

# ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОРНЫХ МОЛЕКУЛ АВТОНОМНОГО И НЕАВТОНОМНОГО ВЛИЯНИЯ АПОПТОЗА Т-ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ «КЛЕТОЧНОГО СОСЕДСТВА» В КУЛЬТУРЕ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С РА

**Абрамова Т.Я., Блинова Е.А., Пашкина Е.А., Гришина Л.В.,  
Ильина Н.А., Чумасова О.А., Сизиков А.Э., Козлов В.А.**

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

**Резюме.** Известно, что клеточный гомеостаз в организме поддерживается процессами пролиферации и гибели клеток, при этом апоптоз является наиболее частым и физиологичным, «тихим» механизмом элиминации клеток. В настоящее время показано, что процесс апоптоза, традиционно считавшийся автономным, оказывает выраженное неавтономное влияние на миграцию, пролиферацию, гибель соседних клеток. Основанием для данной работы послужили данные о нарушении программированной гибели моноклеарных клеток у пациентов с ревматоидным артритом, приводящие к формированию аутоиммунного воспаления.

Целью настоящего исследования являлось оценка эффекторных молекул автономного и неавтономного влияния апоптоза Т-лимфоцитов в условиях «клеточного соседства» в культуре у здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом (РА).

Объектом исследования являлись образцы крови пациенток с РА и здоровых женщин сопоставимого возраста. Проводились эксперименты, направленные на выявление уровней основных молекул рецепторного и митохондриального апоптоза Т-лимфоцитов *in vitro*.

В проведенных ранее исследованиях с применением разработанной нами модели «клеточного соседства» не было установлено различий по параметрам раннего и позднего активационного апоптоза между группами доноров и пациентов с РА. При этом в результате недельной инкубации в апоптотических культурах пациентов значительно увеличилось число живых клеток, несущих маркер пролиферации Ki-67. Различный исход индукции апоптоза в культурах, находящихся в равных условиях «клеточного соседства» у здоровых людей и пациентов с РА, выявил необходимость изучения основных эффекторных молекул апоптоза в исследуемых группах.

## Адрес для переписки:

Абрамова Татьяна Яковлевна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
клинической и фундаментальной иммунологии»  
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (383) 227-01-35.  
Факс: 8 (383) 222-70-28.  
E-mail: tatjana-abramova@mail.ru

## Address for correspondence:

Tatiana Ya. Abramova  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
630099, Russian Federation, Novosibirsk,  
Yadrintsevskaya str., 14.  
Phone: +7 (383) 227-01-35.  
Fax: +7 (383) 222-70-28.  
E-mail: tatjana-abramova@mail.ru

## Образец цитирования:

Т.Я. Абрамова, Е.А. Блинова, Е.А. Пашкина,  
Л.В. Гришина, Н.А. Ильина, О.А. Чумасова,  
А.Э. Сизиков, В.А. Козлов «Исследование эффекторных  
молекул автономного и неавтономного влияния  
апоптоза Т-лимфоцитов в условиях «клеточного  
соседства» в культуре у здоровых людей и пациентов  
с РА» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6.  
С. 1119-1138. doi: 10.15789/1563-0625-SOE-2527

© Абрамова Т.Я. и соавт., 2022

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

## For citation:

T. Ya. Abramova, E. A. Blinova, E. A. Pashkina, L. V. Grishina,  
N. A. Ilina, O. A. Chumasova, A. E. Sizikov, V. A. Kozlov  
“Studies of effector molecules exerting autonomous and non-  
autonomous influence of T lymphocyte apoptosis under the  
conditions of *in vitro* “cell neighborhood” in healthy people  
and patients with rheumatoid arthritis”, *Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022, Vol. 24, no. 6,  
pp. 1119-1138. doi: 10.15789/1563-0625-SOE-2527

© Abramova T. Ya. et al., 2022

The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-SOE-2527

В данном исследовании был установлен низкий потенциал рецепторного пути активации апоптоза за счет подавления продукции TNF $\alpha$  в процессе инкубации клеток в условиях «клеточного соседства» в культурах здоровых людей и низкого изначально и не меняющегося в динамике и в различных вариантах инкубации уровня TNF $\alpha$  в супернатантах пациентов с РА, а также низкого содержания инициирующей каспазы-8 в обеих группах.

Было определено значимое подавление эффекторных молекул митохондриального пути активации апоптоза — антиапоптотического фактора Bcl-2 и транскрипционного фактора p53 в культурах апоптотических клеток, а также смешанных в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотических клеток у пациентов с РА и отсутствие динамики по содержанию указанных белков у здоровых людей. При этом между отдельными вариантами культур пациентов с РА относительно здоровых людей по содержанию указанных молекул различий не было установлено. Учитывая, что обе исследуемые группы характеризовались значительной активацией продукции IL-4 и IL-6, цитокинов, обладающих автономными и не автономными защитными и репаративными свойствами, можно заключить, что высокие уровни указанных цитокинов различным образом проявляли себя в культурах клеток, находящихся в условиях «клеточного соседства». Если у здоровых людей нахождение клеток в неблагоприятных условиях сочеталось с поддержанием баланса пролиферации и апоптоза, то у пациентов с РА поддержание указанного баланса активировало процессы пролиферации и сопровождалось увеличением числа живых клеток в апоптотических культурах.

*Ключевые слова:* молекулы рецепторного апоптоза, молекулы митохондриального апоптоза, автономное влияние апоптоза, неавтономное влияние апоптоза, «клеточное соседство», ревматоидный артрит

## STUDIES OF EFFECTOR MOLECULES EXERTING AUTONOMOUS AND NON-AUTONOMOUS INFLUENCE OF T LYMPHOCYTE APOPTOSIS UNDER THE CONDITIONS OF *IN VITRO* “CELL NEIGHBORHOOD” IN HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Abramova T.Ya., Blinova E.A., Pashkina E.A., Grishina L.V., Ilina N.A., Chumasova O.A., Sizikov A.E., Kozlov V.A.

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

**Abstract.** Cellular homeostasis in the body is known to be maintained by the processes of cell proliferation and death, whereas apoptosis is the most frequent and physiological, “silent” mechanism of cell elimination. It has been currently shown that the process of apoptosis traditionally considered an autonomous event, has a pronounced non-autonomous effect on migration, proliferation, and death of the neighboring cells. This work was based on the data on impaired programmed death of mononuclear cells from the patients with rheumatoid arthritis (RA) leading to the evolving autoimmune inflammation. The aim of this study was to evaluate effector molecules exerting autonomous and non-autonomous influence of T cell apoptosis under the conditions of “cell neighborhood” in cell cultures of healthy people and RA patients. The studies were performed with blood samples of RA patients and healthy women of comparable age. These experiments were performed in order to assess the levels of main molecules mediating the *in vitro* receptor and mitochondrial apoptosis of T lymphocytes. In previous studies, using the original “cell neighborhood” model, no differences were found in parameters of early and late activation apoptosis between the groups of donors and RA patients. At the same time, 1-week incubation in apoptotic cultures of the patients was followed by significantly increased number of viable cells carrying the proliferation marker Ki-67. Different results of *in vitro* apoptosis induction in cultures under similar conditions of “cell neighborhood” in healthy people and patients with RA have revealed the importance of main effector molecules of apoptosis in the studied groups.

In this study, we have revealed low potential of the receptor pathway for apoptosis activation in healthy people, due to suppression of TNF $\alpha$  production during cell incubation under the conditions of “cell neighborhood”, and in RA patients due to initially low TNF $\alpha$  in supernatants which did not change over time and in various incubation variants, along with low content of initiating caspase 8 in both groups.

Significant suppression of effector molecules of mitochondrial pathway of apoptosis activation, i.e., Bcl-2 anti-apoptotic factor and p53 transcription factor was detected in cultures of apoptotic cells, as well as mixtures of proliferating and apoptotic cells under the conditions of “cell neighborhood” in RA patients. The amounts of these molecules did not change in healthy persons. At the same time, no differences in these molecules were found between individual variants of cell cultures from the patients with RA and healthy people.

The both studied groups were characterized by a significant activation of IL-4 and IL-6 production, i.e., the cytokines with autonomous and non-autonomous protective and reparative properties. Hence, one may conclude that high levels of these cytokines had different effects in cell cultures under the conditions of “cell neighborhood”. Incubation of cells from healthy people under suboptimal conditions was associated with maintaining the balance of proliferation and apoptosis, whereas, in cell cultures of RA patients, this balance caused activation of proliferation processes, being accompanied by an increase in the number of living cells in apoptotic cultures.

*Keywords: receptor apoptosis, mitochondrial apoptosis, autonomous influence of apoptosis, non-autonomous influence of apoptosis, “cell neighborhood”, rheumatoid arthritis*

## Введение

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой хроническое воспалительное заболевание, связанное с аномальной активацией фибробластоподобных клеток синовиальной оболочки (ФЛС) с апоптозом, воспалением и окислительным повреждением [37]. Хронический воспалительный процесс, характерный для РА, тем не менее не сопровождается усилением апоптоза, что нарушает клеточный гомеостаз и вызывает формирование аутоиммунного воспаления вследствие нарушения выбраковки аутоспецифичных клонов лимфоцитов [1]. Апоптоз представляет собой регулируемый процесс программируемой клеточной гибели и является необходимым условием нормального существования организма. Процессы пролиферации и апоптоза поддерживают клеточный гомеостаз в организме, обеспечивая физиологическое соотношение клеток различных типов [25].

Помимо основной автономной функции — физиологической гибели клеток и поддержания гомеостаза выявлены неавтономные эффекты апоптоза в отношении соседних клеток — влияние на миграцию, пролиферацию, морфологию, эмбриогенез. Установлено, что апоптотические клетки могут продуцировать и секретировать митогенные сигналы, а также вызывать гибель клеток в окружающих тканях посредством создания механического давления [28].

Исследование ключевых молекул апоптоза, их участия в неавтономных эффектах в норме и при патологии — одно из направлений поиска возможных причин нарушения клеточного гомео-

стаза, в частности избыточной, злокачественной пролиферации синовиоцитов при РА.

Для запуска апоптоза выделяют рецепторные и внутриклеточные сигналы. Как известно, фактор некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ), доминирующий медиатор воспаления в патогенезе РА, способствует прогрессированию симптомов РА и является внешним фактором, осуществляющим запуск рецепторного варианта апоптоза через семейство TNF-рецепторов. Специализированные рецепторы из семейства TNF для индукции апоптоза — CD95 (Fas/Apo-1), TNF-R1, TRAIL-R1, TRAIL-R2Hflp, DR3, DR6, EDA-R и NGF-R, находятся на цитоплазматической мембране клеток [16]. Апоптоз, опосредованный рецептором CD95, Fas и другими членами данного семейства, образует мультибелковый комплекс, необходимый для взаимодействия с обязательными для индукции апоптоза адапторными молекулами, в том числе с доменом цитозольного проэнзима прокаспазы 8. Помимо основной, автономной функции запуска рецепторного апоптоза, активация TNF $\alpha$  опосредованно активирует пролиферативные процессы. Так, в работе [24] было установлено, что опухолевый супрессор JNK, активируемый консервативной передачей сигналов TNF $\alpha$ , способен неавтономно влиять на микроокружение опухоли, воздействуя на транскрипцию различных молекул, способствующих росту и пролиферации клеток. А в работе [36] было определено, что TNF $\alpha$  способствовал пролиферации клеток синовиоцитов у пациентов с РА посредством подавления экспрессии PDCD5. PDCD5 может быть вовлечен в аномальную про-

лиферацию синовиоцитов и дегенерацию хондроцитов, стимулированную TNF $\alpha$ .

