

А. Е. Гончаров^{1,2}, Е. В. Дуж^{1,2}, И. В. Романова^{1,2}, О. В. Дегтярева³

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ КЛЕТОК СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ ОСТЕОАРТРИТОМ КРУПНЫХ И СРЕДНИХ СУСТАВОВ

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси¹,

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь²,

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Беларусь³

Исследован субпопуляционный состав синовиальной жидкости у пациентов с остеоартритом крупных и средних суставов. У 68,2% пациентов в синовиальной жидкости выявлены фибробластоподобные синовиоциты, что указывает на повреждение синовиальной оболочки. Установлено, что количественное содержание Т-клеток и соотношение их субпопуляций указывает на наличие иммунного воспаления в пораженном суставе.

Цель исследования – изучить иммунофенотип клеток СЖ пациентов, страдающих ОА.

Ключевые слова: остеоартрит, остеоартроз, синовиальная жидкость, синовиоциты, Т-клетки.

A. Y. Hancharou, A. V. Duzh, I. U. Ramanava, O. V. Degtereva

CELLS OF THE SYNOVIAL FLUID OF PATIENTS WITH OSTEOARTHRITIS

Subpopulation composition of synovial fluid in patients with osteoarthritis joints of large and medium-sized was studied. Fibroblast-like synoviocytes were identified in the synovial fluid of 68,2% of the patients. This indicates damage to the synovial membrane.

It was found that the quantitative content of T-cells and the ratio of their subpopulations indicates the presence of immune inflammation in the affected joint.

Key words: osteoarthritis, osteoarthritis, synovial fluid, synoviocytes, T-cells.

Остеоартрит (ОА) – одно из самых распространенных заболеваний опорно-двигательной системы, приводящее к постепенному износу хряща, а, следовательно, и к снижению качества жизни пациента и инвалидизации. Чаще всего поражаются крупные суставы – коленные и бедренные, что характеризуется болевым синдромом, деформацией и нарушением функции суставов [5–6, 10]. Установлено, что ОА – заболевание, на патогенез которого влияют многие внешние факторы риска, но существенная роль отводится также и иммунному механизму воспаления [1, 3]. Несмотря на то, что известны некоторые особенности субпопуляционного состава синовиальной жидкости (СЖ) у пациентов с ОА, в опубликованных исследованиях не была проведена всесторонняя оценка иммунофенотипа клеток [4, 11].

Материалы и методы

В исследование было включено 56 пациентов (возраст – 70,0 (64,0–77,0) лет) с ОА крупных и средних суставов (диагнозы по МКБ-10: М16 – коксартроз, М17 – гонартроз), находившихся на стационарном лечении в УЗ «2-я городская клиническая больница» г. Минска.

Забор материала для исследования. Синовиальную жидкость забирали под контролем УЗИ в пробирку объемом 50 мл, содержащую 100 мкл раствора гепарина. Пробирку доставляли в лабораторию не позднее 3 часов с момента забора образца.

Определение иммунофенотипа клеток СЖ. Исследуемый образец клеток СЖ в количестве 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами на протяжении 15 минут при температуре 4 °С, затем отмывали клетки

в PBS. Учет проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

Культивирование синовиоцитов. Клетки СЖ в количестве $5-10 \times 10^5$ высевали на лунку 6-луночного планшета и культивировали в 3 мл питательной среды DMEM/F12 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки на протяжении 24 ч для адгезии к пластику. Неприкрепившиеся клетки удаляли, в лунки вносили свежую среду и культивировали клетки дополнительно 3–4 суток. По истечении времени культивирования определяли субпопуляционный состав клеток.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica версии 12 (StatSoft, США). Значения показателей представлены в виде медианы с интерквартильным размахом [2].

