

Оценка содержания CD4+CD25+CD127low регуляторных Т-лимфоцитов и их функционального состояния по экспрессии молекул CTLA-4 и CD39 у больных ревматоидным артритом

Г.А. Жулай¹, Е.К. Олейник¹, О.Ю. Барышева²,
А.В. Чуров¹, В.М. Олейник¹, П.Н. Кравченко¹, А.А. Кучин²

¹ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН, Петрозаводск, Россия;
²ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»
Петрозаводск, Россия
¹185610, Петрозаводск, ул. Пушкина, 11;
²185910, Петрозаводск, ул. Ленина, 33

¹Institute of Biology, Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia;
²Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia
¹Pushkina Str., 11, Petrozavodsk, 185610 Russia;
²Lenina Str., 33, Petrozavodsk, 185910 Russia

Контакты: Галина Афанасьевна Жулай
zhgali-111@rambler.ru

Contacts:
Galina Zhulai
zhgali-111@rambler.ru

Поступила 16.09.13

Цель исследования — изучить содержание супрессорной популяции регуляторных Т-клеток (T_{рег}) по экспрессии молекул CD4, CD25, CD127, а также уровень экспрессии ими двух функциональных молекул (CTLA-4 и CD39) у больных ревматоидным артритом (РА).

Материал и методы. Исследованы 16 образцов периферической крови больных РА и 10 образцов крови здоровых доноров. Все больные получали терапию базисными противовоспалительными препаратами. Уровень экспрессии всех исследуемых молекул оценивался методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты исследования. Содержание Т-хелперов в периферической крови больных РА составило 36,3±7,1% от общего числа лимфоцитов и было ниже, чем в контроле (43,8±6,2%, p<0,05), а число активированных CD4+CD25+ Т-клеток у этих больных было увеличено в 2 раза (РА 23,7±9,8%, контроль 11,1±2,0% от числа CD4+ Т-клеток; p<0,05). Относительное количество CD4+CD25high (РА 2,7±1,0%, контроль 1,5±0,8%) и CD4+CD25highCD127low/- (РА 2,5±1,0%, контроль 1,6±0,9% от CD4+ Т-клеток) T_{рег}-клеток у больных РА было достоверно больше, чем у здоровых лиц (p<0,05). Экспрессия T_{рег}-клетками больных РА негативной регуляторной молекулы CTLA-4 и эктонуклеотидазы CD39 не отличалась от контроля.

Заключение. Проведенное исследование показало, что РА характеризуется повышенным содержанием T_{рег}-клеток фенотипов CD4+CD25high и CD4+CD25highCD127low, но не CD4+CD25+CD127low, а также схожей с контролем экспрессией T_{рег}-клетками функциональных молекул CTLA-4 и CD39.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; T_{рег}-клетки; CTLA-4; CD39.

Для ссылки: Жулай ГА, Олейник ЕК, Барышева ОЮ и др. Оценка содержания CD4+CD25+CD127low регуляторных Т-лимфоцитов и их функционального состояния по экспрессии молекул CTLA-4 и CD39 у больных ревматоидным артритом. Научно-практическая ревматология. 2014;52(2):169–173.

EVALUATION OF THE CONTENT OF CD4+CD25+CD127LOW REGULATORY T CELLS AND THEIR FUNCTIONAL STATUS ACCORDING TO THE EXPRESSION OF CTLA-4 AND CD39 MOLECULES IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

G.A. Zhulai¹, E.K. Oleinik¹, O.Yu. Barysheva², A.V. Churov¹, V.M. Oleinik¹, P.N. Kravchenko¹, A.A. Kuchin²

Objective. To study the content of the suppressor population of regulatory T cells (T_{reg}) according to the expression of CD4, CD25, CD127 molecules, as well as the expression of two functional molecules (CTLA-4 and CD39) in patients with rheumatoid arthritis (RA).

Material and methods. 16 samples of peripheral blood of RA patients and 10 blood samples of healthy donors were analyzed. All patients received disease-modifying anti-rheumatic drugs. The expression level of all studied molecules was assessed by flow cytometry.