Неотъемлемой частью регуляции и инициации опосредованной рецепторами смерти активации запрограммированной гибели клеток является аспартат-специфичная цистеиновая протеаза (каспаза) 8. В результате аутопротелитической активации прокаспазы-8 следует образование активной формы иницирующей каспазы-8, которая запускает активацию эффекторных каспаз-3, -6, -7. Разрушение субстратов данными каспазами приводит к клеточной гибели. Помимо инициации апоптоза, лигирование рецепторов смерти также может вызывать некроптоз, при котором не происходит фрагментация ДНК, а гибель клетки по механизму некроптоза вызывает мощный иммунный ответ, в том числе и пролиферацию. Внешние пути апоптоза и некроптоза регулируют друг друга [16]. В другом исследовании характеризуют каспазу 8 как молекулярный переключатель, контролирующий апоптоз, некроптоз и пироптоз и предотвращающий повреждение тканей во время эмбрионального развития и взросления [12].

Регуляция апоптоза белками семейства Bcl-2 осуществляется преимущественно на отрезке митохондриального сигнального пути, поскольку сигналы рецептор-зависимого сигнального пути в основном не нуждаются во влиянии стороны Bcl-2. Митохондриальный, а не рецепторный путь активации апоптоза является наиболее частым вариантом клеточной гибели. При этом происходит выход белков из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму. В регуляции апоптоза большая роль принадлежит белкам семейства Bcl. Различают агонистов (Bax, Bad, Bcl-xS, Bak, Bid, Bik, Bim, Krk, Mtd) и антагонистов (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A-1, Boo) активности апоптотической гибели клетки. Решающее значение в реализации апоптоза имеет соотношение про- и антиапоптозных белков. Имеются данные о возрастном снижении антиапоптотического белка Bcl-2 [15].

Как известно, сигналом нереперторного апоптоза служит изменение потенциала и стабильности мембраны митохондрий, вызванное проапоптогенными белками семейства bcl-2 и белка p53, который активируется при нарушении клеточного цикла. Онкосупрессор p53 – внутриклеточный фактор, осуществляющий надзор за клеточным гомеостазом. Большинство мутаций гена p53 приводят к потере его функций, вызывающих апоптоз и старение [21]. В дополнение к автономным эффектам p53 существуют данные, свидетельствующие об усилении функции или активации неавтономных путей, которые прямо или косвенно способствуют онкогенезу. В настоящее

время признается, что дисфункция p53 в различных клеточных компартментах ТМЕ приводит к иммуносупрессии и уклонению от иммунитета. Обнаружена функциональная связь между молекулами, осуществляющими апоптоз – уровнями апоптоза, эффекторными каспазами, белком p53 и низким содержанием белка Bcl-xL [11], а в работе [36] связывают недостаточную экспрессию Bax, сверхэкспрессию p53 и высокое отношение Bcl-2 к Bax с карциномой эндометрия.

Установлено, что IL-6 может способствовать усилению апоптоза, индуцированного TNF $\alpha$  или TRAIL, посредством p53-зависимой повышающей регуляции DR-4 и DR-5 [30]. Значительная роль IL-6 в его влиянии на автономные и неавтономные эффекты апоптоза. IL-6 представляет собой плеiotропный цитокин, характер функциональной активности которого (воспалительной или противовоспалительной) зависит от типа сигналинга и до конца не изучен. Классический сигналинг происходит в клетках, которые имеют IL-6R и gp130 на своей мембране, и опосредует регенеративную и противовоспалительную активность. Для транссигналинга необходимо наличие растворимой формы sIL-6R. Предполагается, что кластерный вариант сигналинга необходим для дифференцировки наивных Т-лимфоцитов [11]. Было показано, что IL-6 индуцирует альтернативную активацию макрофагов. В отличие от классически активированных макрофагов (M1), отвечающих за усиление воспалительной реакции, альтернативно активированные макрофаги (M2) обеспечивают регенеративные процессы в поврежденных тканях, продуцируя противовоспалительные цитокины IL-10 и TGF- $\beta$ . Активация M2-макрофагов происходит при воздействии IL-4 [11].

Цитокины IFN $\gamma$  и IL-4 исполняют множество биологических функций, в числе которых важнейшей является взаимная регуляция провоспалительной функции Th1 интерлейкином-4 посредством снижения продукции IFN $\gamma$  и снижение противовоспалительной активности Th2 за счет подавления IL-4 интерфероном гамма. Активная передача сигналов IFN $\gamma$  может непосредственно запускать апоптоз и остановку клеточного цикла. В литературе представлены данные, свидетельствующие о возможности регуляции апоптоза посредством ингибирования стресса эндоплазматического ретикулума, вызванного IFN $\gamma$  [9]. Тканевая трансглутаминаза (TG2), кальций-зависимый сшивающий фермент, была описана как маркер противовоспалительных, интерлейкин-4 (IL-4) поляризованных макрофагов (M (IL-4)), которые представляют субпопуляцию макрофагов с фагоцитарной способностью. В макрофагально-дифференцированных моноцитах THP-1



уровень TG2 повышался при обработке IL-4 [31]. Обзор литературы, посвященный основным эффекторным молекулам апоптоза, свидетельствует о неоднозначности их влияния, наличии не только автономных, но и различных неавтономных функций у данных белков.

**Целью настоящего исследования** являлась оценка эффекторных молекул автономного и неавтономного влияния апоптоза Т-лимфоцитов в условиях «клеточного соседства» в культуре у здоровых людей и пациентов с РА.

## Материалы и методы

Объектом исследования являлась периферическая кровь 10 условно здоровых женщин, не имеющих аутоиммунных, острых и обострения хронических заболеваний, средний возраст группы составил  $48,1 \pm 3,9$  лет а также периферическая кровь 9 женщин больных РА (средний возраст  $52,5 \pm 3,8$  лет), находившихся на лечении в клинике ФГБНУ НИИФКИ, г. Новосибирска. У всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на проведение необходимых манипуляций (приложение № 1).

Выделенная на градиенте плотности (фикол-верографин, 1,078) (BioClot GmbH, Германия) лимфоцитарная фракция клеток была распределена на 2 варианта культуры. Первый вариант («нормально пролиферирующая CFSE+ культура» (НП)) — 7 лунок по  $5,0 \times 10^5$  кл/0,5 мл полной культуральной среды (ПКС), окрашенных флуоресцентным красителем CFSE (Molecular probes, США), (CFSE+). В составе ПКС — среда RPMI-1640 (ООО «Биолот», Санкт-Петербург), тие-нам, (ЗАО ОПТАТ, Россия), L-глутамин (Gerbu, Biotechnik, GmbH, Германия), буферный раствор Нерес (GERBU, Biotechnik, GmbH), фетальная телячья сыворотка (FCS), (Hy Clone, США). Вторым вариантом — «апоптотическая CFSE-культура» (АК) — 3 лунки (нестимулированные клетки, aCD3 (1 мкг/мл, МедБиоСпектр, Москва), и дексаметазон-стимулированные ( $1 \times 10^{-4}$ М) клетки) по  $2 \times 10^6$  кл/150,0 мкл обедненной среды (ОС) — 1% FCS — (CFSE-). На 4-е сутки инкубации (96 h) в термостате (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) апоптотическая культура (клетки и супернатант отдельно) была перенесена к лимфоцитам, пролиферирующим в условиях ПКС (приложение № 2). Далее проводилось сокультивирование проб, получивших условные названия: 1 — «Контроль» — контрольное культивирование лимфоцитов в ПКС; 2 — «Контроль апоптоза» — к НП лимфоцитам была добавлена клеточная часть нестимулированных клеток АК; 3 — «Контроль апоптоза супернатант» — сокультивирование НП в ПКС и перенесенного к ней супернатанта от нестиму-

лированной 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 ( $1 \times 10^{-4}$ М); 7 — «Деха супернатант» — НП лимфоциты и супернатант от АК, обработанной дексаметазоном (приложение № 3).

Контроль апоптотических проб в динамике проводился на 4-е сутки (96 ч) и 7-е сутки (168 ч) в пробах «КА», «aCD3» и «Деха».

На 7-е сутки каждая проба — супернатант и клетки отдельно — замораживалась и хранилась в холодильнике до использования при  $t^{\circ} -80$  °C. Клеточная часть культуры предварительно смешивалась с раствором альбумина человека (ФГУП «НПО Микроген г. Томск», содержащим 10% DMSO (SIGMA)).

Определение содержания TNF $\alpha$  (пг/мл) в супернатантах клеток проводилось с помощью набора для иммуноферментного анализа АО «Вектор-Бест» (ИФА-БЕСТ), набор реагентов А-8756, р. п. Кольцово, Новосибирская область, согласно инструкции по применению. В определении концентрации IL-6 (пг/мл) (А-8768), IFN $\gamma$  (пг/мл) (А-8752), IL-4 (пг/мл) (А-8754) в супернатантах также были использованы наборы ИФА-БЕСТ, в соответствии с прилагаемой инструкцией. В лизатах клеток в соответствии с прилагаемым протоколом испытаний определялось содержание внутриклеточных компонентов — каспазы-8 (нг/мл), Human Caspase 8 ELISA Kit, invitrogen; Human p53 (Ед/мл) ELISA Kit, invitrogen; ab119506 — Bcl-2 (нг/мл), Human ELISA Kit, abcam.

Статистическая обработка данных проводилась с применением методов непараметрической статистики (Statistica 6.0). В анализе был использован U-критерий Манна-Уитни. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха — Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>), возраст представлен в виде  $M \pm m$ . Различия между группами считались статистически значимыми при достигнутом уровне  $p \leq 0,05$ .

## Результаты

Установленное нами ранее увеличение числа живых клеток в апоптотических культурах больных РА на фоне отсутствия, относительно здоровых людей, значимых различий по параметрам апоптоза и динамики активационных маркеров, а также высокий уровень содержания клеток, несущих маркер пролиферации Ki-67, свидетельствовало о вкладе неавтономных эффектов апоптоза в клеточный гомеостаз у пациентов с РА.

Выявление факторов неавтономного влияния апоптоза в сложной системе «клеточного соседства» апоптотизирующих и пролиферирующих клеток привело к необходимости изучения возможных функциональных дефектов эффекторных молекул апоптоза у пациентов с РА относительно здоровых людей.

Фактор некроза опухоли (TNF $\alpha$ ) — мощный провоспалительный цитокин, включенный в иммунный ответ, является основным фактором, осуществляющим запуск рецепторного варианта апоптоза [16].

В наших исследованиях было установлено, что здоровых людей изначально характеризует более высокий уровень TNF $\alpha$  (единицы измерения пг/мл) в культурах Т-лимфоцитов относительно пациентов с РА. Так, при исследовании уровня цитокина в супернатантах клеточных культур было выявлено более высокое содержание TNF $\alpha$  не только в контроле пролиферирующих кле-

ток (проба «К») у здоровых людей относительно аналогичных культуры пациентов с РА, но также в контроле сокультивированных пролиферирующих и апоптотизирующих клеток (проба «КА»). Аналогичные различия между группами доноров и пациентов были установлены в пробе «Деха» — сокультивированных пролиферирующих и апоптотизирующих мононуклеаров, стимулированных дексаметазоном ( $1 \times 10^{-4}$ М) (рис. 1).

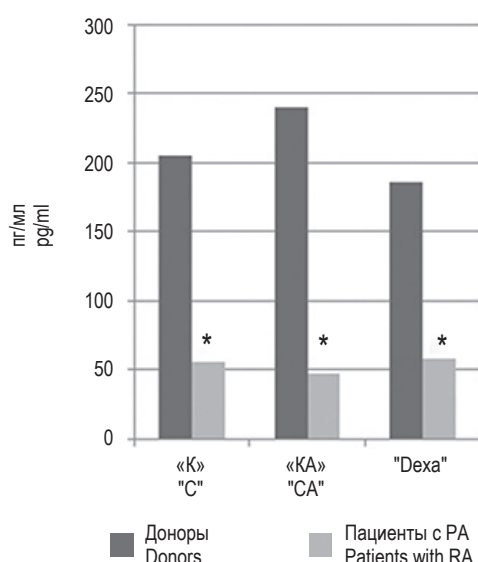
В процессе инкубации в клеточных культурах здоровых людей было установлено снижение содержание TNF $\alpha$  относительно контроля «К» (1) в пробах «КА» (96 ч), «КА» (168 ч), а также в пробах «Деха» (96 ч) и «Деха» (168 ч). Аналогичный характер различий был выявлен относительно пробы «КА» (2) — в пробах «КА» (96 ч), «КА» (168 ч), «Деха» (96 ч), «Деха» (168 ч) (табл. 1).

