

Основные субпопуляции CD8⁺ Т-клеток периферической крови у пациентов с системной красной волчанкой

С.С. Беневоленская¹, И.В. Кудрявцев^{1,2}, М.К. Серебрякова², А.А. Рубинштейн²,
Е.С. Кувардин¹, И.Н. Григорьева¹, Д.Б. Алиев³, Д.Б. Заммеева¹, Д.В. Моторин¹,
А.С. Головкин¹, О.В. Калинина¹, С.В. Лапин⁴, И.З. Гайдукова⁵, А.Л. Маслянский^{1,6},
Е.К. Гайдукова⁷

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России 197341, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2
²ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» 197022, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12
³СПб ГБУЗ «Клиническая ревматологическая больница № 25» 190068, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Большая Подъяческая, 30
⁴ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России 197022, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8
⁵ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России 198015, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41
⁶ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» 199034, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9
⁷Университет Сорбонна 75006, Франция, Париж, улица Школы медицины, 21

Актуальность. Системная красная волчанка (СКВ) — аутоиммунное заболевание, характеризующееся нарушением иммунной толерантности и устойчивой выработкой аутоантител.

Цель исследования — изучение субпопуляционного состава цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов (Тцит) и определение клинического значения выявленных при системной красной волчанке изменений.

Материалы и методы. В исследование включено 35 пациентов с СКВ; 33 здоровых человека составили группу контроля. Для выявления субпопуляций Т-клеток периферической крови использовался метод проточной цитометрии. Т-лимфоциты определяли с использованием антител против CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺. Для определения субпопуляций Тцит применяли антитела против CD45RA и CD62L. На основании комбинации экспрессии рецепторов CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5 обнаружены основные субпопуляции Тцит: цитотоксические клетки 1-го типа (Tc1), 2-го типа (Tc2), 17-го типа (Tc17), 17-го и 1-го типов (Tc17.1), 17/22-го типа (Tc17.22), Т-фолликулярные цитотоксические лимфоциты (Tfc).

Результаты. Абсолютные и относительные значения числа Тцит, наивных Тцит, а также Тцит центральной и эффекторной памяти в группе пациентов с СКВ были статистически значимо выше, чем в контрольной группе. Кроме того, в группе пациентов с СКВ выявлено статистически значимое снижение относительно содержания Tc1, Tc17.1 и Tfc1 и статистически значимое повышение относительного содержания Tc2, Tfc17 и Tfc17.1 по сравнению с группой контроля.

Была обнаружена статистически значимая положительная связь количества Tc1 ($r=0,404$, $p<0,05$; $r=0,526$, $p<0,05$), а также статистически значимая отрицательная связь Tc2 ($r=-0,378$, $p<0,05$; $r=-0,548$, $p<0,05$) с уровнем C3 и C4 компонентов комплемента. Выявлена связь числа Tfc17 и Tfc17.1 с уровнем IgG ($r=-0,42$, $p<0,05$; $r=-0,553$, $p<0,05$), а Tfc1 — с уровнем антител к двуспиральной ДНК ($r=-0,361$; $p<0,05$).

Выводы. Относительные и абсолютные значения численности субпопуляций Тцит периферической крови у пациентов с СКВ изменены по сравнению с группой контроля. Повышение содержания Tc2 при СКВ связано с маркерами активности заболевания. Эти результаты демонстрируют важную роль Tc2 патогенезе СКВ. В то же время субпопуляции Tc1, Tc17, Tc17.1 и Tfc, вероятно, выполняют регуляторные функции.

Ключевые слова: субпопуляции лимфоидных клеток, CD8⁺ Т-клетки, системная красная волчанка, проточная цитометрия

Для цитирования: Беневоленская СС, Кудрявцев ИВ, Серебрякова МК, Рубинштейн АА, Кувардин ЕС, Григорьева ИН, Алиев ДБ, Заммеева ДБ, Моторин ДВ, Головкин АС, Калинина ОВ, Лапин СВ, Гайдукова ИЗ, Маслянский АЛ, Гайдукова ЕК. Основные субпопуляции CD8⁺ Т-клеток периферической крови у пациентов с системной красной волчанкой. *Научно-практическая ревматология*. 2024;62(1):90–97.

MAIN CIRCULATING CD8⁺ T CELL SUBSETS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Stanislava S. Benevolenskaya¹, Igor V. Kudriavtsev^{1,2}, Maria K. Serebriakova², Artem A. Rubinstein²,
Evgeniy S. Kuvardin¹, Irina N. Grigor'yeva¹, Damir B. Aliev³, Darina B. Zammoeva¹, Dmitry B. Motorin¹,
Alexey S. Golovkin¹, Olga V. Kalinina¹, Sergey V. Lapin⁴, Inna Z. Gaydukova⁵, Alexey L. Maslyanskiy^{1,6},
Ekaterina K. Gaydukova⁷

Relevance. Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by loss of immune tolerance and sustained production of autoantibodies.

The aim of the study — to compare composition of peripheral blood cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes (Tc) subsets and assess the clinical significance of them in systemic lupus erythematosus.

Materials and methods. A total of 35 SLE patients and 49 healthy volunteers were included in the study. Phenotyping of peripheral blood T cell subpopulations was carried out by means of flow cytometry. T lymphocytes were determined using CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ antibodies. Tc were identified by using CD45RA and CD62L antibodies. Also the expression of chemokine receptors (CCR4, CCR6, CXCR3 and CXCR5) on Tc cells was assessed and the main Tc subpopulations were determined: Type 1 (Tc1), type 2 (Tc2), type 17 (Tc17), type 17/1 (Tc17.1), type 17/22 (Tc17.22) cytotoxic cells and T follicular cytotoxic cells (Tfc).

Results. The absolute and relative number of Tc was significantly higher in the group of patients with SLE compared with the control group. Additionally, there was a significant decrease in the relative number of Tc1, Tc 17.1 and Tfc1 and a significant increase in the relative number of Tc2, Tfc 17 and Tfc17.1 within the SLE group when compared to the control group. There were significant positive correlation for Tc1 and levels of C3 and C4 complement components ($r=0.404$, $p<0.05$; $r=0.526$, $p<0.05$), as well as significant negative correlation for Tc2 and C3 and C4 complement components ($r=-0.378$, $p<0.05$; $r=-0.548$, $p<0.05$). Also there were significant correlation for T follicular cytotoxic cells (Tfc17 and Tfc17.1) and the level of IgG ($r=-0.42$, $p<0.05$; $r=-0.553$, $p<0.05$), Tfc1 and the level of antibodies to double-stranded DNA ($r=-0.361$; $p<0.05$).

