

Динамика уровня FoxP3+ регуляторных Т-лимфоцитов у больных ранним ревматоидным артритом на фоне терапии метотрексатом

Авдеева А.С.¹, Рубцов Ю.П.², Попкова Т.В.¹, Дыйканов Д.Т.², 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, Москва, Россия;
³ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, кафедра ревматологии Института профессионального образования, Москва, Россия
¹115522 Москва, Каширское шоссе, 34А;
²119192 Москва, Ломоносовский проспект, 31, корп. 5; ³119991 Москва, ул. Трубецкая, 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, Moscow, Russia; ³Department of Rheumatology, Institute of Professional Education, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Цель — проанализировать влияние терапии метотрексатом (МТ) на процентное и абсолютное содержание FoxP3 регуляторных Т-лимфоцитов (T_{reg}) в периферической крови пациентов с ранним ревматоидным артритом (РА), не получавших ранее МТ.

Материал и методы. В исследование было включено 45 пациентов с ранним РА (критерии ACR/EULAR 2010 г.), не получавших ранее терапии МТ (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% — по антителам к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП). Всем больным в качестве первого базисного противовоспалительного препарата (БПВП) был назначен МТ в подкожной форме в начальной дозе 10 мг/нед с быстрой эскалацией до 20–25 мг/нед. Процентное 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 цитофлуориметрии.

Результаты и обсуждение. Через 24 нед после начала терапии медиана индекса DAS28 составила 3,1 [2,7; 3,62]; SDAI — 7,4 [4,2; 11,4], CDAI — 7,0 [4,0; 11,0]; ремиссия/низкая активность заболевания по DAS28 была достигнута у 22 (56,4%) по SDAI — у 25 (64,1%) больных, отсутствие эффекта терапии МТ по критериям EULAR регистрировалось у 4 (10,3%) пациентов. После 6-месячного курса терапии МТ по группе в целом регистрировалось повышение процентного содержания CD4+клеток (с 45,0 [38,0; 49,2] до 46,8 [39,9; 53,2]%), повышение процентного и абсолютного количества CD152+surface с 0,65[0,22; 1,67] до 2,07 [1,11; 3,81]% и с 0,0002 [0,0001; 0,0008] • 10⁹ до 0,0007 [0,0004; 0,002] • 10⁹; умеренное снижение процентного и абсолютного содержания FoxP3+ICOS+ клеток — с 5,3 [2,1; 11,3] до 4,07 [1,6; 6,6]% и с 0,002 [0,001-0,006] • 10⁹ до 0,0015 [0,0006-0,003] • 10⁹ (p<0,05 во всех случаях).

Заключение. Применение МТ при раннем РА сопровождается увеличением пропорции и числа T_{reg} с высоким уровнем маркеров активации, что может свидетельствовать об их повышенной супрессорной активности, более выраженной среди пациентов, достигших ремиссии/низкой активности заболевания на фоне лечения.

Ключевые слова: ранний ревматоидный артрит; активность заболевания; регуляторные Т-лимфоциты; эффективность терапии; базисные противовоспалительные препараты.

Для ссылки: Авдеева АС, Рубцов ЮП, Попкова ТВ и др. Взаимосвязь FoxP3+ регуляторных Т-клеток с активностью заболевания и уровнем антител при раннем ревматоидном артрите. Научно-практическая ревматология. 2017;55(4):360-367.

CHANGES IN THE LEVEL OF FoxP3+ REGULATORY T LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH EARLY RHEUMATOID ARTHRITIS DURING METHOTREXATE THERAPY

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

Objective: to analyze the impact of methotrexate (MTX) therapy on percentage and absolute content of FoxP3+ regulatory T lymphocytes (T_{reg}) in the peripheral blood of patients with early rheumatoid arthritis (RA) who had not previously received MTX.

Subjects and methods. The investigation included 45 patients with early RA (2010 ACR/EULAR criteria) who had not previously received MTX, 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 positive for rheumatoid factor and 88.9% — for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies. As the first disease-modifying antirheumatic drug, all the patients were assigned to receive subcutaneous MTX at an initial dose of 10 mg/week with its rapid escalation up to 20–25 mg/week. The percentage and absolute count of T_{reg} (FoxP3+CD25+; CD152+surface; CD152+intracellular; FoxP3+CD127-; CD25+CD127-; FoxP3+ICOS+; FoxP3+CD154+; and FoxP3+CD274+) were measured by immunofluorescence staining and multicolor flow cytometry.

Results and discussion. At 24 weeks after starting the therapy, median DAS28, SDAI, and CDAI were 3.1 [2.7; 3.62], 7.4 [4.2; 11.4], and 7.0 [4.0; 11.0], respectively; DAS28 and SDAI remission/low disease activity was reached by 22 (56.4%) and 25 (64.1%) patients, respectively; 4 (10.3%) patients had no MTX treatment effect according to the EULAR criteria. After a 6-month course of MTX therapy, the whole group had increases in the percentage of CD4+ cells (from 45.0 [38.0; 49.2] to 46.8 [39.9; 53.2]%) and in the percentage and absolute number of CD152+surface from 0.65 [0.22; 1.67] to 2.07 [1.11; 3.81]% and from 0.0002 [0.0001; 0.0008] • 10⁹ to 0.0007 [0.0004; 0.002] • 10⁹, and a moderate decrease in the percentage and absolute content of FoxP3+ICOS+ cells from 5.3 [2.1; 11.3] to 4.07 [1.6; 6.6]% and from 0.002 [0.001-0.006] • 10⁹ to 0.0015 [0.0006-0.003] • 10⁹ (p<0.05 in all cases).

Conclusion. The use of MTX in early RA is accompanied by an increase in the proportion and number of T_{reg} with a high level of activation markers, which may indicate their enhanced suppressor activity that is more pronounced among the patients who have achieved remission/low disease activity during the treatment.

Key words: early rheumatoid arthritis; disease activity; T regulatory lymphocytes; efficiency of therapy; disease-modifying antirheumatic drugs.

