

УДК 571.27

## ВЛИЯНИЕ МЕТИЛПРЕДНИЗОЛОНА НА ПОЗДНИЕ ЭТАПЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ $CD4^+$ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ: ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO*

© 2019 г. Н. М. Тодосенко<sup>1</sup>, К. А. Юрова<sup>1</sup>, О. Г. Хазиахматова<sup>1</sup>, Л. С. Литвинова<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

\*E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.04.2018 г.

После доработки 15.05.2018 г.

Принята к публикации 01.11.2018 г.

В системе *in vitro* исследованы эффекты метилпреднизолон (МП) на поздние этапы дифференцировки активированных Т-клеток памяти у здоровых доноров и у пациентов с диагнозом ревматоидный артрит (РА). Установлено супрессорное влияние метилпреднизолон (МП) на число  $CD4^+$  Т-клеток, экспрессирующих молекулы активации ( $CD25$ ) и костимуляции ( $CD28$ ) в  $CD3^+CD45RO^+$  культурах здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (РА). Оценка уровня экспрессии мРНК генов  $U2af114$  и  $Gfi1$ , контролирующих альтернативный сплайсинг гена  $Ptprc$ , позволила продемонстрировать однонаправленные, но разной степени выраженности изменения в норме и при РА. Выявленные ассоциации между уровнем экспрессии генов  $U2af114$  и  $Gfi1$  и числом  $CD3^+CD4^+CD45RO^-CD28^-$  клеток в популяциях ТCR-активированных Т-клеток памяти больных РА, подвергнутых действию МП, подтверждают гипотезу о способности глюкокортикоидов стимулировать образование терминально-дифференцированных лимфоцитов ( $CD4^+CD28^-CD45RO^-$ ;  $TEMRA$ ), которые предположительно играют ключевую роль в патогенезе РА.

**Ключевые слова:** ревматоидный артрит, метилпреднизолон, активация, дифференцировка, экспрессия генов.

**DOI:** 10.1134/S0131164619030172

Ревматоидный артрит (РА) — хроническое аутоиммунное заболевание (АИЗ), характеризующееся воспалительной реакцией в результате дисрегуляции Т-клеточного звена иммунитета [1]. Предполагают, что основными артритогенными клетками в патогенезе РА являются  $CD4^+CD45RO^+$  Т-лимфоциты памяти с высоким провоспалительным потенциалом [2]. Молекула  $CD45RO$  представляет собой короткий вариант общелейкоцитарного рецептора  $CD45$ , образующийся в результате альтернативного сплайсинга гена  $Ptprc$  (кодирующего молекулу  $CD45$ ) [3]. Установлено, что несоответствующее сплайсирование премРНК гена  $Ptprc$  или наличие некоторых полиморфных вариантов гена  $CD45$  коррелируют с восприимчивостью к широкому спектру аутоиммунных заболеваний, вирусных инфекций и тяжелых иммунодефицитов человека [3]. Можно предположить, что альтернативный сплайсинг гена  $Ptprc$  регулируется взаимоисключающими факторами: сплайсинга  $U2af114$  ( $U2$  small nuclear RNA auxiliary factor 1-like 4,  $U2af114$ ) и транскрипции  $Gfi1$  ( $growth$  factor independent 1), определяющими образование специфических изоформ гли-

копротеина  $CD45$  в процессах дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов [4].

С целью снижения воспалительной реакции организма при АИЗ, в частности при РА, применяют глюкокортикоидные препараты (ГК) [1, 5]. Однако на фоне постоянного приема ГК (примерно у 50% пациентов) возможен рецидив аутоиммунного процесса с утяжелением течения заболевания [5], что позволяет сделать предположение, что ГК не в полной мере блокируют основное звено патогенеза — аутореактивные лимфоциты. Мы предполагаем, что ГК, регулируя альтернативный сплайсинг гена  $Ptprc$  [6], участвуют в процессе терминальной дифференцировки аутореактивных Т-клеток при АИЗ, что в свою очередь, может определять исход/течение иммунных реакций при РА. В данной работе в условиях *in vitro* была оценена взаимосвязь между изменением уровней экспрессии генов  $U2af114$  и  $Gfi1$  и фенотипическими проявлениями, характеризующими процессы активации и дифференцировки ТCR-стимулированных  $CD3^+CD4^+CD45RO^+$  Т-клеток, индуцированных ГК — метилпреднизолоном (МП) в норме и при РА.