Результаты и обсуждение

Известно, что фибробластоподобные синовиоциты не экспрессируют молекулу CD45 – общий маркер клеток гемопозитического происхождения, в то же время отличаются высокой экспрессией молекул типичных для клеток мезенхимального происхождения: CD90 (Thy-1) и CD55 (DAF) (рисунк 1) [7].

У 68,2% пациентов с ОА было выявлено более 1,2% CD45⁺CD90⁺CD55⁺ клеток в СЖ с максимальным значением – 34% от числа всех ядродержащих клеток. У остальных пациентов CD90⁺ клетки отсутствовали или выявлялись в количестве не более десятых долей процента, что может свидетельствовать о целостности синовиальной оболочки. Медианное содержание FLS в исследуемой группе пациентов составило 1,85 (0,70–3,78) %.

Макрофаги и макрофагоподобные синовиоциты

CD14-позитивные моноциты, макрофаги и макрофагоподобные синовиоциты (MLS) составляли 28,5 (14,1–40,2)% всех клеток СЖ у пациентов с ОА (максимальное содержание – 78,5%, минимальное – 2,1%). Было показано, что более 95% CD14⁺ клеток экспрессировали молекулу HLA-DR, более 70% – молекулу CD16, что указывает на дифференцировку клеток в макрофаги/MLS. Экспрессия костимуляторной молекулы CD80 – одного из маркеров активации макрофагов, ни в одном из исследованных образцов не превышала 2%.

Тучные клетки. Было установлено, что от 7 до 25% клеток СЖ с высокими показателями бокового светорассеяния экспрессируют молекулу c-kit (CD117), при отсутствии экспрессии маркера базофилов CD203с, предположительно являясь тучными клетками.

Основные субпопуляции лимфоцитов

Показано, что содержание Т-клеток в образцах СЖ сильно варьировало и составило от 42,0% до 91,0%. Содержание ЕК-клеток также колеблется в широких пределах, от 4,0% до 51%. Среди CD3⁺ клеток преобладали Т-клетки с αβ-клеточным рецептором. Содержание TCRγδ-клеток составляло не более 2,6%, при медианном значении 1,2 (0,2–2,4)%.

Т-регуляторные клетки СЖ характеризовались высокой (более 80% от числа всех Т-регуляторных клеток) экспрессией молекулы CD39 – эктонуклеотидазы, расщепляющей аденозинмонофосфаты. В целом, содержание регуляторных Т-клеток было невысоким и составляло 1,3 (0,05–2,1)%. Следует также отметить еще одну особенность лимфоцитов СЖ у пациентов с ОА – это практически полное отсутствие экспрессии на лимфоцитах рецептора к ИЛ-7 – молекулы CD127.

Одна из наиболее важных для патогенеза аутоиммунных заболеваний субпопуляций лимфоцитов – CD8⁺CD161⁺ Т-клетки. Такие лимфоциты экспрессируют хемокиновый рецептор CCR6, продуцируют провоспалительные цитокины ИЛ-17, фактор некроза опухоли-α и ИНФ-γ. В СЖ выявлено значительное содержание CD161⁺ Т-клеток, составляющее от 5,2 до 25,6% от количества всех лимфоцитов.

Содержание В-лимфоцитов среди всех образцов не превышало 2,3%. В-клетки практически не экспрессировали молекулы CD5, CD10 и CD23.

