

CD68 И CD88 ЕКСПРЕСИЯ В СИНОВИАЛНАТА ТЪКАН ПРИ ПАЦИЕНТИ С ПСОРИАТИЧЕН АРТРИТ



проф. д-р Мариела
Генева-Попова¹, дм,
д-р Станислава
Попова-Белова¹, дм,
д-р Александър
Георгиев Иванов²,
д-р Величка
Попова³, дм

¹Катедра по
пропедевтика
на вътрешните
болести, Медицински
факултет,
МУ-Пловдив, Клиника
по ревматология,
УМБАЛ „Св. Георги“,
гр. Пловдив

²Катедра по обща и
клинична патология,
Медицински
факултет,
МУ-Пловдив,
Университетска
многопрофилна
болница „Св. Георги“
гр. Пловдив

³Катедра по
пропедевтика
на вътрешните
болести, Медицински
факултет,
МУ-Пловдив,
Ревматология,
УМБАЛ „Каспела“,
гр. Пловдив

ДАННИ ЗА ВРЪЗКИТЕ МЕЖДУ КЛЕТКИТЕ, ИЗГРАЖДАЩИ СИНОВИАЛНАТА ТЪКАН НА ПАЦИЕНТИ С ПСОРИАТИЧЕН АРТРИТ (ПсА) и нивото на произведените от тях хемокини, цитокини и ензими, действащи върху ставната деструкция, са оскъдни. Наличието на такава корелация би подобрило настоящите познания за патогенезата на заболяването чрез разкриване на механизмите на ставната увреда. Синовиалната патология при болни с ПсА е отличителен белег и проучването ѝ, заедно с проучване на цитокиновите нива, вероятно ще допринесе за неговото развитие.

Пациенти и методи: 35 пациенти с диагноза на ПсА бяха включени в настоящото пилотно проучване; от тях всички са с полиартриткуларно периферно и централно засягане (CASPAR-критерии >3, DARSA >14), средната им възраст е 45.12 ± 15.07 год., с давност на заболяването 5.67 ± 3.24 год. Резултатите на болните с ПсА бяха сравнени с резултати на болни, страдащи от гонартроза ($n=40$), ACR критерии за гонартроза (1991), III-IV степен по скалата на Kellgren-Lawrence. Биологичен материал от синовия на колянни стави, получен по време на операция за смяна на колянна става беше изследван имунохистохимично



за експресия на CD68+ и CD88+ в Имунологичната лаборатория на Института по репродуктивна биология при БАН, София и в Катедра по обща и патологична анатомия, Медицински факултет, МУ-Пловдив. От всяка една тъканна проба на болни с псориатичен артрит и гонартроза са направени поне 10 предметни стъкла и са изследвани от хистолог.

Заклучения: Резултатите показваха, че в синовиалната тъкан на болните с ПсА се установяват активирани CD68+ и CD88+ клетки, които синтезират високо ниво на

ТНФ-а, интерлевкин-17, интерлевкин-22, интерлевкин-23 и определят тежка ставна деструкция в сравнение с болните от гонартроза, което доказва необходимостта от ранна биологична терапия.

Въведение

Синовиалната мембрана покрива ставната кухина и се състои от тънък слой клетки синовиални фибробласти и макрофаги. Под тях има рехава съединителна тъкан с кръвоносни съдове, лимфоидни съдове, фибробласти, нервни влакна и лев-

коцити^[1]. При патологична промяна, свързана с възпалителен ставен процес, в синовиата се наблюдава хиперплазия, дължаща се на пролиферация на синовиални фибробласти и натрупване на макрофаги, неоваскулогенеза и инфилтрация от имунни клетки, произвеждащи провъзпалителни цитокини^[1,2]. Синовиумът при псориатичен артрит (ПсА) се характеризира с хиперплазия и повишен брой на фибробластоподобни синовиоцити и макрофаги, хиперваскуларност, наличие на хиперемични вили и субсиновиален инфилтрат от Т-клетки, В-клетки, неутрофили и мастоцити^[2]. Наличието на тези клетки в синовиалната мембрана на пациенти с ПсА води до повишена експресия на тумор некрозис фактор-а (TNF-а), интерферон-гамма (INF-гамма), интерлевкин (IL)-1B, IL-2, IL-10, IL-17, IL-18, матрични металпротеинази, колонистимулиращи фактори^[2,3].

