

Взаимосвязь FoxP3+ регуляторных Т-клеток с активностью заболевания и уровнем антител при раннем ревматоидном артрите

Авдеева А.С.¹, Рубцов Ю.П.², Дыйканов Д.Т.², Попкова Т.В.¹, Насонов Е.Л.^{1,3}

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва, Россия; ²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», кафедра биохимии и молекулярной медицины факультета фундаментальной медицины; ³ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, кафедра ревматологии Института профессионального образования, Москва, Россия 115522 Москва, Каширское шоссе, 34А; ¹119192 Москва, Ломоносовский проспект, 31, корп. 5; ¹119991 Москва, ул. Трубетцкая, 8, стр. 2

¹V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia; ²Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Fundamental Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University; ³Department of Rheumatology, Institute of Professional Education, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia ³34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522; ³31, Lomonosovsky Prospect, Build. 5, Moscow 119192; ³8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991

Контакты: Анастасия Сергеевна Авдеева; 9056249400@mail.ru

Contact: Anastasia Avdeeva; 9056249400@mail.ru

Поступила 27.02.17

Цель – проанализировать взаимосвязь количества FoxP3+ регуляторных Т-клеток (T_{reg}) с клинико-лабораторными показателями активности заболевания и уровнем антител в группе пациентов с ранним ревматоидным артритом (РА).

Материал и методы. В исследование были включены 45 не получавших ранее терапии метотрексатом пациентов с ранним РА (критерии ACR/EULAR 2010 г.), в том числе 39 женщин; медиана возраста составила 52,0 [32,5; 57,5] года, длительность заболевания – 5 [4; 6] мес, DAS28 – 5,01 [4,18; 5,8]; 71,1% больных были позитивны по ревматоидному фактору (РФ) и 88,9% позитивны по антителам к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП). Относительное и абсолютное количество T_{reg} (FoxP3+CD25+; CD152+surface; CD152+intracellular; FoxP3+CD127-; CD25+CD127-; FoxP3+ICOS+; FoxP3+CD154+; FoxP3+CD274+) определялось методом иммунофлюоресцентного окрашивания и многоцветной проточной цитофлюориметрии. Контрольную группу составили 20 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными.

Результаты и обсуждение. У 22 (48,9%) больных была высокая, у 20 (44,4%) – умеренная и у 3 (6,7%) – низкая активность патологического процесса по DAS28. У пациентов с ранним РА, по сравнению со здоровыми донорами, отмечалось более низкое процентное количество (ПК) FoxP3+CD25+ клеток, ПК и абсолютное содержание (абс.) FoxP3+ICOS+ клеток, ПК и абс. FoxP3+CD154+ и FoxP3+CD274+ Т-клеток; $p < 0,05$ во всех случаях. Регистрировалась отрицательная корреляционная взаимосвязь: ПК FoxP3+CD25+ с С-реактивным белком (СРБ) ($r = -0,4$); ПК CD152+intracellular с DAS28 ($r = -0,35$), СОЭ ($r = -0,46$), СРБ ($r = -0,54$); ПК FoxP3+CD127- с СРБ ($r = -0,42$); ПК CD25+CD127- с DAS28 ($r = -0,38$), SDAI ($r = -0,41$), CDAI ($r = -0,36$), СОЭ ($r = -0,39$), СРБ ($r = -0,47$); $p < 0,05$ во всех случаях.

Среди серонегативных по РФ больных была выявлена более высокая ПК CD25+CD127-, ПК и абс. Foxp3+CD154+ и Foxp3+CD274+ Т-лимфоцитов.

Заключение. Представленные данные позволяют говорить о снижении количества и функциональной активности T_{reg} при раннем РА, что ассоциируется с более высокой активностью заболевания, наличием системных проявлений болезни, а также сопровождается гиперпродукцией антител.

Ключевые слова: ранний ревматоидный артрит; активность заболевания; аутоантитела; регуляторные Т-лимфоциты.

Для ссылки: Авдеева АС, Рубцов ЮП, Дыйканов ДТ и др. Взаимосвязь FoxP3+ регуляторных Т-клеток с активностью заболевания и уровнем антител при раннем ревматоидном артрите. Научно-практическая ревматология. 2017;55(3):245–251.

THE RELATIONSHIP OF FoxP3+ T REGULATORY CELLS TO DISEASE ACTIVITY AND ANTIBODY LEVELS IN EARLY RHEUMATOID ARTHRITIS

Avdeeva A.S.¹, Rubtsov Yu.P.², Dyikanov D.T.², Nasonov E.L.^{1,3}

Objective: to analyze the relationship of the count of FoxP3+ T regulatory cells (T_{regs}) to the clinical and laboratory parameters of disease activity and the levels of antibodies in a group of patients with early rheumatoid arthritis (RA).

Subjects and methods. The investigation enrolled 45 patients with early RA (2010 ACR/EULAR criteria) who had not previously received treatment with methotrexate, including 39 women; median age was 52.0 [32.5; 57.5] years; disease duration, 5 [4; 6] months, DAS28 5.01 [4.18; 5.8]; 71.1% of the patients were rheumatoid factor (RF) positive and 88.9% were anti-cyclic citrullinated peptide positive. The relative and absolute counts of T_{reg} (FoxP3+CD25+; CD152+surface; CD152+intracellular; FoxP3+CD127-; CD25+CD127-; FoxP3+ICOS+; FoxP3+CD154+; FoxP3+CD274+) were measured by immunofluorescence staining and multicolor flow cytometry. A control group consisted of 20 healthy donors who were matched for sex and age with the examined patients.

Results and discussion. DAS28 was high, moderate, and low in 22 (48.9%), 20 (44.4%), and 3 (6.7%) patients, respectively. As compared with the healthy donors, the patients with early RA were observed to have lower values in the percentage of FoxP3+CD25+ cells, in the percentage and absolute count of FoxP3+ICOS+ cells, in the percentage and absolute count of FoxP3+CD154+ and FoxP3+CD274+ T cells; $p < 0.05$ in all cases.