¹Almazov National Medical Research Centre 197341, Russian Federation, Saint Petersburg, Akkuratova str., 2

²Institute of Experimental Medicine 197376, Russian Federation, Saint Petersburg, Akademika Pavlova str., 12

³Saint Petersburg Clinical Rheumatology Hospital N 25 190068, Russian Federation, Saint Petersburg, Bolshaya Podyacheskaya str., 30

⁴Pavlov First Saint Petersburg State Medical University 197022, Russian Federation, Saint Petersburg, L'va Tolstogo str., 6-8

⁵North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov 191015, Russian Federation, Saint-Petersburg, Kirochnaya str., 41

⁶Saint Petersburg State University 199034, Russian Federation, Saint-Petersburg, Universitetskaya embankment, 7-9

⁷Sorbonne University 75006, France, Paris, School of Medicine Street, 21

Контакты:

Беневоленская
Станислава Сергеевна,
stsebe@mail.ru
Contacts: Stanislava
Benevolenskaya,
stsebe@mail.ru

Поступила 10.09.2023

Принята 12.01.2024

Conclusions. The absolute and relative number of peripheral blood Tc subsets is altered in SLE patients compared with the control group. It was found that patients with SLE contained increased number of Tc2 cells, which seems to be associated with markers of disease activity. These results demonstrate a prominent pathological role of Tc2 in SLE. While Tc1, Tc17, Tc17.1, Tfc subsets probably have regulatory functions.

Key words: lymphoid cell subpopulations, CD8⁺ T cells, systemic lupus erythematosus, flow cytometry

For citation: Benevolenskaya SS, Kudriavtsev IV, Serebriakova MK, Rubinstein AA, Kuvardin ES, Grigor'yeva IN, Aliev DB, Zammoeva DB, Motorin DB, Golovkin AS, Kalinina OV, Lapin SV, Gaydukova IZ, Maslyanskiy AL, Gaydukova EK. Main circulating CD8⁺ T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologia = Rheumatology Science and Practice*. 2024;62(1):90–97 (In Russ.).

doi: 10.47360/1995-4484-2024-90-97

Введение

Системная красная волчанка (СКВ) — хроническое аутоиммунное заболевание с поражением различных органов и систем, характеризующееся гиперпродукцией органонеспецифических аутоантител к различным компонентам клеточного ядра и развитием иммуновоспалительного повреждения внутренних органов [1]. В основе заболевания лежит нарушение иммунной толерантности, что приводит к повреждению органов-мишеней. Основные нарушения работы иммунной системы включают дисбаланс субпопуляций Т-лимфоцитов, гиперфункцию В-клеток, выработку большого количества аутоантител и отложение иммунных комплексов, что приводит к повреждению тканей. Нарушение функции гуморального звена иммунитета традиционно считалось основным в патогенезе заболевания; В-клетки и их субпопуляции являются предметом изучения, а также мишенями для анти-В-клеточной терапии [2].

В последнее время появились сообщения об участии в патогенезе СКВ Т-клеточного звена, в том числе данные о роли CD8⁺ Т-лимфоцитов (Тцит). Так, Д.В. Шадуро и соавт. [3] обнаружили повышенное содержание Тцит в периферической крови пациентов с СКВ по сравнению с группой контроля. Р. Blanco и соавт. [4] у пациентов с СКВ наблюдали увеличение числа зрелых активированных Тцит периферической крови, несущих перфорины и гранзимы в составе своих цитоплазматических гранул. L. Couzi и соавт. [5] выявили Тцит в биоптатах почек у пациентов с люпус-нефритом, причем перигломерулярное отложение Тцит ассоциировалось с неблагоприятным прогнозом. По данным S. Dolfi и соавт. [6], абсолютное содержание Тцит в моче характеризуется высокой информативностью, позволяющей отличить активный люпус-нефрит от неактивного, что было также подтверждено в работе J. Klocke и соавт. [7]. Кроме того, циркулирующие в крови Тцит пациентов с СКВ экспрессировали высокий уровень маркеров хронической активации CD38 и HLA-DR [8], что еще раз указывает на участие этих клеток в патогенезе данного заболевания.

Следует отметить, что первоначально Тцит рассматривались как однородная популяция, секретирующая большое количество интерферона (ИФН) γ , перфорины и гранзима В, а основная функция Тцит определялась как уничтожение клеток-мишеней. В настоящее время при использовании в классификации клеток применявшегося ранее для Т-хелперов подхода, основанного на выделении профиля синтезируемых цитокинов и выполняемой функции, идентифицировано несколько подмножеств Тцит: цитотоксические клетки 1-го типа (Тc1), 2-го типа (Тc2), 17-го типа (Тc17), 17-го и 1-го типов (Тc17.1), 17-го и 22-го типов (Тc17.22) [9]. Также в настоящее время известны CXCR5-экспрессирующие Тцит, способные проникать в В-зависимые зоны и проявлять свои эффекторные свойства во вторичных лимфоидных органах (Т-фолликулярные CD8⁺-лимфоциты, Тfc) [10].

Целью данной работы является изучение субпопуляционного состава цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов и определение клинического значения выявленных при системной красной волчанке изменений.

Материалы и методы

В исследование включено 35 пациентов с СКВ; группу контроля составили 33 здоровых человека. Диагноз СКВ соответствовал классификационным критериям Американской коллегии ревматологов/Европейского альянса ревматологических ассоциаций (ACR/EULAR, American College of Rheumatology/European Alliance of Associations for Rheumatology) 2019 г. [11]. Критериями исключения были наличие текущего онкологического, воспалительного или инфекционного заболевания, беременность, а также проведение терапии основного заболевания высокими дозами глюкокортикоидов (пульс-терапия), алкилирующими препаратами (циклофосфамид) или генно-инженерными биологическими препаратами в течение года перед проведением исследования. Активность СКВ оценивалась по индексу SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) в модификации SELENA (Safety of Estrogen in Lupus National Assessment).

В группе пациентов с СКВ медиана возраста составила 39 [32; 50] лет, в группе контроля – 44 [42; 49] года.

В обеих группах преобладали женщины, в группе СКВ было 4 мужчины, в группе контроля – 5 мужчин. Медиана индекса SELENA-SLEDAI у пациентов с СКВ составляла 4,5 [2; 9]; низкую степень активности заболевания имели 28,6% пациентов, умеренную – 51,4%, высокую – 20%.