134A, Kashirskoe
Shosse, Moscow
115522;
31, Lomonosovsky
Prospect, Build. 5,
Moscow 119192;
8, Trubetskaya St.,
Build. 2, Moscow
119991

Контакты: Анастасия
Сергеевна Авдеева;
9056249400@mail.ru

Contact:
Anastasia Avdeeva;
9056249400@mail.ru

Поступила 29.03.17

For reference: Avdeeva AS, Rubtsov YuP, Popkova TV, et al. Changes in the level of FoxP3+regulatory T lymphocytes in patients with early rheumatoid arthritis during methotrexate therapy. Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice. 2017;55(4):360-367 (In Russ.).
doi: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2017-360-367>

Ревматоидный артрит (РА) — аутоиммунное ревматическое заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся хроническим эрозивным артритом (синовитом) и системным воспалительным поражением внутренних органов [1]. По современным представлениям, в основе патогенеза РА лежит сложное взаимодействие генетических и приобретенных дефектов иммунорегуляции, что приводит к патологической активации иммунной системы в ответ на патогенные или физиологические стимулы [1]. В результате нарушения В-клеточной толерантности происходит индукция синтеза широкого спектра антител, таких как ревматоидные факторы (РФ), антитела к цитруллинированным и карбамоилированным белкам, которые могут присутствовать в сыворотке пациентов задолго до развития клинических проявлений заболевания [2, 3]. Кроме того, в доклинической стадии РА может выявляться повышение уровня ряда цитокинов, хемокинов и связанных с ними медиаторов, что свидетельствует об активации адаптивной иммунной системы [4].

В норме иммунологическое равновесие поддерживается за счет апоптоза незрелых аутореактивных лимфоцитов в тимусе, активации индуцированной гибели зрелых Т-лимфоцитов, а также подавления иммунных реакций против собственных антигенов с помощью регуляторных Т-лимфоцитов (T_{reg}) [5]. Основной функцией T_{reg} является подавление активации иммунной системы путем модуляции клеточных функций, таких как Т-клеточная пролиферация и продукция цитокинов [6, 7]. Наиболее специфическим маркером T_{reg} является ядерный фактор транскрипции FoxP3, который имеет фундаментальное значение в развитии T_{reg} и их ингибиторной функции [7, 8]. У человека T_{reg} относятся к субпопуляции CD4+FoxP3+ Т-клеток и отличаются высоким уровнем CD25 и низким — CD127 на поверхности клеток [6–8]. Данные об уровне T_{reg} в периферическом кровотоке пациентов с РА весьма противоречивы. Большинство исследователей наблюдали уменьшение процентного количества (ПК) циркулирующих T_{reg} [9–12], в то время как в других работах выявлено его увеличение [13, 14] или отсутствие отличий в ПК T_{reg} от здоровых доноров [15–17]. В наших исследованиях было продемонстрировано снижение ПК FoxP3+CD25+ клеток, ПК и абсолютного количества (абс.) FoxP3+ICOS+ клеток; FoxP3+CD154+ клеток и FoxP3+ CD274+ Т-клеток в периферическом кровотоке пациентов с ранним РА, не получавших предшествующей терапии базисными противовоспалительными препаратами (БПВП) [18].

«Золотым стандартом» фармакотерапии РА в настоящее время является метотрексат (МТ). Современная тактика применения МТ (быстрая эскалация дозы, прием фолиевой кислоты) и, особенно, использование подкожных форм препарата позволяют повысить эффективность терапии на всех стадиях болезни и снизить потребность в назначении генноинженерных биологических препаратов (ГИБП). В ряде работ выявлено изменение уровня T_{reg} , а также соотношения $T_{reg}/Th17$ на фоне применения МТ [19, 20]. Так, на культурах клеток, а также на мышинных моделях продемонстрировано увеличение продукции FoxP3, а также синтеза CD4+ лимфоцитами интерлейкина 10 (ИЛ10) и трансформирующего фактора роста β (ТФР β) при воздействии МТ [20–23]. Необходимо отметить, что МТ повышал продукцию FoxP3 мононуклеарными клетками периферической крови, выделенными от больных РА, и не оказывал влияния на клетки здоровых доноров [21, 23].

Целью нашей работы являлся анализ влияния терапии МТ на содержание T_{reg} в периферической крови пациентов с ранним РА, не получавших ранее МТ.

Материал и методы

В исследование было включено 45 пациентов с ранним РА (критерии 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 клинко-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 РФ и АЦЦП, имели высокую активность воспалительного процесса, I и II рентгенологическую стадию, I функциональный класс. До включения в исследование пациенты не получали терапию БПВП и глюкокортикоидами. Всем больным в качестве первого БПВП был назначен МТ в подкожной форме (методжект) в начальной дозе 10 мг/нед с быстрой эскалацией до 20–25 мг/нед; 6 пациентов были исключены из исследования по организационным причинам.

Определение СОЭ осуществляли стандартным международным методом по Вестергрену (норма ≤ 30 мм/ч). Сывороточную концентрацию СРБ и IgM РФ измеряли иммунонефелометрическим методом на анализаторе BN ProSpec (Siemens, Германия). Нормальный

уровень СРБ в сыворотке крови составлял $\leq 5,0$ 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+) и анализировали методом многоцветной проточной цитофлюориметрии на анализаторе BD LSR Fortessa Special Order Research Product (BD). Контрольную группу составили 20 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными пациентами. Лабораторные показатели анализировали исходно, затем через 12 и 24 нед от начала терапии МТ. Нормальные значения для различных субпопуляций $T_{\text{рег}}$ в крови здоровых доноров составили: ПК FoxP3+CD25+ от 3,7 до 9,8%, абс. от 0,03 до $0,11 \cdot 10^9$ /л; ПК CD152+surface – 0,13–4,9%, абс. – 0,00006–0,0018 $\cdot 10^9$ /л; ПК CD152+intracellular – 36,3–89,8%, абс. – 0,00003–0,00108 $\cdot 10^9$ /л; ПК FoxP3+CD127- – 3,2–8,5%, абс. – 0,03–0,096 $\cdot 10^9$ /л; ПК CD25+CD127- – 3,9–9,7%, абс. – 0,03–0,09 $\cdot 10^9$ /л; ПК FoxP3+ICOS+ – 7,0–27,5%, абс. – 0,002–0,019 $\cdot 10^9$ /л; ПК FoxP3+CD154+ – 0,39–3,25%, абс. – 0,0001–0,0019 $\cdot 10^9$ /л; ПК FoxP3+CD274+ – 0,47–3,43%, абс. – 0,00016–0,00334 $\cdot 10^9$ /л.

