Особенности фенотипа Т-регуляторных клеток при ранней и развернутой стадиях ревматоидного артрита

Авдеева А.С.[1], Рубцов Ю.П.[2], Попкова Т.В.[1], Дыйканов Д.Т.[2], Алексанкин А.П.[1], Насонов Е.Л.[1, 3]

[1]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва, Россия; [2]ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», факультет фундаментальной медицины, кафедра биохимии и молекулярной медицины, Москва, Россия; [3]ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), кафедра ревматологии Института профессионального образования, Москва, Россия
[1]115522, Москва, Каширское шоссе, 34А; [2]119192, Москва, Ломоносовский пр., 27, к. 1; [3]119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

[1]V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia; [2]Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Fundamental Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; [3]Department of Rheumatology, Institute of Professional Education, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia
[1]34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522; [2]27, Lomonosovsky Pr., Build. 1, Moscow 119192; [3]8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991

Контакты: Авдеева Анастасия Сергеевна; **9056249400@mail.ru**

Contact: Anastasia Avdeeva; **9056249400@mail.ru**

Поступила 04.04.18

Цель исследования – проанализировать уровни CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD56+ Т-лимфоцитов, FoxP3+ регуляторных Т-клеток ($T_{рег}$) и CD19+ В-лимфоцитов у пациентов с ранним и развернутым ревматоидным артритом (РА).
Материал и методы. В исследование было включено 45 не получавших ранее метотрексат (МТ-наивных) пациентов с ранним РА и 15 пациентов с развернутым РА. Процентное (ПК) и абсолютное (абс.) количество CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD16+CD56+, CD19+, $T_{рег}$ (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. У пациентов с ранним РА регистрировалось более низкое, по сравнению со здоровыми донорами, ПК FoxP3+CD25+ клеток, ПК и абс. FoxP3+ ICOS+ клеток, ПК и абс. FoxP3+CD154+ клеток и FoxP3+ CD274+ Т-клеток ($p<0,05$ во всех случаях).
У пациентов с развернутым РА также регистрировалось более низкое, по сравнению со здоровыми донорами, ПК FoxP3+CD25+ клеток, ПК и абс. FoxP3+ ICOS+ клеток, ПК и абс. FoxP3+CD154+ клеток и FoxP3+ CD274+ Т-клеток ($p<0,05$ во всех случаях).
Среди пациентов с развернутым РА регистрировалось более высокое, по сравнению с больными с ранней стадией заболевания, содержание CD4+ лимфоцитов (50,7 [44,4; 53,1] и 45,0 [38,0; 49,2]) и более низкое ПК CD25+CD127- Т-лимфоцитов (5,0 [4,0; 5,7] и 6,5 [5,1; 7,9]; $p<0,05$ во всех случаях).
Заключение. У пациентов с РА (как с ранней, так и развернутой стадией заболевания) наблюдается снижение как уровня, так и функциональной активности $T_{рег}$. У больных с развернутой стадией заболевания, по сравнению с пациентами с ранней стадией РА, регистрируется повышение уровня CD4+ лимфоцитов и более низкий уровень CD25+CD127- клеток, что свидетельствует о более выраженных нарушениях гомеостаза $T_{рег}$ при развернутой стадии РА.
Ключевые слова: ранний ревматоидный артрит; Т-лимфоциты; В-лимфоциты; Т-регуляторные клетки.
Для ссылки: Авдеева АС, Рубцов ЮП, Попкова ТВ и др. Особенности фенотипа Т-регуляторных клеток при ранней и развернутой стадиях ревматоидного артрита. Научно-практическая ревматология. 2018;56(4):423-428.

FEATURES OF THE PHENOTYPE OF REGULATORY T CELLS IN EARLY AND ADVANCED RHEUMATOID ARTHRITIS

Avdeeva A.S.[1], Rubtsov Yu.P.[2], Popkova T.V.[1], Dyikanov D.T.[2], Aleksankin A.P.[1], Nasonov E.L.[1, 3]

