

*Е.Д. Полянских, П.Б. Лозовая*  
**СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ И ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ СИНО-  
ВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИ-  
ТОМ**

*Научный руководитель: канд. биол. наук, доц. Е.Г. Костоломова  
Кафедра микробиологии  
Тюменский государственный медицинский университет, г. Тюмень*

*E.D. Polyanskikh, P.B. Lozovaya*  
**SUBPOPULATION COMPOSITION AND CYTOKINE PROFILE OF SYNOVIAL  
FLUID IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS**

*Tutor: PhD in biology sciences, assoc. E.G. Kostolomova  
Department of Microbiology  
Tyumen state medical University, Tyumen*

**Резюме.** В образцах синовиальной жидкости 30 больных ревматоидным артритом, 10 из которых находились в стадии обострения и 20 в стадии ремиссии, исследовали клеточный состав и цитокиновый профиль.

**Ключевые слова:** ревматоидный артрит, синовиальная жидкость, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, цитокины.

**Resume.** In samples of synovial fluid of 30 patients with rheumatoid arthritis, 10 of which were in the acute stage and 20 in remission, the cellular composition and cytokine profile were studied.

**Keywords:** rheumatoid arthritis, synovial fluid, T-lymphocytes, B-lymphocytes, cytokines.

**Актуальность.** В структуре заболеваемости хроническими заболеваниями суставов первое место занимает ревматоидный артрит (РА), приводящий к инвалидизации уже через 3–5 лет после начала заболевания. Наиболее часто РА поражает лица трудоспособного возраста, при этом качество жизни больных значительно снижается. РА является иммуновоспалительным ревматическим заболеванием, следовательно, именно иммунная система обеспечивает формирование очага воспаления с зонами первичной и вторичной альтерации, реакции микроциркуляторного русла, выход жидкой части крови, биоорганических соединений, электролитов из сосудов в ткани – экссудацию, скопление эмигрирующих клеток гематогенного происхождения и активацию резидентных клеток *in situ*, а также исход процесса в виде развития склероза и фиброза или различной степени регенерации клеток и тканей [2]. На разных этапах хронического воспаления формируются определённые взаимодействия между клетками, эмигрировавшими из сосудистого русла, и клетками – резидентами, которые опосредуются с помощью цитокинов и других биологически активных веществ [11]. Оценка характера межклеточных взаимоотношений и роли цитокинов необходима для разработки иммунотерапевтических подходов не только для достижения, но и для поддержания ремиссии.

**Цель:** оценить клеточный состав и цитокиновый профиль синовиальной жидкости у пациентов в стадии обострения и ремиссии РА.

### Задачи:

1. Оценить клеточный состав синовиальной жидкости у пациентов в стадии обострения и ремиссии РА.

2. Определить количество про- и противовоспалительных цитокинов синовиальной жидкости у пациентов в стадии обострения и ремиссии РА.

**Материалы и методы.** Образцы синовиальной жидкости были получены от 30 пациентов РА, из которых 10 (6 женщина и 4 мужчин) находились в стадии обострения и 20 (12 женщин и 8 мужчин) в стадии ремиссии. Возраст больных, находившихся в стадии обострения, составил  $57,0 \pm 15,4$  лет, с длительностью болезни  $8,55 \pm 6,9$  лет. Средний возраст больных в стадии ремиссии составил  $53,5 \pm 10,9$  года, длительность болезни  $6,9 \pm 5,8$  лет. Набор пациентов и верификация диагноза осуществлялись в отделении ревматологии ГБУЗ ТО «ОКБ № 1» согласно приказу № 21 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным ревматоидным артритом» от 13 января от 2019 г. Образцы синовиальной жидкости (СЖ) отбирали в вакуумные пробирки с добавлением КЗЭДТА. СЖ обрабатывали гиалуронидазой (Sigma Chemical Co, США) в течение 20 мин при  $37^\circ\text{C}$  для снижения вязкости, затем смешивали с равным объемом среды RPMI 1640. Выделение мононуклеарных клеток (МНК) из СЖ проводили стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина («Pharmacia», Швеция) ( $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ ). МНК СЖ окрашивали моноклональными антителами против CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19 (Beckman Coulter, США). После окрашивания образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора при 1500 об/мин в течение 7 мин. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Содержание цитокинов определяли иммуноферментным методом с использованием стандартного набора реактивов ООО "Протеиновый контур" (Россия). В день проведения исследований пробы размораживали. Анализ проводили согласно инструкции, прилагаемой к набору фирмой изготовителем. Регистрацию результатов проводили на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ «Excel» и «Statistica 7.0» для WinXP. Статистическую достоверность различий между двумя группами данных оценивали по критерию *t* Стюдента.