Статистическую обработку результатов проводили 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 $p < 0,05$.

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

Показатель	Значение
Пол, мужчины/женщины, n	6/39
Возраст, годы, Me [25-й; 75-й перцентили]	52,0 [32,5; 57,5]
Длительность заболевания, мес, Me [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, Me [25-й; 75-й перцентили]	5,01 [4,18; 5,8]
СОЭ, мм/ч, Me [25-й; 75-й перцентили]	36,0 [18,0; 54,0]
СРБ, мг/л, Me [25-й; 75-й перцентили]	12,1 [2,9; 37,4]
IgM РФ, МЕ/мл, Me [25-й; 75-й перцентили]	94,5 [17,8; 186,0]
IgM РФ-позитивных, n (%)	34 (75,6)
АЦЦП, Ед/мл, Me [25-й; 75-й перцентили]	105,0 [42,5; 230,6]
АЦЦП-позитивных, n (%)	40 (88,9)

Примечание. СРБ – С-реактивный белок, АЦЦП – антитела к циклическому цитруллинированному пептиду.

Результаты

Среди включенных в исследование больных медиана DAS28 составила 5,01 [4,2; 5,8], при этом у 22 (48,9%) 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], CDAI – 20,0 [15,0; 26,0]. Повышенный уровень СРБ регистрировался у 30 (66,7%), а СОЭ – у 26 (57,8%) больных.

Через 12 нед после начала терапии медиана индекса DAS28 составила 3,63 [2,84; 4,44], SDAI – 9,4 [6,7; 15,1], CDAI – 8,0 [5,5; 15,0]; ремиссия/низкая активность заболевания по DAS28 была достигнута у 14 (35,9%) пациентов, у такого же числа больных регистрировался хороший ответ по критериям EULAR, отсутствие клинического эффекта выявлялось у 7 (17,9%) больных. После 24 нед терапии медиана индекса DAS28 составила 3,1 [2,7; 3,62]; SDAI – 7,4 [4,2; 11,4], CDAI – 7,0 [4,0; 11,0]; ремиссия/низкая активность заболевания по DAS28 была достигнута у 22 (56,4%) по SDAI – у 25 (64,1%) больных, отсутствие эффекта терапии МТ по критериям EULAR регистрировалось у 4 (10,3%) пациентов.

До начала терапии была установлена положительная корреляционная взаимосвязь между: исходным ПК CD4+ клеток и CDAI ($r=0,4$; $p=0,04$), абс. CD4+ клеток и CDAI ($r=0,4$; $p=0,03$), HAQ ($r=0,46$; $p=0,04$). Регистрировалась отрицательная корреляционная взаимосвязь между: ПК FoxP3+CD25+ клеток и СРБ ($r=-0,5$; $p=0,026$), ПК CD152+intracellular и СРБ ($r=-0,53$; $p=0,023$), ПК FoxP3+CD127- клеток и СРБ ($r=-0,65$; $p=0,02$), ПК CD25+CD127- клеток и DAS28 ($r=-0,64$; $p=0,016$), SDAI ($r=-0,6$; $p=0,03$), CDAI ($r=-0,6$; $p=0,03$), СОЭ ($r=-0,59$; $p=0,032$) и СРБ ($r=-0,63$; $p=0,02$). Через 24 нед после назначения МТ регистрировалась отрицательная корреляционная взаимосвязь между: ПК FoxP3+CD154+ и DAS28 ($r=-0,4$; $p=0,02$), SDAI ($r=-0,5$; $p=0,005$); ПК FoxP3+CD274+ и DAS28 ($r=-0,4$; $p=0,02$), SDAI ($r=-0,6$; $p=0,0001$) и CDAI ($r=-0,7$; $p=0,001$).

Динамика числа $T_{\text{рег}}$ на фоне терапии МТ, а также в зависимости от эффекта препарата к 24-й неделе лечения по критериям EULAR представлена в табл. 2 и на рис. 1. Как видно из табл. 2, после 24 нед лечения по группе в целом регистрировалось повышение ПК CD4+клеток (с 45,0 [38,0; 49,2] до 46,8 [39,9; 53,2]%), повышение ПК и абс. CD152+surface с 0,65 [0,22; 1,67] до 2,07 [1,11; 3,81] и с 0,0002 [0,0001; 0,0008] $\cdot 10^9$ до 0,0007 [0,0004; 0,002] $\cdot 10^9$ /л; умеренное снижение ПК и абс FoxP3+ICOS+ клеток с 5,3 [2,1; 11,3] до 4,07 [1,6; 6,6] и с 0,002 [0,001; 0,006] $\cdot 10^9$ /л до 0,0015 [0,0006; 0,003] $\cdot 10^9$ /л ($p < 0,05$ во всех случаях). Число $T_{\text{рег}}$, экспрессирующих CD152+surface, в группе РА к 24-й неделе терапии МТ было более чем в 2 раза выше по сравнению с группой здоровых доноров – 2,07 [1,11; 3,81] и 0,51 [0,34; 1,2]%; 0,0007 [0,0004; 0,002] $\cdot 10^9$ /л и 0,0003 [0,00014; 0,0008] $\cdot 10^9$ /л соответственно ($p < 0,05$). Достоверных различий в динамике разных субпопуляций $T_{\text{рег}}$ в зависимости от эффекта терапии выявлено не было (см. табл. 2).