В группе СКВ все пациенты, кроме одного, получали терапию на момент исследования (96,3%); медиана дозы преднизолона (ПЗ) составляла 10 [0,0; 17,5] мг/сут.; гидроксихлорохин получали 29 пациентов, микофенолата мофетил – 6, азатиоприн – 3, метотрексат – 2. Клиническая характеристика пациентов с СКВ представлена в таблице 1.

Забор образцов производился при пункции кубитальной вены с использованием вакуумных пробирок с содержанием K_3 ЭДТА. Все исследования проводили в день взятия крови. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями производителей антигенов. Для окраски клеток крови использовали следующий набор антигенов, конъюгированных с различными флуорохромами: CD45RA-FITC (Beckman Coulter, США); CD62L-PE (Beckman Coulter, США); CXCR5-PerCP/Cy5.5 (CD185, BioLegend Inc., США); CCR6-PE/Cy7 (CD196, BioLegend Inc., США); CXCR3-APC (CD183, BioLegend Inc., США), CD3-APC-Alexa Fluor 750 (Beckman Coulter, США); CD4-Pacific-Blue (BioLegend Inc., США) для Т-хелперов

Таблица 1. Характеристика больных (n=35)

Показатели	Значение
Женщины, n (%)	31 (88,6)
Возраст (годы), Ме [25-й; 75-й перцентили]	39 [32; 50]
Длительность болезни (годы), Ме [25-й; 75-й перцентили]	5 [3; 12]
SELENA-SLEDAI, Ме [25-й; 75-й перцентили]	4,5 [2; 9]
SELENA-SLEDAI ≤ 3, n (%)	10 (28,6)
3 < SELENA-SLEDAI < 11, n (%)	18 (51,4)
SELENA-SLEDAI ≥ 12, n (%)	7 (20)
Люпус-нефрит, n (%)	13 (37,1)
Артрит/артралгии, n (%)	27 (77,1)
Кожные проявления СКВ, n (%)	13 (37,1)
Фиброзирующий альвеолит, n (%)	3 (8,6)
Психоневрологические проявления, n (%)	5 (14,3)
Алопеция, n (%)	9 (25,7)
Тромбоцитопения, n (%)	15 (42,9)
Лейкопения, n (%)	17 (48,6)
Снижение уровня С3 компонента комплемента, n (%)	14 (40)
Снижение уровня С4 компонента комплемента, n (%)	18 (51,4)
Антитела к двуспиральной ДНК, n (%)	23 (65,7)
Антитела к Sm, n (%)	5 (14,3)
Повышение уровня IgG, n (%)	4 (11,4)
СОЭ (мм/ч), Ме [25-й; 75-й перцентили]	17 [12; 30]
С-реактивный белок (мг/л), Ме [25-й; 75-й перцентили]	1,9 [0,8; 3,7]
Преднизолон (мг/сут.), Ме [25-й; 75-й перцентили]	10 [0,0; 17,5]
Гидроксихлорохин, n (%)	29 (82,9)
Азатиоприн, n (%)	3 (8,6)
Микофенолата мофетил, n (%)	6 (17,1)
Метотрексат, n (%)	2 (5,7)

Примечание: SELENA-SLEDAI – Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index в модификации Safety of Estrogen in Lupus National Assessment; СКВ – системная красная волчанка; СОЭ – скорость оседания эритроцитов

или CD8-Pacific-Blue для Тцит (BioLegend Inc., США), CCR4-Brilliant Violet 510 (CD194, BioLegend Inc., США). Для выявления популяции Т-лимфоцитов периферической крови использовали антитела против CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺.

Для анализа пути дифференцировки Тцит по основным субпопуляциям применяли антитела против поверхностных CD45RA и CD62L; были выделены: «наивные» CD8⁺ Т-клетки (Naive Tc), клетки центральной (CM Tc, central memory T cells) и эффекторной памяти (EM Tc, effector memory T cells), а также терминально-дифференцированные Т цитотоксические лимфоциты (TEMRA Tc).

С использованием восьмичетного цитометрического анализа на основании экспрессии рецепторов CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5 определяется направление миграции клеток в состав периферических лимфоидных органов, что служит одним из методических приемов для определения поляризации Т-хелперов [12]. В данной работе использованы аналогичные маркеры, комбинация которых позволила выявить основные субпопуляции Тцит. Экспрессия CCR4 связана со способностью клеток к миграции в очаги воспаления, локализованные в соединительной ткани кожных покровов. Лигандами для CCR4 являются CCL17, экспрессируемый эндотелиальными клетками микроциркуляторного русла дермы, и CCL22, синтезируемый дермальными дендритными клетками. Хемокиновый рецептор CCR4 выступает маркером для Тc2-клеток [12, 13]. Единственным выявленным лигандом CCR6 служит CCL20, который синтезируется различными клетками, входящими в состав дермы (фибробласты, клетки эндотелия сосудов, дендритные клетки) и эпидермиса (в первую очередь, кератиноциты), кожи, слизистых оболочек кишечника, включая эпителий аппендикса и Пейеровых бляшек. CCR6 маркирует Тc17- и Тc17.1-клетки [12, 13]. Основными лигандами CXCR3 являются три хемокина CXС-семейства: CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) и CXCL11 (I-TAC), – синтезируемые клетками различных органов и тканей при развитии воспалительного процесса под действием в первую очередь ИФН-γ. Известно, что CXCR3⁺-клетки – это Тc1 [12, 13]. Лигандом CXCR5 является CXCL13, который необходим для формирования В-клеточных фолликулов в составе лимфатических узлов, а также дифференцировки В-лимфоцитов в плазматические клетки. CXCR5 является маркером Тfc-клеток [10, 12, 13].

Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США), к 975 мкл которого добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter, США). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора при 330 g в течение 7 мин, после чего надосадов удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе с pH 7,2–7,4, содержащем 2% параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v. 1.2 и Kaluza™ v. 1.3 (Beckman Coulter, США). Алгоритмы выявления основных субпопуляций CD8⁺ Т-лимфоцитов были детально описаны ранее [14]. Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 12.0 и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad, США).

Результаты выражали в виде процента позитивных клеток от общего числа лимфоцитов и в виде абсолютных значений (количество клеток на $10^6/\text{л}$), приводили в виде медианы (Me) и 25-го и 75-го перцентилей.

