоптоза в культуре. Дексаметазон, как синтетический аналог глюкокортикоидов, был нами выбран по причине более выраженного действия. С целью достижения максимального эффекта было проведено титрование – исследование уровня апоптоза лимфоцитов в 72-часовых культурах, культивируемых в ОС с различными дозами дексаметазона. Принято считать, что концентрации дексаметазона от 1×10^{-1} М до 1×10^{-5} М являются не физиологичными и подавляют пролиферацию клеток, вызывая апоптоз и некроз. Однако в процессе культивирования было выявлено, что

добавление дексаметазона оказывает модулирующий эффект на процессы апоптоза – более высокие дозы (1×10^{-2} М и 1×10^{-3} М) подавляют, очевидно, вызывая некроз, а субфизиологическая – (1×10^{-5} М) снижает, относительно предыдущего разведения, возможно, стимулируя пролиферативный процесс. Оптимальной оказалась концентрация 1×10^{-4} М, которая привела к наиболее выраженному апоптотическому эффекту.

Для исследования содержания клеток, находящихся на стадии раннего апоптоза, применялся метод, основанный на анализе липидного состава плазматической мембраны. Появление на клеточной мембране фосфатидилсерина (PS) принято считать основным маркером клеток, находящихся на стадии раннего апоптоза. Аннексин V (AnnV), называемый также «плацентарный антикоагулянтный протеин», обладает высокой аффинностью по отношению к PS, поэтому для исследования уровня апоптоза клетки окрашивали при помощи AnnV, конъюгированного

с флуорохромом FITC (изотиоцианат флуоресцеина).

С целью последующей идентификации, при культивировании популяции нормально пролиферирующих лимфоцитов, к клеткам добавлялся внутриклеточный флуоресцентный краситель CFSE, который представляет собой интернализуемую флуоресцентную метку, способную пассивно проникать внутрь клетки. Само по себе это вещество бесцветно и не флуоресцирует до тех пор, пока его ацетатные группы не будут расщеплены внутриклеточными эстеразами. После контакта с эстеразами CFSE превращается в сильнофлуоресцирующее вещество. Диапазон интенсивности флуоресценции CFSE совпадает с FITC, поэтому применялись моноклональные антитела к $CD3^+$ лимфоцитам, меченные PC7, свечение которых происходит по другому каналу флуоресценции.

Добавление флуоресцентного красителя CFSE к популяции нормально пролиферирующих лимфоцитов при цитофлуориметрии позволяет в одной пробе различить $CFSE^+$ клетки, пролифе-