**Результаты и их обсуждение.** В синовиальной жидкости у больных с обострением РА содержание лейкоцитов было значительно выше, чем в стадию ремиссии. Если в период ремиссии в гемограмме СЖ было одинаковое количество нейтрофилов и лимфоцитов, то в период обострения содержание нейтрофилов увеличилось в 4 раза, а число лимфоцитов и моноцитов осталось прежним (табл. 1).

**Табл. 1.** Клеточный состав синовиальной жидкости во время ремиссии и обострения РА.

Исследуемый параметр Tested parameter	Ремиссия РА Remission RA	Обострение РА Exacerbation RA
Лейкоциты $10^9/\text{л}$ Leukocytes $10^9/\text{л}$	$8,3 \pm 4,25$	$20,12 \pm 1,8^*$
Нейтрофилы $10^9/\text{л}$ Neutrophils $10^9/\text{л}$	$3,6 \pm 1,88$	$15,65 \pm 1,59^*$

Продолжение табл. 1

Лимфоциты 10 <sup>9</sup> /л Lymphocytes 10 <sup>9</sup> /l	4,197±2,2	3,86±0,53
Моноциты 10 <sup>9</sup> /л Monocytes 10 <sup>9</sup> /l	0,51±0,287	0,66±0,099

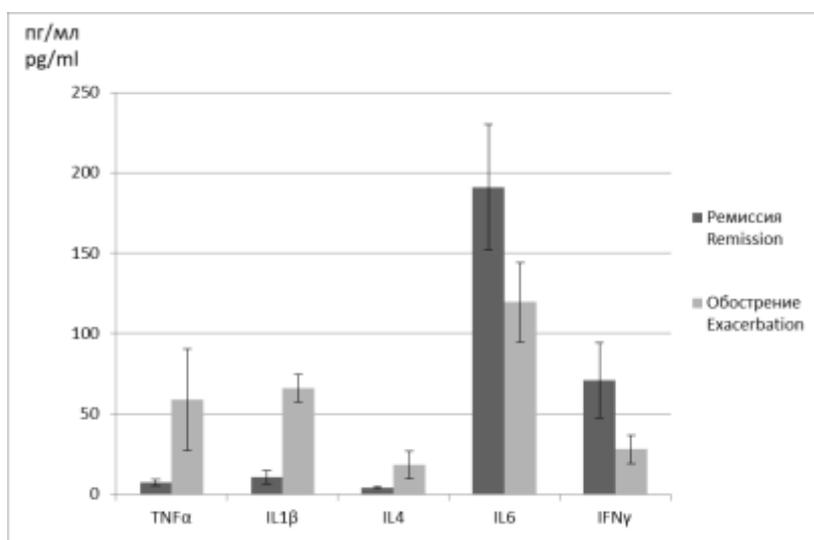
Примечание: \* - обозначены величины, достоверно отличающиеся от показателей в стадии ремиссии ( $p < 0,05$ ).

Несмотря на то, что количество лимфоцитов и их популяционный состав не зависели от фазы заболевания, во время обострения изменялась численность субпопуляций Т-лимфоцитов: число CD4<sup>+</sup> лимфоцитов уменьшалась, а CD8<sup>+</sup> возрастало (табл. 2). Соотношение CD4/CD8 в СЖ на фоне обострения составило 0,49, в то время как при ремиссии оно было 3,88. При обострении в СЖ достоверно возрастало количество Treg-лимфоцитов и НКТ-клеток.

**Табл. 2.** Популяционный состав лимфоцитов в СЖ во время ремиссии и обострения РА.

Исследуемый параметр Tested parameter	Ремиссия РА Remission RA	Обострение РА Exacerbation RA
CD3 <sup>+</sup> 10 <sup>9</sup> /л	2,05±1,11	1,57±0,28
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> 10 <sup>9</sup> /л	0,8±0,34	0,224±0,11*
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> 10 <sup>9</sup> /л	0,21±0,07	0,46±0,1*
Treg (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup> ) 10 <sup>9</sup> /л	0,12±0,02	0,214±0,025*
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> 10 <sup>9</sup> /л	0,125±0,012	0,174± 0,018*
CD3 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup> 10 <sup>9</sup> /л	0,67±0,37	0,61±0,1
CD3 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> 10 <sup>9</sup> /л	1,47±0,82	1,64±0,34

Примечание: \* - обозначены величины, достоверно отличающиеся от показателей в стадии ремиссии ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 1** – Содержание цитокинов в СЖ во время ремиссии и обострения РА.