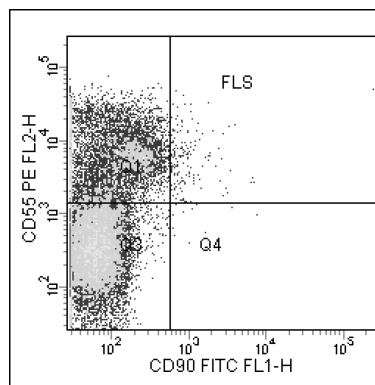


Рис. 1. CD45⁻CD90⁺CD55⁺ фибробластоподобные синовиоциты

Субпопуляционный состав Т-клеток СЖ. Жизненный цикл Т-клеток состоит из нескольких важнейших этапов, в течение которых наивная Т-клетка дифференцируется в Т-клетки памяти и эффекторные Т-лимфоциты, непосредственно принимающие участие в поддержании иммунного воспаления [9]. Данные процессы находят свое отражение в экспрессии ряда важнейших маркеров на клеточной поверхности, в частности, хемокинового рецептора CCR7 (CD197) и L-селектина (CD62L), ассоциированных с миграцией клеток во вторичные лимфоидные органы, костимуляторных молекул CD27 и CD28, проапоптотической молекулы PD1 (CD279) и др. Общепринятая схема дифференцировки клеток вкратце может быть представлена следующим образом: наивные Т-клетки (CCR7⁺/CD62L⁺CD45RA⁺CD45RO⁻) → центральные Т-клетки памяти TCM (CCR7⁺/CD62L⁺CD45RA⁻CD45RO⁺CD27⁺CD28⁺PD1⁻) → эффекторные Т-клетки памяти – TEM (претерминально-дифференцированные: CCR7⁻/CD62L⁻CD45RA⁻CD45RO⁺CD27^{+/+}CD28^{+/+}) → терминально-дифференцированные Т-клетки – TEMRA (CCR7⁻/CD62L⁻CD45RA⁺CD45RO⁻CD28⁻PD1⁺) [8].

Как CD4⁺, так и CD8⁺ лимфоциты СЖ были представлены в основном (на 60–80%) TEM-клетками (рисунок 2). В этой связи, наиболее вероятна миграция лимфоцитов в сустав с последующей дифференцировкой в эффекторные субтипы Т-клеток, поддерживающие иммунное воспаление. Полученные данные указывают на то, что соотноше-