Negative correlation was recorded between the percentage of FoxP3+CD25+ and C-reactive protein (CRP) ($r = -0.4$); that of CD152+intracellular and DAS28 ($r = -0.35$), ESR ($r = -0.46$), CRP ($r = -0.54$); that of FoxP3+CD127 and CRP ($r = -0.42$); that of CD25+CD127 and DAS28 ($r = -0.38$), SDAI ($r = -0.41$), CDAI ($r = -0.36$), ESR ($r = -0.39$), CRP ($r = -0.47$); $p < 0.05$ in all cases.

The patients who were seronegative for RF were found to have higher values in the percentage of CD25+CD127, in the percentage and absolute count of Foxp3+CD154+ and Foxp3+CD274+ T lymphocytes.

Conclusion. The given data may indicate that the count and functional activity of T_{reg} were decreased in early RA, which is associated with higher disease activity, the systemic manifestations of the disease and which is also accompanied by antibody hyperproduction.

Key words: early rheumatoid arthritis; disease activity; autoantibodies; T regulatory lymphocytes.

For reference: Avdeeva AS, Rubtsov YuP, Dyikanov DT et al. The relationship of FoxP3+ T regulatory cells to disease activity and antibody levels in early rheumatoid arthritis. Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice. 2017;55(3):245–251 (In Russ.).

doi: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2017-245-251>

FoxP3+ регуляторные Т-клетки (T_{рег}) играют ключевую роль в иммунной системе благодаря подавлению гипериммунного ответа в отношении аутоантигенов, а также кишечных условно-патогенных микроорганизмов [1, 2]. В последние годы получены данные о способности T_{рег} подавлять различные иммуновоспалительные реакции в ответ на широкий спектр физиологических и патологических стимулов, включая микроорганизмы, опухолевые клетки, аллогенные трансплантаты, клетки плода, а также при ожирении и атеросклеротическом поражении сосудов [2, 3]. Впервые эта роль была продемонстрирована у мышей, которые вследствие генетического дефекта с рождения лишены T_{рег}, что приводило к развитию аутоиммунного гастрита, тиреоидита, диабета и воспалительных заболеваний кишечника [4]. Впоследствии во многих исследованиях было показано, что дефекты в CD4+CD25+Foxp3+ T_{рег} способствуют развитию аутоиммунных заболеваний и что эти процессы можно предотвратить путем трансплантации функциональных T_{рег} от здоровых животных больным [5]. Ведущую роль CD4+CD25+FOXp3+ Т-клеток в контроле иммунологической толерантности к собственным антигенам наглядно иллюстрируют врожденные наследственные заболевания человека, вызываемые мутациями в гене *FOXP3* и проявляющиеся в развитии летального синдрома IPEX (Immunodysregulation, Polyendocrinopathy and Enteropathy, X-Linked), характеризующегося сахарным диабетом 1-го типа, тиреоидитом, тяжелой аллергией и воспалительным поражением кишечника, которые сочетаются с цитокиновым «штормом» [6].

По современным представлениям, ключевую роль в развитии синовиального воспаления и суставной деструкции при ревматоидном артрите (РА) играют активированные CD4+ Т-лимфоциты. Распознавание аутоантигенов этими клетками способствует активации В-лимфоцитов и макрофагов, а также усиливает продукцию цитокинов [7–10]. В настоящее время выделяют несколько субпопуляций эффекторных CD4+ Т-хелперов (Th), которые различаются в зависимости от набора продуцируемых ими цитокинов и спектра клеток-мишеней. Th1-клетки ответственны за клеточный иммунитет и участвуют в патогенезе аутоиммунных заболеваний, Th2-клетки – поддерживают гуморальный иммунитет и, наряду с регуляцией иммуни-

тета к паразитам (гельминтам и простейшим), вовлечены в развитие аллергических заболеваний. Th17-клетки обладают наиболее выраженным провоспалительным потенциалом и имеют ведущее значение в развитии коллаген-индуцированного артрита и ряда других экспериментальных аутоиммунных заболеваний у лабораторных животных [11]. Негативную регуляцию Th1-, Th2- и Th17-лимфоцитов осуществляют T_{рег}.

В настоящее время в литературе представлено большое количество работ, посвященных оценке уровня и фенотипа T_{рег} при РА как в периферическом кровотоке, так и в синовиальной жидкости [12–26], однако полученные в них данные весьма противоречивы и требуют дальнейшего уточнения. Полагают, что количественный дефект CD4+CD25+Foxp3+CD127- регуляторных клеток особенно характерен для раннего РА и ассоциируется с риском развития РА у бессимптомных пациентов, позитивных по антителам к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП) [27, 28].

Целью нашей работы являлась оценка взаимосвязи количества T_{рег} с активностью заболевания и уровнем антител у пациентов с ранним РА.

Материал и методы

В исследование было включено 45 пациентов с ранним РА, соответствующим критериям Американской коллегии ревматологов / Европейской антиревматической лиги (ACR/EULAR) 2010 г., наблюдавшихся в ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой в период с 2014 по 2016 г. Общая клинико-иммунологическая характеристика больных представлена в табл. 1. Как следует из таблицы, большинство больных были женского пола, среднего возраста, с ранней и очень ранней стадией заболевания (медиана длительности болезни составила 5 [4; 6] мес), серопозитивные по IgM ревматоидному фактору (РФ) и АЦЦП, имели высокую активность воспалительного процесса, I или II рентгенологическую стадию, I функциональный класс, до включения в исследование пациенты не получали базисных противовоспалительных препаратов (БПВП) и глюкокортикоидов. Всем больным в качестве первого БПВП был назначен метотрексат (МТ) в подкожной форме (методжект) в начальной дозе 10 мг/нед.