Кроме того, значимое снижение уровня TNF $\alpha$  в культурах здоровых людей было выявлено в динамике культивирования в пробах "Деха" (96 ч) — 12,03 (5,1 ÷ 66,7),  $p = 0,005$  и "Деха" (168 ч) — 38,1 (2,9 ÷ 82,9),  $p = 0,023$  относительно пробы «Деха» 185,6 (92,5 ÷ 395,5). В культурах пациентов с РА не было установлено значимой динамики в содержании TNF $\alpha$  в процессе инкубации.

Снижение уровня TNF $\alpha$  в культурах доноров в процессе инкубации в неблагоприятных условиях и относительно низкое изначально содержание цитокина у пациентов с РА могло послужить причиной низкой активности каспазы 8 как у здоровых, так и у больных людей.

Исследование содержания каспазы-8 (единицы измерения нг/мл), инициирующей каспазы внешнего контура запуска процессов рецепторного апоптоза, выявило отсутствие различий по уровню фермента в лизатах Т-лимфоцитов между группами доноров и пациентов с РА. Была определена лишь тенденция, свидетельствующая о более высоком содержании у здоровых людей в пробе ("Деха sup"). Также не было установлено значимой динамики, зависящей от применяемых стимулов и времени инкубации, ни у здоровых людей, ни у пациентов с РА.

Одним из самых важных моментов в митохондриальном пути клеточной гибели является включение белков семейства Bcl. При определении в лизатах клеток содержания антиапоптотического фактора из группы Bcl — Bcl-2 (единицы измерения — нг/мл) не было установлено значимых различий между контрольной группой и группой больных. При этом в группе пациентов с РА относительно пробы «К» было определено значимое снижение уровня Bcl-2 в пробах, содержащих клетки апоптотических культур, как не стимулированных — проба «КА», так и в стимулированных — проба «аCD3», в пробе «Деха», пробе «аCD3» (168 ч) и пробе «Деха» (168 ч) (табл. 2).



**Рисунок 1. Содержание TNF $\alpha$  в супернатантах Т-клеточных культур здоровых людей и пациентов с РА**  
Примечание.  $n = 14$ ; \* —  $p \leq 0,05$ ; единицы измерения — пг/мл. Образец «С», контроль пролиферирующих клеток; образец «СА», контроль инкубации в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотических клеток; образец «Деха», инкубация в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и стимулированных дексаметазоном ( $1 \times 10^{-4}$  М) апоптотических клеток.

Figure 1. Concentration of TNF $\alpha$  in supernatants of T cell cultures of healthy people and patients with RA

Note.  $n = 14$ ; \* —  $p \leq 0,05$ ; units of measurement — pg/ml.

Sample "C", control of proliferating cells; sample "CA", control of incubation in the conditions of "cellular neighborhood" of proliferating and apoptotic cells; sample "Dexa", incubation in the conditions of "cell neighborhood" of proliferating and stimulated by dexamethasone ( $1 \times 10^{-4}$  M) apoptotic cells.

**ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ TNF $\alpha$  В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР Т-ЛИМФОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ ИНКУБАЦИИ В УСЛОВИЯХ «КЛЕТОЧНОГО СОСЕДСТВА» ОТНОСИТЕЛЬНО ПРОБ «К» (1) И «КА» (2) У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ**

TABLE 1. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CONCENTRATION OF TNF $\alpha$  IN THE SUPERNATANTS OF T LYMPHOCYTE CULTURES DURING INCUBATION UNDER CONDITIONS OF "CELL NEIGHBORHOOD" RELATIVE TO SAMPLES "C" (1) AND "CA" (2) IN HEALTHY PEOPLE

	<b>K / C (1)</b> <b>204,9 (99,9 ÷ 465,6)</b>		<b>KA / CA (2)</b> <b>240,1 (107,0 ÷ 421,2)</b>
<b>КА (96 ч) / CA (96 h)</b> 61,2 (24,1 ÷ 117,4)	p = 0,04	<b>КА (96 ч) / CA (96 h)</b> 61,2 (24,1 ÷ 117,4)	p = 0,021
<b>КА (168 ч) / CA (168 h)</b> 53,3 (27,1 ÷ 71,06)	p = 0,01	<b>КА (168 ч) / CA (168 h)</b> 53,3 (27,1 ÷ 71,06)	p = 0,01
<b>Деха (96 ч) / Dеха (96 h)</b> 12,03 (5,1 ÷ 66,7)	p = 0,007	<b>Деха (96 ч) / Dеха (96 h)</b> 12,03 (5,1 ÷ 66,7)	p = 0,005
<b>Деха (168 ч) / Dеха (168 h)</b> 38,1 (2,9 ÷ 82,9)	p = 0,022	<b>Деха (168 ч) / Dеха (168 h)</b> 38,1 (2,9 ÷ 82,9)	p = 0,023

Примечание. n = 7, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ), единицы измерения – пг/мл.

Образец «К», контроль пролиферирующих клеток; образец «КА», контроль инкубации в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотических клеток; «КА» (96 ч), «КА» (168 ч), нестимулированные апоптотические лимфоциты, время инкубации – 96, 168 часов; образец «aCD3» (96 ч), апоптотические, стимулированные aCD3 лимфоциты, время инкубации 96 часов; образцы «Деха» (96 ч) (168 ч), апоптотические, стимулированные дексаметазоном ( $1 \times 10^{-4}$ М) лимфоциты, время инкубации 96, 168 часов.

Note. n = 7, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ), measure units – pg/mL. Sample "C", control of proliferating cells; sample "CA", control of incubation in the conditions of "cellular neighborhood" of proliferating and apoptotic cells; "CA" (96 h), "CA" (168 h), unstimulated apoptotic lymphocytes, incubation time – 96, 168 hours; sample "aCD3" (96 h), apoptotic, aCD3-stimulated lymphocytes, incubation time 96 hours; samples "Dеха" (96 h) (168 h), apoptotic, dexamethasone-stimulated ( $1 \times 10^{-4}$ М) lymphocytes, incubation time 96, 168 hours.

**ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЕ BCL-2 В ЛИЗАТАХ КУЛЬТУР Т-ЛИМФОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ ИНКУБАЦИИ В УСЛОВИЯХ «КЛЕТОЧНОГО СОСЕДСТВА» У ПАЦИЕНТОВ С РА ОТНОСИТЕЛЬНО ПРОБ «К» (1) И «КА» (2)**

TABLE 2. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CONCENTRATION OF BCL-2 IN LYSATES OF T LYMPHOCYTE CULTURES DURING INCUBATION UNDER CONDITIONS OF "CELL NEIGHBORHOOD" IN PATIENTS WITH RA RELATIVE TO SAMPLES "C" (1) AND "CA" (2)

	<b>K / C (1)</b> <b>13,7 (7,8 ÷ 19,9)</b>		<b>KA / CA (2)</b> <b>1,42 (0,7 ÷ 2,2)</b>
<b>КА / CA</b> 1,42 (0,7 ÷ 2,2)	p = 0,012	–	
<b>aCD3</b> 1,5 (1,2 ÷ 2,9)	p = 0,012	<b>aCD3</b> 1,5 (1,2 ÷ 2,9)	p > 0,05
<b>aCD3 (168 ч) / aCD3 (168 h)</b> 0,00 (0,00 ÷ 0,00)	p = 0,009	<b>aCD3 (168 ч) / aCD3 (168 h)</b> 0,0 (0,0 ÷ 0,0)	p = 0,052
<b>Деха</b> 0,48 (0,00 ÷ 1,60)	p = 0,013	<b>Деха</b> 0,48 (0,00 ÷ 1,60)	p > 0,05
<b>Деха (168 ч) / Dеха (168 h)</b> 1,13 (0,17 ÷ 3,10)	p = 0,019	<b>Деха (168 ч) / Dеха (168 h)</b> 1,13 (0,17 ÷ 3,10)	p > 0,05

Примечание. n = 5, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ), единицы измерения – нг/мл.

Образец «К», контроль пролиферирующих клеток; образец «КА», контроль инкубации в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотических клеток; образец «aCD3», инкубация в условиях «клеточного соседства» пролиферирующей и стимулированной aCD3 апоптотической клетки; образец «Деха», инкубация в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и стимулированных дексаметазоном ( $1 \times 10^{-4}$  м) апоптотических клеток; образец «aCD3» (168 ч), апоптотические, стимулированные aCD3 лимфоциты, время инкубации 168 часов; образец «Деха» (168 ч), апоптотические, стимулированные дексаметазоном ( $1 \times 10^{-4}$ М) лимфоцитов, время инкубации 168 часов.

Note. n = 5, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ), measure units – ng/mL. Sample "C", control of proliferating cells; sample "CA", control of incubation in the conditions of "cellular neighborhood" of proliferating and apoptotic cells; sample "aCD3", incubation in the conditions of "cell neighborhood" of proliferating and stimulated by aCD3 apoptotic cell; sample "Dеха", incubation in the conditions of "cell neighborhood" of proliferating and stimulated by dexamethasone ( $1 \times 10^{-4}$ М) apoptotic cells; sample "aCD3" (168 h), apoptotic, aCD3-stimulated lymphocytes, incubation time 168 hours; sample "Dеха" (168 h), apoptotic, dexamethasone-stimulated ( $1 \times 10^{-4}$ М) lymphocytes, incubation time 168 hours.

Относительно пробы «аCD3» — 1,5 (1,2 ÷ 2,9), понизилось содержание Bcl-2 в пробе «аCD3» (168 ч), 0,00 (0,00 ÷ 0,00)  $p = 0,052$ .

Определение уровня Bcl-2 в лизатах пролиферирующих клеток, со культивированных с супернатантами от апоптотических культур в пробах «КА супернатант», «аCD3 супернатант», «Деха супернатант» выявило понижение содержания Bcl-2 в меньшей степени — на уровне тенденций. Относительно второй контрольной пробы — «КА» также было определено снижение Bcl-2 в пробе «аCD3» (168 ч).

В группе здоровых людей не было установлено значимой динамики содержания Bcl-2 в культурах, зависящих от характера стимуляции и времени инкубации.

Важнейшим фактором, регулирующим клеточную гибель, является белок p53 (единицы измерения — Ед/мл), это транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл. Исследование внутриклеточного содержания белка p53 выявило отсутствие различий между группами больных РА и здоровыми людьми. При этом в культурах пациентов относительно контроля — пробы «К» 1,73 (1,47 ÷ 1,96) было установлено выраженное снижение содержания указанного белка в пробе «КА» — 0,16 (0,1 ÷ 0,3),  $p = 0,02$ ; в пробе «Деха» 0,0 (0,0 ÷ 0,016),  $p = 0,01$  и в пробе «Деха 168 ч» — 0,0 (0,0 ÷ 0,013),  $p = 0,017$ . В этой же группе пациентов относительно контроля апоптоза «КА» — 0,16 (0,1 ÷ 0,3) было определено

повышение содержания p53 в пробе «CD3sup» 2,5 (1,6 ÷ 2,8),  $p = 0,012$ . Учитывая последние данные, а также результаты, свидетельствующие о различиях между пробами «К» и «КА», можно предположить, что именно контакт с апоптотизирующими клетками в условиях «клеточного соседства» ингибирует содержание транскрипционного фактора в культурах лимфоцитов больных РА.

Определение вклада IL-6 (единицы измерения — пг/мл) в автономные и неавтономные эффекты апоптоза в процессе совместной инкубации пролиферирующих и апоптотизирующих клеток выявило отсутствие различий по уровню цитокина между группами здоровых людей и пациентами с РА. В динамике инкубации в обеих группах были установлены сходные изменения, имеющие однонаправленный характер и свидетельствующие о выраженной стимуляции относительно контроля продукции IL-6 во многих исследуемых вариантах культуры, как у здоровых людей, так и у пациентов с РА. Различия заключались в следующем — у здоровых людей, в отличие от пациентов, на уровне тенденции определялись различия по параметрам цитокина в апоптотической культуре «Деха» (96 ч) относительно контроля «К» (табл. 3).