Objective: to analyze the levels of CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, and CD3-CD56+ T lymphocytes, FoxP3+ regulatory T cells (T_{reg}), and CD19+ B lymphocytes in patients with early and advanced rheumatoid arthritis (RA).
Subjects and methods. The investigation enrolled 45 patients previously untreated with methotrexate (MTX-naive) who had early RA and 15 patients who had advanced RA. Immunofluorescence staining and multicolor flow cytometry assays were used to estimate the percentage and absolute (abs) counts of CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD16+CD56+, CD19+, T_{reg} (FoxP3+CD25+; surface CD152+; intracellular CD152+; FoxP3+CD127; CD25+CD127-; FoxP3+ICOS+; FoxP3+CD154+; and FoxP3+CD274+.
Results and discussion. The patients with early RA were found to have a lower percentage of FoxP3+CD25+ cells and lower percentages and abs counts of FoxP3+ ICOS+ cells, FoxP3+CD154+ cells, and FoxP3+ CD274+ T cells than healthy donors ($p<0.05$ in all cases).
The patients with advanced RA were also recorded to have a lower percentage of FoxP3+CD25+ cells and lower percentages and abs contents of FoxP3+ ICOS+ cells, FoxP3+CD154+ cells, and FoxP3+ CD274+ T cells ($p<0.05$ in all cases).
The patients with advanced RA compared to those with early RA had a higher content of CD4+ lymphocytes (50.7 [44.4; 53.1] and 45.0 [38.0; 49.2]) and lower percentages of CD25+CD127- T lymphocytes (5.0 [4.0; 5.7] and 6.5 [5.1; 7.9] respectively; $p<0.05$ in all cases).
Conclusion. Patients with RA (with the early or advanced stage of the disease) show a decrease in both the counts and functional activity of T_{reg}. The patients with advanced RA compared with those with early RA showed an increase in CD4+ lymphocyte counts and a decrease in CD25+CD127- cell levels, which suggests that there are more pronounced impairments in T_{reg} homeostasis in advanced RA.
Keywords: early rheumatoid arthritis; T lymphocytes; B lymphocytes; regulatory T cells.
For reference: Avdeeva AS, Rubtsov YuP, Popkova TV, et al. Features of the phenotype of regulatory T cells in early and advanced rheumatoid arthritis. Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice. 2018;56(4):423-428 (In Russ.).
doi: 10.14412/1995-4484-2018-423-428

Регуляторные Т-лимфоциты ($T_{рег}$) играют ключевую роль в иммунной системе благодаря подавлению гипериммунного ответа в отношении аутоантигенов, а также кишечных условно-патогенных микроорганизмов [1–6]. Во многих исследованиях было показано, что дефекты в CD4+CD25+FOXP3+$T_{рег}$ способствуют развитию аутоиммунных забо-

леваний и что эти процессы можно предотвратить путем адаптивного переноса функциональных $T_{рег}$ от здоровых животных [7–9]. 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* (forkhead box P3) и проявляющиеся в развитии летального синдрома IPEX (Immunodysregiilation, Polyendocrinopathy and Enteropathy, X-Linked), характеризующегося сахарным диабетом 1-го типа, тиреоидитом, тяжелой аллергией и воспалительным поражением кишечника, которые сочетаются с цитокиновым «штормом» [10].

Большое количество исследований, посвященных изучению периферической толерантности, сосредоточены на изучении числа Foxp3+ регуляторных клеток, их функциональной активности, а также феномена пластичности, т. е. способности этих клеток переходить в другие типы CD4+Т-лимфоцитов при определенных условиях [11, 12]. У человека $T_{рег}$ относятся к субпопуляции CD4+Foxp3+Т-клеток и отличаются высоким уровнем CD25 и низким – CD127 на клеточной поверхности. Функциональная активность $T_{рег}$ зависит от набора поверхностных маркеров: CTLA-4, ICOS, CD154, CD274 и ряда других, участвующих в контроле активации Т-клеток (табл. 1).

Ревматоидный артрит (РА) – системное аутоиммунное воспалительное заболевание, характеризующееся хроническим воспалением синовиальной оболочки суставов и прогрессирующей деструкцией костной и хрящевой ткани [22, 23]. По современным представлениям, ключевую роль в развитии синовиального воспаления и суставной деструкции при РА играют активированные CD4+ Т-лимфоциты, распознающие аутоантигены, что способствует активации В-лимфоцитов и макрофагов, а также усиливает продукцию цитокинов [23–25].