## МЕТОДИКА

Материалом для исследования служили мононуклеарные лейкоциты, выделенные из венозной крови, взятой из локтевой вены утром натощак с помощью стандартных вакуумных систем “*BD VACUTAINER™*” (“*Greiner-bio-one*”, Австрия) с гепарином (20 ед./мл) у 50 больных РА (38 женщин и 12 мужчин в возрасте  $36.4 \pm 7.2$  лет) и 20 доноров без заболевания РА (10 женщин и 10 мужчин в возрасте  $35.3 \pm 8.9$  лет). Верификацию диагноза и набор пациентов в группы исследования осуществляли зав. ревматологическим отделением, заслуженный врач РФ И.П. Малинина на базе областной клинической больницы г. Калининграда (главный врач – заслуженный врач РФ К.И. Поляков). Постановку диагноза РА выполняли согласно приказу № 21 “Об утверждении стандарта медицинской помощи больным ревматоидным артритом” от 13 января 2006 г.

Диагностические исследования включали опрос пациентов, рентгенографию, компьютерную и ядерно-магнитно-резонансную (ЯМР)-томографию суставов, выявление ревматоидного фактора и титра антител к циклическому цитрулин-содержащему пептиду, оценку скорости оседания эритроцитов и С-реактивного белка. На основании оценки анамнеза болезни в исследование включили пациентов, отвечающих следующим критериям:

- активность болезни – ремиссия (*DAS28* (визуальный калькулятор оценки активности заболевания при РА) < 2.6) (10 чел.) или низкая (*DAS28* – 2.6–3.2) (40 чел.);
- ревматоидный фактор – серопозитивный;
- антитела к циклическому цитрулин-содержащему пептиду – серопозитивный;
- отсутствие терапии стероидными и цитостатическими препаратами с момента манифестации заболевания (не менее 6 мес.);
- продолжительность заболевания – не более года с момента постановки диагноза.

Критерием исключения пациентов из исследования явилось получение медикаментозной терапии (в том числе терапия ГК препаратами) на момент взятия крови и наличие внесуставных осложнений заболевания. Со всеми обследованными лицами подписали добровольное информированное согласие на исследование. Разрешение на проведение исследования получили в локальном этическом комитете (№ 2 от 11 ноября 2014 г.).

Мононуклеарные клетки (МНК) получали методом центрифугирования в градиенте плотности ( $1.077 \text{ г/см}^3$ ) фиколл-урографина (“*Pharmacia*”, Швеция) по стандартной методике. Культуры Т-клеток ( $CD3^+CD45RO^+$ ) получали из МНК методом иммуномагнитной сепарации с использо-

ванием технологии *MACS®* (*MidiMACS Separator, LS Columns, “Miltenyi Biotec”*, Германия) и моноклональных антител к *CD14* и *CD45RO* с парамагнитными частицами (*MicroBeads human, Miltenyi Biotec*, Германия), согласно протоколу фирмы-изготовителя. Использовали клеточные культуры, чистота которых после магнитной сепарации составляла в среднем  $97.5 \pm 2.12\%$  (фенотип  $CD3^+CD45RO^+CD14^-CD19^-$ ) (далее,  $CD3^+CD45RO^+$  клетки). Число живых клеток в культурах составляло не менее 98%.  $CD3^+CD45RO^+$  клетки ( $10^6$  кл./мл) культивировали в 48-луночном планшете в бессывороточной среде Искова (“*Sigma*”, США), содержащей 0.5% сывороточного альбумина человека (Микроген, Россия),  $5 \times 10^{-5}$  М  $\beta$ -меркаптоэтанола (“*Acros Organic*”, США) и 30 мкг/мл гентамицина, в присутствии синтетического ГК (МП) (“*Orion Pharma*”, Россия) в разных концентрациях или без него (контроль) при  $37^\circ\text{C}$  во влажной атмосфере, содержащей 5%  $\text{CO}_2$  в течение 48 ч. В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент *T-Cell Activation/Expansion Kit human* (“*Miltenyi Biotec*”, Германия) – антибиотиновые частицы *MACSiBead™* с биотинилированными антителами против  $CD2^+$ ,  $CD3^+$ ,  $CD28^+$  человека (далее *Ac/Exp*). Использовали следующие варианты культивирования: 1) интактная проба (без добавления *Ac/Exp* и синтетических ГК); 2) проба с добавлением *Ac/Exp*; 3) пробы с добавлением *Ac/Exp* и разных концентраций МП (10.6; 21.3; 46.2; 85.3; 170.7 мг). Дозы МП, используемые в эксперименте, определили, исходя из математической фармакокинетической двухкамерной модели, где учитывался расчетный объем распределения ГК в организме [7].