Results. The content of T-helpers in peripheral blood of RA patients was 36.3 ± 7.1% of the total number of lymphocytes and was lower than that in the control (43.8 ± 6.2%, p<0.05). The number of activated CD4+CD25+ T cells in these patients increased twofold (RA 23.7 ± 9.8%, control 11.1 ± 2.0% of the number of CD4+ T cells, p<0.05). The relative amount of CD4+CD25high (RA 2.7 ± 1.0%, control 1.5 ± 0.8%) and CD4+CD25highCD127low/- (RA 2.5 ± 1.0%, control 1.6 ± 0.9% of CD4+ T cells) T_{reg} cells in RA patients was significantly higher than that in healthy individuals (p<0.05). The expression of the CTLA-4 negative regulatory molecule and CD39 ectonucleotidase by T_{reg} cells of RA patients did not differ from the control.

Conclusion. The study demonstrated that RA is characterized by an increased content of T_{reg} cells of CD4+CD25high and CD4+CD25highCD127low phenotypes rather than CD4+CD25+CD127low, as well as by the control-like expression of CTLA-4 and CD39 functional molecules by T_{reg} cells.

Keywords: rheumatoid arthritis; T_{reg} cells; CTLA-4; CD39.

Reference: Zhulai GA, Oleinik EK, Barysheva OYu, et al. Evaluation of the content of CD4+CD25+CD127low regulatory T cells and their functional status according to the expression of CTLA-4 and CD39 molecules in patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology Science and Practice. 2014;52(2):169–173.

DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2014-169-173>

Развитие иммунной патологии, в частности развитие аутоиммунных реакций, связано с нарушением Т-клеточной толерантности в организме. Особое место в этом вопросе отводится популяции CD4+ Т-лимфоци-

тов (Т-хелперы), которые играют важную роль в развитии воспаления и способны формировать с помощью хемокинов и цитокинов провоспалительное микроокружение. Регуляция иммунного ответа осуществляется

различными способами. Одним из них является активация отдельной группы Т-лимфоцитов – регуляторных Т-клеток (T_{per}). В норме они способствуют поддержанию иммунологической толерантности, подавляя иммунный ответ на аутоантигены. T_{per} -клетки представляют собой минорную супрессорную популяцию Т-лимфоцитов, которые для реализации своей функции используют различные механизмы: понижение костимуляции посредством экспрессии таких молекул, как антиген 4 цитотоксических лимфоцитов (CTLA-4) и ген активации лимфоцитов 3 (*LAG-3*); секреция противовоспалительных цитокинов (трансформирующий фактор роста β – ТФР β , интерлейкин 10 – ИЛ10, ИЛ35); перфорин-зависимая цитотоксичность. Также они могут способствовать продуцированию других иммуnoreгуляторных молекул, таких как галектин 1 или внеклеточный аденозин [1].

К настоящему времени установлено, что T_{per} -клетки вовлечены в патогенез аутоиммунных заболеваний, в частности ревматоидного артрита (РА). Эта патология определяется как заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся хроническим эрозивным артритом и системным воспалительным поражением внутренних органов [2]. Важная роль T_{per} -клеток в развитии этого заболевания установлена в 2003 г., когда М.Е. Morgan и соавт. [3] на экспериментальной модели коллаген-индуцированного артрита у мышей показали, что удаление $CD4+CD25+ T_{\text{per}}$ -клеток осложняет развитие воспаления. Изучение T_{per} -клеток у больных РА обнаружило их повышенное количество в очагах воспаления (в синовиальной жидкости пораженных суставов) [4]. Вместе с тем нет единого мнения о роли этих лимфоцитов в системном воспалении у больных РА, поскольку не ясна степень их активации на периферии. По данным разных исследователей, содержание T_{per} в периферической крови таких больных значительно варьирует [5, 6].

