

На правах рукописи



Шевырев Даниил Вадимович

Влияние гуморальных факторов гомеостатической пролиферации на Т-регуляторные клетки в норме и при ревматоидном артрите *in vitro*

14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск 2020

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»**

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор,

академик РАН

Козлов Владимир Александрович

Официальные оппоненты:

Топтыгина Анна Павловна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории цитокинов, Федеральное бюджетное учреждение науки Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора

Повещенко Ольга Владимировна, доктор медицинских наук, руководитель лаборатории клеточных технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук г. Екатеринбург

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2020 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 в НИИФКИ по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте <http://www.niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета>

Автореферат разослан «_____» _____ 2020 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,
Кандидат биологических наук**



Облеухова И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Ревматоидный артрит (РА) – это системное аутоиммунное заболевание (АИЗ), характеризующееся хроническим воспалением синовиальной оболочки суставов и прогрессирующей деструкцией костной и хрящевой ткани, а также вовлечением в патологический процесс других органов и систем [Firestein, 2003]. РА – одно из наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний человека [Cooper and Stroehla, 2003], в мире насчитывается около 20 миллионов человек, страдающих этим заболеванием [Safiri et al., 2019]. Согласно результатам российского эпидемиологического исследования, РА страдают около 800 тыс. человек [Насонов, 2017]. Высокий риск инвалидизации и потери трудоспособности, а также высокая стоимость лечения делают ревматоидный артрит серьёзной социально-экономической проблемой современности.

Развитие РА связывают с генетической предрасположенностью, а также с негативным влиянием внешних факторов окружающей среды. В основе патогенеза РА лежит нарушение баланса между регуляторными и эффекторными звеньями иммунитета. Для РА характерна выраженная инфильтрация синовиальных тканей активированными макрофагами, моноцитами, гранулоцитами, плазматическими и дендритными клетками, В-лимфоцитами, CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами, а также локальное и системное повышение концентрации провоспалительных медиаторов, продуцируемых этими клетками [Avdeeva et al., 2016]. Хроническое течение воспалительного процесса приводит к повреждению не только костной и синовиальной тканей, но и негативно отражается на функциях различных органов и может приводить к различным системным осложнениям [Cimmino et al., 2000].

Стоит отметить, что увеличение риска развития аутоиммунных заболеваний, в том числе РА, часто связывают с лимфопенией, которая типична для многих АИЗ и может играть важную роль на ранних этапах ещё до появления клинических симптомов [Schulze-Koops, 2004]. В течение жизни организм человека подвергается воздействию множества негативных факторов, которые могут приводить к развитию лимфопении: стрессы, различные инфекции, радиация, а также иные химические или физические воздействия. Естественно, что существуют механизмы, направленные на восполнение пула лимфоцитов. Основными из них являются тимопоз (до инволюции тимуса) и гомеостатическая пролиферация (ГП), которая представляет собой процесс численного восстановления пула Т-лимфоцитов в условиях лимфопении с участием IL-7 и IL-15 [Moxham et al., 2008; Murray et al., 2003]. Основными факторами, обеспечивающими ГП, являются контакт Т-клеточного рецептора (TCR) с аутоантигеном в составе главного комплекса гистосовместимости (МНС), сигналы ко-стимуляции и взаимодействие с цитокинами IL-7 и IL-15, уровень которых повышается при лимфопении [Miller et al., 2013; Schluns et al., 2016]. Известно, что в зависимости от выраженности и продолжительности лимфопении, ГП может сопровождаться рядом негативных эффектов – снижением разнообразия репертуара TCR, отбором потенциально аутореактивных лимфоцитов, а также конверсией фенотипа наивных Т-лимфоцитов в Т-клетки памяти. Всё это может приводить к нарушению ауто толерантности и способствует развитию аутоиммунных заболеваний [Theofilopoulos et al., 2001; Ge, 2001; Kieper et al., 2004; Jones et al., 2013].