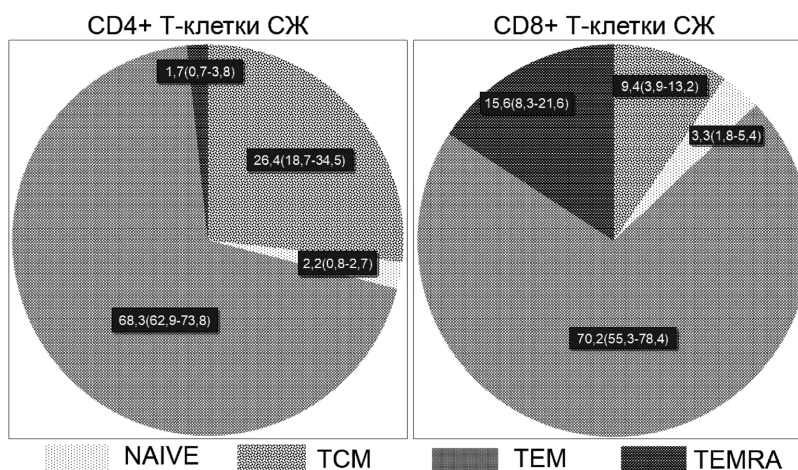


Рис. 2. Субпопуляции Т-клеток СЖ у пациентов с ОА

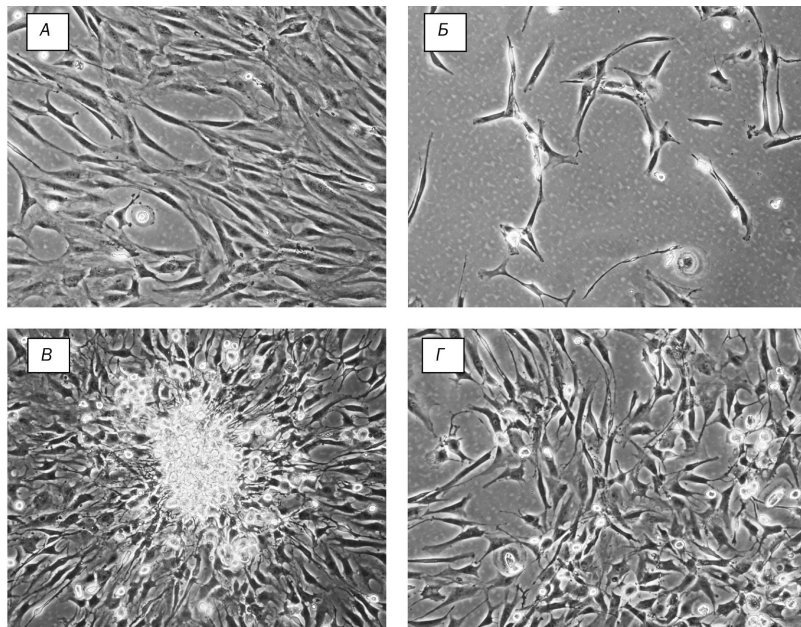


Рис. 3. Морфология культивированных клеток СЖ, представленных преимущественно фибробластоподобными синовиоцитами: А – 1-е сутки; Б – 1-е сутки; В – 5-е сутки; Г – 5-е сутки (фазово-контрастная микроскопия, $\times 100$)

ние субпопуляций Т-лимфоцитов в СЖ при ОА соответствуют «воспалительному» иммунофенотипическому профилю.

Следует отметить, что возможность сравнить полученные данные с группой здоровых добровольцев принципиально отсутствовала в связи с тем, что в непораженном суставе количество СЖ крайне невелико, а клеточность образца минимальна.

Субпопуляционный состав культивированных клеток СЖ

Всего получено 5 монослойных культур клеток СЖ. Клетки СЖ на первые сутки после посева приобретали преимущественно веретенообразную форму, были сгруппированы в микроколонии небольших размеров (рисунок 3).

Имунофенотипирование культивированных клеток СЖ включало определение ряда молекул, что позволило идентифицировать синовиоциты макрофагального и фибробластного происхождения. Первая культура – с преобладанием макрофагальных клеток ($> 95\%$), вторая – почти исключительно $CD90^+CD55^+CD45^-$ (FLS), третья – смешанная,

в которой содержание FLS составило 66% , MLS – 18% , других клеток 16% (рисунок 4), в четвертой культуре было преобладание макрофагальных клеток (более 55%), а содержание FLS не отмечалось. Содержание $HLA-DR^+$ клеток в данной культуре составило 58% , $CD16^+$ – около 45% , а $CD64^+$ – 45% . В пятой культуре синовиоцитов отмечалось большее содержание клеток фибробластоподобного происхождения, а количество макрофагальных клеток от общего количества составило не более 6% .

Макрофагальные синовиоциты экспрессировали типичные маркеры АПК – молекулы $CD16$, $CD64$, $CD86$, $CD273$ (B7-DC) и $HLA-DR$, что подтверждает их миелоидное происхождение. Экспрессия $CD16$ и $CD106$ (VCAM-1) была более вариабельна, с медианными значениями $80,2(75,6-96,1)\%$ и $54,2(36,4-84,0)\%$ соответственно. Более 65% клеток экспрессировали молекулу $CD273$, что указывает на потенциальные иммуносупрессивные свойства клеток.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлен субпопуляционный состав синовиальной жидкости у пациентов с остеоартритом крупных и средних суставов. Фибробластоподобные синовиоциты выявлялись у $68,2\%$ пациентов с ОА при медианном содержании $1,85(0,70-3,78)\%$. Макрофагоподобные синовиоциты присутствовали во всех исследованных образцах синовиальной жидкости и составляли $28,5(14,1-40,2)\%$ клеток.

Культивирование прикрепившихся клеток синовиальной жидкости позволило получить 5 культур клеток с различным процентным содержанием FLS и MLS. Показано, что макрофагальные синовиоциты экспрессируют типичные маркеры АПК и молекулу $CD273$, что указывает на потенциальные иммуносупрессивные свойства клеток.