Описано несколько поверхностных и внутриклеточных антигенов для идентификации T_{per} -клеток. Для определения этой популяции лимфоцитов у человека чаще используют два фенотипа: $CD4+CD25^{\text{high}}$ и $CD4+CD25+CD127^{\text{low/-}}$. Причем если определение повышенной экспрессии α -цепи ИЛ2 (CD25) стало уже «классическим» способом идентификации T_{per} -клеток,

то молекулу CD127 (α -цепи рецептора ИЛ7) стали использовать для фенотипирования T_{per} -клеток после того, как было обнаружено, что ее экспрессия обратно пропорциональна экспрессии транскрипционного фактора FOXP3, отвечающего за их развитие и функционирование [7]. Поэтому целью настоящей работы являлась оценка содержания T_{per} -клеток в периферической крови больных РА по экспрессии молекул CD4, CD25, CD127, а также анализ экспрессии этими лимфоцитами функциональных молекул CTLA-4 и эктонуклеозид трифосфат дифосфогидролазы-1 (CD39).

Материал и методы

В работе было исследовано 16 образцов периферической крови больных РА (табл. 1). Диагноз РА устанавливался на основании критериев Американской коллегии ревматологов (ACR) 1987 г. Все больные получали терапию базисными противовоспалительными препаратами (метотрексат, сульфасалазин), часть больных получали глюкокортикоиды (37,5%) и нестероидные противовоспалительные препараты (37,5%). В качестве контроля исследованы образцы крови 10 здоровых доноров (см. табл. 1). Экспрессию молекул лимфоцитами оценивали методом проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с применением программного обеспечения CXP 2.0. Для определения T_{per} -клеток и экспрессии функциональных молекул были использованы моноклональные антитела: CD4-FITC, CD25-PC5, CD127-PC7, CTLA-4-PE, CD278-PE (Beckman Coulter, США) и CD39-PE (R&D Systems, США), а также соответствующие изотипические контроли. Для анализа внутриклеточной экспрессии CTLA-4 использовали реагент для пермеабилзации IntraPrep (Beckman Coulter, США). Достоверность различий между группами оценивали по критерию Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Экспрессия $CD4+$ Т-хелперами молекул CD25 и CD127 в периферической крови больных РА. Для оценки экспрессии молекул CD25 и CD127 популяцией $CD4+$ Т-лимфоцитов в исследуемых образцах периферической крови был проведен многоцветный цитометрический анализ. В результате обнаружено, что количество Т-хелперов в крови больных РА снижено по сравнению с контролем ($36,3 \pm 7,1$ и $43,8 \pm 6,2\%$ от общего числа лимфоцитов соответственно; $p < 0,05$). Однако у этих больных число активированных $CD4+$ Т-лимфоцитов, несущих на своей поверхности CD25, было увеличено в 2 раза по сравнению со здоровыми донорами ($23,7 \pm 9,8$ и $11,1 \pm 2,0\%$ от числа $CD4+$ Т-клеток соответственно; $p < 0,05$).

Содержание T_{per} -клеток с фенотипом $CD4+CD25^{\text{high}}$ у исследуемых больных было почти в 2 раза выше, чем в контроле (рис. 1).

Данные литературы о содержании этой популяции клеток в периферической крови больных РА сильно варьируют. Одни авторы утверждают, что число T_{per} -клеток при РА снижено по сравнению со здоровыми донорами [6], другие, напротив, наблюдают увеличение их количества [5]. Поэтому мы провели анализ T_{per} -клеток по фенотипу $CD4+CD25+CD127^{\text{low/-}}$, в результате которого достоверных отличий в содержании клеток с этим фенотипом у больных РА и у здоровых доноров не обнаружилось (см. рис. 1).

Таблица 1 Характеристика здоровых лиц и больных РА

Показатель	Здоровые доноры	Больные РА
Число обследованных	10	16
Средний возраст, годы, $M \pm SD$	$52,3 \pm 11$	$63,0 \pm 10$
Мужчины/женщины, n	3/7	3/13
Длительность заболевания, годы, $M \pm SD$	–	$7,4 \pm 6,2$
Серопозитивные по ревматоидному фактору, n (%)	–	14 (87,5)
Активность по DAS28, n (%):	–	
низкая		0
умеренная		8 (50)
высокая		8 (50)
Рентгенологическая стадия, n (%)	–	
I		1 (6,2)
II		5 (31,3)
III		8 (50)
IV		2 (12,5)
Системные проявления, n (%)	–	5 (31,3)