Нормальность распределения проверяли по критерию согласия Пирсона χ^2 . Для оценки статистической значимости различий использовали непараметрический U-критерий Манна – Уитни и критерий Краскела – Уоллиса; для исследования силы взаимосвязи показателей вычисляли коэффициент ранговой корреляции по Спирмену.

Результаты

Между абсолютными значениями числа $\text{CD}3^+$ лимфоцитов в группах различий не было. Также не было выявлено статистически значимых различий между группами по абсолютным и относительным значениям числа Т-хелперов (фенотип $\text{CD}3^+\text{CD}4^+$) и двойных негативных клеток (фенотип $\text{CD}3^+\text{CD}4^-\text{CD}8^-$). В группе пациентов с СКВ отмечалось статистически значимое повышение абсолютного и относительного количества Тцит, а также статистически значимое снижение абсолютного и относительного количества двойных позитивных лимфоцитов с фенотипом $\text{CD}3^+\text{CD}4^+\text{CD}8^+$.

Абсолютное и относительное количество наивных Тс, СМ Тс и ЕМ Тс было статистически значимо выше в группе пациентов с СКВ. Абсолютное и относительное количество ТЕМРА Тс статистически значимо не различалось между группами.

Также были проанализированы основные пути поляризации Тцит. Выявлено статистически значимое снижение относительного содержания Тс1 ($\text{CXCR}5^-\text{CXCR}3^+\text{CCR}6^-\text{CCR}4^-$) и Тс17.1 ($\text{CXCR}5^-\text{CXCR}3^+\text{CCR}6^+\text{CCR}4^-$) в группе пациентов с СКВ по сравнению с группой контроля. Данные изменения не выявляются при анализе абсолютных значений, что может быть связано со статистически значимым увеличением абсолютного содержания всех Тцит у пациентов с СКВ по сравнению с группой контроля. Также отмечено статистически значимое повышение содержания Тс2 ($\text{CXCR}5^-\text{CXCR}3^-\text{CCR}6^-\text{CCR}4^+$) в группе пациентов с СКВ. Относительное содержание Тс17 ($\text{CXCR}5^-\text{CXCR}3^-\text{CCR}6^+\text{CCR}4^-$), а также Тс17.22 ($\text{CXCR}5^-\text{CXCR}3^-\text{CCR}6^+\text{CCR}4^+$) в группах статистически значимо не различалось. Однако выявлено статистически значимое повышение абсолютного количества Тс17 в группе пациентов с СКВ (рис. 1).

При анализе субпопуляций Тfc (маркер $\text{CXCR}5^+$), в группе СКВ выявлено статистически значимое снижение

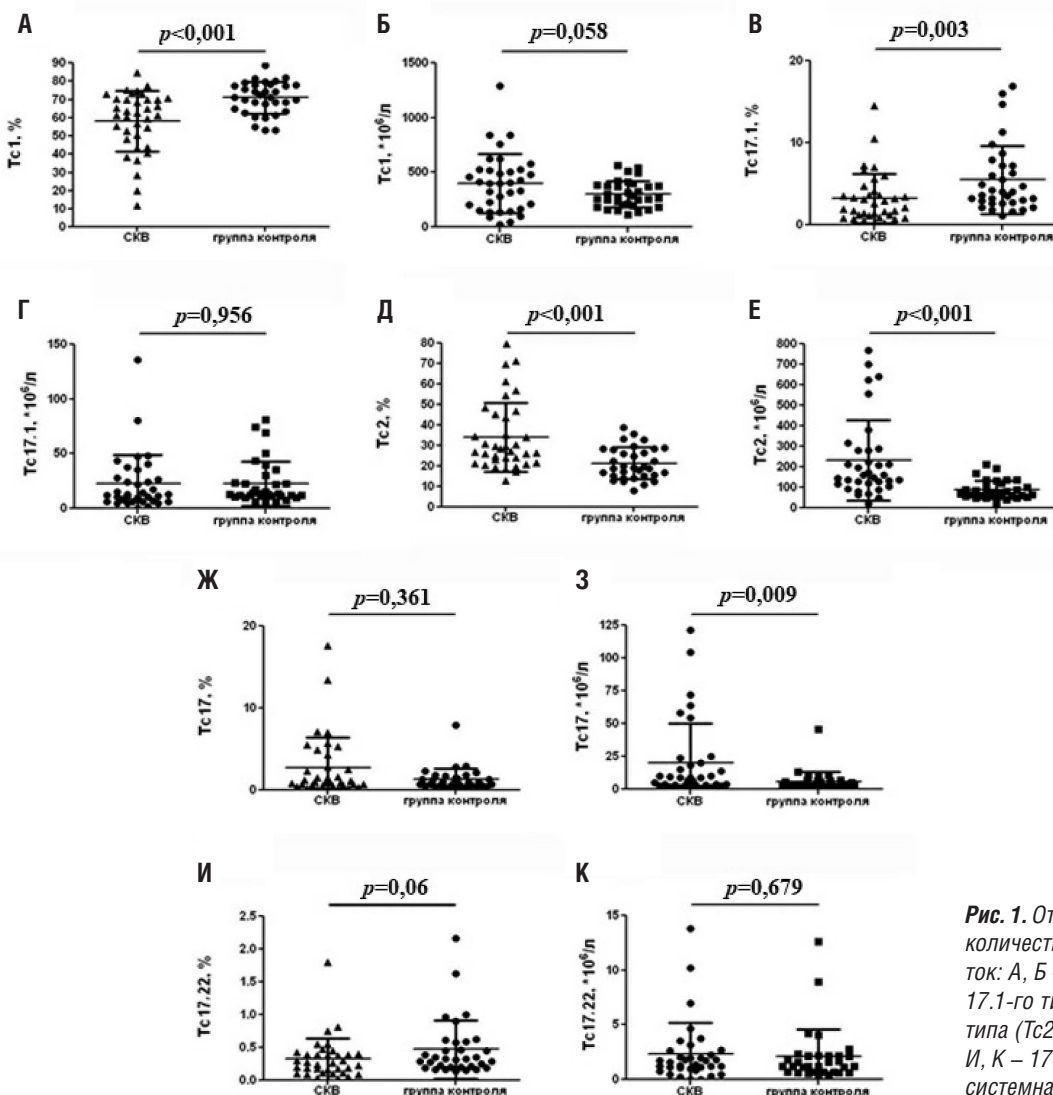


Рис. 1. Относительное и абсолютное количество Т-цитотоксических клеток: А, Б – 1-го типа (Тс1); В, Г – 17.1-го типа (Тс17.1); Д, Е – 2-го типа (Тс2); Ж, З – 17-го типа (Тс17); И, К – 17.22-го типа (Тс17.22); СКВ – системная красная волчанка

относительного содержания Tfc1 (CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁻CCR4⁻), статистически значимое повышение относительного содержания Tfc17 (CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁻), а также Tfc17.1 (CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻) по сравнению с группой контроля. Относительное и абсолютное содержание Tfc2 (CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁻CCR4⁺) и Tfc17.22 (CXCR5⁺CXCR3⁻CCR6⁺CCR4⁺) статистически значимо не различалось между группами.