Уровень и фенотип $T_{\text{рег}}$ также оценивали в группах больных в зависимости от эффекта МТ к 24-й неделе лечения. Среди пациентов, достигших ремиссии по SDAI (n=25), были выявлены более высокие ПК и абс. FoxP3+CD274+ клеток к 24-й неделе применения препарата (1,25 [0,43; 2,3] и 0,0004 [0,0002; 0,001] $\cdot 10^9$ /л), по сравнению с пациентами с умеренной активностью за-

Таблица 2 Динамика субпопуляций T_{рег} на фоне терапии МТ, Ме [25-й; 75-й перцентили]

Субпопуляции T _{рег}	Недели	Группа в целом (n=39)	Хороший эффект терапии (n=14)	Умеренный эффект/отсутствие эффекта (n=25)
ПК CD4+	Исходно	45,0 [38,02; 49,2]	44,4 [35,9; 48,0]	47,8 [38; 51,4]
	12-я	47,3 [41,9; 54,3]*	45,9 [41,9; 55,2]	50,5 [42,7; 53,8]*
	24-я	46,8 [39,9; 53,5]*	46,1 [38,9; 48,3]*	52,3 [40,2; 55,0]
абс. CD4+, • 10 ⁹ /л	Исходно	0,82 [0,57; 1,09]	0,79 [0,52; 0,94]	0,79 [0,57; 1,09]
	12-я	0,87 [0,59; 1,04]	0,89 [0,67; 1,16]	0,83 [0,052; 1,0]
	24-я	0,68 [0,56; 0,86]	0,66 [0,52; 1,03]	0,68 [0,56; 0,83]
ПК FoxP3+CD25+	Исходно	5,57 [4,6; 6,93]	6,61 [4,86; 7,18]	5,2 [4,1; 5,8]**
	12-я	5,25 [3,78; 6,2]	5,49 [3,73; 6,91]	5,23 [3,95; 6,2]
	24-я	5,47 [4,39; 6,59]	5,2 [4,4; 6,14]	6,13 [4,77; 7,23]
абс. FoxP3+CD25+, • 10 ⁹ /л	Исходно	0,05 [0,03; 0,06]	0,05 [0,036; 0,06]	0,05 [0,03; 0,06]
	12-я	0,039 [0,032; 0,06]	0,04 [0,03; 0,06]	0,04 [0,03; 0,06]
	24-я	0,04 [0,03; 0,05]	0,03 [0,02; 0,054]	0,04 [0,03; 0,05]
ПК CD152+surface	Исходно	0,65 [0,22; 1,67]	1,19 [0,51; 3,49]	0,53 [0,22; 0,9]
	12-я	1,29 [0,56; 2,4]	1,69 [1,01; 2,4]	0,86 [0,39; 1,37]
	24-я	2,07 [1,11; 3,8]*	2,11 [1,1; 4,3]	1,4 [1,11; 3,54]*
абс. CD152+surface, • 10 ⁹ /л	Исходно	0,0002 [0,0001; 0,0008]	0,0006 [0,00018; 0,0018]	0,00018 [0,0001; 0,0006]
	12-я	0,0006 [0,0002; 0,001]	0,001 [0,00048; 0,0013]	0,0004 [0,0002; 0,0007]
	24-я	0,0007 [0,0004; 0,002]*	0,0009 [0,0003; 0,002]	0,0007 [0,0004; 0,0016]*
ПК CD152+intracellular	Исходно	62,9 [47,0; 75,4]	66,2 [52,4; 77,5]	62,9 [54,8; 75,4]
	12-я	62,3 [55,8; 76,3]	67,4 [57,2; 76,1]	60,2 [51,1; 77,1]
	24-я	66,2 [56,2; 74,7]	63,6 [54,9; 74,7]	69,4 [58,6; 79,2]
абс. CD152+intracellular, • 10 ⁹ /л	Исходно	0,0005 [0,00008; 0,002]	0,0004 [0,00008; 0,001]	0,0009 [0,00016; 0,03]
	12-я	0,00035 [0,00013; 0,00075]	0,00061 [0,0003; 0,001]	0,0003 [0,00012; 0,0004]
	24-я	0,0004 [0,0003; 0,0014]	0,0005 [0,0002; 0,0018]	0,0004 [0,0003; 0,0014]
ПК FoxP3+CD127-	Исходно	5,96 [4,58; 7,32]	6,39 [4,71; 7,37]	4,97 [4,49; 7,47]
	12-я	5,29 [4,31; 6,79]	5,28 [3,8; 6,2]	5,3 [4,6; 6,9]
	24-я	5,56 [4,1; 7,62]	5,2 [4,1; 7,4]	6,03 [3,86; 7,62]
абс. FoxP3+CD127-, • 10 ⁹ /л	Исходно	0,05 [0,04; 0,064]	0,051 [0,03; 0,06]	0,05 [0,04; 0,07]
	12-я	0,04 [0,03; 0,06]	0,04 [0,03; 0,06]	0,04 [0,03; 0,06]
	24-я	0,038 [0,023; 0,048]	0,04 [0,02; 0,05]	0,04 [0,03; 0,05]
ПК CD25+CD127-	Исходно	6,5 [5,11; 7,91]	7,22 [5,11; 8,23]	5,6 [5,13; 7,19]
	12-я	5,57 [4,37; 6,64]*	5,63 [4,03; 6,64]	5,57 [4,59; 7,02]
	24-я	5,32 [4,51; 7,34]	4,9 [4,45; 7,65]	5,41 [4,68; 7,24]
абс. CD25+CD127-, • 10 ⁹ /л	Исходно	0,056 [0,037; 0,069]	0,05 [0,036; 0,07]	0,057 [0,05; 0,06]
	12-я	0,05 [0,03; 0,06]	0,05 [0,034; 0,063]	0,04 [0,03; 0,06]
	24-я	0,04 [0,03; 0,06]	0,04 [0,02; 0,05]	0,04 [0,03; 0,056]
ПК FoxP3+ICOS+	Исходно	5,33 [2,14; 11,3]	4,48 [2,14; 12,8]	5,33 [1,93; 10,9]
	12-я	3,79 [2,78; 9,17]	3,62 [2,36; 6,47]	7,79 [2,94; 9,5]
	24-я	4,07 [1,65; 6,57]*	2,49 [1,21; 5,73]	5,02 [2,53; 7,78]
абс. FoxP3+ICOS+, • 10 ⁹ /л	Исходно	0,002 [0,0013; 0,0056]	0,002 [0,01; 0,005]	0,0016 [0,001; 0,006]
	12-я	0,0017 [0,001; 0,004]	0,0013 [0,001; 0,004]	0,003 [0,001; 0,005]
	24-я	0,0015 [0,0006; 0,003]*	0,0007 [0,0004; 0,002]*	0,002 [0,0008; 0,004]
ПК FoxP3+CD154+	Исходно	0,38 [0,19; 0,83]	0,51 [0,023; 1,23]	0,29 [0,18; 0,68]
	12-я	0,45 [0,22; 0,83]	0,29 [0,17; 0,76]	0,7 [0,32; 0,84]
	24-я	0,98 [0,27; 1,84]	1,01 [0,4; 1,89]	0,63 [0,21; 1,84]
абс. FoxP3+CD154+, • 10 ⁹ /л	Исходно	0,0002 [0,0001; 0,0005]	0,0003 [0,0001; 0,0007]	0,00016 [0,00009; 0,0004]
	12-я	0,00013 [0,00004; 0,00023]*	0,0001 [0,00006; 0,0002]	0,0002 [0,0; 0,00027]
	24-я	0,0003 [0,00012; 0,0009]	0,0003 [0,0002; 0,0009]	0,0003 [0,0001; 0,0007]
ПК FoxP3+CD274+	Исходно	0,61 [0,28; 1,25]	0,69 [0,25; 1,8]	0,46 [0,28; 0,67]
	12-я	0,65 [0,29; 0,96]	0,5 [0,27; 0,95]	0,75 [0,43; 0,97]
	24-я	0,93 [0,4; 2,22]	1,05 [0,43; 2,68]	0,8 [0,26; 2,18]
абс. FoxP3+CD274+, • 10 ⁹ /л	Исходно	0,00023 [0,0001; 0,00065]	0,0002 [0,00012; 0,0008]	0,00023 [0,00012; 0,0006]
	12-я	0,00038 [0,0001; 0,0005]	0,0002 [0,00012; 0,0005]	0,00029 [0,00014; 0,0006]
	24-я	0,0004 [0,00017; 0,0006]	0,0004 [0,0002; 0,0014]	0,0004 [0,00013; 0,0006]