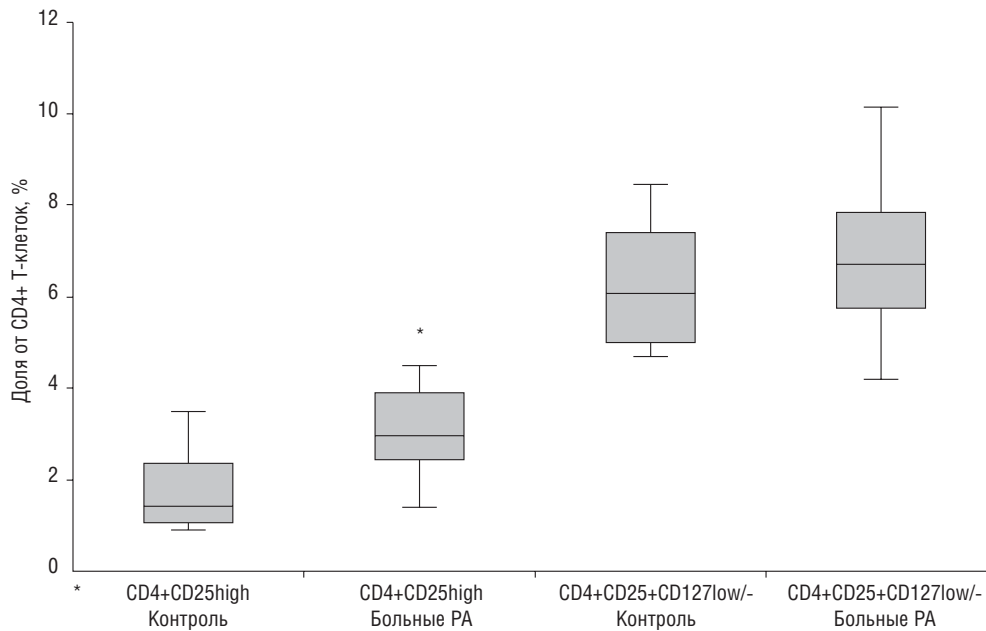


Рис. 1. Содержание T_{reg} -клеток (CD4+CD25high и CD4+CD25+CD127low/-) в периферической крови больных РА и здоровых доноров. Для рис. 1, 2 и табл. 2: * – $p < 0,05$

Исследования по использованию молекулы α -цепи рецептора к ИЛ7 для идентификации T_{reg} -клеток ранее проводились в группах здоровых доноров [7, 8], и, возможно, в условиях воспаления, связанных с РА, будет иметь место иная картина. Поэтому при анализе содержания T_{reg} -клеток наряду с экспрессией CD127 нами учитывалась и повышенная экспрессия CD25. В результате иммунофенотипирования лимфоцитов таким способом было обнаружено, что в образцах периферической крови исследуемых групп существуют достоверные различия в количестве T_{reg} -клеток с фенотипом CD4+CD25highCD127low/-, которых у больных РА было в 1,5 раза больше (рис. 2).

Изменения содержания популяций CD4+CD25+CD127low/- и CD4+CD25highCD127low/- T -клеток у больных РА отмечали и другие авторы [9, 10].

Оценка экспрессии CD4+ T -лимфоцитами функциональных молекул регуляторных T -клеток CTLA-4 и CD39. В литературе сообщается, что развитие РА может сопровождаться изменением количества и функций T_{reg} -клеток, отмечаются нарушения в механизмах подавления ими аутореактивных лимфоцитов [11]. Поэтому в образцах крови исследуемых групп нами была рассмотрена экспрессия двух молекул, участвующих в клеточных ингибиторных механизмах и важных для супрессорной функции T_{reg} -клеток: CTLA-4 и эктонуклеотидазы CD39.

CTLA-4 является негативной регуляторной молекулой, которая, взаимодействуя с молекулами семейства B7 на поверхности клетки-мишени, снижает ее активацию и препятствует дальнейшей пролиферации и функционированию. О принадлежности CTLA-4 к механизмам супрессии T_{reg} -клеток свидетельствуют ее конститутивная экспрессия этими клетками, а также эффект моноклональных антител к CTLA-4, которые устраняют подавление пролиферации эффекторных T -клеток *in vitro*.

