

УДК 612.112.9:616-008.1-092.4:616.72-002.772

ОБРАЗОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК МОНОЦИТОВ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

¹Мозговая Е.Э., ^{1,2}Трофименко А.С., ¹Мамус М.А., ¹Тихомирова Е.А.,
¹Бедина С.А., ^{1,2}Спицина С.С.

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», Волгоград, e-mail: m.mamus@yandex.ru;

²ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Волгоград

Изучали способность моноцитов, выделенных из периферической крови больных ревматоидным артритом (РА), к спонтанному и индуцированному образованию внеклеточных ловушек. В исследовании участвовали 15 больных РА и 15 практически здоровых людей. Выделение моноцитов проводили с помощью одноэтапного центрифугирования в градиенте фиколл-урографиновой смеси с плотностью 1068 кг/м³. Качественный состав моноцитарной фракции оценивали с помощью микроскопии стандартных мазков, степень активации моноцитов – при помощи стандартного теста с нитросиним тетразолием. Стимуляцию образования внеклеточных ловушек проводили при помощи раствора пирогенала 0,02 мкг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе. Контроль спонтанного образования внеклеточных ловушек выполнялся с использованием фосфатно-солевого буфера. Средняя доля моноцитов со спонтанным ловушкообразованием у больных РА была существенно выше по сравнению со здоровыми лицами. Частота спонтанного ловушкообразования для моноцитов больных РА, позитивных по антицитруллиновым аутоантителам, не имела существенных отличий от образцов других пациентов. После применения индукторов ловушкообразования доля моноцитов, образующих внеклеточные ловушки, существенно увеличивалась, при этом степень увеличения при неактивном РА также была отчетливо выше по сравнению с нормой.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, моноциты, внеклеточные ловушки моноцитов

FORMATION OF MONOCYTE EXTRACELLULAR TRAPS IN RHEUMATOID ARTHRITIS

¹Mozgovaya E.E., ^{1,2}Trofimenko A.S., ¹Mamus M.A., ¹Tikhomirova E.A.,
¹Bedina S.A., ^{1,2}Spitsina S.S.

¹Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovskiy»,
Volgograd, e-mail: m.mamus@yandex.ru;

²Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Volgograd

We studied the ability of monocytes isolated from peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis (RA) to spontaneous and induced formation of extracellular traps. The study involved 15 patients with RA and 15 healthy people. The isolation of monocytes was performed using one-step centrifugation in a gradient of ficoll-urographin mixture with a density of 1068 kg / m³. The qualitative composition of the monocyte fraction was evaluated using standard smear microscopy, the degree of monocyte activation was measured using the standard nitro-blue tetrazole test. The stimulation of the formation of extracellular traps was carried out using a pyrogenal solution of 0.02 µg / ml in phosphate-saline buffer. The control of spontaneous formation of extracellular traps was performed using phosphate-saline buffer. The average proportion of monocytes with spontaneous trap formation in RA patients was significantly higher compared with healthy individuals. The frequency of spontaneous trap formation for monocytes in patients with RA, which are positive for anti-citrullinated protein antibodies, did not have significant differences from the samples of other patients. After the use of trap inducers, the proportion of monocytes that form extracellular traps increased significantly, while the degree of increase with inactive RA was also clearly higher than normal.

Keywords: rheumatoid arthritis, monocytes, monocyte extracellular traps

Ревматоидный артрит (РА) – одно из наиболее частых аутоиммунных заболеваний человека, при этом в последние годы наблюдается отчетливый тренд к повышению его распространенности [1]. В частности, заболеваемость РА в европейских странах оценивается на уровне 24–36 случаев на 100 000 населения в год [2]. Кроме того, РА представляет собой значительное социальное бремя: при естественном течении заболевания у большинства пациентов возникает выраженное нарушение двигательной функции и тяжелое повреждение внутрен-

них органов. В то же время современные биологические препараты (моноклональные терапевтические антитела – ингибиторы ФНО, антагонисты ИЛ-6, антагонисты CTLA4 и др.), отличающиеся крайне высокой стоимостью, позволяют лишь уменьшить скорость прогрессирования РА, улучшить качество жизни пациентов, однако не позволяют добиться полного излечения.

Сложности, возникающие в процессе лечения РА, имеют под собой фундаментальные основания, представляющие собой комплекс научно-исследовательских проблем. В насто-

ящее время не до конца расшифрован механизм ранних стадий патогенеза РА [3]. Особый интерес при этом вызывает механизм запуска аутоиммунных реакций на антигены, характерные для клеток и межклеточного вещества хрящевой ткани, а также на эпитопы, общие для многих тканей, например цитруллинированные белки (фибриноген, виментин, альфа-енолаза, гистоны и др.). С учетом накопленных к настоящему времени данных [4], наиболее вероятным представляется нарушение функции процессинга и презентации антигена, характерной для антигенпрезентирующих клеток, преимущественно относящихся к системе мононуклеарных фагоцитов.