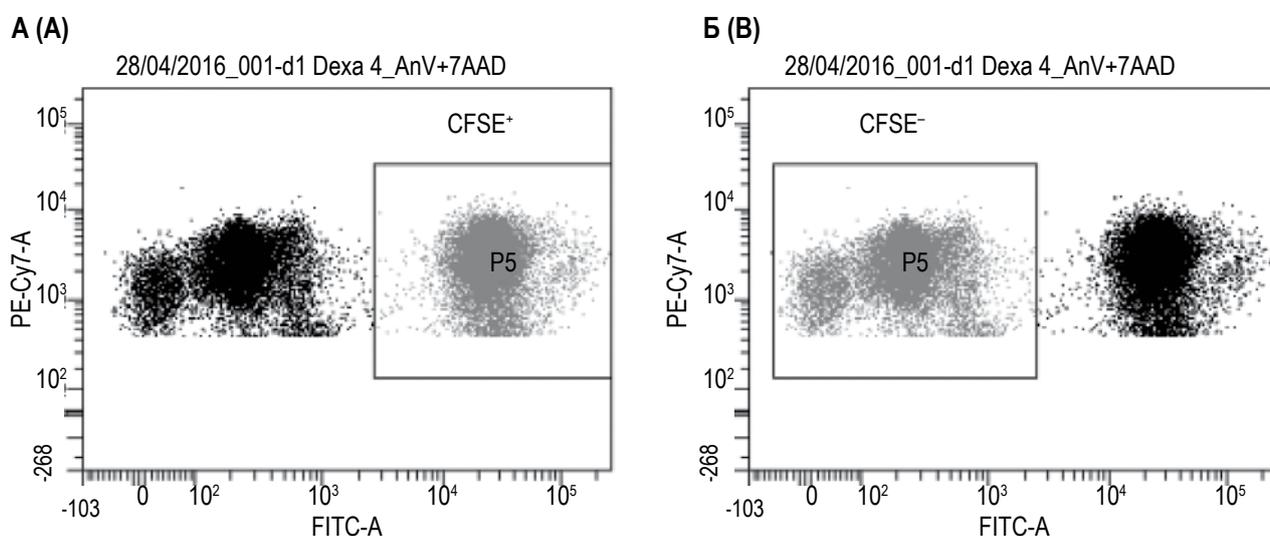


Рисунок 1. Цитофлуориметрия недельной культуры $CD3^+$ лимфоцитов, пролиферирующих в условиях ПКС, окрашенных CFSE ($CFSE^+$) и 72 часа сокультивированных с «апоптотическими» клетками, пролиферирующими в обедненной среде (ОС) с добавлением дексаметазона ($CFSE^-$)

Примечание. Гистограмма А – выделенный гейт соответствует $CFSE^+$ лимфоцитам; гистограмма Б – выделенный гейт соответствует $CFSE^-$ лимфоцитам.

Figure 1. Flow cytometry analysis of 1-week culture of $CD3^+$ lymphocytes which proliferated under FCM conditions labeled with CFSE ($CFSE^+$), and after 72 hours of co-culture with “apoptotic” cells proliferated in depleted medium (DM) supplemented with dexamethasone ($CFSE^-$)

Note. Histogram A, the marked gate corresponds to $CFSE^+$ lymphocytes; histogram B, the marked gate corresponds to $CFSE^-$ lymphocytes.

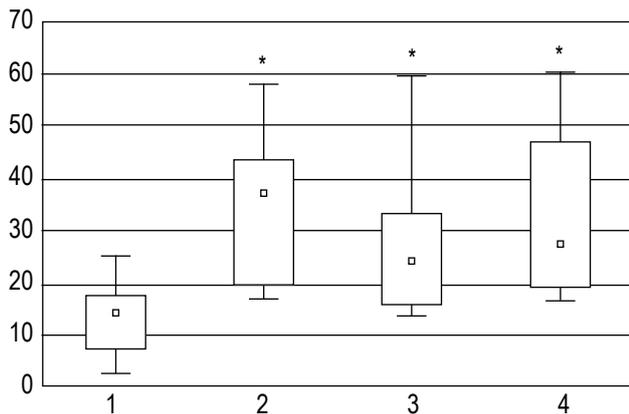


Рисунок 2. Сравнительный анализ уровня раннего апоптоза нативных клеток (1) и недельной культуры лимфоцитов, стимулированных «aCD3 (CFSE⁺)» (2), «aCD3 супернатант» (3) и «aCD3 (CFSE⁻)» (4), (%)

Примечание. * – достоверное отличие по сравнению с группой 1 до культивирования ($p < 0,05$).

Figure 2. Comparative analysis of early apoptosis levels among native cells (1) and a 1-week lymphocyte culture stimulated with “aCD3 (CFSE⁺)” (2), “aCD3 supernatant” (3) and “aCD3 (CFSE⁻)” (4), (%)

Note. *, significant difference compared to group 1 before culture ($p < 0.05$).

рирующие в условиях ПКС и апоптозирующие (CFSE⁻), не меченные CFSE лимфоциты (рис. 1).

В результате проведенного в течение недели культивирования лимфоцитов, полученных от пациентов с РА, произошло достоверное, в сравнении с нативными лимфоцитами, повышение уровня раннего апоптоза в пробе «aCD3 (CFSE⁺)», а также в пробе, культивируемой с добавлением супернатанта от этих клеток. Кроме того, значимый рост раннего апоптоза наблюдался в донорской популяции (CFSE⁻) лимфоцитов, стимулированных aCD3. То есть стимуляция Т-лимфоцитов антителами к CD3 и, как следствие, активация пролиферативного процесса клеток *in vitro* не только привели к увеличению уровня раннего апоптоза непосредственно клеток, получивших стимул, но и способствовали повышению влияния клеточного и гуморального компонентов aCD3-стимулированной культуры, находящейся в условиях скученности и обеднения среды, на нормально пролиферирующие лимфоциты (рис. 2).