При оценке уровня цитокинов в СЖ установлено, что при обострении РА уровень TNF $\alpha$  повышается в 8 раз по сравнению с ремиссией, IL1 $\beta$  — в 6,3 раз, IL4 — в 4,3 раза. При этом уровень IL6 уменьшается в 1,5 раза, а INF $\gamma$  в 2,5 раза (рис.1). Клеточный и цитокиновый профили СЖ зависят от фазы РА. При обострении РА в 2,4 раза увеличивается количество лейкоцитов за счёт нейтрофилов. Усиленный синтез макрофагами, синовиоцитами, хондроцитами, остеокластами цитокинов - IL1 $\beta$  и TNF $\alpha$  — обуславливает выработку хемокинов и простагландинов, гиперэкспрессию молекул адгезии и активную миграцию нейтрофилов в СЖ. В свою очередь нейтрофилы, находящиеся в синовиальной жидкости при РА, сами секретируют ряд провоспалительных факторов семейства TNF, включая TNF $\alpha$  [3], стимулируя выход гранулоцитов в очаг воспаления. Кроме того, TNF- $\alpha$  может индуцировать образование нейтрофильных внеклеточных ловушек, которые значительно усиливают продукцию ИЛ-6, ИЛ-8, хемокинов и молекул адгезии синовиальными фибробластами при РА. Нейтрофилы, гибнущие после фагоцитоза, оставляют после себя в экссудате цитотоксические факторы, в том числе свободные радикалы, которые непосредственно повреждают внутрисуставные структуры [5]. Кроме того, в нейтрофилах синтезируется активатор рецептора лиганда ядерного фактора каппа-В (RANKL), а сам лиганд остеопротегерина усиленно образуется под действием TNF $\alpha$ . Взаимодействие лиганда с рецептором обеспечивает дифференцировку остеокластов, что ведёт к резорбции костной ткани при РА, а также способствует активации металлопротеиназ и коллагеназ. IL1 $\beta$  также активирует матриксные протеиназы и ферменты, способствующие разрушению хряща и костной ткани. Показано, что нейтрофилы, экспрессируя МНС II, способны презентировать антиген *in vitro* и *ex vivo* аутологичным CD4+ Т-клеткам памяти и активировать их пролиферацию [8]. Кроме того, нейтрофильные клетки способны синтезировать фактор активации В-клеток (BAFF) [10], который индуцирует их пролиферацию и способствует выработке аутоантител. Таким образом, активированные нейтрофилы могут регулировать функции Т- и В-лимфоцитов. В стадию ремиссии в СЖ преобладает ИЛ6, который не влияет на функции нейтрофилов [9], Несмотря на неизменное количество лимфоцитов в СЖ и их популяционный состав, а также фенотип Т-клеток изменяется в зависимости от фазы хронического процесса. Если во время ремиссии преобладали CD3+CD4+, то во время обострения - CD3+CD8+. Синовиальные CD4+Т-клетки больных РА экспрессируют рецептор-активатор лиганда ядерного фактора (RANKL), который взаимодействует с RANK, экспрессируемым на моноцитах, индуцируя их дифференцировку в остеокласты и, следовательно, вызывая эрозию кости. Моноциты являются предшественниками остеокластов, представляющих собой единственный тип клеток, способный разрушать кость. Если в норме резорбция кости остеокластами и образование кости остеобластами жестко регулируются для поддержания целостности скелета и гомеостаза, то при РА повышенная активность остеокластов в суставе приводит к несбалансированной эрозии кости. Кроме того, опосредованно через связанные с мембраной INF $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL1 $\alpha$  CD4+Т-клетки ингибируют синтез коллагена фибробластоподобными синовиоцитами. Во время ремиссии преобладает Th1 иммунный ответ, о чём свидетельствует возрастание концентраций INF $\gamma$  и IL6. INF $\gamma$  замедляет внутрисуставную

деструкцию, снижает продукцию IL1 и матриксных металлопротеиназ и пролиферацию фибробластоподобных синовиоцитов, но при этом тормозит коллаген-синтетическую функцию фибробластов. В свою очередь IL6 потенцирует дегенеративные нарушения в костной ткани через активацию пролиферации синовиальных фибробластов и стимуляцию остеокластов. За счёт дифференцировки остеокластов, увеличения активности протеолитического фермента агреканызы и ускорения деградации протеогликана даже во время ремиссии прогрессируют околоуставной остеопороз и суставная деструкция. Во время обострения преобладает Th2 иммунный ответ, что подтверждается увеличением концентрации IL4 в СЖ. Этот цитокин ингибирует продукцию Th1-цитокинов, в том числе IL6 и INF $\gamma$ , но при этом активирует пролиферацию и активность В-клеток. Несмотря на то, что количество CD16+CD56+ В-клеток в СЖ при обострении не изменилось, их способность к выработке аутоантител может возрасти, так как степень экспрессии их мембраносвязанных рецепторов к TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  при РА реализуется как через процент позитивных клеток, так и через увеличение или уменьшение плотности распределения рецепторов на них [1]. В свою очередь IL4 способен подавлять пролиферацию синовиоцитов. При обострении в СЖ увеличилось количество Treg. Несмотря на то, что Treg-клетки ингибируют аутоиммунный ответ, если их количество и/или функция аномальны, родственные антигены и молекулы DR вызывают амплификацию иммунного каскада, что приводит к быстрому увеличению уровней различных цитокинов в организме, в частности IL2, а также стимуляции продукции макрофагами многих воспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1, ИЛ-6 и ИЛ-8, в синовиальной оболочке суставов. Возрастание в СЖ количества CD8+ Т-клеток может быть связано с их цитотоксическим потенциалом, однако другие исследования утверждают обратное: они играют в основном регулируемую роль в воспалённых суставах [4]. При этом у пациентов с РА количество CD8+ Т-клеток коррелирует с уровнями провоспалительных цитокинов в синовиальной жидкости, что указывает на их способность продуцировать большое количество цитокинов (IL10, а также INF $\gamma$ , IL-4 и IL-5) и, таким образом, активно способствовать воспалению и деградации суставов [6]. Увеличение в СЖ содержания CD3+CD16+CD56+ НКТ-клеток во время обострения также свидетельствуют как о непосредственной роли цитотоксического клеточно-опосредованного механизма в повреждении сустава, так и о стимуляции неспецифической цитотоксичности других элементов врожденного иммунитета - НК-клеток и макрофагов.