Определение СОЭ осуществляли стандартным международным методом по Вестергрену (норма ≤30 мм/ч). Сывороточную концентрацию С-реактивного белка (СРБ) и IgM РФ измеряли иммунофлуориметрическим методом на анализаторе BN ProSpec (Siemens, Германия). Нормальный уровень СРБ в сыворотке крови составлял ≤5,0 мг/л. По инструкции фирмы-изготовителя за верхнюю границу нормы IgM РФ была принята концентрация, равная 15,0 МЕ/мл. Количественное определение АЦЦП в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческого набора реагентов (Axis-Shield, Великобритания; верхняя граница нормы – 5,0 Ед/мл).

Мононуклеарные клетки выделяли из цельной крови в градиенте плотности фикола, затем окрашивали на различные поверхностные и внутриклеточные маркеры (FoxP3+CD25+; CD152+surface; CD152+intracellular; FoxP3+CD127-; CD25+CD127-; FoxP3+ICOS+; FoxP3+CD154+; FoxP3+CD274+), фиксировали и анализировали методом многоцветной проточной цитофлюо-

Таблица 1 Общая клинико-иммунологическая характеристика пациентов, включенных в исследование (n=45)

Показатель	Значение
Пол, мужчины/женщины, n	6/39
Возраст, годы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	52,0 [32,5; 57,5]
Длительность заболевания, мес, Ме [25-й; 75-й перцентили]	5 [4; 6]
Рентгенологическая стадия РА, I/II/III/IV, n (%)	21 (46,7)/24 (53,3)/0/0
DAS28, Ме [25-й; 75-й перцентили]	5,01 [4,18; 5,8]
СОЭ, мм/ч, Ме [25-й; 75-й перцентили]	36,0 [18,0; 54,0]
СРБ, мг/л, Ме [25-й; 75-й перцентили]	12,1 [2,9; 37,4]
IgM РФ, МЕ/мл, Ме [25-й; 75-й перцентили]	94,5 [17,8; 186,0]
Число РФ-позитивных, n (%)	34 (75,6)
АЦЦП, Ед/мл, Ме [25-й; 75-й перцентили]	105,0 [42,5; 230,6]
Число АЦЦП-позитивных, n (%)	40 (88,9)

риметрии на анализаторе BD LSR Fortessa (Becton Dickinson). Контрольную группу составили 20 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными пациентами. Нормальные значения различных субпопуляций $T_{рег}$ в крови здоровых доноров составили: процентное количество (ПК) FoxP3+CD25+ от 3,7 до 9,8%, абсолютное содержание (абс.) от 0,03 до 0,11 на $10^9/л$; ПК CD152+surface – 0,13–4,9%, абс. – 0,00006–0,0018 на $10^9/л$; ПК CD152+intracellular – 36,3–89,8%, абс. – 0,00003–0,00108 на $10^9/л$; ПК FoxP3+CD127- – 3,2–8,5%, абс. – 0,03–0,096 на $10^9/л$; ПК CD25+CD127- – 3,9–9,7%, абс. – 0,03–0,09 на $10^9/л$; ПК FoxP3+ICOS+ – 7,0–27,5%, абс. – 0,002–0,019 на $10^9/л$; ПК FoxP3+CD154+ – 0,39–3,25%, абс. – 0,0001–0,0019 на $10^9/л$; ПК FoxP3+CD274+ – 0,47–3,43%, абс. – 0,00016–0,00334 на $10^9/л$.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft, США), включая общепринятые методы параметрического и непараметрического анализа. Для параметров, распределение которых отличалось от нормального, при сравнении двух групп использовали критерий Манна–Уитни, а при сравнении трех и более групп – критерий Краскела–Уоллиса, результаты представлены в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом [25-й; 75-й перцентили]. Корреляционный анализ проводился по методу Спирмена. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Среди включенных в исследование больных медиана DAS28 составила 5,01 [4,2; 5,8], при этом у 22 (48,9%) пациентов регистрировалась высокая, у 20 (44,4%) – умеренная и у 3 (6,7%) – низкая активность патологического процесса. Медиана SDAI составила 22,8 [17,0; 28,7] и CDAI – 20,0 [15,0; 26,0]. Повышенный уровень СРБ регистрировался у 30 (66,7%), а СОЭ – у 26 (57,8%) больных.

В группе раннего РА, по сравнению со здоровыми донорами, регистрировалось более низкое ПК FoxP3+CD25+ клеток (5,53 [4,09; 6,48] и 6,92 [5,84; 7,96]%), ПК и абс. FoxP3+ICOS+ клеток (6,91 [2,14; 11,47] и 10,83 [9,27; 13,71]%; 0,0035 [0,0013; 0,0067] и 0,0068 [0,0039; 0,009] $10^9/л$), ПК и абс. FoxP3+CD154+ клеток (0,47 [0,19; 0,83] и 1,51 [1,12; 2,08]%; 0,0002 [0,00009; 0,0005] и 0,00087 [0,00047; 0,0014] $10^9/л$) и FoxP3+CD274+ Т-клеток (0,63 [0,34; 1,49] и 1,94 [1,16; 2,25]%; 0,0003 [0,0002; 0,00065] и 0,001 [0,0006; 0,0016] $10^9/л$; $p < 0,05$ во всех случаях).

Была установлена положительная корреляционная взаимосвязь между: ПК CD4+ и CDAI ($r=0,4$; $p=0,04$), абс. CD4+ и CDAI ($r=0,4$; $p=0,03$), HAQ ($r=0,46$; $p=0,04$). Регистрировалась отрицательная корреляционная взаимосвязь между: ПК FoxP3+CD25+ и СРБ ($r=-0,5$; $p=0,026$), ПК CD152+intracellular и СРБ ($r=-0,53$; $p=0,023$), ПК FoxP3+CD127- и СРБ ($r=-0,65$; $p=0,02$), ПК CD25+CD127- и DAS28 ($r=-0,64$; $p=0,016$), ПК CD25+CD127- и SDAI ($r=-0,6$; $p=0,03$), ПК CD25+CD127- и CDAI ($r=-0,6$; $p=0,03$), ПК CD25+CD127- и СОЭ ($r=-0,59$; $p=0,032$), ПК CD25+CD127- и СРБ ($r=-0,63$; $p=0,02$).