Согласно современным представлениям дефект моноцитарно-макрофагального звена играет существенную роль в патогенезе многих заболеваний. К ним относятся бактериальные инфекции – туберкулез, сифилис, бруцеллез, сепсис, болезни вирусной этиологии – грипп, инфекционный мононуклеоз, ВИЧ. Наряду с этим функция моноцитов и макрофагов страдает при некоторых заболеваниях неинфекционной природы (злокачественные солидные опухоли, лейкозы, миелопролиферативные заболевания, гемолитические анемии). Специфические дефекты моноцитов и макрофагов характерны и для аутоиммунных заболеваний, таких как аутоиммунный тиреоидит, системная красная волчанка, рассеянный склероз [5].

Моноциты и образующиеся из них тканевые макрофаги оказывают значительное влияние на иммунную реактивность организма, являясь ведущими клетками иммунного ответа. Они обеспечивают фагоцитоз и элиминацию клеток, несущих генетически чужеродную информацию (переработку антигенов); индукцию иммунного ответа со стороны Т- и В-лимфоцитов (презентацию антигенов Т-лимфоцитам); развитие синдрома системного воспалительного ответа (активацию синтеза цитокинов) [6]. В 2010 г. были опубликованы данные о том, что моноциты/макрофаги в ответ на воздействие различных агентов способны образовывать экстрацеллюлярные сетеподобные структуры, состоящие из нуклеиновых кислот и ферментов – внеклеточные ловушки (англ. extracellular traps, ET), которые захватывают и уничтожают патогены [7–9].

В связи с вышеизложенным изучение моноцитов, их функциональных способностей и активности сохраняет свою актуальность и представляет интерес не только в плане совершенствования диагностики, прогнозирования течения заболеваний, но также имеет перспективы в направлении поиска новых мишеней для разработки инновационных методов терапии.

Цель исследования: изучить способность моноцитов, выделенных из периферической крови больных ревматоидным артритом, к спонтанному и индуцированному образованию внеклеточных ловушек.

Материалы и методы исследования

Мониторинг пациентов для включения в исследование осуществлялся на базе ГУЗ «ГКБСМП № 25» и ФГБНУ «НИИ КиЭР им. А.Б. Зборовского». В исследование были включены 15 пациентов старше 18 лет с верифицированным РА и длительностью заболевания не более 2 лет. Диагноз устанавливался в соответствии с критериями ACR/EULAR [10]. Среди включенных в исследование лиц было 11 женщин и 4 мужчин. Средний возраст больных составил $56,2 \pm 3,4$ лет; средняя продолжительность заболевания – $1,4 \pm 0,5$ лет. В соответствии с протоколом активность РА по DAS28 была не более 2,6 баллов [11]. Антитела к циклическому цитруллинированному пептиду были выявлены у 9 из 15 пациентов с РА (60%).

В качестве референтной группы служили 15 практически здоровых доноров.

Статистически значимых различий между основной и контрольной группами по демографическим признакам выявлено не было.

Выделение моноцитов проводили с помощью одноэтапного центрифугирования в градиенте фикола-урографиновой смеси с плотностью 1068 кг/м^3 , приготовленной самостоятельно. При насаивании крови поверх данного градиента в верхней интерфазе концентрируются моноциты с минимальной (не более 5–7%) примесью лимфоцитов.

Для приготовления градиента использовали 25% раствор фикола-400 (Pharmacia, Швеция) и 76% раствор N-метилглюкамина – натрия амидотризоата (Merck-Schering Plough, США). Приведение к требуемой плотности осуществляли путем титрования компонентами градиента под контролем ареометра, строго соблюдая правила измерения плотности согласно ГОСТ 18995.1-73 [12]. Приведения градиента к pH 7,2–7,4 достигали добавлением небольшого количества 1M KOH. Градиент имел расчетную осмолярность в пределах 280–320 мосм/л. Осветление и стерилизацию градиента выполняли путем фильтрации через шприцевые ацетатцеллюлозные фильтры с порами 0,2 мкм (Sartorius, Германия). Плотность и pH приготовленного градиента в процессе хранения периодически контролировали и корректировали.

Венозную кровь пациента получали, используя силиконированные пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Кровь смешивали с равным объемом изотонического 0,02M трис-HCl буфера pH 7,4, содержащего 5 ммоль/л глюкозы. Градиент насаивали в силиконированные центрифужные пробирки при помощи шприца с длинной иглой калибра 20G, разбавленную кровь (4 мл) насаивали сверху при помощи силиконированных тонкоконечных стеклянных пипеток и механического пипетатора. Центрифугирование проводили при 400g и $20 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 40 мин. На верхней интерфазе собирали моноцитарную фракцию, после чего двукратно отмывали клетки от градиента и тромбоцитов в стандартном фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБР), центрифугируя их при 3000 об/мин в течение 10 мин в силиконированных пробирках. Разбавление суспензии до нужной концентрации выполняли в среде RPMI-1640.