В группе пациентов с РА характер тенденции носили различия группы контроля «К» относительно не стимулированных клеток в пробах контроль апоптоза «КА» (96 ч) (табл. 4).

**ТАБЛИЦА 3. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ IL-6 В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР Т-ЛИМФОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ ИНКУБАЦИИ В УСЛОВИЯХ «КЛЕТОЧНОГО СОСЕДСТВА» ОТНОСИТЕЛЬНО ПРОБ «К» (1) И «КА» (2) У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ**

TABLE 3. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CONCENTRATION OF IL-6 IN THE SUPERNATANTS OF T LYMPHOCYTE CULTURES DURING INCUBATION UNDER CONDITIONS OF "CELL NEIGHBORHOOD" RELATIVE TO SAMPLES "C" (1) AND "CA" (2) IN HEALTHY PEOPLE

	<b>К / C (1)</b> <b>589,0 (228,0 ÷ 842,3)</b>		<b>КА / CA (2)</b> <b>827,2 (640,7 ÷ 882,8)</b>
<b>КА (96 ч) / CA (96 h)</b> 1807,9 (1623,8 ÷ 3096,0)	$p = 0,0022$	<b>КА (96 ч) / CA (96 h)</b> 1807,9 (1623,8 ÷ 3096,0)	$p = 0,0021$
<b>аCD3 (96 ч) / аCD3 (96 h)</b> 1895,9 (1695,8 ÷ 3038,2)	$p = 0,002$	<b>аCD3 (96 ч) / аCD3 (96 h)</b> 1895,9 (1695,8 ÷ 3038,2)	$p = 0,002$
<b>КА (168 ч) / CA (168 h)</b> 2618,2 (1874,8 ÷ 3339,1)	$p = 0,001$	<b>КА (168 ч) / CA (168 h)</b> 2618,2 (1874,8 ÷ 3339,1)	$p > 0,05$
<b>Деха (96 ч) / Dеха (96 h)</b> 1435,6 (688,07 ÷ 2535,80)	$p = 0,07$	<b>Деха (96 ч) / Dеха (96 h)</b> 1435,6 (688,07 ÷ 2535,80)	$p > 0,05$

Примечание.  $n = 7$ , Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ), единицы измерения — пг/мл.

Образец «К», контроль пролиферирующих клеток; образец «КА», контроль инкубации в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотических клеток; «КА» (96 ч), «КА» (168 ч), нестимулированные апоптотические лимфоциты, время инкубации 96, 168 часов; образец «аCD3» (96 ч), апоптотические, стимулированные аCD3 лимфоциты, время инкубации 96 часов; образец «Деха» (96 ч), апоптотические, стимулированные дексаметазоном ( $1 \times 10^{-4}$  М) лимфоциты, время инкубации 96 часов.

Note.  $n = 7$ , Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ), measure units — pg/mL. Sample "C", control of proliferating cells; sample "CA", control of incubation in the conditions of "cellular neighborhood" of proliferating and apoptotic cells; "CA" (96 h), "CA" (168 h), unstimulated apoptotic lymphocytes, incubation time 96, 168 hours; sample "aCD3" (96 h), apoptotic, aCD3-stimulated lymphocytes, incubation time 96 hours; sample "Dеха" (96 h), apoptotic, dexamethasone-stimulated ( $1 \times 10^{-4}$  M) lymphocytes, incubation time 96 hours.



**ТАБЛИЦА 4. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ IL-6 В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР Т-ЛИМФОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ ИНКУБАЦИИ В УСЛОВИЯХ «КЛЕТОЧНОГО СОСЕДСТВА» ОТНОСИТЕЛЬНО ПРОБ «К» (1) И «КА» (2) У ПАЦИЕНТОВ С РА**

TABLE 4. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE CONCENTRATION OF IL-6 IN THE SUPERNATANTS OF T LYMPHOCYTE CULTURES DURING INCUBATION IN THE CONDITIONS OF "CELL NEIGHBORHOOD" RELATIVE TO SAMPLES "C" (1) AND "CA" (2) IN PATIENTS WITH RA

	<b>K / C (1)</b> <b>485,1 (148,9÷567,3)</b>		<b>KA / CA (2)</b> <b>563,5 (199,2÷639,7)</b>
<b>КА (96 ч) / CA (96 h)</b> 2399,3 (1616,2 ÷ 2603,9)	p = 0,07	<b>КА (96 ч) / CA (96 h)</b> 2399,3 (1616,2 ÷ 2603,9)	p = 0,07
<b>aCD3 (96 ч) / aCD3 (96 h)</b> 2794,9 (2621,2 ÷ 2994,3)	p = 0,006	<b>aCD3 (96 ч) / aCD3 (96 h)</b> 2794,9 (2621,2 ÷ 2994,3)	p = 0,01
<b>Деха (96 ч) / Dexa (96 h)</b> 2496,7 (1955,7 ÷ 2666,1)	p = 0,01	<b>Деха (96 ч) / Dexa (96 h)</b> 2496,7 (1955,7 ÷ 2666,1)	p = 0,010
<b>КА (168 ч) / CA (168 h)</b> 1567,3 (1008,6 ÷ 2774,2)	p = 0,005	<b>КА (168 ч) / CA (168 h)</b> 1567,3 (1008,6 ÷ 2774,2)	p = 0,0053

**Примечание. См. примечание к таблице 3.**

Note. As for Table 3.

Кроме того, у пациентов с РА было выявлено значимое повышение продукции IL-6 на стимуляцию дексаметазоном, не только относительно проб «К» и «КА», но и относительно пробы «Деха» 521,6 (177,5 ÷ 694,5) параметров пробы «Деха» (96 ч) – 2496,7 (1955,7 ÷ 2666,1), p = 0,01.

В супернатантах клеточных культур нами были определены уровни IFN $\gamma$  и IL-4 с целью установления функциональной активности моноклеоров в процессе инкубации в условиях «клеточно-го соседства».

Проведенные исследования свидетельствовали об отсутствии различий по содержанию IFN $\gamma$  (единицы измерения – пг/мл) в супернатантах культур здоровых людей и пациентов с РА, при этом значимое повышение уровня IFN $\gamma$  относительно двух видов контроля было установлено в группе здоровых людей после добавления клеток от aCD3<sup>+</sup> апоптотической культуры. А в культурах пациентов, после добавления супернатанта от aCD3<sup>+</sup> апоптотической культуры. Так, у здоровых людей было определено повышение содержания цитокина в пробах апоптотических культур, стимулированных aCD3 – (aCD3 96 ч) относительно контроля «К» – 4862,5 (416,8 ÷ 7816,0) и 4,2 (0,00 ÷ 23,9), соответственно, p = 0,049. Сходные различия по содержанию IFN $\gamma$  были выявлены также в пробе «aCD3» (96 ч) относительно пробы контроль апоптоза «КА» 4862,5 (416,8 ÷ 7816,0) и 7,9 (0,00 ÷ 23,5) соответственно, p = 0,049.

У пациентов с РА также было установлено достоверное повышение содержания IFN $\gamma$  в супернатантах культуры Т-лимфоцитов при совместном культивировании пролиферирующих клеток и супернатанта от aCD3 апоптотирующей куль-

туры (проба «aCD3sup») относительно пробы «К» 1469,5 (733,9 ÷ 1757,4) и 0,00 (0,00 ÷ 0,95) соответственно, p = 0,027; а также относительно пробы «КА» 1469,5 (733,9 ÷ 1757,4) 0,00 (0,00 ÷ 0,73) p = 0,027.

В супернатантах исследуемых культур нами были определены сходные изменения – повышение уровня IL-4 (единицы измерения – пг/мл) во многих вариантах культур, как у здоровых людей, так и у пациентов с РА. Значимое повышение уровня цитокина у здоровых людей относительно пробы «К» 0,00 (0,00 ÷ 0,81) было установлено в пробе «aCD3» (96 ч) – 99,0 (19,4 ÷ 102,2), p = 0,043; в пробе «Деха» (96 ч) – 74,3 (39,2 ÷ 99,0), p = 0,043; в пробе «aCD3» (168 ч) – 48,5 (18,6 ÷ 91,3), p = 0,044. У здоровых людей также было выявлено повышение уровня IL-4 относительно пробы «КА» – 2,4 (0,85 ÷ 29,1) в пробе – «aCD3» (96 ч), p = 0,049; в пробе «Деха» (96 ч), p = 0,049; в пробе «aCD3» (168 ч), p = 0,049. Кроме того, длительная инкубация апоптотических aCD3-стимулированных культур также повышала уровень цитокина относительно пробы «aCD3» (пролиферирующие и апоптотирующие клетки) – 0,4 (0,00 ÷ 2,025), при инкубации (96 ч), p = 0,049; и при инкубации (168 ч), p = 0,049. В пробе апоптотирующих клеток «Деха» (96 ч) также был установлен более высокий уровень IL-4 относительно пробы «Деха» – пролиферирующие и апоптотирующие клетки в условиях «клеточного соседства» 0,00 (0,00 ÷ 0,59), p = 0,044.

В культурах клеток больных РА было определено аналогичное повышение содержания IL-4 в стимулированных пробах относительно пробы «К» – 0,00 (0,00 ÷ 1,66). В частности, в пробе

«aCD3» (96 ч) 31,4 (31,06 ÷ 111,1),  $p = 0,04$ ; в пробе «aCD3» (168 ч) — 52,2 (30,0 ÷ 177,8),  $p = 0,027$ ; в пробе «Деха» (168 ч) — 49,7 (28,7 ÷ 133,0),  $p = 0,026$ . Относительно пробы «КА» — 2,1 (0,10 ÷ 4,2) определено повышение в пробах «aCD3» (96 ч),  $p = 0,051$ ; «aCD3» (168 ч),  $p = 0,03$ ; «Деха» (168 ч)  $p = 0,03$ . У пациентов, так же как у здоровых людей, повышен уровень IL-4 в пробе «aCD3» (96 ч),  $p = 0,051$  и в пробе «aCD3» (168 ч),  $p = 0,03$  относительно «aCD3» — 4,5 (2,2 ÷ 12,3). В пробе апоптотирующих клеток «Деха» (168 ч) был выявлен более высокий уровень IL-4 относительно пробы «Деха» — «клеточное соседство» пролиферирующих и апоптотирующих стимулированных дексаметазоном ( $1 \times 10^{-4}$  М) клеток — 1,49 (0,6 ÷ 4,8),  $p = 0,03$ .

## Обсуждение

Литературные данные о неавтономных эффектах апоптоза, обусловленные «клеточным соседством», позволили нам предположить, что особенности или нарушение процессов взаимодействия апоптотирующих и пролиферирующих клеток могут являться потенциальными механизмами развития и поддержания патологического воспаления при РА [17].

На предыдущих этапах работы нами была разработана модель «клеточного соседства», в которой, *in vitro* совместно культивировались клеточные и гуморальные компоненты культуры, подвергнутой наиболее физиологичному варианту активационного апоптоза (инкубации в условиях скученности и обеднения культуральной среды) и аутологичные клетки, пролиферирующие в полной культуральной среде. Применение модели выявило отсутствие различий по уровню активационного апоптоза в культурах Т-лимфоцитов, находящихся в условиях «клеточного соседства», стимулированных и не стимулированных, пролиферирующих и апоптотирующих клеток между группами здоровых людей и пациентов с РА. При этом на фоне отсутствия значимых различий по параметрам апоптоза и динамики активационных маркеров, было установлено увеличение числа живых клеток, а также повышение числа клеток несущих маркер пролиферации Ki-67 в апоптотических культурах больных РА относительно показателей здоровых людей, что свидетельствовало о вкладе неавтономных эффектов апоптоза в клеточный гомеостаз у пациентов с РА. Полученные результаты поставили перед необходимостью изучения ключевых молекул апоптоза и их возможное участие в неавтономных эффектах в условиях «клеточно-

го соседства» пролиферирующих и апоптотирующих клеток у больных РА и здоровых людей.