Хистологичната оценка на псориатичния синовиум показва наличието на клонални и неклонални Т-лимфоцити, макрофаги и моноцити^[4]. Хистологичното разположение на имунните клетки в синовиалната тъкан при пациенти с ПсА е хетерогенно и включва наличието на ектопични лимфоидни структури. Клъстери от дендритни клетки и Т-лимфни агрегати допринасят за хронифицирането на заболяването^[5]. Провъзпалителните цитокини, секретирани от макрофагите (напр. TNF-а, IL-6, IL-17), играят значителна роля в ПсА^[5,6]. Неутрофилният компонент, който характеризира синовиума в ПсА, наподобява псориатични кожни лезии^[5].

Според резултатите от изследването на синовиалната биология при пациенти с възпалителни артрити, тя има поне няколко патологични вида – "лимфоиден" патологичен

тип, с преобладаване на лимфоцити в синовиума, "миелоиден" патологичен тип, доминиран от макрофаги, без ясно организирани фоликуларни структури и "фибробен" тип, при който синовиалната тъкан се характеризира с рядка инфилтрация на имунни клетки и богата на фибробласти строма^[7].

Имунохистохимичният анализ на синовиалната мембрана може да бъде полезен при оценка на пациенти с псориатичен артрит. Авторите са установили, че синовиалната покривка при възпалителни ставни заболявания като ревматоиден артрит и ПсА са гостатъчно различни, за да може това изследване да потвърди конкретната диагноза^[8].

CD68

CD68 (клъстер от диференциация 68, макросиалин) е гликопротеин от семейството на Dendritic cell – Lysosomal-Associated Membrane Protein (LAMP)^[9]. Протеинът се експресира върху кръвни моноцити и тъканни макрофаги, освен това присъства в лимфоцити, фибробласти и ендотелни клетки^[9,10]. CD68 има значение за фагоцитната активност на тъканните макрофаги както във вътреклетъчния лизозомен метаболизъм, така и в извънклетъчните клетъчни клетки и взаимодействие клетка-патоген^[11].

Той се свързва с лектини и селектини, което позволява на макрофага да се фиксира в специфична тъканна област. CD68 циркулира между ендозоми и лизозоми, което позволява на макрофага да се движи по повърхността на субстрата, съдържащ селектин, или по повърхността на други клетки^[11].

Активираните Т-клетки и някои зре-

ли В-клетки също могат да експресират CD68, който обикновено се появява като точкова цитоплазматична или фино-зърнеста положителност чрез имунохистохимични техники^[10].

Alivernini et al. (2019) изследват синовиална тъкан на пациенти, за да диференцират серонегативен периферен възпалителен артрит^[8]. Авторите установяват, че CD68+ клетките са най-честите клетки на синовиата на изследваните пациенти със серонегативен артрит ($p < 0.001$) и тяхното изследване помага при диагностицирането на недиференцирани артрит от дегенеративно ставно засягане^[8].

Fiechter et al. (2021) изследват влиянието на биологичната терапия върху синовиалната активност на пациенти с ПсА^[9]. Авторите са използвали като маркер за активност на ПсА CD68+ синовиални макрофаги, оценявайки тяхното числово намаляване, достигащо статистическа значимост и установяват числени намалявания на всички инфилтриращи клетъчни подтипове на 12^{ма} седмица, достигайки статистическа значимост за CD68+, поради което авторите предлагат изследването на CD68+ да се счита за белег на активност на заболяването^[12].

Според *van Kuijk и съавтори (2006)* CD68+ положителни клетки се натрупват в синовиума на ставите на болни от ревматоиден артрит и псориатичен артрит, където проявяват деструктивен и ремоделиращ потенциал и допринасят значително за ставно възпаление и разрушаване на ставите^[13]. Според *Baeten и съавтори (2005)* плътността на макрофагите корелира с активността на ПсА^[14], което се свързва с разрушителен ставен потенциал.