Примечание. * – p<0,05 по сравнению с исходным уровнем; ** – p<0,05 между группами.

болевания (n=14; 0,44 [0,2; 0,69]% и 0,00016 [0,0001; 0,0004] • 10⁹/л, p<0,05; рис. 2).

Для выявления возможных прогностических факторов эффективности МТ при раннем РА был проанализирован исходный уровень субпопуляций T_{рег} в зависимо-

сти от эффективности терапии по различным критериям к 24-й неделе применения препарата. В группе больных с хорошим эффектом МТ по критериям EULAR к 24-й неделе лечения регистрировалась исходно более высокая ПК FoxP3+CD25+ клеток – 6,61 [4,86; 7,18]% по сравне-

нию с больными с удовлетворительным эффектом / отсутствием эффекта терапии (5,2 [4,1; 5,8]%; $p < 0,05$; см. табл. 2). Среди пациентов, достигших ремиссии/низкой активности заболевания по индексу DAS28, регистрировались исходно более высокие ПК и абс. CD152+surface (1,3 [0,52; 3,06]%; 0,0005 [0,0002; 0,0014] $\cdot 10^9$ /л) по сравнению с пациентами с умеренной активностью патологического процесса (0,24 [0,22; 0,85]%; 0,00015 [0,0001; 0,0006] $\cdot 10^9$ /л соответственно; $p < 0,05$; рис. 3). Среди пациентов, достигших ремиссии/низкой активности за-

болевания по индексу DAS28 к 24-й неделе терапии, отмечалась тенденция к более низкому уровню СРБ (4 [2,4; 49,4] мг/л) и меньшей длительности заболевания – 4 [3; 5] мес, по сравнению с больными с умеренной активностью патологического процесса (23,3 [17,1; 30,7] мг/л; 5 [4; 7] мес; $p = 0,052$).

Обсуждение

Результаты исследования свидетельствуют о позитивном влиянии терапии МТ на функциональную активность T_{reg} при раннем РА, что проявляется в увеличении пропорции и числа T_{reg} с высоким уровнем маркеров активации, свидетельствующем об их повышенной супрессорной активности. Этот эффект был более выражен в группе пациентов, достигших ремиссии/низкой активности заболевания на фоне лечения.

В ряде работ продемонстрировано изменение уровня T_{reg} , а также соотношения $T_{reg}/Th17$ на фоне применения МТ. Х.Ю и соавт. [19] на мышиных моделях продемонстрировали увеличение содержания T_{reg} , снижение числа Th17-лимфоцитов, а также дендритных клеток на фоне комбинированной терапии МТ и циклофосамидом. Также в ряде исследований был продемонстрирован эффект МТ в культурах клеток [20–23]. При воздействии препарата на мононуклеарные клетки, выделенные из периферической крови пациентов с РА, регистрировали усиление продукции FoxP3, а также секреции CD4+ лимфоцитами ИЛ10, ТФР β ; также отмечено повышение супрессорной активности T_{reg} и снижение уровня мРНК ИЛ17 [22]. Е. Pегicolini и соавт. [21] продемонстрировали способность МТ подавлять продукцию ИЛ17 и связанных с ним цитокинов ИЛ6, ИЛ22 и ИЛ23 в культурах мононуклеарных клеток пациентов с РА. Интересные данные были получены G. Guggino и соавт. [20], установившими снижение процентного содержания Th17-клеток у пациентов с ранним РА на фоне применения МТ *in vitro*. Также необходимо отметить, что МТ повышал продукцию FoxP3 мононуклеарными клетками периферической крови, выделенными от больных РА, и не оказывал влияния на клетки здоровых доноров [21, 23]. В нашей работе было выявлено повышение ПК и абс. CD152+surface на поверхности T_{reg} через 24 нед после назначения МТ, причем уровень данного маркера на тот момент был выше, чем в группе здоровых доноров.