Число клеток, несущих поверхностные маркеры (*CD3*, *CD4*, *CD25*, *CD28*, *CD71*, *CD45RO*), определяли методом проточной лазерной цитометрии с помощью моноклональных антител, конъюгированных с *Viablu* (*CD45RO*), аллофикоцианином (*APC*) (*CD3*) (“*Miltenyi Biotec*”, Германия), флюоресцеинизотиоцианатом (*FITC*) (*CD25*), фикоэритрином (*PE*) (*CD4*), (“*Abcam*”, *Cambridge, UK*); с конъюгатом *PE* с цианином (*PE-Cy7*) (*CD71*) или с пиридинхлорофиллом (*PerCP*) (*CD28*) (“*e-Bioscience*”, США) согласно методикам производителя. Регистрацию результатов проводили на проточном цитофлюориметре *MACSQuant* (“*Miltenyi Biotec*”, Германия). Все результаты цитометрического анализа проанализировали с помощью программы “*KALUZA Analysis Software*” (“*Beckman Coulter*”, США).

После инкубации клеточных культур тотальную РНК выделяли с использованием водного раствора фенола и гуанидин-изотиоцианата (*ExtractRNA kit* “Евроген”, Россия) согласно протоколу производителя. Обратную – проводили с использованием набора реагентов *MMLV RT kit*

(“Евроген”, Россия) согласно протоколу производителя. В качестве затравки использовали олигонуклеотидный праймер (*oligo(dT23)*, 20 мкМ) (“Бигль”, Россия). Для определения уровней относительной экспрессии генов проводили мультиплексный анализ ПЦР с использованием специфичных зондов *TaqMan* (“Бигль”, Россия). ПЦР проводили с использованием реагентов *qPCRmixHS* (“Евроген”, Россия) и праймеров в концентрации 10 пМ. В качестве матрицы использовали 4 мкл кДНК, в качестве референсного гена — ген *GAPDH*. Предварительную оценку специфичности праймеров, ампликонов и зондов проводили с помощью *on-line* программы *BLAST*. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, используемых в эксперименте, а также протоколы амплификации, описаны ранее [6].

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы *IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences)*. Статистическую обработку данных ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени осуществляли с помощью специализированной программы *REST 2009 v. 2.0.12*. Уровень экспрессии исследуемых генов в контрольной группе приняли за 1 усл. ед.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ эффектов активатора и МП на реакции, характеризующие процессы активации и дифференцировки *TCR*-стимулированных  $CD3^+CD4^+CD45RO^+$  *T*-клеток, проведенный нами с учетом гендерных различий доноров без заболевания РА и больных РА, не выявил статистически достоверных отличий тестируемых параметров. На наш взгляд, отсутствие различий по половому признаку в модели исследования *in vitro* обусловлено тем фактом, что иммунокомпетентные клетки, в частности, *T*-лимфоциты женщин и мужчин по сути не отличаются по функциям и фенотипу, а их рецепторный репертуар определяется гормональным фоном организма [8, 9].

Культивирование  $CD3^+CD45RO^+$  клеток в присутствии активатора приводило к достоверному повышению числа  $CD4^+$  *T*-клеток, экспрессирующих молекулу *CD25*, напротив, содержание  $CD4^+CD28^+$  *T*-лимфоцитов снижалось по сравнению с интактной пробой (табл. 1). Известно, что молекула *CD25* экспрессируется на ранних этапах *T*-клеточной активации и свидетельствует о пролиферативном и дифференцировочном потенциале клетки [10]. Молекула костимуляции *CD28*, в свою очередь, опосредует функциональную активность *T*-лимфоцитов, участвуя в формиро-

вании иммунного синапса с последующей клональной экспансией *T*-клеток [11, 12].