Таблица 1 Основные маркеры регуляторных Т-лимфоцитов

Маркер	Функция
FoxP3	Ядерный фактор транскрипции, основной внутриклеточный маркер $T_{рег}$. Необходим для проявления регуляторного фенотипа [4, 6, 7]
CD25	CD25 совместно с CD 122 (β-цепь рецептора ИЛ2Р) и CD132 (γ-цепь ИЛ2Р) составляют высокоаффинный ИЛ2Р на поверхности $T_{рег}$, что позволяет им успешно конкурировать за потребление ИЛ2 с наивными клетками и $T_{эфф}$ [6, 7]
CD 127	Рецептор ИЛ7, негативный маркер $T_{рег}$
CTLA-4 (CD152)	Поверхностный иммуноглобулин-подобный гликопротеин, обладает большим большим сродством к костимуляторным молекулам CD80/86 на поверхности АПК. CTLA-4 ингибирует Т-клеточный ответ, что приводит к уменьшению пролиферации и продукции цитокинов [3, 13–15]
ICOS (Inducible costimulator)	Член семейства костимуляторных молекул; повышает пролиферацию Т-клеток и продукцию цитокинов. Высокий уровень ICOS коррелирует с активированным состоянием $T_{рег}$ и свидетельствует об их повышенной иммуносупрессорной активности [16, 17]
CD154 (CD40L)	Костимуляторная молекула; является маркером активации $T_{рег}$; его уровень хорошо коррелирует со способностью $T_{рег}$ к иммуносупрессии [18]
PD-1 (programmed death-1 – CD 279) и его лиганды: PD-L1 (CD274) и PD-L2 (CD273)	PD-1 и его лиганды стимулируют развитие и функционирование $T_{рег}$, а также ингибируют пролиферацию $T_{эфф}$ на периферии [19–21]

Примечание. ИЛ – интерлейкин, $T_{эфф}$ – Т-эффекторные Т-клетки, АПК – антиген-презентирующие клетки.

Особое внимание в последнее время уделяется вопросам раннего РА, до сих пор не до конца понятна эволюция «недифференцированного» артрита, с нечеткими признаками того или иного заболевания в типичный РА, именно этот этап болезни наиболее интересен с точки зрения изучения иммунных механизмов. Оценка состояния Т-клеточного звена иммунной системы на разных стадиях заболевания может быть важна для понимания механизмов, лежащих в основе развития РА, и для уточнения эволюции патологического процесса, что может способствовать разработке новых терапевтических подходов. В ряде работ было показано, что изменения в синовиальной оболочке сходны на ранней и развернутой стадиях заболевания [26–28], однако, учитывая системный характер РА, не до конца понятно, существуют ли различия в популяциях Т-лимфоцитов периферического кровотока на различных стадиях РА. Целью нашей работы являлся анализ уровней CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD56+ Т-лимфоцитов, FoxP3+ $T_{рег}$ и CD19+ В-лимфоцитов у пациентов с ранним и развернутым РА.

Материал и методы

В исследование было включено 45 пациентов с ранним (критерии Американской коллегии ревматологов / Европейской антиревматической лиги – ACR/EULAR – 2010 г.) и 15 – с развернутым РА, наблюдавшихся в ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой в период с 2014 по 2016 г. Большинство больных были женского пола, среднего возраста (табл. 2). По длительности РА пациенты разделены на две группы. В первую вошли больные с ранней и очень ранней стадиями заболевания (средняя длительность болезни составила 5 [4; 6] мес), серопозитивные по IgM ревматоидному фактору (РФ) и АЦЦП, имевшие высокую активность воспалительного процесса, I или II рентгенологическую стадию, I функциональный класс. До включения в исследование пациенты первой группы не получали базисные противовоспалительные препараты (БПВП) и глюкокортикоиды. Все пациенты второй группы на момент включения уже получали метотрексат (МТ) в средней дозе 12,5 мг/нед. Всем больным первой группы в качестве первого БПВП был назначен МТ в подкожной форме в начальной дозе 10 мг/нед.

Мононуклеарные клетки выделялись из цельной крови в градиенте плотности фикола, затем окрашивались на различные поверхностные и внутриклеточные маркеры (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD16+CD56+, CD19+, FoxP3+CD25+; CD152+surface; CD152+intracellular; FoxP3+CD127-; CD25+CD127-; FoxP3+ICOS+; FoxP3+CD154+; FoxP3+CD274+), фиксировались и анализировались методом многоцветной проточной цитофлуориметрии на анализаторе BD LSR Fortessa Special Order Research Product (BD). Контрольную группу составили 20 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту

с обследованными пациентами. Нормальные относительные и абсолютные значения различных субпопуляций $T_{рег}$ в крови здоровых доноров составили: процентное количество (ПК) FoxP3+CD25+ от 3,7% до 9,8%, абсолютное значение (абс.) на 109 от 0,03 до 0,11; ПК CD152+surface – 0,13–4,9%, абс. – 0,00006–0,0018; ПК CD152+intracellular – 36,3–89,8%, абс. – 0,00003–0,00108; ПК FoxP3+CD127- – 3,2–8,5%, абс. – 0,03–0,096; ПК CD25+CD127- – 3,9–9,7%, абс. – 0,03–0,09; ПК FoxP3+ICOS+ – 7,0–27,5%, абс. – 0,002–0,019; ПК FoxP3+CD154+ – 0,39–3,25%, абс. – 0,0001–0,0019; ПК FoxP3+CD274+ – 0,47–3,43%, абс. – 0,00016–0,00334.