Основными клетками, которые регулируют иммунный ответ на различные антигенные стимулы, а также обеспечивают толерантность к собственным антигенам,

являются Т-регуляторные лимфоциты (Treg). Эти клетки способны подавлять активацию и пролиферацию эффекторных Т- и В-лимфоцитов, а также ингибировать продукцию цитокинов этими клетками. Основным специфическим маркером Treg является транскрипционный фактор FoxP3, экспрессия которого определяет их фенотипические и функциональные особенности. Также Treg характеризуются высокой плотностью экспрессии CD25 и низкой плотностью экспрессии CD127, которые являются α -цепями рецепторов IL-2 и IL-7 соответственно [Kondelkova et al., 2010]. Предполагается, что количественные или качественные нарушения в популяции Treg могут приводить к развитию различных патологий, в т.ч. аутоиммунных. В настоящее время накоплено большое количество данных, демонстрирующих высокую инфильтрацию синовиальных тканей Treg при РА [Cao et al., 2003; Van Amelsfort et al., 2004; Liu et al., 2005; Jiao et al., 2007]. Несмотря на это, не происходит разрешения воспалительного процесса в синови, что ставит вопрос о функциональной состоятельности Treg при ревматоидном артрите. Действительно, в ряде исследований показано снижение функциональной активности Treg при РА, которое в основном связано с негативным влиянием провоспалительного фона на Treg [Ehrenstein et al., 2004; Valencia et al., 2006; Zanin-Zhorov et al., 2010]. В то же время результаты нескольких других исследований противоречат представлению о том, что снижение числа или нарушение функций Treg способствуют развитию РА [De Kleer et al., 2004; Han et al., 2008; Smigielska-Czepiel et al., 2014; Walter et al., 2016; Rossetti et al., 2017].

Хорошо известно, что гомеостаз Treg в значительной степени зависит от IL-2, главными продуцентами которого являются Т-клетки, несущие $\alpha\beta$ -TCR и любой из ко-рецепторов CD4 или CD8. Таким образом, можно предположить, что лимфопения будет негативно влиять на периферический пул Treg ввиду сокращения компартмента Т-клеток-продуцентов IL-2. Действительно, в нескольких исследованиях *in vivo* было показано, что Treg не только теряют функциональную активность, но и могут подвергаться дифференцировке в Th17-лимфоциты в условиях лимфопении, что в обоих случаях сопряжено с депривацией IL-2 [Komatsu et al., 2014; Duarte et al., 2009; Chevalier et al., 2014]. Учитывая, что при лимфопении в восстановлении пула Т-лимфоцитов основную роль играют цитокины IL-7 и IL-15, возникает вопрос, каким образом данные гомеостатические факторы влияют на фенотип и функциональную активность Treg, могут ли они участвовать в восстановлении пула Treg после лимфопении? Имеющиеся в литературе данные о воздействии цитокинов IL-7 и IL-15 на популяцию Treg малочисленны и противоречивы. Некоторые из них указывают на связь лимфопении и повышения уровня этих цитокинов с возникновением аутоиммунных заболеваний, в том числе на связь с развитием РА [Younas et al., 2013; Heninger et al., 2012; Schulze-Koops, 2004]. При этом ни в одном из этих исследований не проводилось прямой оценки супрессорной активности общего пула Treg по способности подавлять пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺-лимфоцитов под влиянием цитокинов ГП.

Таким образом, представляется важным и актуальным исследование, посвященное изучению влияния гуморальных факторов ГП – IL-7 и IL-15 – на функциональную и пролиферативную активность Treg здоровых доноров и пациентов с РА.

Цель: исследовать влияние гуморальных факторов ГП IL-7 и IL-15 на фенотипические характеристики и функциональную активность Treg у здоровых доноров и пациентов с РА.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Определить субпопуляционный состав и фенотипические характеристики Treg периферической крови здоровых доноров и пациентов с РА;
2. Изучить влияние гуморальных факторов ГП – IL-7 и IL-15 на фенотипические характеристики Treg доноров и пациентов с РА *in vitro*;
3. Оценить пролиферативную активность Treg под воздействием гуморальных факторов ГП – IL-7 и IL-15 у доноров и пациентов с РА *in vitro*;
4. Оценить продукцию супрессорных цитокинов IL-10 и TGF- β у доноров и пациентов с РА под влиянием гуморальных факторов ГП – IL-7 и IL-15 *in vitro*;
5. Исследовать влияние гуморальных факторов ГП – IL-7 и IL-15 на супрессорную активность Treg по способности подавлять пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺-лимфоцитов *in vitro* в норме и при ревматоидном артрите;

Научная новизна работы

Впервые было изучено влияние гуморальных факторов ГП – IL-7 и IL-15 на экспрессию молекул CD86/86, PD-L1, CTLA-4, CCR4 и HLA-DR Treg здоровых доноров и пациентов с РА *in vitro*. Было установлено, что IL-7 и IL-15 способны индуцировать экспрессию молекулы PD-L1 на Treg в обеих группах доноров и пациентов с РА, при этом процентное содержание PD-L1⁺Treg под влиянием гуморальных факторов ГП не увеличивалось. В то время как стимуляция анти-CD3-антителами в комбинации с IL-2 достоверно увеличивала не только плотность экспрессии (MFI) молекул PD-L1 и CTLA-4, но и содержание Treg, экспрессирующих PD-L1, CTLA-4, HLA-DR и CCR4.