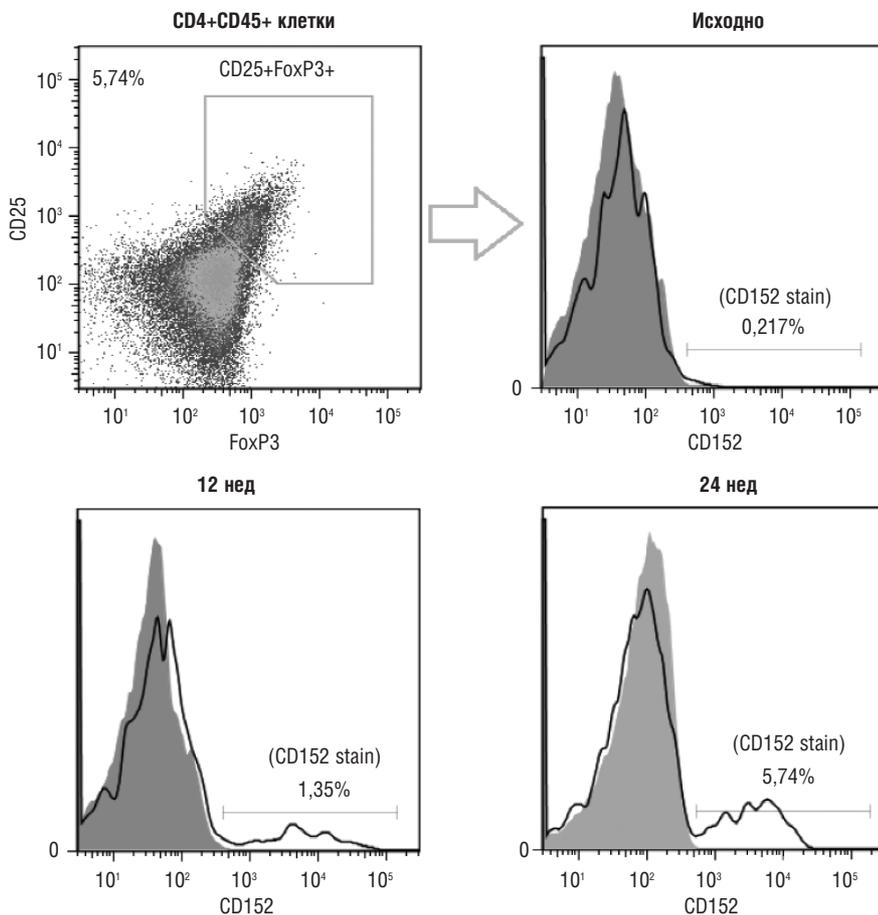


Рис. 1. Динамика уровня CD152+surface в группе больных РА на фоне терапии МТ

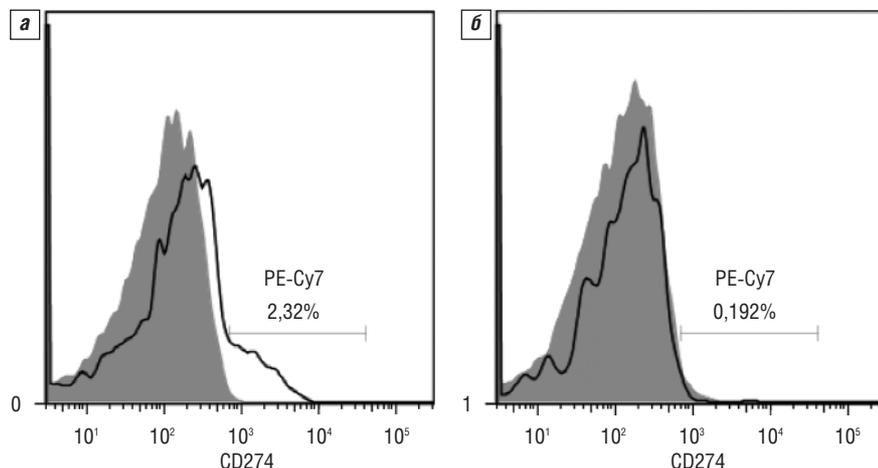


Рис. 2. Уровень FoxP3+CD274+ Т-лимфоцитов в группах больных, достигших (а) и не достигших (б) ремиссии по SDAI к 24-й неделе терапии МТ

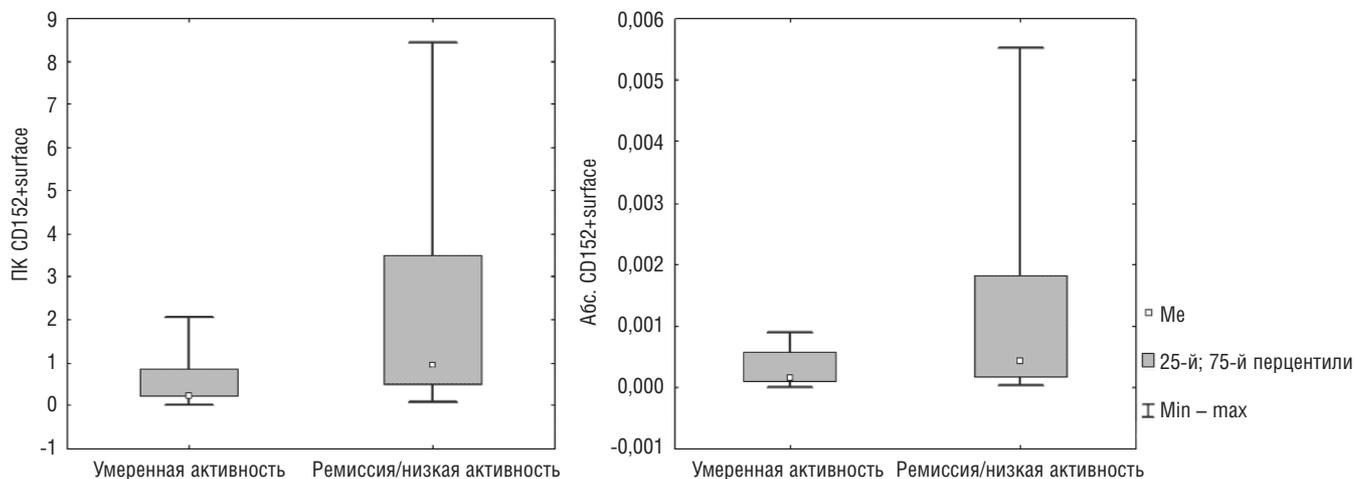


Рис. 3. Исходный уровень CD152+surface в группах пациентов, достигших и не достигших ремиссии/низкой активности заболевания по DAS28 к 24-й неделе терапии МТ