Инкубация *TCR*-активированных  $CD3^+CD45RO^+$  клеток с МП (весь ряд используемых концентраций) сопровождалась снижением ( $p < 0.05$ ) числа  $CD4^+$  клеток, экспрессирующих молекулы активации (*CD25*) и костимуляции (*CD28*) в контроле и у больных РА (табл. 1). Полученные нами результаты не противоречат данным литературы, раскрывающим геномные противовоспалительные эффекты ГК [10, 13, 14]. Кроме того, потеря экспрессии молекулы коактивации (*CD28*) *TCR*-активированными  $CD3^+CD45RO^+$  *T*-клетками может косвенно указывать на процессы созревания *T*-лимфоцитов под действием МП [6, 15].

Известно, что в процессе антигенной стимуляции *T*-лимфоциты претерпевают активационные изменения, затрагивающие экспрессию молекулы *CD45*, которая является критическим регулятором сигнализации, опосредованной *T*-клеточным рецептором (*TCR*) [16, 17]. Как уже упоминалось, регуляция альтернативного сплайсинга гликопротеина *CD45* осуществляется за счет совместного действия двух факторов: сплайсинга *U2AF26 (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 like 4, U2af114)* и транскрипции *Gfi1 (growth factor independent 1)*, реципрокное действие которых определяет соотношение коротких и длинных сплайс-форм *CD45* [3]. Так, экспрессия продукта гена *U2af114* приводит к образованию короткой молекулы *CD45 (CD45RO)*, тогда как *Gfi1* способствует формированию высокомолекулярной изоформы *CD45 – CD45RA*, характерной, преимущественно, для наивных *T*-лимфоцитов [3, 4, 13]. В процессе терминальной дифференцировки эффекторные клетки памяти (*TEM*) ( $CD3^+CD45RO^+CD28^-$ ) могут реэкспрессировать длинный сплайс-вариант *CD45 (CD45RA)*, образуя пул терминально-дифференцированных клеток (*TEMRA*,  $CD3^+CD45RO^-CD45RA^+CD28^-$ ) [15].

Согласно полученным результатам, культивирование  $CD3^+CD45RO^+$  *T*-клеток в присутствии *Ac/Exp* сопровождалось повышением уровня экспрессии гена *Gfi1* в *T*-лимфоцитах в обеих исследуемых группах, по сравнению с интактными пробами (рис. 1).

Интересно, что *Ac/Exp* значимо угнетал экспрессию гена *U2af114* (в 35.43 раза) в *T*-клетках здоровых доноров, напротив, у больных РА данный показатель возрастал в 2.2 раза по отношению к пробам без активатора (рис. 2). Добавление в *TCR*-активированные  $CD3^+CD45RO^+$  культуры здоровых доноров МП (10.6–46.2 мг) сопровождалось снижением экспрессии гена *Gfi1*, тогда как увеличение дозы МП (85.3; 170.7 мг) в среде приводило к возрастанию данного показателя (рис. 1).

**Таблица 1.** Содержание  $CD25$ ,  $CD28$  и  $CD28^-CD45RO^-$  (негативных) клеток (%) в культурах  $CD3^+CD4^+CD45RO^+$   $T$ -лимфоцитов, полученных у здоровых доноров ( $n = 20$ ) и больных ревматоидным артритом ( $n = 50$ ), в условиях инкубации с разными концентрациями метилпреднизолона (МП) и активатором ( $Ac/Exp$ ) ( $Me$  (Q1–Q3))