Впервые было изучено влияние гуморальных факторов ГП – IL-7 и IL-15 на супрессорную активность Treg. При этом было установлено, что Treg способны эффективно подавлять пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺-клеток, вызванную IL-7 и IL-15. В то же время способность Treg подавлять пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺-лимфоцитов резко снижается в условиях, когда влияние цитокинов ГП – IL-7 или IL-15 (но не IL-2) сопровождается сильной стимуляцией TCR анти-CD3-антителами. Кроме того, было показано, что предварительная обработка Treg IL-7 также снижает супрессорную активность Treg при стимуляции анти-CD3-антителами.

Впервые было проведено сравнение супрессорной активности Treg условно-здоровых доноров и пациентов с РА в условиях стимуляции гуморальными факторами ГП. При этом во всех условиях стимуляции (анти-CD3, анти-CD3+IL-2, анти-CD3+IL-7, анти-CD3+IL-15, IL-7, IL-15, анти-CD3+Treg^(IL-7)) разницы между донорами и пациентами с РА не наблюдалось.

Теоретическая и практическая значимость работы

Выявленные особенности влияния гуморальных факторов ГП на супрессорную активность Treg позволяют расширить современные представления о негативном влиянии ГП на иммунное равновесие и раскрывают дополнительный механизм, который может способствовать нарушению аутоотолерантности в условиях лимфопении и увеличивать риск развития аутоиммунных заболеваний. Было установлено, что под влиянием цитокинов ГП в условиях стимуляции TCR анти-CD3-антителами резко снижается способность Treg подавлять пролиферацию как CD4⁺, так и CD8⁺-лимфоцитов. Такое снижение супрессорной активности Treg может наблюдаться в отношении узкого спектра аутореактивных клонов Т-лимфоцитов, получающих сильный сигнал от TCR даже в условиях слабой ГП, что может вносить существенный вклад в снижение разнообразия репертуара TCR при ГП вне

зависимости от её интенсивности и приводить к олигоклональной экспансии аутореактивных Т-лимфоцитов.

Учитывая, что при сильной стимуляции TCR анти-CD3-антителами супрессорная активность Treg снижалась в присутствии IL-7 и IL-15, но не в присутствии IL-2, можно сделать вывод, что цитокины ГП не могут обеспечивать такой же уровень супрессорной активности Treg, как IL-2 в условиях сильной стимуляции TCR.

В проведенном исследовании не было выявлено значимых нарушений в функциональной активности общего пула Treg периферической крови пациентов с РА. Способность подавлять пролиферацию Т-респондеров сохранялась на уровне доноров во всех условиях стимуляции, что свидетельствует об отсутствии внутренних дефектов со стороны популяции Treg при РА. Однако стоит отметить, что перспективными представляются дополнительные исследования разнообразия репертуаров TCR эффекторных и регуляторных клеток с целью выявления дефектов на уровне клонов, специфичных к аутоантигенам, в отношении которых нарушена ауто толерантность. Выявление специфических клонов Т-лимфоцитов, которые участвуют в нарушении толерантности, позволит в перспективе использовать индивидуальные подходы к терапии пациентов с РА, основанные на специфическом воздействии на эти клоны с помощью моноклональных антител или CAR-Т-лимфоцитов.

Выявленная строгая корреляционная связь между активностью заболевания и содержанием переходных форм $\text{FoxP3}^+\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ и $\text{CD4}^+\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ лимфоцитов может в перспективе позволить использовать маркер ROR γt , как дополнительный параметр при оценке активности РА.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Супрессорная активность популяции Treg периферической крови при культивировании *in vitro* не отличается между донорами и пациентами с ревматоидным артритом во всех изученных условиях стимуляции;
2. Цитокины IL-7 и IL-15 являются модуляторами супрессорной активности Treg-клеток в зависимости от условий культивирования: при воздействии IL-7 или IL-15 супрессорная активность сохраняется на высоком уровне, но при сопутствующей стимуляции анти-CD3-антителами она резко снижается как у доноров, так и у пациентов с ревматоидным артритом.
3. Treg-клетки периферической крови пациентов с ревматоидным артритом отличаются от доноров по ряду фенотипических характеристик: повышено процентное содержание $\text{CCR4}^+\text{Treg}$, снижено содержание Treg с поверхностной экспрессией CTLA-4, а также повышено содержание $\text{CD4}^+\text{ROR}\gamma\text{t}^+\text{FoxP3}^-$ и $\text{CD4}^+\text{ROR}\gamma\text{t}^+\text{FoxP3}^+$ -лимфоцитов, которое коррелирует с тяжестью заболевания.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации доложены и обсуждены на отчетных конференциях аспирантов и ординаторов НИИФКИ (Новосибирск, 2017, 2018, 2019), на Международной конференции «Future of Biomedicine Conference» (Владивосток, 2017), на XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2018), на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы регенеративной медицины, инновации в репродуктологии» (Самара, 2018), на V Европейском иммунологическом конгрессе «5-th European Congress of Immunology», (Амстердам, 2018), а также на