Затем все пациенты были разделены на две группы в зависимости от исходной активности патологического процесса: первую группу составили больные с высокой

воспалительной активностью: (DAS28 $>5,1$, SDAI >26 , CDAI >22), а вторую – с умеренной и низкой. Среди пациентов первой группы регистрировалось более низкое ПК CD25+CD127- $T_{рег}$ по сравнению с больными второй группы (5,1 [4,9; 5,6] и 6,9 [6,4; 7,9]; $p < 0,05$; рис. 1). Также мы оценили различия в уровнях $T_{рег}$ у пациентов с РА в зависимости от наличия системных проявлений заболевания. При наличии системных проявлений РА ($n=7$) регистрировалось более низкое ПК FoxP3+CD127- клеток (4,23 [2,76; 5,4] и 6,4 [4,9; 7,3]) и CD25+CD127- клеток (5,05 [3,52; 5,1] и 6,63 [5,6; 7,9]); $p < 0,05$ во всех случаях; рис.2).

Среди пациентов, включенных в исследование, преобладали больные, позитивные по РФ и/или АЦЦП. У большинства пациентов – 31 (68,9%) – выявлялись повышенные уровни и РФ, и АЦЦП, 8 (17,8%) – были позитивны по АЦЦП и негативны по РФ и 4 (8,8%) – негативны по РФ и АЦЦП. Мы проанализировали уровни субпопуляции $T_{рег}$ у пациентов в зависимости от различного спектра антител в сыворотке крови. Среди серонегативных по РФ больных было выявлено более высокое ПК CD25+CD127-, ПК и абс. Foxp3+CD154+ и Foxp3+CD274+ Т-лимфоцитов (табл. 2, рис. 3). Достоверной разницы между группами, позитивными и негативными по АЦЦП, выявлено не было, вероятно, в связи с малым числом негативных по АЦЦП больных.

Также была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь между уровнем IgM РФ и ПК Foxp3+CD274+ Т-лимфоцитов ($r=-0,4$; $p=0,003$).

Обсуждение

При анализе уровня $T_{рег}$ нами было выявлено снижение ПК CD4+FoxP3+CD25+ $T_{рег}$ в группе пациентов с ранним РА по сравнению со здоровыми донорами. В литературе представлены противоречивые данные об уровне $T_{рег}$ в синовиальной жидкости и периферической крови при РА. В подавляющем большинстве исследований указывается на увеличение содержания $T_{рег}$ в синовиальной

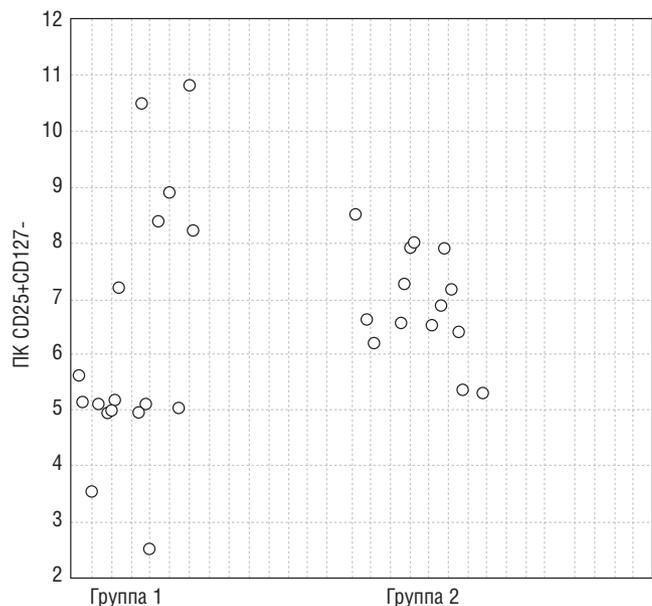


Рис. 1. Относительное количество CD25+CD127- Т-лимфоцитов в группах пациентов в зависимости от активности заболевания

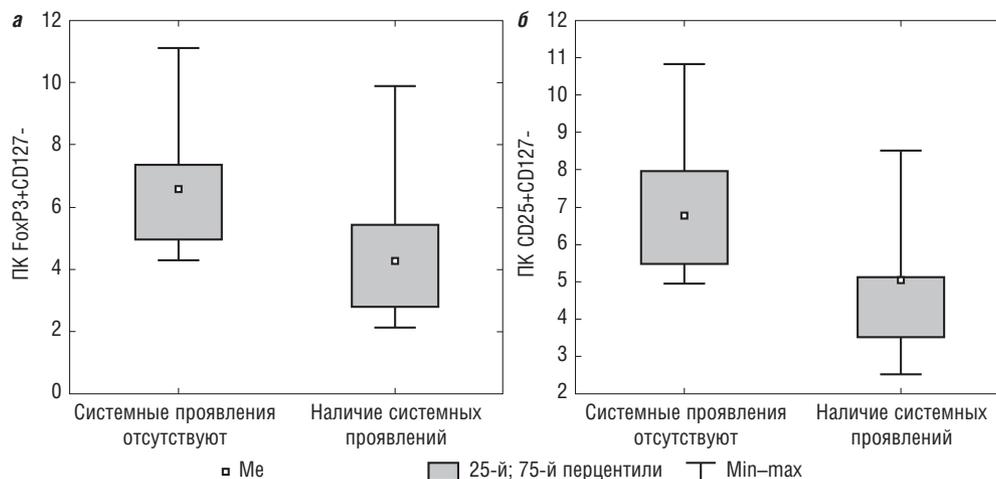


Рис. 2. ПК FoxP3+CD127- клеток (а) и CD25+CD127- клеток (б) в группах больных в зависимости от наличия системных проявлений заболевания