Качественный состав моноцитарной фракции оценивали с помощью микроскопии стандартных мазков, окрашенных по методу Май-Грюнвальда, концентрацию клеток измеряли при помощи камеры Горяева или автоматического гемоцитометра. Принадлежность мононуклеарных клеток к моноцитам уточняли, используя окрашивание суданом черным В по методу Sheehan и Storey [13]. Клетки, содержащие мелкие или умеренно крупные гранулы, дискретно рассеянные по цитоплазме, либо сконцентрированные по её периферии, идентифицировали как моноциты. Жизнеспособность клеток оценивали путем окрашивания трипановым синим по общепринятому протоколу. Степень активации моноцитов оценивали при помощи стандартного теста с нитросиним тетразолием, ядра негативных клеток докрашивали сафранином.

Стимуляцию образования внеклеточных ловушек проводили следующим образом. Лунки стерильного 96-луночного планшета, помещенного в ламинарный шкаф, покрывали 0,01% поли-L-лизиним и помещали во влажную камеру. В лунки помещали 1×10^5 моноцитов в 100 мкл среды RPMI-1640, содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, и инкубировали 30 мин при 37°C. Стимуляция выполнялась при помощи раствора пирогенала 0,02 мкг/мл в стерильном ФСБР с конечной концентрацией 50 нМ в течение 60 мин при 37°C. После отмыывания клетки фиксировали при помощи 100 мкл 4% параформальдегида в течение 20 мин при комнатной температуре, после чего производилась отмывка от фиксатора. Контроль спонтанного уровня ЕТ выполнялся таким же образом, с заменой пирогенала на стерильный ФСБР [5].

После отмывки клетки инкубировали со 100 мкл 1,25 мкМ SYBR green в течение 10 мин, после чего планшеты помещали в алюминиевую фольгу. Далее клетки отмыывали 100 мкл ФСБР и обрабатывали моноклональными антителами к миелопероксидазе, меченными фикоэритрином (Dako, Дания). Результат учитывали на флуоресцентном микроскопе с длиной волны возбуждения 485 нм и эмиссии – 535 нм (для SYBR green) и 485 и 575 нм соответственно (для RPE). Ловушками считали четко определяемые внеклеточные сети с двойной флуоресценцией, превосходящие размер интактных клеток. Результат выражали в процентах как относительное количество клеток с ловушками на 100 сосчитанных моноцитов при визуализации не менее 200 клеток в образце.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета Statistica 10.0. Результаты выражали как среднее арифметическое (95% доверительный интервал [ДИ]). Для качественных показателей доверительный интервал рассчитывали при помощи биномиального метода.

Верхние границы ДИ, превышающие 100%, усекали до 100,0%. Для анализа различий количественных показателей применяли парный и непарный критерий Стьюдента, для качественных – критерий Макнемара или точный критерий Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе отработки протокола выделения клеток, пригодного для последующего изучения внеклеточных ловушек, процедуры, ранее опубликованные различными отечественными и зарубежными исследователями для выделения моноцитов, потребовали существенной модификации для получения интактных клеточных фракций нужной чистоты. Стандартные протоколы выделения мононуклеарных лейкоцитов с помощью коммерческого градиента не обеспечивают нужной чистоты моноцитарной фракции, а введение дополнительных процедур очистки приводит либо к значительной неспецифической активации, либо к потере части клеток. В целом, несмотря на требовательность к уровню навыков лабораторных работ, использование ступенчатого фиколл-урографинового градиента в нашей модификации позволяет выделять клеточный материал для последующего изучения внеклеточных ловушек.

Значения жизнеспособности и неспецифической активации моноцитов по результатам теста с нитросиним тетразолием не демонстрировали существенных различий между здоровыми лицами и пациентами с РА.

Средняя доля моноцитов со спонтанным ловушкообразованием у больных РА была существенно выше по сравнению со здоровыми лицами (таблица). Частота спонтанного ловушкообразования для моноцитов больных РА, позитивных по АЦА, не имела существенных отличий от образцов других пациентов. После применения индукторов ловушкообразования доля моноцитов, образующих внеклеточные ловушки, существенно увеличивалась, при этом степень увеличения при неактивном РА также была отчетливо выше по сравнению с нормой.