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 ⩽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 электрохемилюминесцентным методом на анализаторе Cobas e411 (Roche, Швейцария; верхняя граница нормы 17,0 ЕД/мл), а также методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческого набора реагентов (Axis-Shield, Великобритания; верхняя граница нормы 5,0 Ед/мл).

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–Уоллеса, 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

В группе раннего РА 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. Повышенный уровень СРБ отмечался у 30 (66,7%), а повышенная СОЭ – у 26 (57,8%) больных. Среди пациентов с развернутой стадией заболевания медиана DAS28 составила: 6,0 [5,7; 6,4], при этом у 14 (93,3%) регистрировалась высокая, у 1 (6,7%) – умеренная активность патологического процесса. Повышенные уровень СРБ и СОЭ наблюдались у всех больных этой группы.

У пациентов с ранним РА уровень CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD16+CD56+, CD19+ лимфоцитов достоверно не отличался от такового здоровых доноров ($p>0,05$); регистрировались более низкое ПК FoxP3+CD25+ клеток, ПК и абс. FoxP3+ICOS+ клеток, ПК и абс. FoxP3+CD154+ клеток и FoxP3+CD274+ Т-клеток, $p<0,05$ во всех случаях по сравнению с контрольной группой (табл. 3).

У пациентов с развернутым РА уровень CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD16+CD56+, CD19+ лимфоцитов также не отличался от такового здоровых доноров ($p>0,05$); отмечалось более низкое ПК FoxP3+CD25+ клеток, ПК и абс. FoxP3+ICOS+ клеток, ПК и абс. FoxP3+CD154+ клеток и FoxP3+CD274+ Т-клеток, $p<0,05$ во всех случаях по сравнению с контрольной группой (см. табл. 3).

Среди пациентов с развернутым РА, по сравнению с больными с ранней стадией заболевания, выявлялось более высокое ПК CD4+ лимфоцитов (Me 50,7 [44,4; 53,1] и 45,0 [38,0; 49,2]), абс. CD3-CD56+ лимфоцитов (0,2 [0,2; 0,3] и 0,17 [0,09; 0,20]); более низкое ПК CD25+CD127- Т-лимфоцитов (5,0 [4,0; 5,7] и 6,5 [5,1; 7,9] соответственно; $p<0,05$ во всех случаях).

В группе раннего РА определялась отрицательная корреляционная взаимосвязь: ПК FoxP3+CD25+ с СРБ (r=-0,4) и СОЭ (r=-0,43); ПК CD152+ intracellular с DAS28 (r=-0,4), СОЭ (r=-0,52) и СРБ (r=-0,55); ПК FoxP3+CD127- с СОЭ (r=-0,41), СРБ (r= -0,48); ПК CD25+CD127- с DAS28 (r=-0,53), SDAI (r=-0,5), CDAI (r=-0,44), СОЭ (r=-0,56) и СРБ (r=-0,53); $p<0,05$ во всех случаях.

При развернутом РА выявлена отрицательная корреляция ПК CD4+ лимфоцитов и ПК FoxP3+ICOS+ с уровнем IgM РФ (r=-0,65 и r=-0,69) соответственно, $p<0,05$ во всех случаях.

Обсуждение

Мы проанализировали уровни CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD56+ Т-лимфоцитов, CD19+ В-лимфоцитов, а также уровень и особенности фенотипа FoxP3+ $T_{рег}$. У пациентов с РА (как с ранней, так и развернутой стадией заболевания) было выявлено более низкое ПК FoxP3+CD25+$T_{рег}$, а также ПК и абс. FoxP3+ICOS+, FoxP3+CD154+, FoxP3+CD274+ Т-клеток по сравнению со здоровыми донорами. В литературе представлены противоречивые данные об уровне $T_{рег}$ в периферической крови при РА. Выявлено как уменьшение ПК циркулирующих

Таблица 2 Общая клинико-иммунологическая характеристика пациентов, включенных в исследование