жидкости пациентов с РА [12–20], однако данные об уровне данной клеточной субпопуляции в периферической крови противоречивы. Выявлено как уменьшение ПК циркулирующих T_{reg} [13, 18, 21, 22], так и его увеличение [14, 23] или отсутствие отличий по уровню T_{reg} клеток от здоровых доноров [12, 15, 16, 20, 23–26] или пациентов с остеоартритом [19]. Вероятно, подобное несоответствие связано со сложностью в выделении данной клеточной субпопуляции из общего пула Т-лимфоцитов в связи с отсутствием универсального поверхностного маркера T_{reg} . В более ранних исследованиях T_{reg} определяли как CD4+CD25+ лимфоциты и не оценивали экспрессию FoxP3 [12–16, 26]; G. Нап и соавт. [23] отметили, что среди CD25+ клеток встречаются FoxP3- Т-лимфоциты, которые не являются регуляторными; вероятно,

с этим может быть связано завышенное количество T_{reg} в периферической крови при РА, продемонстрированное в ряде исследований. Как уже отмечалось выше, уровень T_{reg} в синовиальной жидкости пациентов с РА значительно повышен; также многочисленные публикации продемонстрировали сохранение супрессорного эффекта данных клеток *in vitro*, тем не менее воспалительная среда сустава может заметно снижать их активность. При этом на экспериментальных моделях, а также у пациентов с ревматическими заболеваниями была продемонстрирована потеря способности T_{reg} ингибировать синтез интерлейкина 6 (ИЛ6) и интерферона γ (ИФН γ) эффекторными клетками при сохранении способности ограничивать их пролиферацию [29, 30]. Рядом авторов представлены данные о резистентности эффекторных клеток ($T_{эфф}$) при РА

Таблица 2 Уровни субпопуляций T_{reg} у серопозитивных и серонегативных по IgM РФ больных, Me [25-й; 75-й перцентили]

Субпопуляции T_{reg}	Серопозитивные по IgM РФ пациенты (n=32)	Серонегативные по IgM РФ пациенты (n=13)	P
ПК CD4+	46,6 [38,9; 49,4]	39,9 [30,1; 45,1]	Нд
абс. CD4+ на 10 ⁹ /л	0,9 [0,69; 1,1]	0,6 [0,4; 0,9]	Нд
ПК FoxP3+CD25+	5,5 [4,6; 6,9]	6,02 [4,01; 6,9]	Нд
абс. FoxP3+CD25+ на 10 ⁹ /л	0,05 [0,03; 0,06]	0,04 [0,03; 0,06]	Нд
ПК CD152+surface	0,7 [0,24; 1,7]	0,37 [0,12; 2,2]	Нд
абс. CD152+surface на 10 ⁹ /л	0,0003 [0,0001; 0,0008]	0,0002 [0,00006; 0,001]	Нд
ПК CD152+intracellular	65,8 [47,0; 75,7]	56,4 [47,9; 67,3]	Нд
абс. CD152+intracellular на 10 ⁹ /л	0,0005 [0,00007; 0,001]	0,0009 [0,00008; 0,007]	Нд
ПК FoxP3+CD127-	5,2 [4,4; 7,3]	6,54 [5,9; 8,5]	Нд
абс. FoxP3+CD127- на 10 ⁹ /л	0,05 [0,03; 0,07]	0,05 [0,05; 0,06]	Нд
ПК CD25+CD127-	5,9 [5,1; 7,1]	7,9 [7,2; 8,4]	0,04
абс. CD25+CD127- на 10 ⁹ /л	0,05 [0,04; 0,07]	0,06 [0,03; 0,07]	Нд
ПК FoxP3+ICOS+	4,1 [1,9; 9,9]	11,8 [6,9; 12,8]	Нд
абс. FoxP3+ICOS+ на 10 ⁹ /л	0,002 [0,001; 0,005]	0,007 [0,004; 0,008]	Нд
ПК FoxP3+CD154+	0,3 [0,2; 0,7]	1,2 [0,7; 1,2]	0,02
абс. FoxP3+CD154+ на 10 ⁹ /л	0,0001 [0,00009; 0,0004]	0,0007 [0,0004; 0,0007]	0,01
ПК FoxP3+CD274+	0,4 [0,3; 0,7]	1,49 [1,25; 2,2]	0,009
абс. FoxP3+CD274+ на 10 ⁹ /л	0,0002 [0,0001; 0,0004]	0,0008 [0,0007; 0,001]	0,007

Примечание. Нд – разница между группами не достоверна.