Экспрессия молекулы CTLA-4 T -хелперами периферической крови больных РА была невысока и не отлича-

лась от контроля (табл. 2). Кроме того, и T_{reg} -клетки больных экспрессировали CTLA-4 на том же уровне, что и T_{reg} -клетки здоровых доноров. Однако лимфоциты с фенотипом CD4+CD25high экспрессировали CTLA-4 интенсивнее, чем CD25+ T -лимфоциты, независимо от коэкспрессии молекулы CD127.

Другая молекула, свойственная T_{reg} -клеткам, — эктонуклеотидаза CD39, которая совместно с экто-5'-нуклеотидазой CD73 участвует во внеклеточном катаболизме аденозинтрифосфата/аденозинмонофосфата (АТФ/АМФ), продуцируя аденозин, оказывающий супрессорное воздействие на T -лимфоциты [12]. Молекула CD39 важна для реализации супрессорной функции T_{reg} -клеток, что было показано на модели CD39-/-

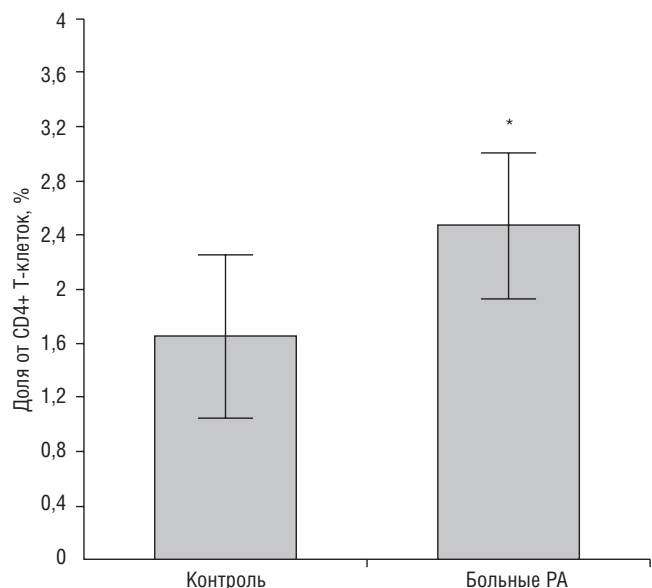


Рис. 2. Содержание CD4+CD25highCD127low/- T -лимфоцитов в периферической крови больных РА и здоровых доноров

Таблица 2 Уровень экспрессии молекул CTLA-4 и CD39 CD4+ Т-лимфоцитами

Фенотип лимфоцитов	Экспрессия CTLA-4		Экспрессия CD39	
	здоровые доноры	больные РА	здоровые доноры	больные РА
CD4+	7,75±1,5	6,94±0,9	6,15±2,9	12,8±6,7*
CD4+CD25+	69,8±8,4	70,9±11,9	36,8±9	42,19±13,2
CD4+CD25high	95,6±2,9	90,76±7,0	69,8±10,8	68,92±16,7
CD4+CD25+CD127low/-	70,2±11,5	71,49±12,7	73,15±11,4	76,11±14,4
CD4+CD25highCD127low/-	94,55±2,8	90,78±7,1	66,4±10,0	68,20±18,2

Примечание. Результаты представлены в виде М±SD. Уровень экспрессии молекул для CD4+ Т-клеток выражен как процент от общего числа лимфоцитов, остальные фенотипы рассматривались как процент от числа CD4+ Т-клеток.

мышей. Выделенные из крови таких животных T_{per} -клетки имели ослабленную способность к супрессии *in vitro* и не могли препятствовать отторжению трансплантата *in vivo* [13]. Проведенный нами анализ экспрессии молекулы CD39 на поверхности CD4+ Т-лимфоцитов показал, что содержание CD4+CD39+ клеток в крови больных РА достоверно увеличено по сравнению с контролем (см. табл. 2). Клетки с фенотипом T_{per} продуцировали почти вдвое большее количество эктонуклеотидазы, чем активированные Т-хелперы, как у здоровых лиц, так и у больных. Однако среди Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD39, число T_{per} -клеток у больных было на уровне контроля. Различия в уровне экспрессии CD39 внутри популяции CD4+ Т-хелперов были обнаружены у нерегуляторных CD4+CD25- Т-клеток (больные РА 29,8±10,9% и здоровые 17,1±4,5% от числа CD4+ Т-клеток; $p<0,05$). Возможно, это свидетельствует о том, что вклад T_{per} -клеток рассматриваемых нами фенотипов в общую продукцию внеклеточного аденозина посредством экспрессии эктонуклеотидазы CD39 у больных РА ярко не выражен.