Показатель	Условия культивирования		Здоровые доноры	Больные РА
$CD25^+$	Без активации		3.11 (2.99–3.14)	1.95 (1.60–2.70) <sup>◇</sup>
	$Ac/Exp$		35.22 (30.19–36.29)*	25.13 (15.75–27.52) <sup>◇</sup>
	$Ac/Exp$ + МП (мг)	10.6	28.63 (24.54–29.50)**	20.96 (13.13–22.95)** <sup>◇</sup>
		21.3	24.29 (20.82–25.03)**	15.41 (9.67–16.88)** <sup>◇</sup>
		42.6	13.55 (11.61–13.96)**	14.87 (9.32–16.88)**
		85.3	11.78 (10.10–12.14)**	15.91 (9.97–17.42)** <sup>◇</sup>
170.7		10.71 (9.18–11.03)**	14.76 (9.25–16.16)** <sup>◇</sup>	
$CD28^+$	Без активации		47.86 (45.83–50.57)	33.65 (29.11–37.85) <sup>◇</sup>
	$Ac/Exp$		41.70 (40.53–43.15)*	31.15 (26.44–35.96) <sup>◇</sup>
	$Ac/Exp$ + МП (мг)	10.6	38.35 (35.04–41.85)	29.20 (27.05–31.63) <sup>◇</sup>
		21.3	37.85 (32.98–42.70)	24.77 (21.20–29.80) <sup>◇</sup>
		42.6	31.32 (27.83–34.87)**	21.22 (18.99–25.08)** <sup>◇</sup>
		85.3	24.30 (22.72–27.13)**	16.44 (15.23–18.21)** <sup>◇</sup>
170.7		21.13 (19.50–23.14)**	11.33 (9.16–13.33)** <sup>◇</sup>	
$CD45RO^-CD28^-$	Без активации		2.50 (2.07–3.09)	5.59 (4.46–6.82) <sup>◇</sup>
	$Ac/Exp$		6.48 (5.96–7.15)*	8.70 (8.37–8.75) <sup>◇</sup>
	$Ac/Exp$ + МП (мг)	10.6	7.75 (7.68–7.83)**	10.76 (10.54–10.93)** <sup>◇</sup>
		21.3	8.74 (8.55–9.05)**	12.30 (11.72–12.98)** <sup>◇</sup>
		42.6	9.57 (9.37–9.78)**	15.89 (15.37–17.00)** <sup>◇</sup>
		85.3	13.54 (13.35–13.59)**	20.08 (19.52–21.03)** <sup>◇</sup>
170.7		14.13 (13.36–14.71)**	23.25 (21.91–24.49)** <sup>◇</sup>	

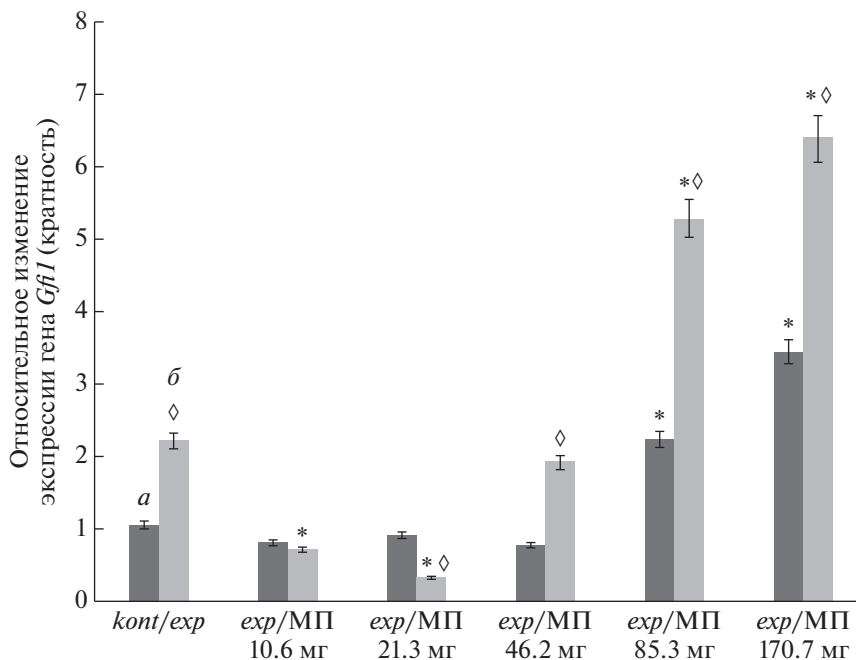
Примечание: \* –  $p < 0.05$  – в сравнении с культурами клеток, культивированными без активационных частиц; \*\* –  $p < 0.05$  – в сравнении с культурами клеток, культивированными с активатором ( $Ac/Exp$ ). <sup>◇</sup> –  $p < 0.05$  – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров.

У больных РА изменения уровня экспрессии гена  $Gfi1$  в  $CD3^+CD45RO^+$   $T$ -клетках под влиянием МП носило аналогичный характер (рис. 1). МП (весь спектр концентраций) повышал экспрессию гена  $U2af114$  в культурах группы контроля и больных РА (рис. 2). Следует отметить, что эффекты МП, оказываемые на культуры больных РА, в отношении экспрессии генов  $Gfi1$  и  $U2af114$  носили дозозависимый характер (коэффициент регрессии  $r^2 = 0.446$ ;  $r^2 = 0.622$ ,  $p < 0.05$ , соответственно).