Показано, что содержание Т-клеток в образцах СЖ сильно варьировало и составило от $42,0\%$ до $91,0\%$. Среди $CD3^+$ клеток преобладали Т-клетки с $\alpha\beta$ -Т-клеточным рецептором. Как $CD4^+$, так и $CD8^+$ лимфоциты СЖ были представлены на $60-80\%$ ТЕМ-клетками, что предполагает миграцию лимфоцитов в сустав с последующей дифферен-

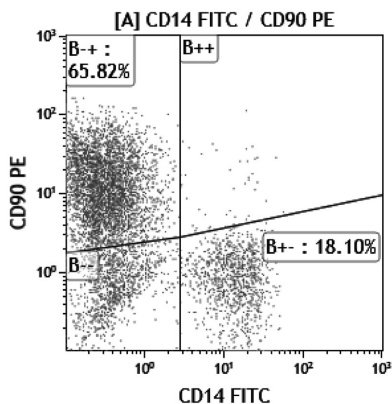


Рис. 4. Фибробластоподобные и макрофагальные синовиоциты в одной культуре СЖ

цировкой в эффекторные субтипы Т-клеток, поддерживающие иммунное воспаление.

В результате исследования иммунофенотипа иммунокомпетентных клеток, входящих в состав синовиальной жидкости пациентов, страдающих ОА, можно предположить, что иммунное воспаление играет значительную роль в этиопатогенезе ОА.

Литература

1. Мазуров В. И. Факторы риска и некоторые аспекты патогенеза остеоартрита / В. И. Мазуров, А. С. Трофимова, Е. А. Трофимов // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. – 2016. – № 2. – С. 116–124.

2. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О. Ю. Реброва. – М., 2008. – 312 с.

3. Синяченко О. В. Современные аспекты анализа синовиальной жидкости / Синяченко О. В. // Украинский ревматологический журнал. – 2008. – № 2. – С. 30–39.

4. Чернякова Ю. М., Сементовская Е. А. Синовиальная жидкость: состав, свойства, лабораторные методы исследования / Ю. М. Чернякова, Е. А. Сементовская // Медицинские новости. – 2005. – № 2. – С. 9–14.

5. Recognition of immune response for the early diagnosis and treatment of osteoarthritis [Electronic resource] / A. M. Kandahari

[et al.] // Journal of Immunology Research – 2015. – Vol. 2015. – Mode of access : <http://www.hindawi.com/journals/jir/2015/192415>. – Date of access : 02.12.2018.

6. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review / B. J. de Lange-Brokaar [et al.] // Osteoarthritis Cartilage. – 2012. – Vol. 20. – P. 1484–1499.

7. 19 Synovial fluid CD34+ CD44+ CD90+ mesenchymal stem cell levels are associated with the severity of primary knee osteoarthritis / D. H. Lee [et al.] // Osteoarthritis Cartilage. – 2012. – Vol. 20. – P. 106–109.

8. Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence / Scott N. Mueller [et al.] // Annual review of immunology 2013. 31:137–6

9. The role of innate immunity in osteoarthritis: when our first line of defense goes on the offensive [Electronic resource] / E. W. Orlovsky [et al.] // The Journal of rheumatology. – 2015. – Vol. 42, N 3. – Mode of access : <http://www.jrheum.org/content/early/2015/01/07/jrheum.140382>. – Date of access : 02.12.2018.

10. Changes in peripheral blood immune cell composition in osteoarthritis / F. Ponchel [et al.] // Osteoarthritis Cartilage. – 2015. – Vol. 23, N 11. – P. 1870–1878.

11. Early lymphocyte activation in the synovial microenvironment in patients with osteoarthritis: comparison with rheumatoid arthritis patients and healthy controls / R. Rollin [et al.] // Rheumatology international – 2008. – Vol. 28. – P. 757–764.