Показатель	Группа раннего РА (n=45)	Группа развернутого РА (n=15)
Пол, мужчины/женщины, n	6/39	3/12
Возраст, годы, Me [25-й; 75-й перцентили]	52,0 [32,5; 57,5]	57,0 [29; 68,5]
Длительность заболевания, мес, Me [25-й; 75-й перцентили]	5 [4; 6]	49 [18; 108]
Рентгенологическая стадия РА, I/II/III/IV, n (%)	21(46,7)/24 (53,3)/0/0	2(13,3)/9(60)/4(26,7)/0
DAS28, Me [25-й; 75-й перцентили]	5,01 [4,18; 5,8]	6,03 [5,7; 6,42]
СОЭ, мм/ч, Me [25-й; 75-й перцентили]	36,0 [18,0; 54,0]	51,0 [36,0; 60,0]
СРБ, мг/л, Me [25-й; 75-й перцентили]	12,1 [2,9; 37,4]	14,6 [9,9; 38,9]
IgM РФ, МЕ/мл, Me [25-й; 75-й перцентили] позитивных	94,5 [17,8; 186,0] 34 (75,6%)	56,1 [22,4; 221,5] 64,1%
АЦЦП, Ед/мл, Me [25-й; 75-й перцентили] позитивных	105,0 [42,5; 230,6] 40 (88,9%)	80,9 [36,8; 300] 86,7%

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

Таблица 3 Субпопуляции лимфоцитов в группах раннего, развернутого РА у здоровых доноров, Me [25-й; 75-й перцентили]

Показатель	Ранний РА (n=45)	Развернутый РА (n=15)	Здоровые доноры
ПК CD3+	76,6 [68,1; 81,4]	76,7 [72,6; 81,5]	77,05 [68,4; 79,7]
абс. CD3+	1,2 [0,9; 1,6]	1,2 [0,9; 1,7]	1,3 [1,2; 1,8]
ПК CD3+CD4+	45,0 [38,02; 49,2]	50,7 [44,4; 53,11]$	46,2 [39,14; 50,39]
абс. CD3+CD4+	0,82 [0,57; 1,09]	1,0 [0,58; 1,17]	0,79 [0,68; 0,97]
ПК CD3+CD8+	20,7 [17,9; 24,6]	19,4 [15,6; 23,5]	20,95 [18,6; 23,7]
абс. CD3+CD8+	0,3 [0,2; 0,5]	0,3 [0,2; 0,4]	0,35 [0,3; 0,5]
Индекс Тх/Тц	2,6 [2; 3,2]	2,9 [2,3; 4,5]	2,5 [1,9; 3,1]
ПК CD3-CD56+	8,3 [6,9; 14,5]	11 [8,6; 17,7]	12,95 [8,5; 16,8]
абс. CD3-CD56+	0,17 [0,09; 0,2]	0,2 [0,2; 0,3]$	0,2 [0,2; 0,5]
ПК CD19+	11,1 [7,4; 13,1]	8,4 [5; 9,9]	9,7 [6,9; 12,3]
абс. CD19+	0,2 [0,1; 0,3]	0,1 [0,09; 0,1]	0,15 [0,1; 0,3]
ПК FoxP3+CD25+	5,57 [4,6; 6,93]#	4,73 [4,0; 6,02]*	6,92 [5,84; 7,96]
абс. FoxP3+CD25+	0,05 [0,03; 0,06]	0,04 [0,03; 0,06]	0,05 [0,04; 0,07]
ПК CD152+surface	0,65 [0,22; 1,67]	0,52 [0,29; 0,79]	0,51 [0,34; 1,2]
абс. CD152+surface	0,0002 [0,0001; 0,0008]	0,0002 [0,0002; 0,0003]	0,0003 [0,00014; 0,0008]
ПК CD152+intracellular	62,9 [47,0; 75,4]	69,46 [60,2; 78,4]	60,29 [50,62; 70,16]
абс. CD152+intracellular	0,0005 [0,00008; 0,002]	0,00017 [0,0001; 0,0003]	0,00021 [0,00008; 0,00058]
ПК FoxP3+CD127;	5,96 [4,58; 7,32]	5,27 [3,93; 6,1]	6,015 [4,99; 6,905]
абс. FoxP3+CD127;	0,05 [0,04; 0,064]	0,045 [0,03; 0,06]	0,05 [0,04; 0,06]
ПК CD25+CD127;	6,5 [5,11; 7,91]	5,03 [4,0; 5,67]*$	6,47 [5,17; 7,58]
абс. CD25+CD127;	0,056 [0,037; 0,069]	0,04 [0,035; 0,059]	0,054 [0,04; 0,064]
ПК FoxP3+ICOS+	5,33 [2,14; 11,3]#	5,69 [3,02; 10,4]*	10,83 [9,27; 13,7]
абс. FoxP3+ICOS+	0,002 [0,0013; 0,0056]#	0,003 [0,002; 0,005]*	0,0068 [0,0039; 0,009]
ПК FoxP3+CD154+	0,38 [0,19; 0,83]	0,3 [0,21; 0,95]*	1,51 [1,12; 2,08]
абс. FoxP3+CD154+	0,0002 [0,0001; 0,0005]#	0,0002 [0,00009; 0,0005]*	0,00087 [0,00047; 0,0014]
ПК FoxP3+CD274+	0,61 [0,28; 1,25]#	0,59 [0,38; 1,35]*	1,94 [1,16; 2,25]
абс. FoxP3+CD274+	0,00023 [0,0001; 0,00065]#	0,00027 [0,00015; 0,0007]*	0,001 [0,0006; 0,0016]