Абсолютные и относительные значения численности субпопуляций Тцит представлены в таблицах 2 и 3.

Был проведен корреляционный анализ, выявлены взаимосвязи численности субпопуляций Тцит с индексом активности СКВ SELENA-SLEDAI, острофазовыми показателями (СОЭ и СРБ), а также с показателями активности заболевания, включая уровень компонентов комплемента С3 и С4, антител к двуспиральной ДНК (анти-дсДНК).

Статистически значимые корреляции представлены на рисунке 2.

Обнаружена положительная связь количества Тс1 ($r=0,404$, $p<0,05$; $r=0,526$, $p<0,05$), а также отрицательная связь числа Тс2 ($r=-0,378$, $p<0,05$; $r=-0,548$, $p<0,05$) с уровнем С3 и С4 компонентов комплемента соответственно. Количество Тс17 имеет отрицательные связи с SELENA-SLEDAI, уровнями СРБ и СОЭ ($r=-0,362$, $p<0,05$; $r=-0,369$, $p<0,05$; $r=-0,399$, $p<0,05$ соответственно). Число Тс17.22 связано с уровнем IgG и анти-дсДНК ($r=-0,505$, $p<0,05$; $r=-0,372$, $p<0,05$ соответственно). Содержание Тfc17 и Тfc17.1 связано с уровнем IgG ($r=-0,42$, $p<0,05$; $r=-0,553$, $p<0,05$ соответственно), а Тfc1 – с уровнем анти-дсДНК ($r=-0,361$; $p<0,05$).

Также выявлена умеренная положительная корреляция относительного содержания СМ Тс и ЕМ Тс с СОЭ

Таблица 2. Численность субпопуляций CD8⁺ клеток, а также наивных цитотоксических Т-лимфоцитов, клеток центральной и эффекторной памяти и терминально дифференцированных цитотоксических Т-лимфоцитов в группе пациентов с системной красной волчанкой и в группе контроля, Ме [25-й; 75-й перцентили]

Показатели	Системная красная волчанка (n=35)		Группа контроля (n=33)	
	Относительные значения, %	Абсолютные значения, ×10 ⁶ /л	Относительные значения, %	Абсолютные значения, ×10 ⁶ /л
CD8 ⁺ Т-лимфоциты	31,4 [26,5; 37,2]	0,158 [0,085; 0,256]	22,7 [19,5; 29,4]	0,138 [0,115; 0,220]
«Наивные» Тцит	9,100 [6,540; 14,178]	167,475 [102,544; 250,831]	3,410 [2,580; 5,760]	66,973 [38,718; 98,493]
Тцит центральной памяти	2,931 [2,050; 4,317]	52,314 [30,600; 82,250]	2,230 [1,590; 3,110]	41,464 [27,251; 56,171]
Тцит эффекторной памяти	5,110 [2,610; 7,544]	82,115 [44,509; 146,750]	2,510 [1,790; 3,440]	42,050 [28,290; 68,567]
Терминально дифференцированные Тцит	8,777 [3,820; 15,378]	143,011 [55,703; 282,518]	7,540 [3,490; 10,040]	112,057 [62,495; 213,959]

Примечание: Тцит – CD8⁺ Т-лимфоциты

Таблица 3. Численность цитотоксических Т-клеток 1-го, 17/1-го, 2-го, 17-го, 17/22-го типов, а также Т-фолликулярных цитотоксических клеток 1-го, 17/1-го, 2-го, 17-го, 17/22-го типов в группах пациентов с системной красной волчанкой и в группе контроля, Ме [25-й; 75-й перцентили]

	Системная красная волчанка (n=35)		Группа контроля (n=33)	
	Относительные значения, %	Абсолютные значения, ×10 ⁶ /л	Относительные значения, %	Абсолютные значения, ×10 ⁶ /л
Тцит 1-го типа	61,490 [48,140; 70,290]	398,090 [167,896; 523,730]	71,380 [64,850; 77,760]	282,348 [204,170; 377,136]
Тцит 2-го типа	27,320 [21,760; 45,080]	159,075 [115,077; 281,729]	19,260 [15,430; 28,220]	71,346 [58,824; 113,322]
Тцит 17-го типа	1,000 [0,630; 4,350]	8,569 [3,052; 20,115]	0,820 [0,560; 1,500]	3,096 [2,183; 6,380]
Тцит 17-го и 1-го типов	2,640 [1,180; 4,080]	12,886 [6,384; 27,863]	3,990 [2,710; 7,180]	13,545 [10,974; 23,045]
Тцит 17-го и 22-го типов	0,267 [0,113; 0,396]	1,556 [0,987; 2,624]	0,330 [0,200; 0,580]	1,218 [0,679; 2,174]
Фолликулярные Тцит 1-го типа	0,568 [0,349; 0,839]	3,379 [1,407; 6,698]	0,710 [0,560; 1,070]	2,912 [1,939; 4,140]
Фолликулярные Тцит 2-го типа	0,076 [0,040; 0,204]	0,339 [0,158; 1,427]	0,060 [0,040; 0,080]	0,240 [0,128; 0,315]
Фолликулярные Тцит 17-го типа	0,060 [0,023; 0,180]	0,449 [0,108; 0,778]	0,010 [0,000; 0,030]	0,038 [0,000; 0,120]
Фолликулярные Тцит 17-го и 1-го типов	0,064 [0,032; 0,223]	0,473 [0,166; 0,781]	0,040 [0,020; 0,090]	0,132 [0,095; 0,388]
Фолликулярные Тцит 17-го и 22-го типов	0,000 [0,000; 0,012]	0,000 [0,000; 0,073]	0,000 [0,000; 0,000]	0,000 [0,000; 0,000]