Обсуждение

Аутоиммунные заболевания сопровождаются нарушением иммунологической толерантности, в формировании которой особая роль принадлежит популяции T_{per} -клеток. Поэтому некоторые авторы связывают патогенез аутоиммунных расстройств с недостаточностью T_{per} -лимфоцитов [14]. Однако имеются противоречивые данные об уровне активации этих клеток РА [5, 6, 10]. Полученные в ходе проведенной нами работы результаты свидетельствуют в пользу увеличения содержания T_{per} -клеток в периферической крови больных РА. Это было продемонстрировано с использованием фенотипов CD4+CD25high и CD4+CD25highCD127low/-, но не CD4+CD25+CD127low/-. Проводя иммунофенотипирование T_{per} -лимфоцитов по последнему фенотипу, мы не обнаружили различий в содержании этих клеток у больных и здоровых лиц. Можно предположить, что группа клеток с таким фенотипом включает активированные Т-хелперы. А это в свою очередь препятствует точному определению содержания T_{per} -клеток у больных с чрезмерным иммунным ответом. Так, N.E. Aerts и соавт. [9], исследуя состояние людей с этой патологией, на основе оценки экспрессии FOXP3 и анализа иммунной супрессии показали, что не все CD4+CD25+CD127low/- Т-лимфоциты проявляют свойства T_{per} -клеток. Часть этих клеток были негативны по FOXP3 и не могли подавлять пролиферацию аутологичных Т-лимфоцитов *in vitro*. По мнению авторов, такие клетки представляют собой

активированные CD4+ Т-лимфоциты, и у больных с острым воспалением их содержание повышается.

T_{per} -клетки подавляют активацию и пролиферацию других иммунокомпетентных клеток посредством различных механизмов, включая продукцию молекул CTLA-4 или CD39. Оценка функционирования T_{per} -клеток по анализу экспрессии этих молекул показала, что T_{per} -клетки больных РА и здоровых доноров имеют схожий уровень экспрессии как ингибирующей молекулы CTLA-4, так и эктонуклеотидазы CD39.

В ходе исследования было отмечено, что клетки с фенотипом нерегуляторных Т-лимфоцитов (CD25low/-) экспрессировали CTLA-4 очень слабо. Проанализировав экспрессию CTLA-4 в популяции CD4+ Т-лимфоцитов, различающихся поверхностной экспрессией CD25 и CD127, мы обнаружили, что CD25-CD127+CTLA-4+ Т-клеток у больных РА было почти в 2 раза больше, чем у здоровых лиц (соответственно 6,81±3,3 и 3,77±1,0% от числа CD4+ Т-клеток, $p<0,05$). R.M. Dunham и соавт. [14], изучая CD4+ Т-лимфоциты у здоровых доноров и у инфекционных больных на основе экспрессии молекул CD45RA, L-селектина (CD62L), маркеров активации HLA-DR и Ki-67, определили популяцию Т-хелперов, на мембранной поверхности которых присутствует CD127 и нет CD25, как наивные или центральные Т-клетки памяти. Возможно, обнаруженные нами клетки представляют собой Т-клетки памяти, которые находятся на поздней стадии активации. Так как экспрессия ингибиторной молекулы CTLA-4 увеличивается после активации, чтобы обеспечить подавление пролиферации эффекторной клетки, что рассматривается как механизм саморегуляции иммунного ответа [16]. Повышенное содержание таких лимфоцитов может свидетельствовать об активно протекающем иммунном ответе в организме, что характерно для аутоиммунной патологии.