Объединенном иммунологическом форуме – 2019 (Новосибирск, 2019). Апробация диссертации состоялась на семинаре клинического отдела НИИФКИ (протокол от 23 июня 2020 г).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертационных работ, и 2 статьи в журналах, индексирующихся в базах Scopus и Web of Science.

Степень достоверности и личное участие автора

Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором на базе лаборатории клинической иммунопатологии НИИФКИ.

Объём и структура диссертации

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 127 страницах машинописного текста, включающего 36 рисунков. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 274 литературных источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования

Объектами исследования являлись Treg, полученные из фракции моноклеарных клеток (МНК) периферической крови (ПК) доноров и пациентов с РА, находившихся в ревматологическом отделении Клиники иммунопатологии НИИФКИ, г. Новосибирск. Диагноз РА устанавливали на основании критериев ACR/EULAR 2010. Активность заболевания оценивали по индексу DAS-28.

Группу пациентов составили 36 человек – 29 женщин и 7 мужчин, в контрольную группу сравнения вошло 25 условно-здоровых доноров – 18 женщин и 7 мужчин. Группы были сопоставимы по полу и возрасту (средний возраст доноров 52 ± 13 года, пациентов 56 ± 13 лет). Пациенты имели среднюю продолжительность заболевания $5,7 \pm 3,6$ года, характеризовались низкой, умеренной или высокой степенью активности РА и получали терапию стандартными болезнью-модифицирующими препаратами (метотрексат, сульфасалазин, лефлуномид, плаквенил) в виде монотерапии или в комбинации с глюкокортикостероидными гормонами.

Критериями исключения были: беременность или период лактации, наличие острого инфекционного заболевания, введение любых вакцин в течение 3 месяцев перед исследованием, наличие тяжелых инфекционных или соматических патологий, а также использование биологической терапии. Все данные и образцы крови были получены после получения письменного добровольного информированного согласия и после одобрения локальным этическим комитетом (Протокол НИИФКИ №110, от 11 октября 2018 года).

Цитофлуориметрический анализ

После выделения фракции МНК методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина [Böyum, 1968] производилась оценка экспрессии различных функциональных молекул Treg (как поверхностных: PD-1, PD-L1, CTLA-4, CCR-4, HLA-DR, CD80/86, так и внутриклеточных: CTLA-4, ROR γ t, FoxP3).

Фенотипирование Treg проводилось методом проточной цитометрии на цитофлуориметре FACS Canto II. Для определения Treg по фенотипу CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low} использовались человеческие моноклональные антитела фирмы

BioLegend (USA): CD3 – PE/Cy7, CD4 – APC/Cy7, CD25 – PE, CD127 – PerCP/Cy5.5. Для идентификации Treg по фенотипу $CD3^+CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ использовались моноклональные антитела фирмы BioLegend (USA): CD3 – PE/Cy7, CD4 – APC/Cy7, CD25 – APC, FoxP3 – PE. Для оценки экспрессии различных функциональных молекул использовались следующие моноклональные антитела фирмы BioLegend (США): CTLA-4 – PE/Cy7, PD-1 – APC, PD-L1 – PE/Cy7, HLA-DR – PerCP, CD86 – PE/Cy7, CD80 – APC, CCR4 – PE/Cy7; RORyt – PerCP (R&D Systems, USA). При оценке экспрессии функциональных молекул использовался FMO-контроль (Fluorescence Minus One), а также изотипический контроль для RORyt. Для определения уровня экспрессии CTLA-4 и PD-L1 на клетках оценивалась средняя интенсивность флуоресценции по MFI (Mean Fluorescent Intensity).