Примечание: Тцит – CD8⁺ Т-лимфоциты

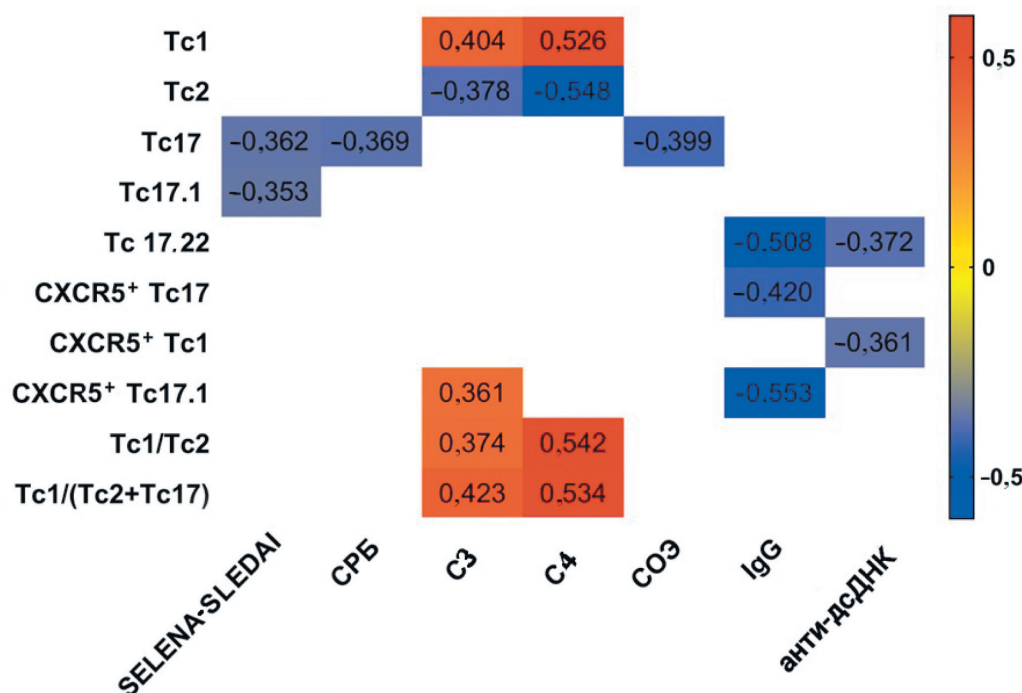


Рис. 2. Корреляция относительного содержания субпопуляций цитотоксических лимфоцитов с индексом активности системной красной волчанки SELENA-SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index в модификации Safety of Estrogen in Lupus National Assessment), острофазовыми показателями скорости оседания эритроцитов (СОЭ) и С-реактивного белка (СРБ), а также с показателями активности заболевания (компоненты комплемента С3 и С4, антитела к двуспиральной ДНК (анти-дсДНК); $p < 0,05$): Тс1 – цитотоксические Т-клетки 1-го типа; Тс2 – цитотоксические Т-клетки 2-го типа; Тс17 – цитотоксические Т-клетки 17-го типа; Тс17.1 – цитотоксические Т-клетки 17-го и 1-го типов; Тс17.22 – цитотоксические Т-клетки 17-го и 22-го типов

($r=0,297$, $p < 0,05$; $r=0,317$, $p < 0,05$ соответственно). При анализе связи между субпопуляциями Тцит и клиническими проявлениями СКВ была выявлена умеренная отрицательная корреляция между наличием люпус-нефрита и содержанием Тс17.22 ($r=-0,34$; $p < 0,05$); положительная связь количества Тс17 и Тс17.1 с тромбоцитопенией ($r=0,366$, $p < 0,05$; $r=0,377$, $p < 0,05$ соответственно); связь содержания Тс2 и Тс17.1 с фиброзирующим альвеолитом ($r=0,354$, $p < 0,05$; $r=-0,359$, $p < 0,05$ соответственно), умеренная отрицательная связь числа Тс2 с алопецией ($r=-0,37$; $p < 0,05$); содержания Тс17 и артрита ($r=-0,431$; $p < 0,05$). Корреляции между субпопуляциями Тцит и кожными проявлениями СКВ не обнаружено.

Обсуждение

В данной работе были выявлены количественные и качественные различия спектра Тцит периферической крови у пациентов с СКВ и здоровых добровольцев, а также взаимосвязь этих параметров с клиническими проявлениями.

Обращает на себя внимание повышенное содержание Тцит у пациентов с СКВ по сравнению с группой контроля, при этом абсолютное содержание CD3⁺ клеток не различалось между группами.

По данным литературы, при СКВ имеет место повышение содержания Тцит [3] в сочетании со снижением количества CD4⁺ Т-клеток, а также уменьшение коэффициента CD4⁺/CD8⁺ [15]. Ранее существовала теория, что Тцит в первую очередь выполняют цитотоксические функции для уничтожения клеток-мишеней, а CD4⁺ Т-клетки

играют роль хелперов или индукторов. В настоящее время известно, что различные субпопуляции CD4⁺ Т-клеток характеризуются определенным профилем хемокиновых рецепторов, синтезируемых цитокинов и выполняемой функцией, что формирует поляризацию иммунного ответа. По аналогии с Т-хелперами, среди Тцит выделяют Тс2, Тс17 и Тс22, которые, в отличие от клеток Тс1 и Тс17.1, экспрессируют рецептор к ИЛ-6, лишены цитотоксичности и вместо этого выполняют хелперные функции.

Таким образом, клетки CD4⁺ и CD8⁺ не являются в полном смысле слова антагонистическими популяциями [13]. Абсолютные и относительные значения числа «наивных» Тцит, СМ Тс и ЕМ Тс были статистически значимо выше в группе пациентов с СКВ. Абсолютные и относительные значения числа ТЕМРА Тс статистически значимо не различались между группами.

Можно предположить, что число более ранних форм Тцит в периферическом кровотоке больше в связи с активной пролиферацией клеток, в то время как более зрелые формы лимфоцитов мигрируют в пораженные ткани.