При анализе экспрессии молекулы CD39 было показано, что у больных РА количество CD39+ Т-лимфоцитов выше, чем у здоровых лиц. Повышенный уровень экспрессии эктонуклеотидазы, скорее всего, не связан с изменением функционирования регуляторных Т-лимфоцитов, поскольку CD4+CD25high Т-клетки экспрессировали ее на уровне контроля. Увеличение CD39 на поверхности Т-лимфоцитов больных может быть связано с действием метотрексата, который является базисным противовоспалительным препаратом для больных РА. В литературе отмечается, что противовоспалительное действие метотрексата в низких дозах может быть связано с продукцией внеклеточного аденозина. Этот препарат способствует накоплению адениновых нук-

леотидов и аденозина внутри клетки и их последующему выходу во внеклеточное пространство, где они дефосфорилируются до аденозина эктонуклеотидазами [12], что может объяснять наблюдаемый нами повышенный уровень экспрессии CD39 Т-хелперами, но не Т_{рег}-клетками.

Заключение

Таким образом, в результате проведенной работы было обнаружено, что, с одной стороны, в крови больных РА содержится повышенное количество CD4⁺CD25^{high} и CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}/- Т_{рег}-клеток. С другой стороны, экспрессия исследуемых функциональных молекул в этой популяции не была увеличена и оставалась на уровне здоровых доноров. Исходя из этого можно предположить, что существует функциональная недостаточность Т_{рег}-лимфоцитов больных РА, связанная с экспрессией молекул CTLA-4 и CD39, однако активация других молеку-

лярных механизмов Т_{рег} приводит к развитию супрессии, что требует дальнейшего изучения.

Прозрачность исследования

Исследование проводилось при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проекты № 14.132.21.1339 и № 4.6221.2011), РФФИ (проект № 13-04-98826), а также программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет». Исследователи несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции и дизайна исследования и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за исследование.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shevach EM. Mechanisms of Foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009 May;30(5):636–45.
2. Насонов ЕЛ, Насонова ВА, редакторы. Ревматология: Национальное руководство. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2008. [Nasonov EL, Nasonova VA, editors. *Revmatologiya: Natsional'noe rukovodstvo* [Rheumatology: National management]. Moscow: GEOTAR-Media; 2008.
3. Morgan ME, Suttmuller RP, Witteveen HJ, et al. CD25⁺ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003 May;48(5):1452–60. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.11063>.
4. Möttönen M, Heikkinen J, Mustonen L, et al. CD4⁺ CD25⁺ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2005 May;140(2):360–7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02754.x>.
5. Han GM, O'Neil-Andersen NJ, Zurier RB, Lawrence DA. CD4⁺CD25^{high} T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol*. 2008 May-Jun;253(1–2):92–101. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.05.007>.
6. Kim JR, Chae JN, Kim SH, Ha JS. Subpopulations of regulatory T cells in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and Behcet's disease. *J Korean Med Sci*. 2012 Sep;27(9):1009–13. DOI: <http://dx.doi.org/10.3346/jkms.2012.27.9.1009>.
7. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*. 2006 Jul 10;203(7):1693–700. DOI: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20060468>.
8. Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM. Human CD4⁺ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127) allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods*. 2007 Jan 30;319(1–2):41–52. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2006.10.008>.
9. Aerts NE, Dombrecht EJ, Ebo DG, et al. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cell Immunol*. 2008 Feb;251(2):109–15. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.04.008>.
10. Kawashighri SY, Kawakami A, Okada A, et al. CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}/-T_{рег} cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2011 Dec;38(12):2517–21. DOI: <http://dx.doi.org/10.3899/jrheum.110283>.
11. Flowres-Borja F, Jury EC, Mauri C, Ehrenstein MR. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Dec 9;105(49):19396–401. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0806855105>.
12. Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Sep;7(9):759–70. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2638>.
13. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1257–65. DOI: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20062512>.
14. Dunham RM, Cervasi B, Brenchley JM, et al. CD127 and CD25 expression defines CD4⁺ T cell subsets that are differentially depleted during HIV infection. *J Immunol*. 2008 Apr 15;180(8):5582–92.
15. Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2010 Dec;10(12):849–59. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2889>.
16. Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev*. 2008 Aug;224:166–82. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00662.x>.