R. Peres и соавт. [24] проанализировали уровень T_{reg} у пациентов с РА в зависимости от эффективности МТ. В исследование было включено 122 пациента с РА, получавших МТ в стабильной дозе 15–20 мг/нед не менее 4 нед. Все пациенты были разделены на две группы: ответивших ($n=53$; DAS28 <3,0) и не ответивших ($n=69$; DAS28 >4,0) на терапию. В группе ответивших на терапию регистрировали увеличение числа FoxP3+ регуляторных клеток и продуцирующих ИЛ10 CD4+ лимфоцитов, а также более низкое ПК CD4+ИЛ17+ (Th17) и CD4+ интерферона γ (ИФН γ) + (Th1) клеток, по сравнению с группой не ответивших на лечение. У наших пациентов, достигших ремиссии/низкой активности заболевания по SDAI к 24-й неделе лечения МТ, регистрировалось более высокое ПК FoxP3+CD274+ T-лимфоцитов, по сравнению с больными, у которых сохранялась активность заболевания, что также свидетельствует о повышении функциональной активности T_{reg} на фоне успешной терапии МТ.

Недавно были получены новые данные, свидетельствующие о влиянии МТ на эпигенетические дефекты функции T_{reg} [25, 26]. Напомним, что эпигенетическая регуляция генов, в первую очередь метилирование ДНК, играет существенную роль в контроле их функции [27] и участвует в экспрессии транскрипционного регулятора T_{reg} – FoxP3 [27]. Снижение функции T_{reg} у пациентов с ранним РА, не получавших БПВП, ассоциируется со снижением экспрессии CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte protein 4) [25]. Полагают, что механизм, определяющий этот феномен, связан с усилением метилирования фактора транскрипции NFAT (nuclear factor of activated T cells), располагающегося в промоторном участке гена CTLA-4. Это приводит к нарушению транскрипционной активности и, как следствие, снижению экспрессии CTLA-4 [25]. На фоне лечения МТ отмечается усиление экспрессии FoxP3 и CTLA-4, что способствует нормализации супрессивной функции T_{reg} . Механизм, лежащий в основе этого уникального эпигенетического эффекта МТ, связан со снижением экспрессии гена ДНК метилтрансферазы, приводящим к существенному уменьшению метилирования ДНК [26]. В нашей работе применение МТ при раннем РА сопровождалось почти двукратным повышением уровня CD152 на поверхности T_{reg} .

По-прежнему актуальной остается проблема персонализированного выбора оптимальной схемы лечения раннего РА. Диапазон времени, когда может быть получен максимальный эффект от противовоспалительных препаратов («окно возможностей»), составляет, по разным данным, 14–19 нед от начала заболевания [28], и назначение адекватной терапии именно в этот период позволяет добиться наилучших результатов. Поэтому проблема поиска биомаркеров, позволяющих осуществлять персонализированный выбор схемы лечения в каждом конкретном случае, остается актуальной. Учитывая, что МТ является «золотым стандартом» терапии РА, поиск предикторов эффективности именно МТ представляется крайне необходимым. R. Peres и соавт. [24] продемонстрировали роль CD39 в качестве предиктора эффективности терапии МТ в группе из 122 пациентов с РА, получавших МТ в стабильной дозе 15–20 мг/нед не менее 4 нед. Авторы выявили более высокий уровень CD39 на поверхности T_{reg} , а также большее содержание CD4+CD39+CD25+ и CD4+CD39+CD25+FoxP3+ T-лимфоцитов у ответивших на терапию МТ, по сравнению с пациентами, не ответившими на лечение. Уровень CD73+CD4+ клеток достоверно не различался среди ответивших и не ответивших на лечение. Также авторы [24] проанализировали плотность CD39 на поверхности CD4+CD25+FoxP3+ клеток до и после терапии МТ и установили, что исходно более низкая экспрессия данного клеточного маркера ассоциируется с отсутствием эффекта МТ. Подобные результаты могут быть обусловлены одним из возможных механизмов действия МТ, связанным с поддержанием высокого внеклеточного уровня аденозина, являющегося «антивоспалительным» медиатором [29, 30]. CD39 обладает способностью катализировать внеклеточный гидролиз аденозинтрифосфата и совместно с CD73 индуцирует синтез аденозина [31]. Блокирование аденозиновых рецепторов снижает противовоспалительный эффект МТ, что было продемонстрировано как в организме человека, так и на моделях лабораторных животных [32, 33]. Кроме того, МТ не оказывает противовоспалительного эффекта у мышей с дефицитом CD73 [34]. Экспрессия CD39 характерна для T_{reg} и определяет, видимо, один из иммуносупрессивных механизмов действия этих клеток [31]. Аденозин подавляет T-эффекторные

клетки посредством активации рецепторов аденозина 2a и 2b, которые блокируют пролиферацию клеток, высвобождение цитотоксических гранул и секрецию провоспалительных цитокинов [35–37]. Активация 2a-рецепторов увеличивает пролиферацию iT_{reg} путем ингибирования экспрессии ИЛ6 и повышения продукции ТФР β . Кроме того, аденозин может влиять на функцию дендритных клеток, модулируя их созревание и фенотип [38, 39]. В нашей работе более благоприятный ответ на МТ ассоциировался с исходно более высоким уровнем CD152+surfase, а также с меньшей длительностью заболевания и более низким уровнем СРБ. Вероятно, это связано с менее выраженными изменениями функциональной активности T_{reg} при меньшей длительности заболевания, и назначение МТ как можно раньше после начала болезни является максимально эффективным.

Таким образом, применение МТ при раннем РА сопровождается повышением супрессорной активности T_{reg} , проявляющейся в увеличении ПК и абс CD152+surfase и FoxP3+CD274+ клеток, более выраженного среди

пациентов, достигших ремиссии/низкой активности заболевания на фоне лечения. Повышение уровней данных маркеров свидетельствует об увеличении функциональной активности T_{reg} при успешной терапии МТ. Представленные данные дают возможность лучше понять механизм действия МТ при РА, а также выявить возможные предикторы эффективности терапии, что позволит персонализировать лечение на самых ранних стадиях заболевания.