Из двух наиболее изученных путей апоптоза, внешнего (рецепторного) и внутреннего (митохондриального) первый индуцируется лигированием рецепторов смерти надсемейства рецепторов TNF (TNFR), а фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) играет ключевую роль, вмешиваясь в проапоптотический путь лиганда Fas-Fas (FasL) [16, 26]. Полученные в данной работе результаты свидетельствовали о том, что здоровых людей относительно пациентов с РА характеризует высокий уровень TNF $\alpha$  в культурах пролиферирующих клеток или находящихся в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотирующих лимфоцитов. А в процессе инкубации апоптотических, как стимулированных, так и не стимулированных культур доноров продукция TNF $\alpha$  подавлялась. Относительно высокие уровни TNF $\alpha$  и отсутствие различий между пробами «К», содержащей пролиферирующие клетки и «КА», в которой культивировались пролиферирующие и апоптотирующие Т-лимфоциты в культурах здоровых людей, свидетельствует о функциональной активности моноклеаров, находящихся в неблагоприятных условиях.

В то же время изначально низкое, относительно здоровых людей, содержание TNF $\alpha$  в супернатантах культур пациентов с РА не выявило достоверных изменений в динамике инкубирования всех вариантов Т-клеточных культур — пролиферирующих, апоптотирующих и находящихся в условиях «соседства» пролиферирующих и апоптотирующих клеток, что, с учетом полученном нами ранее увеличении числа живых клеток в апоптотической культуре в процессе инкубации может свидетельствовать о наличии факторов пролиферации, поддерживающих изначально клеточный уровень клеток, длительно находящихся в неблагоприятных условиях у пациентов с РА.

Существуют различные данные, выявляющие помимо основных, автономных функций TNF $\alpha$  — многофункционального цитокина, участвующего в гомеостазе иммунной системы, антимикробной защите, регуляции апоптоза, пролиферации и дифференцировке клеток, обеспечивать некоторые неавтономные процессы [19]. Так, известно, что первоначально TNF $\alpha$  синтезируется в виде полноразмерной трансмембранной формы, которая ферментативно расщепляется с образованием растворимого циркулирующего TNF $\alpha$ . Трансмембранная форма цитокина остается биологически активной и способна инициировать сигнальные каскады после связывания с рецеп-

торами TNF $\alpha$  – TNFR I и TNFR II. Она обладает потенциалом регрессии опухоли без инициации клеточной пролиферации. В то время как функция растворимой формы цитокина зависит от варианта специфического рецептора, с которым он устанавливает связь, и его двойная способность стимулировать рост опухоли представляла собой серьезное препятствие для его признания в качестве противораковой молекулы [4]. Относительно аутоиммунных заболеваний, в частности РА, были получены несколько иные данные – растворимая форма цитокина solTNF передает сигналы в основном через TNFR1, который широко экспрессируется и способствует главным образом воспалению и апоптозу. В то время как трансмембранная форма цитокина передает сигналы в основном через TNFR2, который ограничен иммунными и эндотелиальными клетками, активирует сигнальный путь PI3K-Akt/PKB, поддерживает функцию регуляторных клеток и способствует выживанию Т-лимфоцитов [26]. Следующий возможный вариант подавления апоптоза – вариант сплайсинга гена DR3, который содержит четыре однонуклеотидных полиморфизма (SNP) и 14-нуклеотидную делецию в экзоне 5 и интроне 5. Измененный ген смерти DR3, – член семейства Fas, индуцирующего апоптоз, обнаружен при анализе последовательностей ДНК у пациентов с РА. Укороченный белковый продукт гена не содержит домен смерти, образуя гетеротримерный комплекс с DR3 дикого типа и он доминантно-негативно ингибирует индуцированный лигандом апоптоз в лимфоцитах, чем может способствовать патогенезу РА [13]. Еще одним важным фактором поддержания клеточного постоянства в ситуации индукции апоптоза, в частности при хроническом воспалительном заболевании, является аутофагия. Известно, что TNF $\alpha$  индуцирует как апоптоз, так и аутофагию в остеобластах, а усиленная аутофагия защищает клетку, уменьшая апоптоз, индуцированный TNF $\alpha$  [2, 38]. Скрининг нокаута CRISPR в геноме мыши идентифицирует передачу сигналов TNF $\alpha$  опухолевыми клетками как важный компонент апоптоза, индуцированного Т-лимфоцитами, с передачей сигналов NF- $\kappa$ B и аутофагией в качестве основных защитных механизмов. Как известно, аутофагия функционирует на относительно раннем этапе сигнального пути TNF $\alpha$ , ограничивая активацию FADD-зависимой каспазы-8 [34]. В упоминаемой нами ранее работе было сделано заключение, что помимо основной, автономной функции запуска рецепторного апоптоза, активация TNF $\alpha$  опосредованно активирует пролиферативные процессы, в частности, активируемые

им молекулы обладают способностью неавтономно влиять на микроокружение, воздействуя на транскрипцию различных молекул, способствующих росту и пролиферации клеток [24].

Снижение уровня TNF $\alpha$  в культурах доноров в процессе инкубации в неблагоприятных условиях и относительно низкое изначально содержание цитокина у пациентов с РА могло послужить причиной низкой активности каспазы-8, как у здоровых, так и у больных людей.

Апоптоз, индуцированный CD95 (Fas/APO-1) и TNF $\alpha$  активирует каспазу-8 (MACH/FLICE/Mch5), обеспечивая, таким образом, прямую связь между рецепторами клеточной смерти и каспазами, т. е. каспаза 8 находится на вершине апоптозного каскада [29]. Кроме активации CD95, показано расщепление каспазы-8 гранзимом В и даже аутоактивации каспазы-8 в процессе апоптоза, индуцированного Т-лимфоцитами. Эти потенциально летальные ферменты могут служить множеству неапоптотических целей. В частности, стимулировать клеточную пролиферацию, которая может происходить как в результате апоптоза, так и в устойчивых к апоптозу клетках. Одним из возможных вариантов индукции пролиферации вместо апоптоза в стимулированных каспазой-8 лимфоцитах может быть компартментальная активация фермента, приводящая к активации NF- $\kappa$ B и ядерной транслокации [29]. Помимо пролиферации, которая является установленным неавтономным следствием активации каспазы, а митогенные сигналы генерируются каспаз-экспрессирующими клетками, были описаны и другие зависимые от каспаз исходы. В частности, такие, как регулирование гибели и выживания соседних клеток различными способами, одним из которых является продукция PDGF/VGF-подобного белка Pvf, запускающего активацию антиапоптотической микроРНК-бантам в окружающих клетках, явление, получившее название эффекта Махакали, что придает повышенную устойчивость к уничтожению клеток. С другой стороны, апоптоз также может вызывать дальнейшую гибель клеток в окружающих тканях. Это явление, известное как апоптоз, индуцированный апоптозом (AiA), зависит от продукции TNF $\alpha$  умирающими клетками, который активирует JNK в соседних клетках, что приводит к их гибели в результате апоптоза [14].

Нами не было выявлено повышения активности основных эффекторных молекул рецепторного варианта апоптоза в процессе инкубации в условиях «клеточного соседства», ни у здоровых, ни у больных РА. Возможно, полученные резуль-

таты подтверждают данные о том, что большинство форм апоптоза у позвоночных реализуется по митохондриальному пути, а не через рецепторы клеточной гибели.

В культурах пациентов с РА нами было определено значимое подавление антиапоптотического внутриклеточного фактора Bcl-2 относительно контролей в модели «клеточного соседства», в том числе в контрольной пробе «КА» относительно пролиферирующих клеток контроля «К». При этом снижение содержания указанного фактора было наиболее выражено в пробах, содержащих только апоптотические клетки. Длительная инкубация апоптотических клеток, стимулированных антителами к CD3, была сопряжена с полным подавлением Bcl-2 в клеточных лизатах.

Известно, что одними из самых значимых факторов в митохондриальном пути клеточной гибели, является включение регуляторных белков семейства Bcl. Антиапоптотический белок Bcl-2 играет важную роль в клеточной выживаемости [15]. Bcl-2 подавляет апоптоз во многих клеточных системах, включая лимфогематопэтические и нейрональные клетки. Регулирует клеточную смерть, контролируя проницаемость митохондриальной мембраны. Ингибирует каспазы за счет предотвращения выхода цитохрома С из митохондрий и/или за счет связывания фактора, активирующего апоптоз — APAF1. Известно также, что механизм подавления летальности молекулами Bcl-2 и Bcl-xL, может опосредоваться подавлением аутофагии, а не полным апоптозом [35]. Исследования апоптоза в синовиальной оболочке у пациентов с РА показали, что инфильтрирующие синовию Т-лимфоциты экспрессировали высокий уровень белков семейства Bcl-2 и были резистентны к Fas-опосредованному апоптозу. В то же время известно, что митохондриальный путь апоптоза связан с ответом на цитотоксические стимулы или со снижением ростовых факторов и трофических сигналов, поступающих в клетку в виде цитокинов [10, 35].

Модель совместного культивирования пролиферирующих и апоптотирующих клеток, наиболее близко, по нашему мнению, отражающая события, происходящие в суставах при РА, выявила значительное подавление антиапоптотического внутриклеточного фактора Bcl-2 относительно контролей у пациентов с РА. Между тем, у здоровых людей, клетки, находившиеся в аналогичных условиях, не характеризовались значимой динамикой содержания Bcl-2 в процессе культивирования, но и не имели достоверных различий по содержанию Bcl-2 во всех вариантах культур относительно пациентов с РА. Полученные данные

позволяют сделать предположение о большей чувствительности клеток пациентов к неблагоприятным условиям культивирования, к цитотоксическим стимулам.

Важнейшим фактором, регулирующим клеточную гибель, является белок p53. Этот транскрипционный фактор регулирует репарацию клеточной ДНК, индуцирует апоптоз, отвечает за регуляцию старения и вступления клетки в последующие стадии клеточного цикла, а также участвует в ингибировании ангиогенеза и индукции окислительного шока. Активность белка p53 очень жестко контролируется как аллостерической регуляцией его ДНК-связывающей функции, так и регуляцией стабильности белка в ответ на множество внешних раздражителей, таких как: гипоксия, облучение, высокая концентрация монооксида азота. Транскрипционной мишенью p53 является DR5. Ген p53 активирует гены Bax и Bid, p21, PUMA, происходит образование свободных форм кислорода, что способствует выходу цитохрома-С из митохондрий и запуску апоптоза [18, 21]. Клеточное старение частично регулируется геном TP53, критическим геном-супрессором опухоли, который кодирует 12 или более изоформ белка p53. Изоформы p53 продлируются посредством инициации в альтернативных сайтах начала транскрипции и трансляции и альтернативного сплайсинга мРНК. Эти белки укороченной изоформы p53 эндогенно экспрессируются в нормальных клетках человека и выполняют важную функциональную роль, включая модуляцию полноразмерного p53-опосредованного клеточного старения, апоптоза и репарации ДНК [3]. Сорокалетний опыт изучения p53 позволил аналитикам обосновать тезис о том, что апоптоз происходит по принципу «все или ничего». Молекулярные взаимодействия и аутоактивация сети p53 сигнальной молекулой стресса ATM в основной регуляции p53, а также модуль инициации апоптоза с участием Puma, Bcl-2 и Bax определяют решения о судьбах клеток. Роль p53 в качестве апоптотического переключателя может быть нарушена сверхэкспрессией Bcl-2 [3, 7]. Полученные нами результаты свидетельствуют о значимом подавлении не только p53, но и Bcl-2 в апоптотической культуре в процессе инкубации у пациентов с РА и отсутствии достоверных изменений у здоровых людей. В то же время не было выявлено различий по уровню антиапоптотического и проапоптотических факторов между группами доноров и пациентов, что свидетельствует о сходных процессах в клеточном гомеостазе (гибели и пролиферации) в обеих исследуемых группах, по-видимому, в



большей степени выраженных у пациентов с аутоиммунной патологией. Литературные данные свидетельствуют о связи механического напряжения с активностью p53. Известно, что в норме, в условиях полярно-дефицитной конкуренции клеток механическое напряжение активизирует регулятор цитоскелета ROCK, что приводит к повышению активности p53 через активацию p38 [6]. Возможно, скученность клеток в нашей модели апоптоза не послужила достаточным фактором для активации апоптоза у здоровых людей, а у пациентов с РА были задействованы механизмы, повлиявшие на клеточную пролиферацию.

