

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-11

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРОГОВ АКТИВАЦИИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ К ФНО-А НА ОСНОВЕ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ К НЕМУ***INVESTIGATING ACTIVATION THRESHOLDS OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS TO TNF BASED ON ITS SURFACE RECEPTOR EXPRESSION**

С. Алрхмун^{1,2}, Р. Ю. Перик-Заводский^{1,2}, О. Ю. Перик-Заводская², Ю. А. Лопатникова^{1,2},
Ю. В. Жукова^{1,2}, Ю. А. Шевченко^{1,2}, М. О. Вольнец², Ш. К. Сулейманов¹,
Н. А. Сивицкая¹, Ф. Д. Киреев², А. А. Альшевская¹, С. В. Сенников^{1,2}

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова

²НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

S. Alrhmoon^{1,2}, R. Y. Perik-Zavodskii^{1,2}, O. Y. Perik-Zavodskaya², J. A. Lopatnikova^{1,2},
J. V. Zhukova^{1,2}, J. A. Shevchenko^{1,2}, M. O. Volynets², Sh. K. Suleymanov¹,
N. A. Sivitskaya¹, F. D. Kireev², A. A. Alshevskaya¹, S. V. Sennikov^{1,2}

¹Sechenov First Moscow State Medical University

²Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

✉ saleh.alrhmoon1@gmail.com

Аннотация

Фактор некроза опухоли альфа (ФНО-α) является ключевым провоспалительным цитокином в патогенезе ревматоидного артрита (РА), и увеличение его экспрессии вызывает системные эффекты, характерные для РА [1, 2]. Биологическая терапия, воздействующая на ФНО-α, революционизировала терапию РА [3, 4], подчеркнув его роль в прогрессировании и тяжести заболевания. Наше исследование выявило снижение порогов активации моноцитов к ФНО-α у пациентов с РА по сравнению со здоровыми донорами.

Abstract

Tumor necrosis factor alpha (TNF-α) is a key pro-inflammatory cytokine in rheumatoid arthritis (RA) pathogenesis, with its overexpression driving systemic effects characteristic of RA [1, 2]. Targeting TNF-α with biologic therapies has revolutionized RA management [3, 4], highlighting its role in disease progression and severity. Our study revealed that monocytes from patients with RA exhibit lower activation thresholds for TNF-α compared to healthy donors.

Цель — определение полного транскриптома (WTA) и иммунопротеомного профиля (10 поверхностных белков) единичных мононуклеарных клеток из крови здоровых доноров (n = 3) и пациентов с РА (n = 3), а также оценка эффектов добавления ФНО-α в обеих группах.

Материалы и методы. Мы выделили мононуклеарные клетки из крови здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом методом центрифугирования в градиенте плотности Фиколла. Затем мы окрашивали выделенные мононуклеарные клетки антителами, конъюгированными с молекулярными штрихкодами Sample Tag для мультиплексирования, и 10 маркерами AbSeq (CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD45RA, CD45RO, CD56, CD120A и CD120B) для иммунопротеомного профилирования. Затем окрашенные клетки были загружены в платформу BD Rhapsody Express для мультиомного профилирования. Для захвата молекул поли-А были использованы магнитные бусы с молекулярными штрихкодами, после чего был проведен лизис клеток и непосредственная гибридизация поли-А молекул лизированных клеток с бусами. Молекулы поли-А подвергли обратной транскрипции для синтеза кДНК, которая затем была амплифицирована с помощью двух циклов полугнездовой ПЦР и одного цикла гнездовой ПЦР, в результате чего были получены финальные библиотеки полного транскриптома (WTA), AbSeq и Sample Tag. Эти библиотеки были объединены и секвенированы на приборе NovaSeq 6000 (R1 = 71, R2 = 51, проточная ячейка S1).