CD68 макрофаги и моноцити произ-

таблица 1

РЕЗУЛТАТИ НА ЕКСПРЕСИЯТА НА CD68+ И CD88+ ВЪРХУ СИНОВИАЛНАТА ТЪКАН НА БОЛНИ С ПСА И ГОНАРТРОЗА (MANN-WHITNEY U ТЕСТ)

Експресия	Група	Брой	Медиана (Диапазон)	Mann-Whitney U (df 1)	Значимост (p)
CD68+	ПсА	20	2 (0-3)	410.200	000*
	Гонартроза	44	0 (0-2)		
CD88+	ПсА	20	0 (0-3)	305.300	000**
	Гонартроза	44	1 (0-2)		

*Статистическа значимост при ниво на допустима грешка = .05

**Статистическа значимост при ниво на допустима грешка = .01

вещдат провъзпалителни цитокини като интерлевкин-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-12, IL-23 и TNF- α ^[15]. Алтернативно активирани макрофаги, които са провъзпалителни и имунорегулаторни и поляризираны от Th2 цитокини като IL-4 и IL-13 и произвеждат провъзпалителни цитокини като IL-10 и TGF- β ^[15]. При активен възпалителен или аутоимунен процес, макрофагите освобождават TNF- α , IL-1 β , IL-12 и IL-23, а по-късно IL-10 и TGF- β за потискане на възпалението и възстановяване на тъканите^[15,16].

CD88

CD88 (C5a1 рецептор, C5a anaphylatoxin chemotactic receptor 1, C5a anaphylatoxin receptor, C5R1, Complement component 5a receptor 1) е едноверижен протеин със седем обхващащи мембраната региони. CD88 се експресира от моноцити, неутрофили, еозинофили и други клетки^[17]. CD88 е свързан с хетеротримерни G протеини и след свързването си с фракция на комплемента C5a, сигналът, трансдуциран от CD88, води до хемотаксис, освобождаване на ензими и супероксидни аниони, които увреждат всички елементи на ставите^[17]. CD88 е представител на семейството на хемоатрактантните рецептори и се експресира в

различни клетки и тъкани, като синовиоцити, астроцити, неутрофили/макрофаги, мастоцити, незрели гендритни клетки, ендотелни клетки, кераноцити^[18]. *Yuan и Wei (2003)* изследват експресията на CD88 в синовиоцити от пациенти с аутоимунен възпалителен артрит и остеоартрит и анализират освобождаването на тумор некрозис фактор алфа (TNF алфа) от синовиоцитите чрез ELISA^[18]. Авторите установяват, че при 87.17% от изследваните пациенти се наблюдава експресия на CD88 и че тази синовиална експресия е свързана със значително подуване на ставите, скорост на утаяване на еритроцитите (ESR) и C-реактивен протеин (CRP). Активирането на комплекса CD88 с неговия лиганд C5a засилва освобождаване на TNF-алфа от синовиоцитите^[18].

Mehta и съавтори (2015) проучват ефекта на блокирането CD88 със siRNAs фрагменти и установяват, че по този начин може да се реализира клиничен ефект и намаляване на артритата до 66% в животински модели, което е индиректно доказателство за активиране на CD68 при болни с артрит^[19].

Експресията на CD68 и CD88 не са проучени достатъчно при болни с псориатичен артрит.

Целта на разработката е да оцени експресията на CD68 и CD88 в синовиалната тъкан на болни от псориатичен артрит и гонартроза.

Материали и методи: 35 пациенти с диагноза на ПсА бяха включени в настоящото пилотно проучване; от тях всички са с полиартриткуларно периферно и централно засягане (CASPAR – критерии >3, DARSА >14), средната им възраст е 45.12 \pm 15.07 години, с давност на заболяването 5.67 \pm 3.24 год. Резултатите на болните с ПсА бяха сравнени с резултати на болни, страдащи от гонартроза (n=40, ACR критерии за гонартроза, 1991, III-IV степен по скалата на Kellgren-Lawrence). Биологичен материал от синовия на колянни стави, получен по време на операция за смяна на колянна става беше изследван имунохистохимично за експресия на CD68+ и CD88+ в Имунологичната лаборатория на Института по репродуктивна биология при БАН, София и в Катедрата по обща и патологична анатомия, Медицински факултет, МУ-Пловдив. От всяка една тъканна проба на болни с псориатичен артрит и гонартроза са направени поне 10 предметни стъкла и са изследвани от хистолог. За интензитетата на оцветяването е приета скала 0 – липсва; 1 – слаб; 2 – умерено; 3 – силен интензитет, процентът на положително оцветените клетки

се определя, както следва: при 0-10% = 0; 10-39% = 1; 40-69% = 2; 70-100% = 3. Имунохистохимичните резултати се разделят на три групи според наличието на положителни клетки: отрицателен резултат (-), слабо положителен резултат (+), силно положителен резултат (+++) на налични клетки според класификация, предложена от наблюдаващия хистолог.