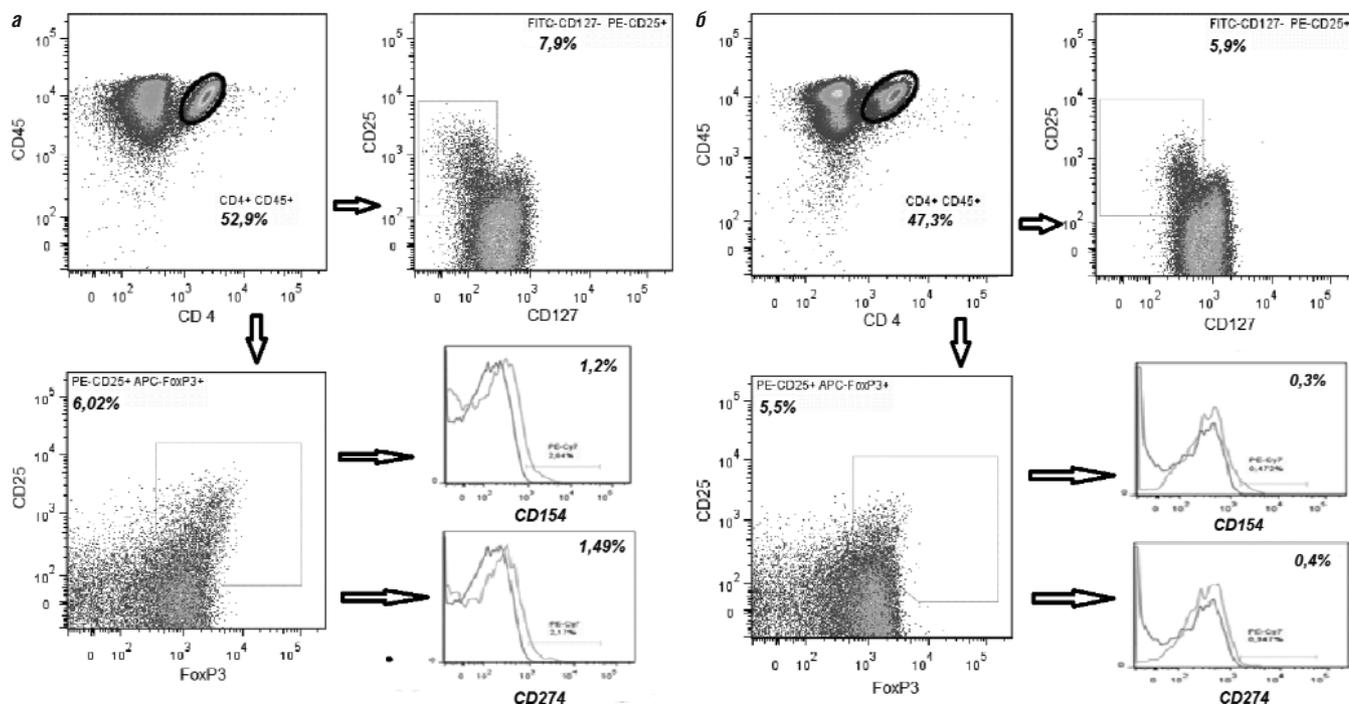


Рис. 3. Относительные уровни T_{reg} в группах серонегативных (а) и серопозитивных (б) по IgM РФ пациентов с ранним РА

к супрессии T_{reg} . E. Wehrens и соавт. [31] продемонстрировали снижение подавления активности Т-лимфоцитов, выделенных из синовиальной жидкости пациентов с ювенильным ревматоидным артритом (ЮРА), T_{reg} . Авторы установили, что этот эффект не связан с функциональным дефектом самих T_{reg} , так как они подавляли активность $T_{эфф}$ периферической крови; вместе с тем $T_{эфф}$, выделенные из воспаленного сустава, в меньшей степени реагировали на супрессорные стимулы T_{reg} . Авторы сделали предположение, что подобный эффект, возможно, связан с гиперактивацией протеинкиназы В/с-акт в $T_{эфф}$ под влиянием провоспалительных цитокинов – ИЛ6 и фактора некроза опухоли α (ФНО α), а также установили, что блокирование данного фермента восстанавливало чувствительность $T_{эфф}$ к ингибирующим эффектам T_{reg} . Еще одним механизмом резистентности эффекторных клеток может служить нарушение чувствительности этих клеток к PD-1 сигнализации, что было продемонстрировано A. Raptoroilou и соавт. [32] при культивировании клеток здоровых доноров в присутствии синовиальной жидкости пациентов с РА.

В нашей работе была установлена взаимосвязь между активностью РА и уровнем T_{reg} в периферическом кровотоке. Так, среди пациентов с высокой активностью патологического процесса регистрировался более низкий уровень CD25+CD127- T_{reg} , а также была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь числа FoxP3+CD25+, CD152+intracellular и CD25+CD127- T_{reg} с клинико-лабораторными показателями активности РА. В литературе представлены противоречивые данные о взаимосвязи количества T_{reg} с активностью заболевания и уровнями острофазовых показателей. Так, в ряде работ выявлена обратная корреляционная взаимосвязь между DAS28 и ПК циркулирующих Foxp3+ T_{reg} [16, 21, 22]. С другой стороны, среди пациентов с высокой активностью заболевания авторы регистрируют высокое содержа-

ние CD25+Foxp3+ Т-клеток [21, 25]. В синовиальной ткани пациентов с РА F. Behrens и соавт. [33] отметили прямую взаимосвязь между T-bet/FoxP3 mRNA и DAS28. Также рядом авторов была продемонстрирована обратная взаимосвязь СОЭ и концентрации СРБ с уровнем T_{reg} , хотя другие исследователи подобной взаимосвязи не обнаружили [17, 18, 22, 23].

Одной особенностью аутоиммунных ревматических заболеваний является продукция широкого спектра аутоантител, которая может быть связана или с непрерывной пролиферацией короткоживущих плазматических клеток, или с активацией долгоживущих плазматических клеток, образующихся в зародышевых центрах периферических лимфоидных органов [34, 35]. Большая часть долгоживущих плазматических клеток мигрируют в костный мозг и окончательно дифференцируются в антителопродуцирующие плазматические клетки [36]. Уровень этих клеток в очень малой степени зависит как от проводимого лечения БПВП, так и от анти-В-клеточной терапии [37–39]. В ряде недавних работ было показано негативное влияние T_{reg} на активацию В-лимфоцитов, опосредованное перфорин/гранзим-цитотоксической активностью [40–42]. В экспериментах *in vitro* была выявлена обратная корреляционная взаимосвязь между активностью T_{reg} и концентрацией антител. На экспериментальной модели коллаген-индуцированного артрита, а также на модели артрита у BALB/с мышей было установлено снижение уровня антител при адоптивном переносе T_{reg} от здоровых животных к больным [43, 44]. E. Jang и соавт. [45] на мышиной модели аутоантитело-зависимого артрита (K/VxN), который развивался у животных, дефицитных по FoxP3, показали подавляющее влияние T_{reg} на долгоживущие плазматические клетки селезенки. В своей работе мы продемонстрировали отрицательную корреляционную взаимосвязь между уровнем IgM РФ и содержанием Foxp3+CD274+ Т-лимфоцитов, а также более низкий

уровень CD25+CD127-, Foxp3+CD154+ и Foxp3+CD274+ T-лимфоцитов в группе серопозитивных по IgM РФ пациентов с РА. Сходные результаты были получены L. Hunt и соавт. [46] в группе из 103 АЦЦП-позитивных пациентов. Авторами было выявлено снижение уровня T_{рег} у 35,8% больных из этой группы. Напротив, K. Janssen и соавт. [47] никакой зависимости между уровнем антител и содержанием T_{рег} в периферическом кровотоке пациентов с РА не выявили.