* Исследование полного транскриптома выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 20-75-10051-П), исследование иммунопротеомного профиля выполнено при поддержке программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030», реализуемой на базе ФГАО ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

© С. Алрхмун, Р. Ю. Перик-Заводский, О. Ю. Перик-Заводская, Ю. А. Лопатникова, Ю. В. Жукова, Ю. А. Шевченко, М. О. Вольнец, Ш. К. Сулейманов, Н. А. Сивицкая, Ф. Д. Киреев, А. А. Альшевская, С. В. Сенников, 2024

Полученные файлы FASTQ были обработаны с использованием BD pipeline версии 2.2 для получения финальных матриц экспрессии генов. Затем эти матрицы были проанализированы с помощью пакета Seurat V5 на языке программирования R. Первоначально матрицы экспрессии генов и белков прошли процедуру контроля качества, а затем были интегрированы. Из объединенных матриц были идентифицированы наиболее вариабельные гены и белки. Данные об экспрессии генов были нормализованы с использованием пакета SCTransform в R с акцентом на идентифицированы вариабельные гены, в то время как данные об экспрессии белков были нормализованы с использованием метода Centered Log-ratio (центрированного логарифмического отношения). Для снижения размерности к нормализованным матрицам был применен анализ главных компонент (PCA). Эффект партии был скорректирован с помощью пакета Harmony в R. Далее было выполнено мультиомное снижение размерности с использованием метода WNN UMAP на скорректированных с помощью Harmony главных компонентах экспрессии генов и белков. Кластеры клеток были идентифицированы и вручную аннотированы на основе профилей экспрессии поверхностных белков и генов. Затем мы использовали пакет AUCell для идентификации клеток с активной геной сигнатурой, связанной с клеточным ответом на ФНО-а. После этого, используя анализ второй производной полиномиальной кривой, построенной по данным AUCell и экспрессии рецепторов к ФНО-а, нашли пороги активации клеток при помощи ФНО-а.

Результаты. Классические моноциты у пациентов с РА показали низкий порог активации по сравнению со здоровыми донорами. Это предполагает, что моноциты у пациентов с РА активируются легче, что может способствовать хроническому воспалению, характерному для этого заболевания.

При добавлении ФНО-а к моноцитам от здоровых доноров мы наблюдали умеренное снижение порога активации. Это указывает на то, что ФНО-а может праймировать моноциты, делая их более восприимчивыми к активации, даже при отсутствии заболевания.

Что касается моноцитов у пациентов с РА, то добавление ФНО-а привело к заметному снижению порога активации, более выраженному по сравнению со здоровыми донорами. Это предполагает, что моноциты у пациентов с РА уже находятся в предварительно активированном состоянии и что ФНО-а усугубляет это состояние, потенциально способствуя усилению воспалительной реакции, характерной для РА.

Выводы. Различия в реакции на ФНО-а между здоровыми донорами и пациентами с РА указывают на измененную чувствительность классических моноцитов при РА, где даже низкие уровни ФНО-а могут вызывать значительную активацию. Это может объяснить сохранение и усиление воспаления при РА. Результаты подчеркивают повышенную реактивность моноцитов при РА и критическую роль ФНО-а в модуляции этого ответа, предлагая потенциальную информацию для разработки целенаправленных терапевтических стратегий.

Литература

1. Jang D. I., Lee A. H., Shin H. Y. et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22 (5). P. 2719.
2. Samimi Z, Kardideh B., Chalabi M. et al. Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) does not have any correlation with disease activity in rheumatoid arthritis patients treated with disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) // *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science.* 2019. Vol. 56 (6).
3. Farrugia M., Baron B. The role of TNF- α in rheumatoid arthritis: a focus on regulatory T cells // *J. Clin. Transl. Res.* 2016. Vol. 2 (3). P. 84–90.
4. Furst D. Development of TNF inhibitor therapies for the treatment of rheumatoid arthritis // *Clinical and Experimental Rheumatology.* 2009. Vol. 28. P. S5–12.