В нашем исследовании инкубация пролиферирующих, апоптотирующих и находящихся в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотирующих клеток у здоровых людей и пациентов с РА сопровождалась повышением продукции IL-6. Известно, что интерлейкин-6 представляет собой многофункциональный белок, который участвует в регуляции иммунного ответа, реакций острой фазы и гематопоеза. Он производится лимфоидными и нелимфоидными клетками, а также нормальными и трансформированными клетками, включая Т-клетки, В-клетки, моноциты, фибробласты, клетки сосудистого эндотелия. Роль IL-6 как про- или противовоспалительного цитокина до сих пор не ясна и во многом зависит от типа сигналинга и многих других причин. В частности, определена антиапоптотическая функция IL-6 в культивируемых  $\beta$ -клетках от стресс-индуцированного апоптоза. Он активирует STAT3, фактор транскрипции, участвующий в аутофагии. IL-6 стимулирует конверсию LC3 и образование аутофагосом [21]. По такому же механизму IL-6 защищает от аномалий нейроны, связанные с депрессией. Повышение уровня IL-6 в области СА1 гиппокампа приводит к плеiotропным защитным действиям, включая снижение оксидативного стресса и модуляцию аутофагии, противовоспалительную активацию и антиапоптотические эффекты [33]. Показано возрастное увеличение IL-6 у стареющих животных, и опосредованное модулированием Bcl-xL и p53 снижение апоптоза [8]. В то же время интерлейкин-6 усиливал TNF $\alpha$ , а TRAIL/Apo2L индуцировал гибель клеток в различных раковых тканях человека, происходящих от злокачественной глиомы, меланомы, рака молочной железы и лейкемии, хотя эффект не был обнаружен при применении только IL-6. IL-6 активировал p53 и рецепторы смерти TRAIL (DR-4 и DR-5) и стимулировал TNF $\alpha$  и TRAIL-зависимый внешний путь апоптоза без активации p53-опосредованного внутреннего пути апоптоза.

Индукционное TNF $\alpha$  и TRAIL расщепление каспазы-8 и каспазы-3 в большей степени усиливалось IL-6, хотя эти каспазы не расщеплялись только IL-6 [30]. Полученное в нашем исследовании подавление ключевых молекул рецепторного и митохондриального вариантов запуска апоптоза могло послужить тем механизмом, который стимулировал продукцию IL-6 в клеточных культурах и его репаративные функции. Или же усиление продукции в условиях клеточного стресса, которое обуславливает «клеточное соседство» или длительное нахождение клеток в условиях скученности и обеднения культуральной среды, могло переключить цитокин на противовоспалительные и антиапоптотические функции, обеспечивая защитные и репаративные возможности.

Определение уровня IFN $\gamma$  в супернатантах исследуемых клеточных культур было обусловлено несомненным участием цитокина в ревматоидном воспалении. Известно, что РА представляет собой системное воспалительное заболевание, связанное с повышенным уровнем медиаторов воспаления, включая TNF $\alpha$ , Th17, а также снижением апоптоза воспалительных клеток. Интерферон- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) вызывает воспалительную реакцию и апоптотическую гибель клеток [20].

Существует много исследований, подтверждающих роль IFN $\gamma$  в клеточной гибели. В частности, активная передача сигналов IFN $\gamma$  может непосредственно запускать апоптоз и остановку клеточного цикла в раковых клетках человека. В уже приведенной нами ранее публикации было обнаружено вмешательство IFN $\gamma$  в аутофагию на этапе слияния аутофагосомы и лизосомы, что нарушало процесс восстановления гомеостаза под влиянием стрессированного эндоплазматического ретикула [9]. В то же время отмечается неоднозначность эффекта IFN $\gamma$  в сложных клеточных системах. Так, в работе [22] было определено, что, с одной стороны, потеря IFN $\gamma$  способствовала продукции cFLIPL и MLKL и некроптозу, а с другой — дефицит IFN $\gamma$  увеличивал количество клеток Th17 и повышал экспрессию IL-17 и TNF $\alpha$ . У животных IFN $\gamma$  -/- CIA в эксперименте наблюдалось усиление повреждения хряща и воспаления суставов. Этот результат позволил авторам сделать вывод, что IFN $\gamma$  регулирует воспалительную гибель клеток. Эта функциональная пластичность позволяет предположить модулирующее участие IFN $\gamma$  в гомеостазе.

Однонаправленная стимуляция продукции IL-4 в культурах мононуклеаров, находящихся в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотирующих культур у здоровых людей и пациентов с РА может свидетельствовать

об активации защитных механизмов при культивировании клеток в неблагоприятных условиях. Так, установлено, что нокдаун SOCS1 (Suppressor of Cytokine Signaling 1) увеличивает экспрессию IL-4, в то время как нокдаун IL-4 снижает жизнеспособность клеток и усиливает клеточный апоптоз остеоартритных хондроцитов, трансфицированных миРНК SOCS1. Более того, сниженная экспрессия воспалительных факторов, индуцированная SOCS1, усиливалась при нокдауне IL-4. Заключается, что передача сигналов IL-4 играет решающую роль в регуляторных функциях SOCS1 при апоптозе и воспалении в остеоартритных хондроцитах человека [14]. При изучении механизмов устойчивости к эпителиальному раку было установлено, что IL-4 действует как аутокринный фактор выживания в эпителиальных клетках [32]. При использовании IL-4 в качестве селективного ингибитора роста клеток ОМЛ была выявлена избирательность его действия. Так, воздействие IL-4 вызывало снижение роста и выживаемости первичных клеток пациентов с ОМЛ CD34<sup>+</sup>CD38 из нескольких генетических подтипов ОМЛ, тогда как нормальные стволовые клетки и клетки-предшественники были менее затронуты [27]. Интересные результаты были получены при восстановлении тканей после заражения гельминтами. Было определено, что для репарации тканей недостаточно только IL-4 или IL-13, но IL-4 или IL-13 вместе с апоптозными клетками индуцировали программу восстановления тканей и резидентных макрофагов. Генетическая абляция сенсоров апоптотических клеток нарушала пролиферацию резидентных макрофагов и индукцию генов противовоспалительных и тканевых репараций в легких после заражения гельминтами или в кишечнике после индукции колита [5]. Существует функциональная связь между IL-6 и активностью IL-4 в процессе альтернативной активации противовоспалительных макрофагов. Так, было показано, что активация M2-макрофагов происходит при воздействии IL-4. При этом IL-6 является мощным индуктором экспрессии альфа цепи рецептора IL-4 (IL-4R) в макрофагах, сенсibiliзируя эти клетки к IL-4-опосредованной активации [11, 23].

Проведенные нами ранее исследования свидетельствовали о том, что выраженная в процессе индукции апоптоза экспрессия активационных маркеров на Т-лимфоцитах периферической крови здоровых людей, в отличие от пациентов с РА, не приводит к запуску процессов пролиферации, в то время как у пациентов значимая экспрессия маркера пролиферации Ki-67 в процессе индукции апоптоза была ассоциирована с увеличением

числа живых клеток. Различный исход индукции апоптоза в культурах, находящихся в одинаковых условиях «клеточного соседства» у здоровых людей и пациентов с РА позволили нам выдвинуть предположение о различиях в механизмах активации и/или о различных эффекторных молекулах, принимающих участие в автономных и неавтономных эффектах апоптоза у здоровых людей и пациентов с РА.

В данном исследовании был установлен низкий потенциал рецепторного пути активации апоптоза за счет подавления продукции TNF $\alpha$  в процессе инкубации клеток в условиях «клеточного соседства» в культурах здоровых людей и низкого изначально и не меняющегося в динамике и в различных вариантах инкубации уровня TNF $\alpha$  в супернатантах пациентов с РА, а также низкого содержания инициирующей каспазы-8 в обеих группах.

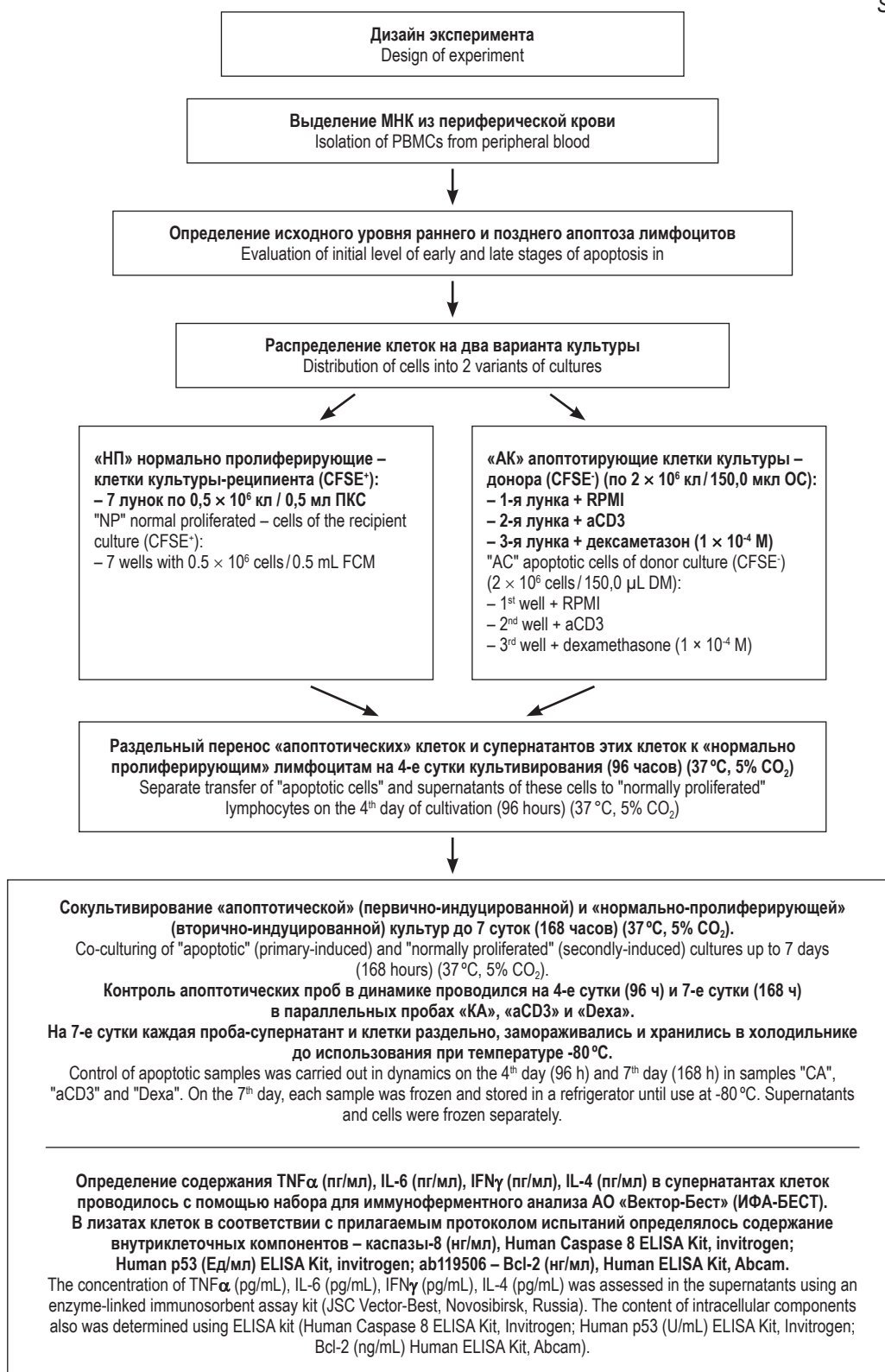
Было определено значимое подавление эффекторных молекул митохондриального пути активации апоптоза — антиапоптотического фактора Bcl-2 и транскрипционного фактора p53 в культурах апоптотических клеток, а также смешанных в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотических клеток у пациентов с РА и отсутствие динамики по содержанию указанных белков у здоровых людей. При этом между отдельными вариантами культур пациентов с РА относительно здоровых людей по содержанию указанных молекул различий не было установлено.