Многие авторы полагают, что количественный дефицит CD4+CD25+Foxp3+CD127- клеток особенно характерен для раннего РА и ассоциируется с риском развития РА у бессимптомных пациентов, позитивных по АЦЦП [27, 28]. L. Hunt и соавт. [46] проанализировали риск развития РА в группе 103 АЦЦП-позитивных пациентов без признаков синовита. Прогрессирование заболевания отмечалось у 46,6% больных, причем у подавляющего большинства – в течение первых 12 мес. Авторы проанализировали три прогностические модели, включающие клинические и лабораторные данные, для определения наиболее информативных предикторов прогрессирования заболевания. Из лабораторных параметров анализировался уровень наивных T-лимфоцитов (CD4+CD45Ra+), клеток, связанных с воспалением (CD45RBbrightCD45RA+CD62L-), и уровень T_{рег} (CD4+CD25+Foxp3+CD127-). Использование только клеточных маркеров (совместно все три субпопуляции) оказалось информативным (AUC – 0,75), однако имело низкую чувствительность (28,6–45,2%). Наиболее ин-

формативным являлось совместное использование клеточных и клинических данных (AUC – 0,79), причем вклад именно клеточных маркеров в информативность данной модели был очень значительным. Напротив, K. Janssen и соавт. [47] взаимосвязи между развитием РА и исходным уровнем T_{рег} не обнаружили, что, возможно, было связано с небольшой численностью группы обследованных больных (n=34).

Таким образом, представленные данные демонстрируют снижение уровня и функциональной активности T_{рег} при раннем РА, что ассоциируется с более высокой активностью заболевания, наличием системных проявлений болезни, а также сопровождается гиперпродукцией антител. Мониторинг уровня T_{рег}, наряду с другими параметрами, может быть информативным для прогнозирования развития РА у бессимптомных пациентов, что позволит выявить группы риска и своевременно начать адекватную терапию.

Прозрачность исследования

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Быковская СН, Насонов ЕЛ. Роль дефектов иммуносупрессии в развитии аутоиммунных заболеваний. Научно-практическая ревматология. 2005;43(4):81-4 [Bykovskaya SN, Nasonov EL. Role of immunosuppression defects in the development of autoimmune diseases. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2005;43(4):81-4 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2005-623
2. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.009
3. Zeng H, Chi H. The interplay between regulatory T cells and metabolism in immune regulation. *Oncol Immunology*. 2013;2(11):e26586. Epub 2013 Oct 21. doi: 10.4161/onci.26586
4. Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, et al. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med*. 2007;204(1):57-63. doi: 10.1084/jem.20061852. Epub 2007 Jan 2.
5. Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:849-59. doi: 10.1038/nri2889
6. Wildin RS, Freitas A. IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives. *J Autoimmun*. 2005;25 Suppl:56-62. doi: 10.1016/j.jaut.2005.04.008
7. Насонов ЕЛ, Каратеев ДЕ, Балабанова РМ. Ревматоидный артрит. В кн.: Насонов ЕЛ, Насонова ВА, редакторы. Ревматология: Национальное руководство. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2008. С. 290-331 [Nasonov EL, Karateev DE, Balabanova RM. Rheumatoid arthritis. In: Nasonov EL, Nasonova VA, editors. *Revmatologiya: Natsional'noe rukovodstvo [Rheumatology: National guidelines]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. P. 290-331].
8. Firestein G. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003;423:356-61. doi: 10.1038/nature01661
9. Cope A. T cells in rheumatoid arthritis. *Arthr Res Ther*. 2008;10 Suppl 1:S1. doi: 10.1186/ar2412
10. Choy E. Selective modulation of T cell co-stimulation: a novel mode of action for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2009;27:510-8.
11. Steward-Tharp S, Song Y, Siegel R, O'Shea J. New insights into T cells biology and T cells directed therapy for autoimmunity inflammation and immunosuppression. *Ann NY Acad Sci*. 2010;1183:123-48. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05124.x
12. Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, et al. Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2003;33:215-23. doi: 10.1002/immu.200390024
13. Cao D, van Vollenhoven R, Klareskog L, et al. CD25+CD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthr Res Ther*. 2004;6:R335-R346. doi: 10.1186/ar1192
14. Van Amelsfort JMR, Jacobs KMG, Bijlsma JWJ, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum*. 2004;50:2775-85. doi: 10.1002/art.20499
15. Mottonen 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 Exper Immunol*. 2005;140:360-7. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02754.x
16. Liu M-F, Wang C-R, Fung L-L, et al. The presence of cytokine-suppressive CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol*. 2005;62:312-7. doi: 10.1111/j.1365-3083.2005.01656.x
17. Cao D, Borjesson O, Larsson P, et al. FOXP3 identifies regulatory CD25brightCD4+ T cells in rheumatic joints. *Scand J Immunol*. 2006;63:444-52. doi: 10.1111/j.1365-3083.2006.001755.x