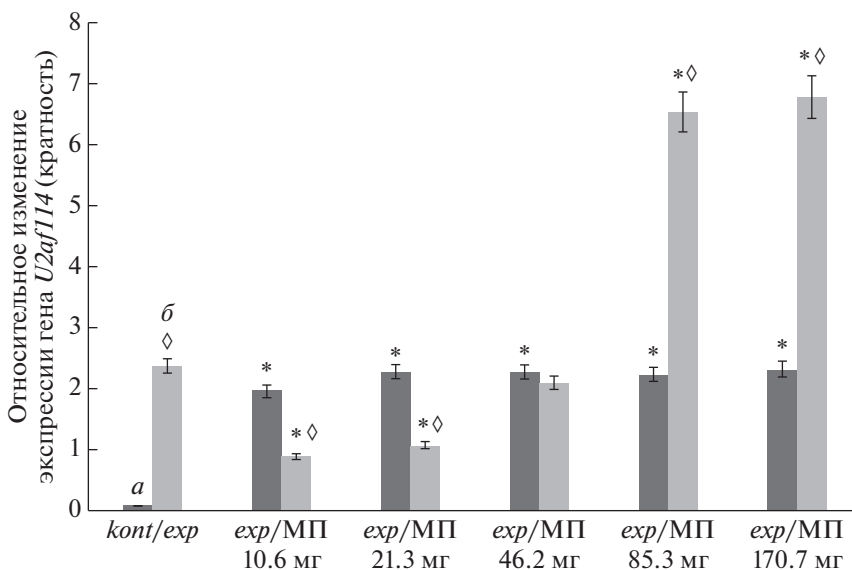
Основываясь на предположении, что МП может оказывать влияние на процессы созревания и дифференцировки  $CD3^+CD4^+CD45RO^+$   $T$ -клеток памяти, нами была проведена оценка влияния МП на содержание  $CD4^+CD28^-CD45RO^-$  лимфоцитов в культурах  $TCR$ -активированных  $CD3^+CD45RO^+$  клеток. Было обнаружено, что инкубация

$CD3^+CD45RO^+$   $T$ -клеток с активатором сопровождалась ростом числа  $CD4^+CD28^-CD45RO^-$   $T$ -лимфоцитов (табл. 1). МП дозозависимым образом увеличивал число  $CD4^+CD28^-CD45RO^-$  клеток в  $TCR$ -активированных культурах  $T$ -лимфоцитов здоровых доноров (коэффициент регрессии  $r^2 = 0.897$ ;  $p < 0.05$ ) и больных РА ( $r^2 = 0.922$ ;  $p < 0.05$ ). Важно отметить, что количество клеток  $CD4^+CD28^-CD45RO^-$  в культурах, полученных у больных РА, превосходило таковое в пробах здоровых доноров, индуцированное действием МП ( $\approx$  в 1.5–2.0 раза) (табл. 1).

Проведенный корреляционный анализ позволил выявить взаимосвязи между содержанием  $CD4^+CD28^-CD45RO^-$  клеток и уровнем относительной экспрессии мРНК гена  $Gfi1$  в  $CD3^+CD45RO^+$   $T$ -клетках в культурах у больных РА ( $r = 0.874$  – при действии активатора,  $r =$



**Рис. 1.** Относительный уровень ( $\bar{X} \pm SD$ ) экспрессии гена *Gfi1* в культурах  $CD3^+CD45RO^+$  T-лимфоцитов здоровых доноров (“a”,  $n = 20$ ) и больных ревматоидным артритом (“b”,  $n = 50$ ), инкубируемых с T-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями метилпреднизолона (МП). a – группа здоровых доноров, b – группа больных РА. *kont/exp* – отношение уровня экспрессии мРНК в контрольных образцах (без воздействия) и образцов с добавлением T-клеточного активатора; *exp/МП* (10.6; 21.3; 46.2; 85.3; 170.7 мг) – отношение уровня экспрессии мРНК в образцах с добавлением T-клеточного активатора и в образцах с добавлением МП. \* – достоверность различий экспрессии гена *Gfi1* по сравнению с пробой *kont/exp*; ◇ – достоверность различий экспрессии гена *Gfi1* в культурах T-лимфоцитов от здоровых доноров и больных РА.