Как типичные Тцит, Тс1 демонстрируют исключительную цитотоксическую активность и эффективно убивают опухолевые клетки и клетки, содержащие внутриклеточные патогены. Индукция Тс1 опосредована интерлейкином (ИЛ) 12, обычно продуцируемым антигенпрезентирующими клетками, включая макрофаги и дендритные клетки. Тс1 характеризуются высоким уровнем перфорина, гранзима В, ИФН- γ и фактора некроза опухоли (ФНО) α в сочетании с низкой экспрессией цитокинов, связанных с другими линиями Тцит (ИЛ-4, ИЛ-9 и ИЛ-17) [9]. В настоящей работе выявлено статистически значимое снижение

относительного содержания Тс1 при СКВ, а также его положительная связь с уровнем С3 и С4 компонентов комплемента. Более того, нарушение цитолитических функций общего пула Тцит периферической крови отмечалось и в более ранних работах [16].

Известно негативное влияние сниженного содержания ФНО- α и ингибиторов ФНО- α на течение СКВ [17]. Например, на модели мышей с СКВ было показано, что сниженное содержание ФНО- α в периферической крови ассоциировалось с тяжелым течением СКВ с формированием люпус-нефрита [18]. Показано также, что ФНО- α играет аналогичную противовоспалительную роль у пациентов с СКВ [19]. Вероятно, Тс1 при СКВ выступают в роли Т-цитотоксических регуляторных клеток.

Тс2 были первой дополнительной субпопуляцией Тс, идентифицированной после Тс1. Они известны продукцией ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13 в сочетании со сниженной выработкой ИФН- γ . Клетки Тс2 также экспрессируют высокий уровень гранзима В и демонстрируют сильные цитотоксические способности, сравнимые с таковыми у клеток Тс1 [8]. Поляризация клеток Тс2 управляется цитокином ИЛ-4. В настоящей исследовании выявлено статистически значимое повышение числа Тс2 в группе пациентов с СКВ, а также обратная корреляция относительного содержания Тс2 с уровнем компонентов комплемента С3 и С4. Можно предположить, что клетки Тс2 являются патогенными при СКВ, так как их содержание коррелирует с маркерами активности, а СКВ является Т2-ассоциированным заболеванием.

Тс17 представляют собой отдельную подгруппу Т-клеток, известных своей высокой продукцией ИЛ-17 и ИЛ-22 в сочетании с их низкой экспрессией ИФН- γ [9]. Комбинация ИЛ-6 и трансформирующего фактора роста β стимулирует дифференцировку клеток Тс17, которая дополнительно усиливается за счет добавления ИЛ-1 β , ИЛ-21 и/или ИЛ-23 [9]. Тс17 также экспрессируют низкий уровень гранзима В и обладают слабой цитолитической функцией [9]. В настоящем исследовании не выявлено статистически значимых различий по относительному содержанию Тс17 у пациентов с СКВ и в группе контроля. Относительное содержание Тс17 имеет отрицательную корреляцию с индексом SELENA-SLEDAI и уровнем СРБ, количество Тс17.1 – с индексом SLEDAI, Тс17.22 – с концентрацией IgG и анти-дсДНК. Корреляционные связи для субпопуляции Тс17 слабее, чем для Тс1 и Тс2, что может свидетельствовать о менее важной патогенетической роли Тс17 при СКВ.

Функция каждой субпопуляции определяется профилем секретируемых цитокинов и хемокинов, а баланс субпопуляций формирует основу эндогенных регуляторных механизмов. Тс1 выполняют регуляторную функцию при СКВ, а сниженная активность Тс1 и сниженное содержание цитокина ФНО- α коррелируют с активностью СКВ и могут способствовать развитию заболевания у предрасположенных лиц. Таким образом, при блокаде ФНО- α происходит сдвиг баланса от Т1- к Т2-клеткам, что ведет к активации Т2-ассоциированных заболеваний. Важность баланса Т1/Т2/Т17 подчеркивается, например, клиническими наблюдениями, в которых препарат дупилумаб блокирует активность ИЛ-4 и ИЛ-13, при этом вызывает дебют серонегативных спондилоартритов у некоторых пациентов, усиливая активность иммунной системы по пути поляризации Т-хелперов/Тс17 [20].

Известно, что хемокиновый рецептор CXCR5, который экспрессируется В-клетками и фолликулярными Т-хелперами, определяя направления миграции к CXCL13⁺ В-клеточным фолликулам, также обнаруживается на Тцит. Тфс могут выполнять как цитотоксические, так и регуляторные функции [10]. В настоящей работе число Тфс17 имело отрицательную корреляцию с уровнем IgG ($r=-0,420$, $p<0,05$; $r=-0,553$, $p<0,05$), количество Тфс17.1 – положительную связь с уровнем С3 ($r=0,361$; $p<0,05$), а содержание Тфс1 отрицательно коррелировало с уровнем анти-дсДНК ($r=-0,420$; $p<0,05$). Можно предположить, что при СКВ субпопуляция Тфс имеет значимую регуляторную функцию, оказывая влияние на синтез аутоантител во вторичных лимфоидных органах.

Выводы

В данной работе выявлены различия в спектре субпопуляций Тцит периферической крови у пациентов с СКВ, а также взаимосвязь субпопуляций и активности иммунопатологического процесса. При сравнении субпопуляций Тцит по степени дифференцировки выявлено, что в группе пациентов с СКВ по сравнению с контрольной группой статистически значимо повышены абсолютные и относительные значения числа «наивных» Тцит, а также СМ Тс и ЕМ Тс. При оценке пути поляризации Тцит обнаружено статистически значимое снижение относительного содержания Тс1 и Тс17.1 и статистически значимое повышение числа Тс2 в группе пациентов с СКВ по сравнению с группой контроля. Отмечалось также статистически значимое снижение относительного содержания Тфс1, повышение относительного содержания Тфс17 и Тфс17.1 в группе СКВ. Обнаружена статистически значимая положительная связь количества Тс1, а также отрицательная связь числа Тс2 с уровнем С3 и С4 компонентов комплемента. Выявлена связь содержания CD8⁺ фолликулярных Т-клеток периферической крови (Тфс17 и Тфс17.1) с уровнем IgG, а Тфс1 – с уровнем анти-дсДНК.

Повышенное содержание Тс2 и прямая корреляция численности данной субпопуляции с маркерами активности СКВ говорят о патогенной роли Тс2 при СКВ. Тс1, Тс17, Тс17.1, Тфс при СКВ играют регуляторную роль. Для СКВ характерно нарушение баланса в сторону Т2-лимфоцитов.

Результаты данной работы в будущем могут быть использованы в комплексе мер оценки активности СКВ, а также с целью определения новых путей персонализированной таргетной терапии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022).