### **Выводы:**

1. Клеточный состав синовиальной жидкости и её цитокиновый профиль зависят от фазы хронического воспалительного процесса. Движущей силой обострения являются нейтрофилы, а также CD3+CD8+ и CD3+CD16+CD56+ клетки при участии Treg. Активация Th2 иммунного ответа усиливает гуморальные механизмы повреждения. Цитокиноопосредованная стимуляция клеток, эмигрировавших внутрь сустава, и резидентов способствует повреждению внутрисуставных поверхностей и костей.

2. Модификация иммунного ответа и цитокинового профиля СЖ в период ремиссии направлена на стимуляцию репаративных процессов, однако формирование

НОВЫХ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ ОБЕСПЕЧИВАЕТ РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ СУСТАВОВ НА ОСНОВЕ ЕЁ СКЛЕРОЗА И ФИБРОЗА.

### Литература

1. Альшевская А.А., Ю.А. Лопатникова, Шкаруба Н.С. Экспрессия мембраносвязанных рецепторов к TNF $\alpha$  на моноцитах при atopическом дерматите и ревматоидном артрите // Цитокины и воспаление. 2015. -Т.14, №1. -С.18-23. [Alshevskaya A.A., Yu.A. Lopatnikova, Shkaruba N.S. Expression of membrane-bound TNF $\alpha$  receptors on monocytes in atopic dermatitis and rheumatoid arthritis // Cytokines and inflammation. 2015. -V.14, No.1. -S.18-23.]
2. Саидов М.З. Патогенетическое значение клеточного инфильтрата при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях» // Медицинская иммунология, 2021. - Т. 23, № 6. - С. 1239-1270. [Saidov M.Z. Pathogenetic significance of cellular infiltrate in immunoinflammatory rheumatic diseases” // Medical Immunology, 2021. - V. 23, No. 6. - P. 1239-1270.]
3. Alunno A., Carubbi F., Giacomelli R., Gerli R. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: new players and therapeutic targets. BMC Rheumatology, 2017.1:3.
4. Carvalho H., da Silva J.A., Souto-Carneiro M.M. Potential roles for CD8(+) T cells in rheumatoid arthritis. Autoimmun Rev. 2013 Jan;12(3):401-9. doi: 10.1016/j.autrev.2012.07.011. Epub 2012 Jul 25. PMID: 22841983.
5. Catrina AI., Svensson C., Malmström V. et al. Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis. Nature Review Rheumatology, 2017, vol.13, no.2, pp.79–86.
6. Hussein M.R., Fathi N.A., El-Din A.M. et al. Alterations of the CD4(+), CD8 (+) T cell subsets, interleukins-1beta, IL-10, IL-17, tumor necrosis factor-alpha and soluble intercellular adhesion molecule-1 in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: preliminary observations. Pathol Oncol. 2008;14(3):321-8.
7. McInnes I., Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Nat Rev Immunol, 2007, Vol. 7, no. 6, pp. 429—442.
8. Nauseef W.M., Borregaard N. Neutrophils at work. Nature Immunology, 2014, vol. 15, no. 7, pp. 602–611.
9. Tanaka S. Emerging anti-osteoclast therapy for rheumatoid arthritis. J Orthop Sci, 2018, vol.23, no. 5, pp. 717–721.
10. Veale D. J., Orr C., Fearon U. Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis. Semin Immunopathol, 2017, Vol. 39, no. 4, pp. 343-354.
11. Vono M, Lin A, Norrby-Teglund A, et al Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4<sup>+</sup> T cells *in vitro* and *ex vivo* . Blood, 2017, vol. 129, no. 14, pp. 1991–2001.