**Рис. 2.** Относительный уровень ( $\bar{X} \pm SD$ ) экспрессии гена *U2af114* в культурах  $CD3^+CD45RO^+$  T-лимфоцитов от здоровых доноров ( $n = 20$ ) и больных РА ( $n = 50$ ), инкубируемых с T-клеточным активатором (Ac/Exp) и разными концентрациями метилпреднизолона (МП). Обозначения см. рис. 1.

= 0.463,  $r = 0.563$ ,  $r = 0.374$  – при действии активатора и МП (46.2; 85.3; 170.7 мг,  $p < 0.05$ ), а также отрицательные ассоциации между числом  $CD3^+CD4^+CD45RO^+CD28^-$  T-клеток и содержанием  $CD4^+CD28^-CD45RO^-$  лимфоцитов как у здоровых доноров ( $r = 0.342$  – при действии активатора,  $r = 0.298$ ,  $r = 0.563$ ,  $r = 0.301$  – при действии активатора и МП (46.2; 170.7 мг)  $p < 0.05$ , соответственно), так и у больных РА ( $r = 0.562$  – при действии активатора,  $r = 0.549$ ,  $r = 0.672$ ,  $r = 0.800$  – при действии активатора и МП (46.2; 85.3; 170.7 мг)  $p < 0.05$ , соответственно), что подтверждает верность выдвинутой гипотезы и свидетельствует об МП-индуцированном созревании T-клеток в терминальные эффекторы как в норме, так и при РА.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно говорить о направленном влиянии МП в условиях *in vitro* на терминальные стадии дифференцировки  $CD4^+$  T-клеток памяти в норме при РА, что способствует появлению пула *TEMRA* лимфоцитов. Последние, согласно данным литературы, обладают выраженными цитотоксическими свойствами (гранзимовые и перфориновые гранулы) и высоким провоспалительным потенциалом [15], утрачивая при этом пролиферативную активность [6].

Можно предположить, что на фоне системного супрессирующего эффекта ГК, у больных РА происходит формирование резистентной к их действию популяции эффекторных *TEMRA* лимфоцитов ( $CD4^+CD45RO^-CD28^-$ ), которая способствует прогрессии заболевания, в частности, за счет мощного выброса провоспалительных факторов. Ранее нами был продемонстрирован высокий провоспалительный потенциал эффекторной (*TEM*) популяции T-клеток с фенотипом –  $CD4^+CD28^-CD45RO^+$  у больных РА (но не у здоровых доноров), который сохранялся на фоне действия ГК в условиях *in vitro* [18]. Безусловно, дальнейшая работа в контексте изучаемой тематики, должна быть направлена на расшифровку спектра реакций эффекторных (потенциально аутореактивных/артритогенных) T-клеток на глюкокортикоидную терапию, для расширения фундаментальных знаний о патогенезе РА (с точки зрения T-клеточной парадигмы) и разработки методологических основ оптимального (патогенетически оправданного) персонализированного фармакологического лечения заболевания.

**Этические нормы.** Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, и одобрены этическим комитетом Балтийского

федерального университета им. И. Канта (Калининград).

**Информированное согласие.** Каждый участник исследования представил добровольное письменное информированное согласие, подписанное им после разъяснения ему потенциальных рисков и преимуществ, а также характера предстоящего исследования.

**Финансирование работы.** Работа выполнена в рамках субсидии “Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/6.7” Балтийского федерального университета им. И. Канта (Калининград).

**Благодарности.** Выражаем благодарность зав. ревматологическим отделением, заслуженному врачу РФ И.П. Малининой областной клинической больницы г. Калининграда (главный врач – заслуженный врач РФ, К.И. Поляков) за помощь в верификации диагноза и наборе пациентов в группы исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pandya J.M., Lundell A.C., Hallström M. et al. Circulating T helper and T regulatory subsets in untreated early rheumatoid arthritis and healthy control subjects // J. Leukoc. Biol. 2016. V. 100. № 4. P. 823.
2. Perng O.A., Aitken M., Rankin A.L. et al. The degree of CD4+ T cell autoreactivity determines cellular pathways underlying inflammatory arthritis // J. Immunol. 2014. V. 192. № 7. P. 3043.
3. Heyd F., ten Dam G., Möry T. Auxiliary splice factor U2AF26 and transcription factor Gfil cooperate directly in regulating CD45 alternative splicing // Nat. Immunol. 2006. V. 7. № 8. P. 539.
4. Litvinova L.S., Sokhnevich N.A., Gutsol A.A., Kofanova K.A. The influence of immunoregulatory cytokines IL-2, IL-7, and IL-15 upon activation, proliferation, and apoptosis of immune memory T-cells *in vitro* // Cell and Tissue Biology. 2013. V. 7. № 6. C. 566.
5. Сытыбалдиев А.М. Лечение ревматической полимиалгии // Современная ревматология. 2013. № 1. С. 66.
6. Тодосенко Н.М., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г. и др. Влияние дексаметазона на процессы активации и созревания  $CD3^+CD4^+CD45RO^+$  T-клеток при ревматоидном артрите *in vitro* // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2017. Т. 61. № 4. С. 89.
7. Справочник Видаль. Лекарственные препараты России. 20-е изд. М.: ЮБМ Медика Рус., 2014. 1600 с.
8. Phiel K.L., Henderson R.A., Adelman S.J., Elloso M.M. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations // Immunol. Lett. 2005. V. 97. № 1. P. 107.
9. Laffont S., Rouquie N., Azar P. et al. X-chromosome complement and estrogen receptor signaling inde-