Прозрачность исследования

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 / REFERENCES

- Насонов ЕЛ (ред.). Ревматология. Российские клинические рекомендации. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017. [Nasonov EL (ed.). Rheumatology. Russian clinical recommendations. Moscow: GEOTAR-Media; 2017 (In Russ.)].
- Насонов ЕЛ. Перспективы анти-В-клеточной терапии в ревматологии. *Научно-практическая ревматология*. 2018;56(5):539-548. [Nasonov E.L. Prospects for anti-B-cell therapy in rheumatology. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologia = Rheumatology Science and Practice*. 2018;56(5):539-548 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2018-539-548
- Шадуро ДВ, Белоглазов ВА, Гордиенко АИ. Уровни основных субпопуляций лимфоцитов и их связь с клеточным и гуморальным звеном антиэндоксинного иммунитета у больных системной красной волчанкой. *Медицинская иммунология*. 2015;17(4):359-366. [Shaduro DV, Beloglazov VA, Gordienko AI. Major lymphocyte subpopulations in patients with systemic lupus erythematosus and their associations with cellular and humoral anti-endotoxin immunity. *Medical Immunology (Russia)*. 2015;17(4):359-366 (In Russ.)]. doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-359-366
- Blanco P, Pitard V, Viallard JF, Taupin JL, Pellegrin JL, Moreau JF. Increase in activated CD8+ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2005;52:201-211. doi: 10.1002/art.20745
- Couzi L, Merville P, Deminière C, Moreau JF, Combe C, Pellegrin JL, et al. Predominance of CD8+ T lymphocytes among periglomerular infiltrating cells and link to the prognosis of class III and class IV lupus nephritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(7):2362-2370. doi: 10.1002/art.22654
- Dolff S, Abdulahad WH, Arends S, van Dijk MC, Limburg PC, Kallenberg CG, et al. Urinary CD8+ T-cell counts discriminate between active and inactive lupus nephritis. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(1):R36. doi: 10.1186/ar4189
- Klocke J, Kopetschke K, Griebbach AS, Langhans V, Humrich JY, Biesen R, et al. Mapping urinary chemokines in human lupus nephritis: Potentially redundant pathways recruit CD4+ and CD8+ T cells and macrophages. *Eur J Immunol*. 2017;47(1):180-192. doi: 10.1002/eji.201646387
- Yuan S, Zeng Y, Li J, Wang C, Li W, He Z, et al. Phenotypical changes and clinical significance of CD4+/CD8+ T cells in SLE. *Lupus Sci Med*. 2022;9(1):e000660. doi: 10.1136/lupus-2022-000660
- St Paul M, Ohashi PS. The roles of CD8+ T cell subsets in antitumor immunity. *Trends Cell Biol*. 2020;30(9):695-704. doi: 10.1016/j.tcb.2020.06.003
- Foster G, Kuka M. The elusive identity of CXCR5+ CD8 T cells in viral infection and autoimmunity: Cytotoxic, regulatory, or helper cells? *Mol Immunol*. 2020;119:101-105. doi: 10.1016/j.molimm.2020.01.007
- Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(9):1400-1412. doi: 10.1002/art.40930
- Кудрявцев ИВ, Борисов АГ, Кробинец ИИ, Савченко АА, Серебрякова МК, Тотолян АА. Хемокиновые рецепторы на Т-хелперах различного уровня дифференцировки: основные субпопуляции. *Медицинская иммунология*. 2016;18(3):239-250. [Kudryavtsev IV, Borisov AG, Krobinec II, Savchenko AA, Serebriakova MK, Totolian AA. Chemokine receptors at distinct differentiation stages of T-helpers from peripheral blood. *Medical Immunology (Russia)*. 2016;18(3):239-250 (In Russ.)]. doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-239-250
- Loyal L, Warth S, Jürchott K, Mölder F, Nikolaou C, Babel N, et al. SLAMF7 and IL-6R define distinct cytotoxic versus helper memory CD8+ T cells. *Nat Commun*. 2020;11(1):6357. doi: 10.1038/s41467-020-19002-6
- Kudryavtsev IV, Arsentieva NA, Korobova ZR, Isakov DV, Rubinstein AA, Batsunov OK, et al. Heterogenous CD8+ T cell maturation and 'polarization' in acute and convalescent COVID-19 patients. *Viruses*. 2022;14(9):1906. doi: 10.3390/v14091906
- Chen J, Ding L, Meng W, Yang J, Yan C, Xie J, et al. Vincristine-cyclophosphamide combination therapy positively affects T-cell subset distribution in systemic lupus erythematosus patients. *Med Sci Monit*. 2015;21:505-510. doi: 10.12659/MSM.893271
- Chen PM, Tsokos GC. The role of CD8+ T-cell systemic lupus erythematosus pathogenesis: An update. *Curr Opin Rheumatol*. 2021;33(6):586-591. doi: 10.1097/BOR.0000000000000815
- Postal M, Appenzeller S. The role of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Cytokine*. 2011;56(3):537-543. doi: 10.1016/j.cyt.2011.08.026
- Jacob CO, McDevitt HO. Tumor necrosis factor- α in murine autoimmune 'lupus' nephritis. *Nature*. 1988;331:356-358. doi: 10.1038/331356a0
- López P, Gutiérrez C, Suárez A. IL-10 and TNF α genotypes in SLE. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:838390. doi: 10.1155/2010/838390
- Bridgwood C, Wittmann M, Macleod T, Watad A, Newton D, Bhan K, et al. T helper 2 IL-4/IL-13 dual blockade with dupilumab is linked to some emergent T helper 17-type diseases, including seronegative arthritis and enthesitis/enthesopathy, but not to humoral autoimmune diseases. *J Invest Dermatol*. 2022;142(10):2660-2667. doi: 10.1016/j.jid.2022.03.013

Беневоленская С.С. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9817-1750>

Кудрявцев И.В. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7204-7850>

Серебрякова М.К. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2596-4220>

Рубинштейн А.А. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8493-5211>

Кувардин Е.С. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8598-0391>

Григорьева И.Н. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9619-1048>

Алиев Д.Б. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8367-4622>

Заммеева Д.Б. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0284-8895>

Моторин Д.В. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5189-6722>

Головкин А.С. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7577-628X>

Калинина О.В. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1916-5705>

Лапин С.В. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4998-3699>

Гайдукова И.З. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3500-7256>

Маслянский А.Л. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2427-4148>

Гайдукова Е.К. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9025-1214>