Полученные результаты свидетельствовали о разной степени выраженности, но однонаправленных процессах в культурах мононуклеаров, находящихся в неблагоприятных условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотизирующих клеток, как у пациентов с РА, так и у здоровых людей.

Учитывая, что обе исследуемые группы характеризовались значительной активацией продукции IL-4 и IL-6, цитокинов, обладающих автономными и неавтономными защитными и репаративными свойствами, можно заключить, что высокие уровни указанных цитокинов различным образом проявляли себя в культурах клеток, находящихся в условиях «клеточного соседства». Если у здоровых людей нахождение клеток в неблагоприятных условиях сочеталось с поддержанием баланса пролиферации и апоптоза, то у пациентов с РА поддержание указанного баланса активировало процессы пролиферации и сопровождалось увеличением числа живых клеток в апоптотических культурах.

**КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ (РА)**  
**CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS (RA)**

№ No.	Возраст Age	Диагноз Diagnosis	Длительность Duration of the disease	Лечение Treatment
1	61	<b>РА, серопозитивный, поздняя стадия, эрозивный, Rg III ст., активность умеренная, DAS28 4.68, АЦЦП (+), аМСV (+). ФК II</b> RA, seropositive, late stage, erosive, Rg III stage, moderate activity, DAS28 4.68, aCCP (+), aMCV (+), functional class (FC) II	<b>&gt; 3 лет</b> > 3 years	<b>Метотрексат 15 мг/нед</b> Methotrexate 15 mg/week
2	56	<b>РА, серопозитивный, развернутая стадия, эрозивный, Rg III ст., активность высокая, DAS28 6.2, с системными проявлениями (полинейропатия, анемия). АЦЦП (+). ФК II</b> RA, seropositive, extended stage, erosive, Rg III stage, high activity, DAS28 6.2, with systemic manifestations (anemia, polyneuropathy). aCCP (+). FC II	<b>&gt; 6 лет</b> > 6 years	<b>Метотрексат 15 мг/нед</b> Methotrexate 15 mg/week
3	59	<b>РА, серопозитивный, развернутая стадия, эрозивный, Rg III ст., активность высокая, DAS28 8.3, с системными проявлениями (плеврит в анамнезе, лихорадка). АЦЦП (+). ФК II. Гормонзависимость</b> RA, seropositive, extended stage, erosive, Rg III stage, high activity, DAS28 6.2, with systemic manifestations (history of pleurisy, fever). aCCP (+). FC II. Hormone dependent	<b>&gt; 11 лет</b> > 11 years	<b>Метилпреднизолон 500 мг в/в кап № 3, Метотрексат 10 мг/нед, Преднизолон 5 мг – 2 таб. в сутки</b> Methylprednisolone 500 mg intravenous drip No. 3, Methotrexate 10 mg/week, Prednisolone 5 mg 2 tab. per day
4	34	<b>РА, серопозитивный, развернутая стадия, неэрозивный, Rg II ст., активность умеренная, DAS28 5.09, с системными проявлениями (синдром Рейно). АЦЦП (+). ФК II</b> RA, seropositive, extended stage, not erosive, Rg II stage, moderate activity, DAS28 5.09, with systemic manifestation (Raynaud's syndrome). aCCP (+). FC II	<b>&gt; 8 лет</b> > 8 years	<b>Сульфасалазин 500 мг 3 р/д, Гидроксихлорохин 200 мг 1 р/д</b> Sulfasalazine 500 mg 3 times per day, Hydroxichloroquine 200 mg per day
5	48	<b>РА, серопозитивный, развернутая стадия, неэрозивный, Rg II ст., активность средняя, DAS28 4.6. АЦЦП (+). ФК II. Гормонзависимость</b> RA, seropositive, extended stage, not erosive, Rg II stage, moderate activity, DAS28 4.6. aCCP (+). FC II. Hormone dependent	<b>&gt; 7 лет</b> > 7 years	<b>Метотрексат 15 мг/нед, Преднизолон 5 мг в сутки</b> Methotrexate 15 mg/week, Prednisolone 5 mg per day
6	56	<b>РА, серонегативный, развернутая стадия, неэрозивный, Rg II ст., активность высокая, DAS28 5.58. АЦЦП (-). ФК II. Гормонзависимость</b> RA, seronegative, extended stage, not erosive, Rg II stage, high activity, DAS28 5.58. aCCP (-). FC II. Hormone dependent	<b>&gt; 2 лет</b> > 2 years	<b>Метотрексат 20 мг/нед, Преднизолон 5 мг 2 таб. в сутки</b> Methotrexate 20 mg/week, Prednisolone 5 mg 2 tab. per day
7	42	<b>РА, серопозитивный, развернутая стадия, неэрозивный, Rg II ст., активность высокая, DAS28 5.2. АЦЦП (+). ФК II</b> RA, seropositive, extended stage, not erosive, Rg II stage, , high activity, DAS28 5.2. aCCP (+). FC II	<b>&gt; 9 лет</b> > 9 years	<b>Лефлуномид 20 мг в сутки, Преднизолон 5 мг 2 таб. в сутки</b> Leflunomide 20 mg per day, Prednisolone 5 mg 2 tab. per day
8	56	<b>РА, серопозитивный, поздняя стадия, эрозивный, Rg IV ст., активность высокая, DAS28 5.4. АЦЦП (+). ФК II</b> RA, seropositive, extended stage, erosive, Rg IV stage, high activity, DAS28 5.4. aCCP (+). FC II.	<b>&gt; 22 лет</b> > 22 years	<b>Метотрексат 15 мг/нед</b> Methotrexate 15 mg/week
9	69	<b>РА, серопозитивный, развернутая стадия, неэрозивный, Rg II ст., активность высокая, DAS28 5.6, АЦЦП (+), аМСV (+). ФК II</b> RA, seropositive, extended stage, erosive, Rg II stage, high activity, DAS28 5.6, aCCP (+), aMCV (+). FC II	<b>&gt; 14 лет</b> > 14 years	<b>Метотрексат 15 мг/нед, Сульфасалазин 500 мг 1 р/д</b> Methotrexate 15 mg/week, Sulfasalazine 500 mg per day



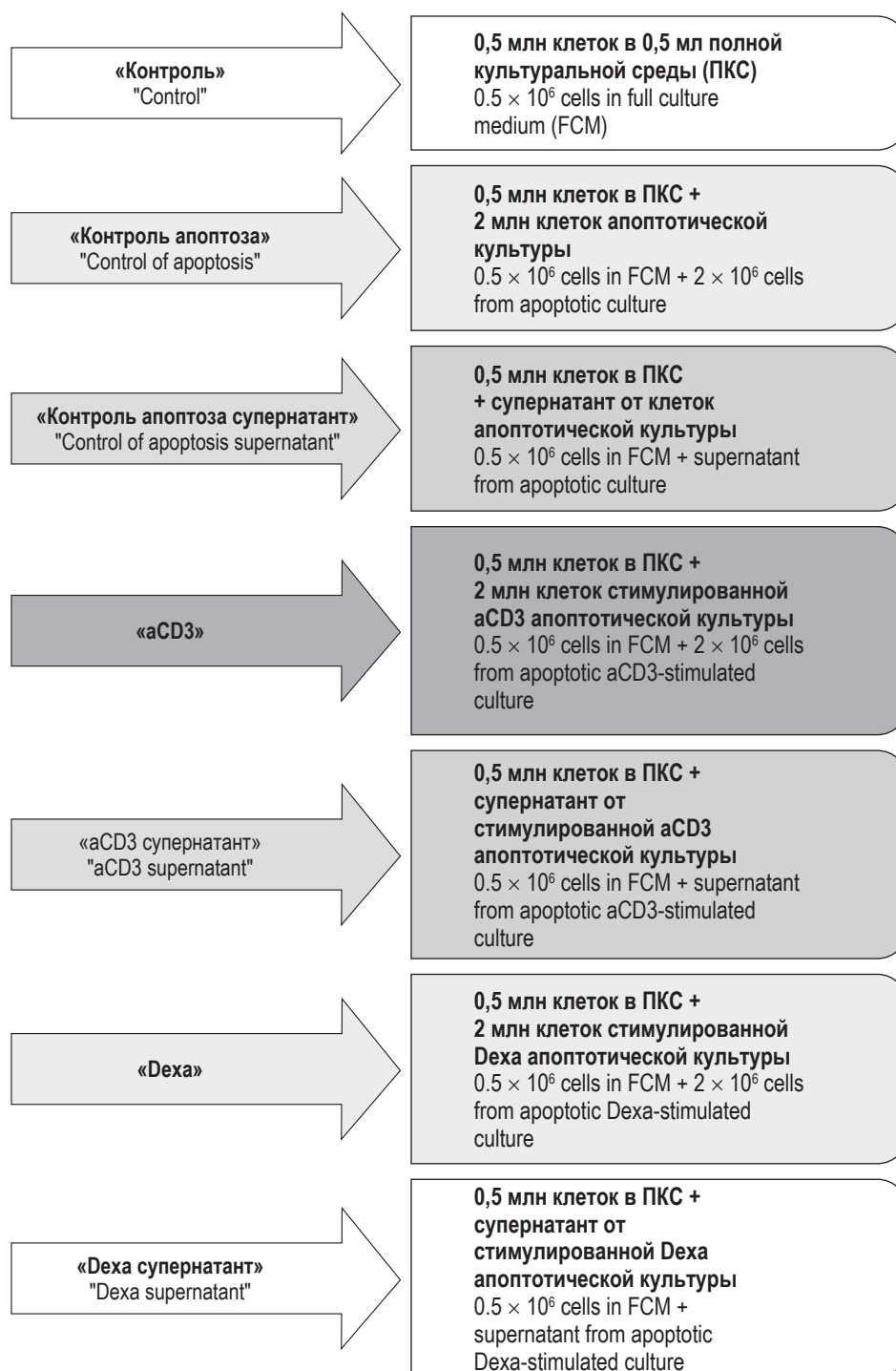
**Примечание.** «НП» – нормально пролиферирующая культура клеток (CFSE<sup>+</sup>); «АК» – апоптотическая культура клеток (CFSE<sup>-</sup>); «ПКС» – полная культуральная среда; «ОС» – обедненная среда; (CFSE<sup>-</sup>) – клетки культуры-донора; (CFSE<sup>+</sup>) – клетки культуры-реципиента.

Note. "NP", normally proliferated cell culture (CFSE<sup>+</sup>); "AC", apoptotic cell culture (CFSE<sup>-</sup>); "FCM", full culture medium; "DM", depleted culture medium; (CFSE<sup>-</sup>), cells of the donor-culture; (CFSE<sup>+</sup>), cells of the recipient-culture.



**НОМИНАЛЬНЫЕ НАЗВАНИЯ СОВМЕСТНО КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРОБ КЛЕТОК ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ В ПОЛНОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ (НП) И АУТОЛОГИЧНЫХ АПОПТОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК (АК)**

NOMINAL NAMES OF CO-CULTURED SAMPLES OF CELLS, PROLIFERATED IN A FULL CULTURE MEDIUM (NP), AND AUTOLOGOUS APOPTOTIC CELLS (AC)



Примечание. Объемы переносимых клеток и супернатантов были доведены ПКС до равных объемов – 0,5 мл.