Примечание. #p<0,05 между группой раннего РА и здоровыми донорами; *p<0,05 между группой развернутого РА и здоровых доноров; $p<0,05 между группой раннего и развернутого РА.

$T_{рег}$ [29–31], так и увеличение данного показателя [32, 33], а также отсутствие его отличий при РА и у здоровых доноров [34–36] или пациентов с остеоартритом [37]. Вероятно, подобное несоответствие связано со сложностью выделения данной клеточной субпопуляции из общего пула Т-лимфоцитов в связи с отсутствием универсального поверхностного маркера $T_{рег}$. В более ранних исследованиях $T_{рег}$ определяли как CD4+CD25+ лимфоциты и не оценивали экспрессию Foxp3 [29, 32, 38–40]. G. Han и соавт. [33] отметили, что среди CD25+ клеток встречаются Foxp3- Т-лимфоциты, которые не могут считаться регуляторными. Вероятно, с этим могут быть связаны завышенные уровни $T_{рег}$ в периферической крови при РА, продемонстрированные в ряде исследований [32, 33].

Учитывая высокую пластичность $T_{рег}$, мы также оценили функциональную активность данной клеточной субпопуляции путем изучения ряда поверхностных маркеров, участвующих в контроле активации Т-клеток: CTLA-4, ICOS, CD154, CD274. Роль исследуемых маркеров в функционировании $T_{рег}$ представлена в табл. 1. У наших пациентов с РА было выявлено достоверное снижение экспрессии таких костимуляторных молекул, как ICOS, CD154, а также снижение содержания FoxP3+CD274+ Т-лимфоцитов. Важный механизм регуляции баланса между активацией Т-клеток, толерантностью и иммуноопосредованным повреждением тканей связан со стимуляцией рецептора PD-1 (programmed death-1, CD 279) лигандами: PD-L1 (CD274) и PD-L2 (CD273). PD-1 и CTLA-4 являются ключевыми ингибиторными молекулами, влияющими на баланс между защитным иммунитетом и толерантностью [19, 20]. PD-1 присутствует на CD4+ и CD8+ Т-клетках, NK Т-клетках, В-клетках, моноцитах и некоторых дендритных клетках. Его уровень повышен в Т-клетках, утративших эффекторную активность, главным образом, способность секретировать интерферон γ (ИФНγ) в результате хронической вирусной инфекции [21]. PD-1 и его лиганды оказывают различное влияние на Т-клетки: с одной стороны, стимулируют развитие и функционирование $T_{рег}$, с другой – ингибируют пролиферацию $T_{эфф}$ на периферии [21]. Снижение экспрессии CD279 на поверхности $T_{рег}$ свидетельствует о снижении функциональной активности данной клеточной субпопуляции как при раннем, так и при развернутом РА.

При сравнении содержания лимфоцитов в периферическом кровотоке в группах пациентов с различной длительностью заболевания нами было выявлено более высокое ПК CD4+ лимфоцитов, абс. CD3-CD56+ лимфоцитов; более низкое ПК CD25+CD127- Т-лимфоцитов среди больных с развернутым РА. C. Lawson и соавт. [41] продемонстрировали снижение уровня CD4+CD25+ Т-лимфоцитов у больных ранним РА (n=43) и отсутствие отличий по уровню анализируемых клеточных популяций