В настоящее время показано, что процесс апоптоза не является индифферентным для окружающих клеток. Выявлены неавтономные эффекты апоптоза в отношении соседних клеток,

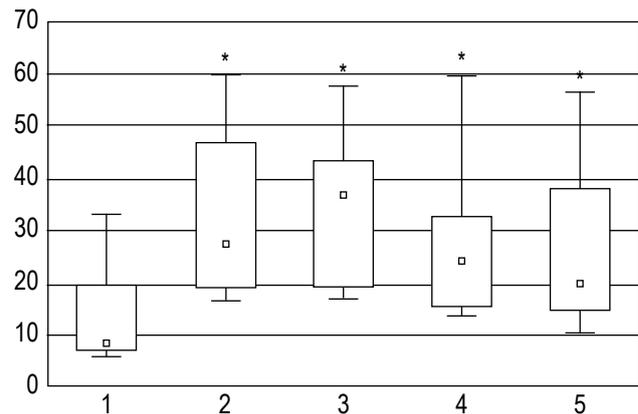


Рисунок 3. Сравнительный анализ уровня раннего апоптоза недельной культуры лимфоцитов в пробах «CA CFSE⁻» (1), «aCD3 (CFSE⁻)» (2) и «aCD3 (CFSE⁺)» (3), «aCD3 супернатант» (4), «Dexa супернатант» (5)

Примечание. * – достоверное отличие по сравнению с группой «CA (CFSE⁻)» ($p < 0,05$).

Figure 3. Comparative analysis of early apoptosis levels in a 1-week lymphocyte culture for the samples “CA CFSE⁻” (1), “aCD3 (CFSE⁻)” (2) and “aCD3 (CFSE⁺)” (3), “aCD3 supernatant” (4), “Dexa supernatant” (5)

Note. *, significant difference against the “CA (CFSE⁻)” group ($p < 0.05$).

включающие в себя влияние на пролиферацию в окружающих клетках и морфогенетические изменения клеточного сообщества посредством создания механического давления [5, 6, 7].

Анализ полученных результатов выявил значимое повышение уровня раннего апоптоза в пробах культуры-реципиента «aCD3 (CFSE⁺)» относительно культуры-донора «Контроль апоптоза (CFSE⁻)». Против данной контрольной пробы было определено также повышение уровня апоптоза в пробах «aCD3 супернатант», «aCD3 (CFSE⁻)» и «Dexa супернатант», что свидетельствует о возможности активации апоптоза нормально пролиферирующей культуры посредством переноса как клеточного, так и гуморального компонента аутологических клеток, подвергнутых активационному апоптозу (рис. 3).

Также было определено повышение раннего апоптоза пробы «aCD3 (CFSE⁺)» относительно варианта «Контроль апоптоза (CFSE⁻)» ($15,8 \pm (10,6 \ 35,7)\%$ vs $37,0 \pm (19,9 \ 43,5)\%$ [$p = 0,05$]), свидетельствующее о потенциальной возможности лимфоцитов больных РА к повышению уровня апоптоза после дополнительного пролиферативного стимула. Значимое усиление апоптоза в пробах, содержащих супернатанты

от «аCD3» и «Деха» апоптотических клеток, относительно контрольных групп, может быть обусловлено присутствием эктосом и апоптотических телец в супернатанте апоптотирующей культуры [10]. Внеклеточные везикулы оказывают негативное воздействие на культивируемые клетки, инициируя запуск программы апоптотической гибели. Кроме того, апоптотические тельца и эктосомы содержат фосфатидилсерин на поверхности мембраны, позволяющий им связываться с Annexin V [10, 12] и, возможно, классифицироваться цитофлуориметром как клетки, находящиеся на стадии раннего апоптоза. Относительно низкие параметры раннего апоптоза клеток «Контроль апоптоза», пролиферирующих в течение недели в условиях скученности и обеднения среды, свидетельствуют о том, что подобный вариант индукции клеточной гибели в меньшей степени влияет на параметры раннего апоптоза лимфоци-

тов больных, в то же время в Т-клетках больных РА выявлена высокая готовность к активационному апоптозу в результате добавления при данных условиях стимулирующего фактора – аCD3.