Резултати: Сравнителният анализ на степента на тъканната експресия на CD68+ и CD88+ върху синовиалната тъкан на болни с ПсА и гонартроза, измерени ординална скала (0 = липсва експресия, 1 = слаба експресия; 2 = умерено ниво на експресия и 3 = високо ниво на експресия) показва значително ниво на експресия на всички показатели (Табл. 1).

В групата на пациентите с ПсА се наблюдава по-високи ниво на CD68+, (респективно UCD68+=410.200, $p < 0.001$). При пациентите с ПсА медианата е 2, а диапазонът 0-3, докато при пациентите с гонартроза медианата се колебае 0-1 при диапазон 0-3, като при всички наблюдавани активирани клетки разликата е достоверна ($p < 0.001$).

Нивото на CD88+, което представлява С5а-рецептор, е достоверно по-ниско при болните с ПсА (UCD88+=305.300, $p < 0.001$), като медианата е 0, а диапазонът 0-3, докато при пациентите с гонартроза медианата е 1 при диапазон 0-3.

Обсъждане и заключение

CD68+ пептидът има значение за фагоцитарната активност на тъканните макрофаги, участва във вътреклетъчния лизозомен метаболизъм, както и във взаимодействията между отделените клетки^[14]. Ние

установихме, подобно на *Alivernini* и *сътрудници*, че нивото на CD68+ е увеличено в синовиалната тъкан на болни с ПсА в сравнение със синовиалната тъкан на болни с активирани гонартроза. Като израз на активиране на макрофаги, моноцити, фибробласти и гендритни клетки, маркерът CD68+ показва тъканна експресия, по-силно изразена при болни с висока клинична активност – DAPSA над 14.

В литературата няма данни за наличието CD88+ в синовиалната мембрана на болни с ПсА. Според нашите данни CD88+ маркерът (установен върху макрофаги, фибробласти, неутрофили) се намират в понижено количество в синовиалната тъкан на болни с ПсА в сравнение с болни с гонартроза.

Според *Furebring* и *сътрудници* нивото на CD88+ е силно намалено при тежки инфекции като сепсис или септичен шок, въпреки че общото ниво на комплементарните фракции е увеличено в серума на болните. Нашите резултати показват ниско ниво на CD88+ клетки (макрофаги, фибробласти, неутрофили), което вероятно е свързано с повишеното ниво на С5а фракцията на комплемента, а като последствие на това свързването му със CD88+, поради което той се установява в ниско количество.

Неутрофилите левкоцити имат важна роля както за иницирането, така и за прогресирането на ПсА, а голям брой активирани неутрофили се откриват както в синовиалната течност, така и в синовиалната тъкан на болни с ПсА. Увеличеното ниво на неутрофили и гендритни клетки са свързващото звено между вродения и придобития имунитет, които изглежда са въввлечени в патогенезата на ПсА. Нашите резултати разширяват разбирането за

молекулярните промени, които се случват с неутрофилите във възпалени стави при ПсА. Вероятно неутрофилите губят своите миграционни свойства и генерират сигнали, които насърчават увреждане на ставите чрез и активиране както на вродения, така и на адаптивния имунен отговор. Предполагаме, че тези активирани неутрофили допринасят за хроничното възпаление и прогресивното увреждане на хрущяла и субхондралната кост, наблюдавани при пациенти с ПсА. ■

Книгопис:

1. van de Sande MG, Baeten DL. Immunopathology of synovitis: from histology to molecular pathways. *Rheumatology*. (2016) 55:599-606. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kev330>
2. Belasco J, Wei N. Psoriatic Arthritis: What is Happening at the Joint? *Rheumatol Ther* 6, 305-315 (2019). <https://doi.org/10.1007/s40744-019-0159-1>
3. Alivernini S, Bruno D, Tolusso B, et al. Differential synovial tissue biomarkers among psoriatic arthritis and rheumatoid factor/anti-citrulline antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 21, 116 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13075-019-1698-7>
4. Celis R, Andr Cuervo J, Ramirez, and J. D. Cañete. "Psoriatic Synovitis: Singularity and Potential Clinical Implications", *Front Med (Lausanne)*. 2019; 6: 14. Published online 2019 Feb 11. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00014>
5. FitzGerald O. "Psoriatic arthritis synovial histopathology: commentary on the article by Kruithof and colleagues.", *Arthritis Res Ther* 7, 124-125 (2005). <https://doi.org/10.1186/ar1747>
6. Kruithof E, Baeten D, De Rycke L, et al. "Synovial histopathology of psoriatic arthritis, both oligo- and polyarticular, resembles spondyloarthritis more than it does rheumatoid arthritis", *Arthritis Res Ther* 7, R569 (2005). <https://doi.org/10.1186/ar1698>
7. Pitzalis C, A. Cauti, N. Pipitone et al. "Cutaneous lymphocyte antigen-positive T lymphocytes preferentially migrate to the skin but not to the joint in psoriatic arthritis", *Arthritis Rheum.* 1996, 39, p 137-145. <https://doi.org/10.1002/art.1780390118>
8. Alivernini S, B. Tolusso, L. Patriccia et al. "Synovial Predictors of Differentiation to Definite Arthritis in Patients With Seronegative Undifferentiated Peripheral Inflammatory Arthritis: microRNA Signature, Histological, and Ultrasound Features", *Front Med (Lausanne)*. 2018 Jul 3;5:186. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00186>
9. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. D68/ macrofalin: not just a histochemical marker. *Lab Invest.* 2017 Jan;97(1):4-13. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.116>
10. van der Koijl MA, van der Mark EM, Kuijk JK, van Velzen A, van Berkel TJ, Morand OH. "Human monocyte-derived macrophages express an approximately 120-40 OX-LDL binding protein with strong identity to CD68", *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Nov;17(11):3107-16. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.17.11.3107>
11. Deng R, Li C, Wang X, Chang L, Ni S, Zhang W, Xue P, Pan D, Wan M, Deng L, Cao X. "Periosteal CD68+ F4/80+ Macrophages Are Mechanosensitive for Cortical Bone Formation by Secretion and Activation of TGF-β1", *Adv Sci (Wein)*. 2022 Jan;9(3):e2103343. <https://doi.org/10.1002/advs.202103343>
12. Fricther RH, de Jong HM, van Mens LJJ, Fluri IA, Tas SW, Baeten DLP, Yerenko NG, van de Sande MGH. IL-12p40/IL-23p40 Blockade With Ustekinumab Decreases the Synovial Inflammatory Infiltrate Through Modulation of Multiple Signaling Pathways Including MAPK-ERK and Wnt", *Front Immunol.* 2021 Mar 4;12:611656. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.611656>
13. van Kuijk AW, Reinders-Blankert P, Smeets TJ, Dijkmans BA, Tak PP. Detailed analysis of the cell infiltrate and the expression of mediators of synovial inflammation and joint destruction in the synovium of patients with psoriatic arthritis: implications for treatment. *Ann Rheum Dis.* (2006) 65:1551-7. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.059963>
14. Baeten D, Kruithof E, De Rycke L, Boots AM, Melants H, Veys EM. Infiltration of the synovial membrane with macrophage subsets and polymorphonuclear cells reflects global disease activity in spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther.* (2005) 7:R359-69. <https://doi.org/10.1186/ar1501>
15. Abbas Shapouri-Moghaddam, S. Mohammadian, H. Vazini, M. Taghadosi, S.-Alireza Esmaili et al. "Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease", *J Cell Physiol.* 2018 Sep;233(9):6425-6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
16. Yanglao Shuanguan, Yongkun Chen, Yihui Ma, Yunpeng Zhao, Yeting He, Weiwei Li, Salubrin protects against inflammatory response in macrophage and attenuates psoriasisiform skin inflammation by antagonizing NF-κB signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 10, 101616. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.11.066>, 569, (63-70), (2022). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.11.066>
17. Monk P N, A-M Scola, P Madala, D P Fairlie. "Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors". *British Journal of Pharmacology* (2007) 152, 429-448. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707332>
18. Yuan G, Wei J, Zhou J, Hu H, Tang Z, Zhang G (2003). Expression of C5aR (CD88) of synovial cells isolated from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Chin Med J (England)* 116:1408-1412. PMID: 14527377.
19. Mehta G, R. I. Scheinman, V. M. Holers and N. K. Banda. "A New Approach for the Treatment of Arthritis in Mice with a Novel Conjugate of an Anti-C5aR1 Antibody and C5 Small Interfering RNA". *J Immunol* June 1, 2015, 194 (11) 5446-5454; DOI: <https://doi.org/10.1093/immunol/1403012>