от здоровых доноров в группе пациентов с развернутой стадией заболевания (n=82), получающих БПВП. Однако, учитывая, что в данной работе в группу раннего РА включались пациенты с длительностью заболевания около 2 лет и удовлетворяющие критериям ACR 1987 г., сопоставление полученных результатов может быть затруднено. Отличные от наших данные также были получены другими авторами, сравнившими уровни CD4+CD25+ Т-лимфоцитов в группах пациентов с недифференцированным артритом (n=10), ранним РА (n=10) и развернутым РА (n=11). Авторы выявили более высокий уровень CD4+CD25+ лимфоцитов у пациентов с ранним РА и отсутствие достоверных различий по уровню CD4+CD25+ клеток между пациентами с развернутым РА и здоровыми донорами [42]. Сходные результаты были получены M. Ehrenstein и соавт. [43], которыми также не было выявлено различий по уровню $T_{рег}$ между пациентами с развернутым РА, получающими БПВП, и здоровыми донорами. Причина подобных различий, возможно, заключается в позитивном влиянии проводимой терапии РА на уровень $T_{рег}$. В наших предыдущих работах было продемонстрировано повышение уровня и функциональной активности $T_{рег}$ на фоне терапии МТ, особенно среди пациентов, достигших ремиссии / низкой активности заболевания на фоне лечения [44]. Учитывая, что в работы J. Pawlowska и соавт. [42] и M. Ehrenstein и соавт. [43] были включены пациенты с низкой и умеренной активностью заболевания, можно предположить, что нормальные уровни $T_{рег}$, выявленные авторами, были связаны именно с эффектами терапии. В нашу группу пациентов с развернутым РА были включены больные с высокой активностью заболевания и неэффективностью МТ, которым в последующем была инициирована терапия ГИБП.

Интерес представляют данные J. Pawlowska и соавт. [42] оценивших содержание CD4+CD28- и CD8+CD28- Т-лимфоцитов в периферическом кровотоке пациентов с РА. Авторы отметили повышение содержания клеточных субпопуляций у пациентов с развернутым РА по сравнению со здоровыми донорами, что не наблюдалось в группе пациентов с ранним РА. В нашей работе также было выявлено повышение общего содержания CD4+ лимфоцитов у пациентов с развернутой стадией заболевания. Рядом авторов была продемонстрирована важная роль CD4+CD28- популяции лимфоцитов в развитии повреждения тканей при аутоиммунных заболеваниях [45–47]. Кроме того, присутствие данной клеточной субпопуляции ассоциируется с высоким уровнем фактора некроза опухоли α (ФНОα). Было также установлено позитивное влияние терапии ингибиторами ФНОα на количество молекул CD28 на поверхности из CD4+ лимфоцитов [47]. Ряд исследователей также показывают, что потеря антигена CD28 на поверхности лимфоцитов является результатом тяжелого хронического воспаления [48].

Таким образом, у пациентов с РА (как с ранней, так и с развернутой стадией заболевания) наблюдается более низкое ПК FoxP3+CD25+ $T_{рег}$, а также низкие ПК и абс. FoxP3+ICOS+, FoxP3+CD154+, FoxP3+CD274+ Т-клеток по сравнению со здоровыми донорами, что свидетельствует о снижении как уровня, так и функциональной активности $T_{рег}$ при РА. У больных с развернутой стадией заболевания, по сравнению с пациентами с ранней стадией РА, регистрируются повышение уровня CD4+ лимфоцитов и более низкий уровень CD25+CD127- клеток, что свидетельствует о более выраженных нарушениях гомеостаза $T_{рег}$ при развернутой стадии РА, вероятно, связанное с длительно текущим хроническим воспалением. Изучение динамики субпопуляций лимфоцитов в процессе развития РА может позволить еще на стадии «недифференцированного» артрита выявлять группы пациентов с потенциально более тяжелым течением заболевания, нуждающихся в наиболее интенсивной терапии.

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. Van Noort JM, van Sechel A, Boon J, et al. Minor myelin proteins can be major targets for peripheral blood T cells from both multiple sclerosis patients and healthy subjects. *J Neuroimmunol.* 1993;46:67-72. doi: 10.1016/0165-5728(93)90234-P
2. Lohmann T, Leslie RD, Londei M. T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes. *J Autoimmun.* 1996;9:385-9. doi: 10.1006/jaut.1996.0052
3. Salomon B, Bluestone JA. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:225-52. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.225
4. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol.* 2010;11:21-7. doi: 10.1038/ni.1817
5. Насонов ЕЛ, Александрова ЕН, Авдеева АС, Рубцов ЮП. Т-регуляторные клетки при ревматических заболеваниях. Научно-практическая ревматология. 2014;52(4):430-7 [Nasonov EL, Aleksandrova EN, Avdeeva AS, Rubtsov YuP. T regulatory cells in rheumatoid arthritis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice.* 2014;52(4):430-7 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2014-430-437
6. 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
7. Zeng H, Chi H. The interplay between regulatory T cells and metabolism in immune regulation. *OncoImmunology.* 2013;2(11):e26586. Epub 2013 Oct 21. doi: 10.4161/onci.26586
8. 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.
9. 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
10. 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
11. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, et al. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med.* 2014;20:62-70. doi: 10.1038/nm.3432
12. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 1996;183:2593-603. doi: 10.1084/jem.183.6.2593

13. Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, et al. Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity* 2010;33:326-39. doi: 10.1016/j.immuni.2010.09.006
14. 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(9):2344-54. doi: 10.1002/art.38715
15. Schneider H, Downey J, Smith A, et al. Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science*. 2006;313:1972-5. doi: 10.1126/science.1131078
16. Sperling AI, Bluestone JA. ICOS costimulation: it's not just for TH2 cells anymore. *Nat Immunol.* 2001;2:573-4. doi: 10.1038/89709
17. Bonhagen K, Liesenfeld O, Stadecker MJ, et al. ICOS Th cells produce distinct cytokines in different mucosal immune responses. *Eur J Immunol.* 2003;33:392-401. doi: 10.1002/immu.200310013
18. Hill D, Eastaff-Leung N, Bresatz-Atkins S, et al. Inhibition of activation induced CD154 on CD4+CD25- cells: a valid surrogate for human T_{reg} suppressor function. *Immunol Cell Biol.* 2012;90:812-21. doi: 10.1038/icb.2012.18
19. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol.* 2007;8:239-45. doi: 10.1038/ni1443
20. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol.* 2007;19:813-24. doi: 10.1093/intimm/dxm057
21. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:677-704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331
22. 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 Guidelance]. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. P. 290-331 (In Russ.)].
23. Firestein G. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003;423:356-61. doi: 10.1038/nature01661
24. Cope A. T cells in rheumatoid arthritis. *Arthr Res Ther.* 2008;10(Suppl1):S1. doi: 10.1186/ar2412
25. 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.
26. Tak PP. Is early rheumatoid arthritis the same disease process as late rheumatoid arthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2001;15:17-26. doi: 10.1053/berh.2000.0123
27. Katrib A, Tak PP, Bertouch JV, et al. Expression of chemokines and matrix metalloproteinases in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2001;40:988-94. doi: 10.1093/rheumatology/40.9.988
28. Smeets TJ, Dolhain RJEM, Miltenburg AM, et al. Poor expression of T cell-derived cytokines and activation and proliferation markers in early rheumatoid synovial tissue. *Clin Immunol Immunopathol.* 1998;88:84-90. doi: 10.1006/clin.1998.4525
29. 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
30. 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
31. 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
32. 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
33. 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
34. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009b;30:899-911. doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.019
35. Miyara M, Ito Y, Sakaguchi S. T reg-cell therapies for autoimmune rheumatic duseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2014. doi: 10.1038/nrhheum.2014.105
36. Prakken B, Wehrens E, van Wijl F. Quality or Quantity? Unraveling the role of T reg cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2013;65:552-4. doi: 10.1002/art.37831
37. 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
38. Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, et al. Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells fromthe target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* 2003;33:215-23. doi: 10.1002/immu.200390024
39. 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
40. 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
41. 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*. 2006;45:1210-7. doi: 10.1093/rheumatology/kel089
42. Pawlowska J, Smolenska Z, Witkowski J, Bryl E. Different pattern of T-cell subpopulations in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis at various stages of disease development. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej.* 2014;124(1-2).
43. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med.* 2004;200:277-85. doi: 10.1084/jem.20040165
44. 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):360-7 [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):360-7 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2017-360-36
45. Weyand CM, Fulbright JW, Goronzy JJ. Immunosenescence, autoimmunity, and rheumatoid arthritis. *Exp Gerontol.* 2003;38:833-41. doi: 10.1016/S0531-5565(03)00090-1
46. Dejaco C, Duftner C, Klauser A, et al. Altered T-cell subtypes in spondyloarthritis, rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica. *Rheumatol Int.* 2010;30:297-303. doi: 10.1007/s00296-009-0949-9
47. Bryl E, Vallejo AN, Matteson EL, et al. Modulation of CD28 expression with anti-tumor necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005;52:2996-3003. doi: 10.1002/art.21353
48. Pawlowska J, Mikosik A, Soroczynska-Cybula M, et al. Different distribution of CD4 and CD8 T cells in synovial membrane and peripheral blood of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009;47:627-32.