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. 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].
2. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* 2004;50:380-6. doi: 10.1002/art.20018
3. Shi J, van de Stadt LA, Levarht EW, et al. Anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies precede the onset of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2014;73:780-3. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204154
4. Kokkonen H, Soderstrom I, Rocklov J, et al. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62:383-91. doi: 10.1002/art.27186
5. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Ann Rev Immunol.* 2004;22:531-62. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122
6. Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, et al. Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2011;10:744-55. doi: 10.1016/j.autrev.2011.05.004
7. Насонов ЕЛ, Александрова ЕН, Авдеева АС, Рубцов ЮП. Т-регуляторные клетки при ревматоидном артрите. Научно-практическая ревматология. 2014;52(4):430-7 [Nasonov EL, Aleksandrova EN, Avdeeva AS, Rubtsov YP. T-regulatory cells in rheumatoid arthritis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice.* 2014;52(4):430-37. (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2014-430-437
8. Rudensky AY. Regulatory T cells and FoxP3. *Immunol Rev.* 2011;241:260-8. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01018.x
9. 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. *Arthritis Res Ther.* 2004;6:R335-46. doi: 10.1186/ar1192
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. Авдеева АС, Рубцов ЮП, Попкова ТВ и др. Особенности фенотипа Т-регуляторных клеток при раннем ревматоидном артрите. Научно-практическая ревматология. 2016;54(6):660-6 [Avdeeva AS, Rubtsov YP, Popkova TV, et al. Phenotypic features of T regulatory cells in early rheumatoid arthritis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice.* 2016;54(6):660-6 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2016-660-666
19. Yu X, Wang C, Luo J, et al. Combination with methotrexate and cyclophosphamide attenuated maturation of dendritic cells: inducing Treg skewing and Th17 suppression in vivo. *Clin Develop Immunol.* 2013;Article ID 238035:12 p.

20. Guggino G, Giardina A, Ferrante A, et al. The in vitro addition of methotrexate and/or methylprednisolone determines peripheral reduction in Th17 and expansion of conventional Treg and of IL-10 producing Th17 lymphocytes in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2015;35:171-5. doi: 10.1007/s00296-014-3030-2
21. Pericolini E, Gabrielli E, Alunno A, et al. Functional improvement of regulatory T cells from rheumatoid arthritis subjects induced by capsular polysaccharide glucuronoxylomannogalactan. *PLoS ONE.* 2014;9:Article ID e111163.
22. Li Y, Jiang L, Zhang S, et al. Methotrexate attenuates the Th17/IL-17 levels in peripheral blood mononuclear cells from healthy individuals and RA patients. *Rheumatol Int.* 2012;32:2415-22. doi: 10.1007/s00296-011-1867-1
23. Oh JS, Kim Y-G, Lee SG, et al. The effect of various disease-modifying anti-rheumatic drugs on the suppressive function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Rheumatol Int.* 2013;33:381-8. doi: 10.1007/s00296-012-2365-9
24. Peres R, Liew F, Talbot J, et al. Low expression of CD39 on regulatory T cells as a biomarker for resistance to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *PNAS.* 2015;122:2509-14. doi: 10.1073/pnas.1424792112
25. Cribbs AP, Kennedy A, Penn H, et al. Regulatory T cell function in rheumatoid arthritis is compromised by CTLA-4 promoter methylation resulting in a failure to activate the IDO pathway. *Arthritis Rheum.* 2014;66:2344-54. doi: 10.1002/art.38715
26. Cribbs AP, Kennedy A, Penn H, et al. Methotrexate restores regulatory T cell function through demethylation of the FoxP3 upstream enhancer in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2015;67:1182-92. doi: 10.1002/art.39031
27. Kennedy A, Schmiudt EM, Cribbs AP, et al. A novel upstream enhancer of FOXP3, sensitive to methylation-induced silencing, exhibit dysregulated methylation in rheumatoid arthritis T reg cells. *Eur J Immunol.* 2014;44:2668-78. doi: 10.1002/eji.201444453
28. Van Nies JA, Gaujoux-Viala C, Tsonaka R, et al. When does the therapeutic window of opportunity in rheumatoid arthritis close? A study in two early RA cohorts. *Ann Rheum Dis.* 2014;73 Suppl 2. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-eular.5266
29. Cronstein BN. Low-dose methotrexate: A mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev.* 2005;57(2):163-72. doi: 10.1124/pr.57.2.3
30. Cronstein BN, Eberle MA, Gruber HE, Levin RI. Methotrexate inhibits neutrophil function by stimulating adenosine release from connective tissue cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(6):2441-5. doi: 10.1073/pnas.88.6.2441
31. 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;204(6):1257-65. doi: 10.1084/jem.20062512
32. Montesinos MC, Yap JS, Desai A, et al. Reversal of the anti-inflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists theophylline and caffeine: Evidence that the anti-inflammatory effects of methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(3):656-63. doi: 10.1002/1529-0131(200003)43:3<656::AID-ANR23>3.0.CO;2-H
33. Neshar G, Mates M, Zevin S. Effect of caffeine consumption on efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(2):571-2. doi: 10.1002/art.10766
34. Montesinos MC, Takedachi M, Thompson LF, et al. The anti-inflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5'-nucleotidase: findings in a study of ecto-5'-nucleotidase gene-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 2007;56(5):1440-5. doi: 10.1002/art.22643
35. Sitkovsky MV, Ohta A. The 'danger' sensors that STOP the immune response: The A2 adenosine receptors? *Trends Immunol.* 2005;26(6):299-304. doi: 10.1016/j.it.2005.04.004
36. Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(9):759-70. doi: 10.1038/nrd2638
37. Hasko G, Cronstein BN. Adenosine: An endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* 2004; 25(1):33-9. doi: 10.1016/j.it.2003.11.003
38. Carregaro V, Sa-Nunes A, Cunha TM, et al. Nucleosides from *Phlebotomus papatasi* salivary gland ameliorate murine collagen-induced arthritis by impairing dendritic cell functions. *J Immunol.* 2011;187(8):4347-59. doi: 10.4049/jimmunol.1003404
39. Li L, Huang L, Ye H, et al. Dendritic cells tolerized with adenosine A2AR agonist attenuate acute kidney injury. *J Clin Invest.* 2012;122(11):3931-42. doi: 10.1172/JCI63170