Note. The volumes of transferred cells and supernatants were equalized by FCM to 0.5 mL.

## Список литературы / References

1. Арефьева А.С. Роль апоптоза в развитии системных аутоиммунных заболеваний // Иммунология, 2014. Т. 35, № 2. С. 103-107. [Arefyeva A.S. Role of apoptosis in the development of systemic autoimmune diseases. *Immunologiya = Immunology*, 2014, Vol. 35, no. 2, pp. 103-107. (In Russ.)]
2. Ковалева О.В., Шитова М.С., Зборовская И.Б. Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания // Клиническая онкогематология, 2014. Т. 7, № 2. С. 103-113. [Kovaleva O.V., Shitova M.S., Zborovskaya I.B. Autophagy: cell death or survival strategy? *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology*, 2014, Vol. 7, no. 2, pp. 103-113. (In Russ.)]
3. Beck J., Turnquist C., Horikawa I., Harris C.. Targeting cellular senescence in cancer and aging: roles of p53 and its isoforms. *Carcinogenesis*, 2020, Vol. 41, no. 8, pp. 1017-1029.
4. Bhattacharyya S., Ghosh S.S.. Unfolding transmembrane TNF $\alpha$  dynamics in cancer therapeutics. *Cytokine*, 2021, Vol. 137, 155303. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155303.
5. Bosurgi L., Cao Y.G., Cabeza-Cabrerizo M., Tucci A., Hughes L.D., Kong Y., Weinstein J.S., Licona-Limon P., Schmid E.T., Pelorosso F., Gagliani N., Craft J.E., Flavell R.A., Ghosh S., Rothlin C.V.. Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science*, 2017, Vol. 356, no. 6342, pp. 1072-1076.
6. Cao Y., Liu J. Impaired apoptosis of peripheral blood CD4<sup>+</sup>T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Chin. J. Cell. Mol. Immunol.*, 2015, Vol. 31, no. 5, pp. 682-685.
7. Chong K.H., Samarasinghe S., Kulasiri D., Zheng J.. Mathematical modelling of core regulatory mechanism in p53 protein that activates apoptotic switch. *J. Theor. Biol.*, 2019, Vol. 462, pp. 134-147.
8. Cimmino I., Prisco F., Orso S., Agognon A.L., Liguoro P., De Biase D., Doti N., Ruvo M., Paciello O., Beguinot F., Formisano P., Oriente F. Interleukin 6 reduces vascular smooth muscle cell apoptosis via Prep1 and is associated with aging. *FASEB J.*, 2021, Vol. 35, no. 11, e21989. doi: 10.1096/fj.202100943R.
9. Fang C., Weng T., Hu S., Yuan Z., Xiong H., Huang B., Cai Y., Li L., Fu X. IFN- $\gamma$ -induced ER stress impairs autophagy and triggers apoptosis in lung cancer cells. *Oncoimmunology*, 2021, Vol. 10, no. 1, 1962591. doi: 10.1080/2162402X.2021.1962591.
10. Feng F.B., Qiu H.Y. Effects of Artesunate on chondrocyte proliferation, apoptosis and autophagy through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rat models with rheumatoid arthritis. *Biomed. Pharmacother.*, 2018, Vol. 102, pp. 1209-1220.
11. Fernando M.R., Reyes J.L., Iannuzzi J., Leung G., McKay D.M. The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 4, e94188. doi: 10.1371/journal.pone.0094188
12. Fritsch M., Günther S.D., Schwarzer R., Albert M.C., Schorn F., Werthenbach J.P., Schiffmann L.M., Stair N., Stocks H., Seeger J.M., Lamkanfi M., Krönke M., Pasparakis M., Kashkar H. Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. *Nature*, 2019, Vol. 575, no. 7784, pp. 683-687.
13. Hashiramoto A., Konishi Y., Murayama K., Kawasaki H., Yoshida K., Tsumiyama K., Tanaka K., Mizuhara M., Shiotsuki T., Kitamura H., Komai K., Kimura T., Yagita H., Shiozawa K., Shiozawa S.. A variant of death-receptor 3 associated with rheumatoid arthritis interferes with apoptosis-induction of T cell. *J. Biol. Chem.*, 2018, Vol. 293, no. 6, pp. 1933-1943.
14. He Q., Sun C., Lei W., Ma J.. SOCS1 Regulates Apoptosis and Inflammation by Inhibiting IL-4 Signaling in IL-1 $\beta$ -Stimulated Human Osteoarthritic Chondrocytes. *Biomed. Res. Int.*, 2017, Vol. 2017, 4601959. doi: 10.1155/2017/4601959.
15. Huang Q., Zheng Y., Ou Y., Xiong H., Yang H., Zhang Z., Chen S., Ye Y.. miR-34a/Bcl-2 signaling pathway contributes to age-related hearing loss by modulating hair cell apoptosis. *Neurosci Lett.*, 2017, Vol. 661, pp. 51-56.
16. Hussain A., Tarahomi T., Singh L., Bollampally M., Heydari-Kamjani M., Kesselman M.M. Cardiovascular Risk Associated With TNF Alpha Inhibitor Use in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Cureus*, 2021, Vol. 13, no. 9, e17938. doi: 10.7759/cureus.17938 5.
17. Kawamoto Y., Nakajima YI., Kuranaga E. Apoptosis in cellular society: communication between apoptotic cells and their neighbors. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 12, 2144. doi: 10.3390/ijms17122144.
18. Kinnaird A., Boukouris A.E., Saleme B., Dromparis P., Zervopoulos S.D., Gurtu V., Sutendra G., Michelakis E.D.. Interaction with p53 explains a pro-proliferative function for VHL in cancer. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 2020, Vol. 98, no. 9, pp. 1269-1278.
19. Kong L., Qian K., Wu S., Li B., Guo Z., Yin X., Huang Y., Ye J., Tu X., Fu S.. Functional characterization of TNF- $\alpha$  in pufferfish (*Takifugu obscurus*) in immune response and apoptosis against *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish Dis.*, 2021, Vol. 44, no. 9, pp. 1343-1353.
20. Lee S.H., Kwon J.Y., Kim S.Y., Jung K., Cho M.L. Interferon-gamma regulates inflammatory cell death by targeting necroptosis in experimental autoimmune arthritis. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 10133. doi: 10.1038/s41598-017-09767-0.
21. Linnemann A.K., Blumer J., Marasco M.R., Battiola T.J., Umhoefer H.M., Han J.Y., Lamming D.W., Davis D.B. Interleukin 6 protects pancreatic  $\beta$  cells from apoptosis by stimulation of autophagy. *FASEB J.*, 2017, Vol. 31, no. 9, pp. 4140-4152.

22. Mattyasovszky S.G., Mausbach S., Ritz U., Wollstädter J., Schmidtman I., Baranowski A., Drees P., Rommens P.M., Hofmann A. Cytokine Interferon- $\gamma$  suppresses the function of capsule myofibroblasts and induces cell apoptosis. *J. Orthop. Res.*, 2017, Vol. 35, no. 11, pp. 2524-2533.
23. Mauer J., Denson J.L., Bruning J.C. Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 36, no. 2, pp. 92-101.
24. Mirakhor Samani S., Ezazi Bojnordi T., Zarghampour M., Merat S., Fouladi D.F. Expression of p53, Bcl-2 and Bax in endometrial carcinoma, endometrial hyperplasia and normal endometrium: a histopathological study. *J. Obstet. Gynaecol.*, 2018, Vol. 38, no. 7, pp. 999-1004.
25. Nakajima Y., Kuranaga E. Apoptosis in cellular society: communication between apoptotic cells and their neighbors. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 12, 2144. doi: 10.3390/ijms17122144.
26. Pegoretti V., Baron W., Laman J.D., Eisel U.L.M. Selective Modulation of TNF-TNFRs Signaling: Insights for Multiple Sclerosis Treatment. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 925. doi: 10.3389/fimmu.2018.00925.
27. Peña-Martínez P., Eriksson M., Ramakrishnan R., Chapellier M., Högberg C., Orsmark-Pietras C., Richter J., Andersson A., Fioretos T., Järås M.. Interleukin 4 induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells in a Stat6-dependent manner. *Leukemia*, 2018, Vol. 32, no. 3, pp. 588-596.
28. Pérez-Garijo A., Steller H. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development*, 2015, Vol. 142, no. 19, pp. 3253-3262.
29. Pérez-Garijo A. When dying is not the end: Apoptotic caspases as drivers of proliferation. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2018, Vol. 82, pp. 86-95.
30. Sano E., Kazaana A., Tadakuma H., Takei T., Yoshimura S., Hanashima Y., Ozawa Y., Yoshino A., Suzuki Y., Ueda T.. Interleukin-6 sensitizes TNF- $\alpha$  and TRAIL/Apo2L dependent cell death through upregulation of death receptors in human cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, 2021, Vol. 1868, no. 7, 119037. doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.119037.
31. Sestito C., Brevé J.J.P., Bol J.G.J.M., Wilhelmus M.M.M., Drukarch B., van Dam A.M. Tissue Transglutaminase contributes to myelin phagocytosis in interleukin-4-treated human monocyte-derived macrophages. *Cytokine*, Vol. 128, 155024. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155024.
32. Todaro M., Lombardo Y., Francipane M.G., Alea M.P., Cammareri P., Iovino F., di Stefano A.B., di Bernardo C., Agrusa A., Condorelli G., Walczak H., Stassi G.. Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. *Cell Death Differ.*, 2008, Vol. 15, no. 4, pp. 762-772.
33. Wang P., Feng Y.B., Wang L., Li Y., Fan C., Song Q., Yu S.Y.. Interleukin-6: Its role and mechanisms in rescuing depression-like behaviors in rat models of depression. *Brain Behav. Immun.*, 2019, Vol. 82, pp. 106-121.
34. Young T.M., Reyes C., Pasnikowski E., Castanaro C., Wong C., Decker C.E., Chiu J., Song H., Wei Y., Bai Y., Zambrowicz B., Thurston G., Daly C. Autophagy protects tumors from T cell-mediated cytotoxicity via inhibition of TNF $\alpha$ -induced apoptosis. *Sci. Immunol.*, 2020, Vol. 5, no. 54, eabb9561. doi: 10.1126/sciimmunol.abb9561.
35. Zhang J., Zhang S., Shi Q., Allen T.D., You F., Yang D.. The anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL suppress Beclin 1/Atg6-mediated lethal autophagy in polyploid cells. *Exp. Cell. Res.*, 2020, Vol. 394, no. 1, 112112. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112112.
36. Zhang K.S., Wang J.F., Zhang S.L., Li Z., Pei Z., Guan Z.P. Effects of tumor necrosis factor alpha on the expression of programmed cell death factor 5 in Arthritis. *Orthop. Surg.*, 2019, Vol. 11, pp. 698-704.
37. Zhang, S., Zhao, J., Ma W. Ma Circ-Sirt1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and ameliorates inflammation in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Autoimmunity*, 2021, Vol. 54, no. 8, pp. 514-525.
38. Zheng L., Wang W., Ni J., Mao X., Song D., Liu T., Wei J., Zhou H. Role of autophagy in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis of osteoblast cells. *J. Investig. Med.*, 2017, Vol. 65, no. 6, pp. 1014-1020.

**Авторы:**

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

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

**Пашкина Е.А.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной 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

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

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

**Гришина Л.В.** — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Ильина Н.А.** — врач-ревматолог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Чумасова О.А.** — к.м.н., врач-ревматолог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

**Сизиков А.Э.** — к.м.н., заведующий отделением ревматологии, врач-ревматолог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

**Grishina L.V.**, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Ilina N.A.**, Rheumatologist, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Chumasova O.A.**, PhD (Medicine), Rheumatologist, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

**Sizikov A.E.**, PhD (Medicine), Head, Department of Rheumatology, Rheumatologist, Clinic of immunopathology, 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, Scientific Advisor, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 01.06.2022  
Принята к печати 27.06.2022

Received 01.06.2022  
Accepted 27.06.2022