18. Jiao Z, Wang W, Jia R, et al. Accumulation of FoxP3-expressing CD4+CD25+ T cells with distinct chemokine receptors in synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2007;36:428-33. doi: 10.1080/03009740701482800
19. Moradi B, Schnatzer P, Hagmann S, et al. CD4+CD25+/highCD127low/- regulatory T cells are enriched in rheumatoid arthritis and osteoarthritis joints – analysis of frequency and phenotype in synovial membrane, synovial fluid and peripheral blood. *Arthritis Res Ther*. 2014;16: R97. doi: 10.1186/ar4545
20. Dejaco C, Duftner C, Klauser A, Schirmer M. Altered T-cell subtypes in spondyloarthritis, rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica. *Rheumatol Int*. 2010;30:297-303. doi: 10.1007/s00296-009-0949-9
21. Sempere-Ortells JM, Perez-Garcia V, Marin-Alberca G, et al. Quantification and phenotype of regulatory T cells in rheumatoid arthritis according to disease activity Score-28. *Autoimmunity*. 2009;42:636-45. doi: 10.3109/08916930903061491
22. Kawashiri S-Y, Kawakami A, Okada A, et al. CD4+CD25(high)CD127(low/-) Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2011;38:2517-21. doi: 10.3899/jrheum.110283
23. Han GM, O'Neil-Andersen NJ, Zurier RB, Lawrence DA. CD4+CD25high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol*. 2008;253:92-101. doi: 10.1016/j.cellimm.2008.05.007
24. Lin SC, Chen K-H, Lin C-H, et al. The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Eur J Clin Invest*. 2007;37:987-96. doi: 10.1111/j.1365-2362.2007.01882.x
25. Ji L, Geng Y, Zhou W, Zhang Z. A study on relationship among apoptosis rates, number of peripheral T cell subtypes and disease activity in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2016;19:167-71. doi: 10.1111/1756-185X.12211
26. Dombrecht EJ, Aerts NE, Schuerwegh AJ, et al. Influence of anti-tumor necrosis factor therapy (Adalimumab) on regulatory T cells and dendritic cells in rheumatoid arthritis. *Clin Exper Rheumatol*. 2006;24:31-7.
27. Lawson CA, Brown AK, Bejarano V, et al. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25high regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45(10):1210-7. doi: 10.1093/rheumatology/ke089
28. Hensor RMA, Hunt L, Patmar R, et al. Predicting the evaluation of inflammatory arthritis in ACPA-positive individuals: can T-cell subset help? *Ann Rheum Dis*. 2014;73 Suppl 1:A14. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-205124.32
29. Ehrenstein MR, Evans JG, Singt A, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *J Exp Med*. 2004;200(3):277-85. doi: 10.1084/jem.20040165. Epub 2004 Jul 26.
30. McGovern JL, Nguyen DX, Notley CA, et al. Th17 cells are restrained by T reg cells via the inhibition of interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis responding to anti-tumor necrosis factor antibody therapy. *Arthritis Rheum*. 2012;64(10):3129-38. doi: 10.1002/art.34565
31. Wehrens EJ, Mijnheer G, Duurland CL, et al. Functional human regulatory T cells fail to control autoimmune inflammation due to PKB/c-akt hyperactivation in effector cells. *Blood*. 2011;118:3538-48. doi: 10.1182/blood-2010-12-328187
32. Raptopoulou AP, Bertias G, Makrygiannakis D, et al. The programmed death 1/programmed death ligand 1 inhibitory pathway is up-regulated in rheumatoid synovium and regulates peripheral T cell responses in human and murine arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62:1870-80. doi: 10.1002/art.27500
33. Behrens F, Himsel A, Rehart S, et al. Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:1151-6. doi: 10.1136/ard.2006.068320
34. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, et al. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med*. 2001;193:1373-81. doi: 10.1084/jem.193.12.1373
35. Odegard JM, Marks BR, DiPlacido LD, et al. ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity. *J Exp Med*. 2008;205:2873-86. doi: 10.1084/jem.20080840
36. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:741-50. doi: 10.1038/nri1886
37. Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity*. 1998;8:363-72. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80541-5
38. Hoyer BF, Moser K, Hauser AE, et al. Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/Wmice. *J Exp Med*. 2004;199:1577-84. doi: 10.1084/jem.20040168
39. Silverman GJ, Weisman S. Rituximab therapy and autoimmune disorders: prospects for anti-B cell therapy. *Arthritis Rheum*. 2003;48:1484-92. doi: 10.1002/art.10947
40. Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*. 2006;107:3925-32. doi: 10.1182/blood-2005-11-4502
41. Iikuni N, Lourenco EV, Hahn BH, La Cava A. Cutting edge: regulatory T cells directly suppress B cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2009;183:1518-22. doi: 10.4049/jimmunol.0901163
42. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, et al. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. 2004;21:589-601. doi: 10.1016/j.immuni.2004.09.002
43. Seo SJ, Fields ML, Buckler JL, et al. The impact of T helper and T regulatory cells on the regulation of anti-double stranded DNA B cells. *Immunity*. 2002;16:535-46. doi: 10.1016/S1074-7613(02)00298-4
44. Morgan ME, Suttmuller RP, Witteveen HJ, et al. CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48:1452-60. doi: 10.1002/art.11063
45. Jang E, Cho W, Cho M, et al. Foxp3+ Regulatory T Cells Control Humoral Autoimmunity by Suppressing the Development of Long-Lived Plasma Cells. *J Immunol*. 2011;186:1546-53. doi: 10.4049/jimmunol.1002942
46. Hunt L, Hensor EM, Nam J, et al. T cell subsets: an immunological biomarker to predict progression to clinical arthritis in ACPA-positive individuals. *Ann Rheum Dis*. 2016;75:1884-9. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-207991
47. Janssen K, Westra J, Chalan P, et al. Regulatory CD4+ T-Cell Subsets and AntiCitruUinated Protein Antibody Repertoire: Potential Biomarkers for Arthritis Development in Seropositive Arthralgia Patients? *PLoS ONE* 2016;11(9):e0162101. doi: 10.1371/journal.pone.0162101PLoS