Таким образом, у пациентов с РА *in vitro* установлена выраженная готовность к раннему апоптозу Т-лимфоцитов, стимулированных аCD3-антителами (CFSE⁺ и CFSE⁻), как относительно исходного уровня апоптоза, так и относительно клеток, находящихся в условиях индукции апоптоза. Перенос клеточных и гуморальных компонентов аутологичной апоптотической «аCD3» и дексаметазон-стимулированной культур активирует некоторые из вариантов раннего апоптоза нормально пролиферирующих клеток, что свидетельствует о высоком уровне активационного апоптоза лимфоцитов периферической крови у больных РА.

Список литературы / References

1. Насонов Е.Л., Александрова Е.Н., Новиков А.А. Аутоиммунные ревматические заболевания – проблемы иммунопатологии и персонализированной терапии // Вестник РАМН, 2015. Т. 70, № 2. С. 169-182. [Nasonov E.L., Aleksandrova E.N., Novikov A.A. Autoimmune rheumatic diseases – problems of immunopathology and personalized treatment. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2015, Vol. 70, no. 2, pp. 169-182. (In Russ.)]
2. Пачкунова М.В. Иммунологический профиль больных ревматоидным артритом // Фундаментальные исследования, 2011. № 1. С. 148-156. [Pachkunova M.V. Immunologic profile sick of rheumatoid arthritis. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2011, no. 1, pp. 148-156. (In Russ.)]
3. Сорока Н.Ф., Свирновский Л.И., Рекун А.Л. Влияние иммуносупрессивных лекарственных препаратов на апоптоз лимфоцитов больных системной красной волчанкой *in vitro* // Научно-практическая ревматология, 2007. № 1. С. 15-21. [Soroka N.F., Svirnovsky A.I., Rekun A.L. Immunosuppressive drugs influence on lymphocyte apoptosis in patients with systemic lupus erythematosus *in vitro*. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2007, no. 1, pp. 15-21. (In Russ.)]
4. 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, no. 31 (5), pp. 682-685.
5. Fuchs Y., Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 2011, no. 147 (4), pp. 742-758.
6. Kawamoto Y., Nakajima Y., Kuranaga E. Apoptosis in cellular society: communication between apoptotic cells and their neighbors. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, pp. 1-15.
7. Morata, G., Shlevkov E., Perez-Garijo A. Mitogenic signaling from apoptotic cells in *Drosophila*. *Dev. Growth Differ*, 2011, no. 53, pp. 168-176.
8. Pérez-Garijo A., Steller H. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development*, 2015, no. 142, pp. 3253-3262.
9. Ryoo H.D., Bergmann A. The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2012, no. 4, pp. 787-789.
10. Sadallah S., Eken C., Schifferli J.A. Ectosomes as modulators of inflammation and immunity. *Clinical and Experimental Immunology*, 2011, Vol. 163, pp. 26-32.

11. Szodoray P, Jellestad S., Nakken B. Programmed cell death in rheumatoid arthritis peripheral blood T-cell subpopulations determined by laser scanning cytometry. *Lab. Invest.*, 2003, Vol. 83, no. 12, pp. 1839-1848.
12. Withrow J., Murphy C., Liu Y. Extracellular vesicles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 2016, Vol. 18, p. 12.

Авторы:

Абрамова Т.Я. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клинической иммунопатологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Цура В.А. — студентка VI курса медико-профилактического факультета ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Блинова Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория клинической иммунопатологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Моренкова А.Ю. — клинический ординатор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Abramova T.Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Tsura V.A., Student, Department of Biochemistry, Novosibirsk State Medical University, Russian Federation

Blinova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Morenkova A.Yu., Clinical Intern, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Supervisor, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 27.07.2017
Принята к печати 13.07.2017

Received 27.07.2017
Accepted 13.07.2017