Основные параметры выделяемых моноцитарных клеточных фракций у больных РА на этапе включения в исследование

Параметр	Моноциты (М (95%ДИ))
Средний выход выделенных клеток, %	66,8 (60,2–75,7)
Средняя чистота клеточных фракций, %	98,8 (91,5–100,0)
Средняя доля жизнеспособных клеток, %	93,7 (88,4–98,9)
Средняя доля неактивированных клеток, %	90,8 (80,2–98,5)
Средняя доля спонтанного образования ЕТ, %	8,4 (6,6–12,0)
Средняя доля индуцированного образования ЕТ, %	27,0 (20,1–33,2)

Морфология внеклеточных ловушек при световой и люминесцентной микроскопии моноцитов здоровых лиц и больных РА не демонстрировала существенных межиндивидуальных различий в отношении размеров, формы и содержания ДНК.

Заключение

Патогенез ранних стадий РА представляет собой сложный и не до конца изученный процесс. При этом в качестве одних из источников белковых антигенов, запускающих каскад иммунных нарушений при этом заболевании, согласно современным данным, рассматриваются внеклеточные ловушки нейтрофилов [14]. Учитывая, что способностью к генерации внеклеточных ловушек обладают не только нейтрофильные гранулоциты, но и клетки моноцитарно-макрофагальной системы, интерес представляют дальнейшие исследования в направлении изучения данных процессов. В ходе продолжающейся активной дискуссии в отношении клинико-патогенетического значения внеклеточных ловушек рассматривается возможность использования последних в качестве инновационных биомаркеров РА, а также возможных мишеней для последующего таргетного терапевтического воздействия.

Список литературы

1. Российские клинические рекомендации. Ревматология / Под ред. Е.Л. Насонова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 464 с.
2. Cross M., Smith E., Hoy D., Nolte S., Ackerman I., Fransen M., Bridgett L., Williams S., Guillemin F., Hill C.L., Laslett L.L., Jones G., Cicuttini F., Osborne R., Vos T., Buchbinder R., Woolf A., March L. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann. Rheum. Dis.* 2014. Vol. 73. N 7. P. 1316–1322. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-204627.
3. Angelotti F., Parma A., Cafaro G., Capocchi R., Alunno A., Puxeddu I. One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2017. Vol. 35. N 3. P. 368–378.
4. Yu M.B., Langridge W.H.R. The function of myeloid dendritic cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 2017. Vol. 37. N. 7. P. 1043–1051. DOI: 10.1007/s00296-017-3671-z.
5. Долгушин И.И., Прокопьева О.Б., Смирнова Т.Г. и др. Изучение способности моноцитов, выделенных из периферической крови, образовывать внеклеточные ловушки спонтанно и после активации // *Иммунология.* 2012. № 5. С. 240–242.
6. Чеснокова Н.П. Лекция 3. Особенности структуры, функции и метаболизма моноцитов крови и мононуклеарно-фагоцитирующей системы тканей // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2015. № 4–2. С. 290–292.
7. Chow O.A., von Köckritz-Blickwede M., Bright A.T., Hensler M.E., Zinkernagel A.S., Cogen A.L., Gallo R.L., Monestier M., Wang Y., Glass C.K., Nizet V. Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. *Cell Host Microbe.* 2010. Vol. 8. P. 445–454. DOI: 10.1016/j.chom.2010.10.005.
8. Matthias B., Heidrun A., Gabriele Z., Groll J. Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells. *Nano Lett.* 2010. Vol. 10. P. 59–63. DOI: 10.1021/nl902830x.
9. Webster S.J., Daigneault M., Bewley M.A., Preston J.A., Marriott H.M., Walmsley S.R., Read R.C., Whyte M.K., Dockrell D.H. Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses causes of invasive bacterial disease following challenge with common J. *Immunol.* 2010. Vol. 185. P. 2968–2979. DOI: 10.4049/jimmunol.1000805.
10. Aletaha D., Neogi T., Silman A.J., et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis.* 2010. Vol. 69. P. 1580–1588. DOI: 10.1002/art.27584.
11. Wells G., Becker J.C., Teng J., et al. Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis. and comparison with the DAS28 based on erythrocyte sedimentation rate. *Ann Rheum Dis.* 2009. Vol. 68. N. 6. P. 954–960. DOI: 10.1136/ard.2007.084459.
12. ГОСТ 18995.1-73. Продукты химические жидкие. Методы определения плотности. М., 1974. 4 с.
13. Хейхоу Ф.Г. Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М.: Медицина, 1983. 368 с.
14. Мамус М.А., Тихомирова Е.А., Бедина С.А., Доценко С.С., Трофименко А.С., Мозговая Е.Э. Внеклеточные нейтрофильные ловушки и их возможная роль в образовании антицитруллиновых антител при ревматоидном артрите // *Актуальные проблемы современной ревматологии: сб. науч. работ.* Волгоград, 2018. Выпуск XXXV / Под ред. д.м.н., профессора И.А. Зборовской. М.: Планета, 2018. С. 202–211.