- pendently contribute to the enhanced TLR7-mediated IFN- $\alpha$  production of plasmacytoid dendritic cells from women // *J. Immunol.* 2014. V. 193. № 11. P. 107.
10. Gutsol A.A., Sokhoneyevich N.A., Seledtsov V.I., Litvinova L.S. Dexamethasone effects on activation and proliferation of immune memory T cells // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2013. V. 155. № 4. P. 474.
  11. Hui E., Cheung J., Zhu J. et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition // *Science.* 2017. V. 155. № 6332. P. 1428.
  12. Riha P., Rudd C.E. CD28 co-signaling in the adaptive immune response // *Self Nonself.* 2010. V. 1(3). P. 231.
  13. Braitch M., Harikrishnan S., Robins R.A. et al. Glucocorticoids increase CD4CD25 cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis // *Acta Neurol. Scand.* 2009. V. 119. № 4. P. 239.
  14. Cain D.W., Cidlowski J.A. Immune regulation by glucocorticoids // *Nat. Rev. Immunol.* 2017. V. 17. № 4. P. 233.
  15. Matsuki F., Saegusa J., Nishimura K. et al. CD45RA-Foxp3(low) non-regulatory T cells in the CCR7-CD45RA-CD27+CD28+ effector memory subset are increased in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis // *Cell Immunol.* 2014. V. 290. № 1. P. 96.
  16. Mustelin T., Taskén K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases // *Biochem J.* 2003. V. 371. P. 15.
  17. McNeill L., Salmond R.J., Cooper J.C. et al. The differential regulation of Lck kinase phosphorylation sites by CD45 is critical for T cell receptor signaling responses // *Immunity.* 2007. V. 27. № 3. P. 425.
  18. Zola H. Markers of cell lineage, differentiation and activation // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 2000. V. 14. № 3. P. 218.

## **Influence of Methylprednisolone on Late Stages of Differentiation of Memory CD4<sup>+</sup> T-Cells in Rheumatoid Arthritis: Investigation of in vitro**

**N. M. Todosenko<sup>a</sup>, K. A. Yurova<sup>a</sup>, O. G. Khaziakhmatova<sup>a</sup>, and L. S. Litvinova<sup>a</sup>, \***

<sup>a</sup>*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia*

\*E-mail: [larisalitvinova@yandex.ru](mailto:larisalitvinova@yandex.ru)

We studied the effects of methylprednisolone (MP) on the late stages of differentiation of activated memory T cells in healthy donors and in patients with the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA) in vitro. It was found that MP has a suppressing effect on the number of CD4<sup>+</sup> T cells expressing the activation molecules (CD25) and costimulation (CD28) in CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cultures of healthy donors and patients with rheumatoid arthritis (RA). Assessment of the level of U2af114 and Gfi1 genes expression controlling the alternative splicing of the Ptpcr gene demonstrated unidirectional but different in intensity changes in healthy subjects and RA. Association between the level of expression of U2af114 and Gfi1 genes and the number of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup> cell populations in TCR-activated memory T cells in RA patients subjected to the action of the MP confirms the hypothesis that glucocorticoids can stimulate the formation of terminally-differentiated lymphocytes (CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RO<sup>-</sup>; TEMRA), which are supposed to play a key role in the pathogenesis of RA.

*Keywords:* rheumatoid arthritis, methylprednisolone, activation, differentiation, gene expression.