Оптимизация протоколов оценки функциональной активности Treg *in vitro*

С целью оптимизации экспериментальных условий под каждую из задач проводились незначительные модификации **протокола** культивирования:

1. *Изучение фенотипических характеристик Treg в общих культурах.* Мононуклеарные клетки в конечной концентрации 2 млн./мл ресуспендировали в полной среде RPMI-1640 с содержанием L-глутамина (0,3 мг/мл), гентамицина (50 мкг/мл), тиенама (25 мкг/мл) и 10% фетальной бычьей сыворотки (FCS HyClone, UK) (в дальнейшем – полная среда) и культивировали в 24-луночном плоскодонном планшете в объеме 1 мл в течение 7 дней в инкубаторе во влажной атмосфере при температуре 37°C и концентрации CO₂ – 5%. Использовались четыре варианта культивирования мононуклеарных клеток: а) контроль без стимуляции, б) стимуляция человеческим рекомбинантным IL-2 (НПК Биотех, Россия) совместно с анти-CD3 антителами (Сорбент, Россия) в итоговых концентрациях 100 U/mL и 1 µg/mL соответственно, в) стимуляция человеческим рекомбинантным IL-7 (MyBiosource, США) в итоговой концентрации 50 ng/mL, и d) стимуляция человеческим рекомбинантным IL-15 (MyBiosource, США) в итоговой концентрации 50 ng/mL.

2. *Изучение пролиферативной активности и фенотипических характеристик Treg после магнитной сортировки.* С этой целью культивирование проводилось в полной среде, в указанных выше условиях стимуляции (а, б, в, и d), в течение 7 дней, в 96-луночных круглодонных планшетах в общем объеме 200 микролитров. Общее число клеток на лунку составляло 60 000: 30 000 Treg и 30 000 МНК, истощенных по содержанию Treg. Treg предварительно окрашивались витальным красителем CFSE (Molecular probe, USA). Параллельно проводилось культивирование окрашенных CFSE МНК без Treg в концентрации 60 000 клеток на лунку в качестве контроля в аналогичных условиях.

3. *Определение супрессорной функции Treg.* С этой целью культивирование проводилось в полной среде, в указанных выше условиях стимуляции (а, б, в, и d) в течение 4 дней в 96-луночных круглодонных планшетах (TPP, Швейцария) в общем объеме 200 микролитров. Общее число клеток на лунку составляло 60 000: 30 000 Treg и 30 000 МНК. МНК предварительно окрашивались витальным красителем CFSE. Для более полной оценки влияния гуморальных факторов ГП (IL-7 и IL-15) на супрессорную активность Treg культивирование Treg с МНК также проводилось под влиянием: анти-CD3, анти-CD3+IL-7, анти-CD3+IL-15, анти-CD3 и предварительной обработки Treg IL-7. При этом Treg инкубировались с IL-7 в концентрации 50 ng/mL в течение 2 часов в CO₂ инкубаторе и дважды отмывались раствором PBS.

Параллельно проводилось культивирование окрашенных CFSE МНК без Treg в концентрации 60 000 клеток на лунку в тех же условиях.

Супрессорный индекс Treg определялся для CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов по формуле:

$$(I) = 100 \times \left(1 - \frac{\% \text{ делящихся лимфоцитов при сокультивировании с Treg}}{\% \text{ делящихся лимфоцитов без Treg}}\right)$$

Выделение Treg проводилось с помощью магнитной сепарации по фенотипу CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low} с использованием набора Miltenyi Biotec MACS Treg Isolation Kit в соответствии с протоколом производителя (чистота сортировки 93,2±4%). Оптимальное соотношение Treg: МНК было определено в предварительных экспериментах как 1:1, что соответствует данным литературы [Walter et al., 2016; Xiao et al., 2011; Massalska et al., 2020].

Иммуноферментный анализ

Оценка уровня продукции IL-10 в супернатантах культур (при исследовании супрессорной активности Treg) была проведена с использованием готового коммерческого набора (ИЛ-10 – ИФА-БЕСТ, НПК Вектор, Россия) для проведения «sandwich»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Изучение концентрации TGF-β в супернатантах этих же культур проводилось с помощью готового коммерческого набора фирмы BioLegend (USA) «LEGEND MAX Total TGF-β1 ELISA Kit». Кондиционные среды собирались в объеме 100μL на третьи сутки совместного культивирования Treg с МНК и замораживались при -80°C. Для проведения ELISA среды были разморожены и проанализированы согласно протоколу производителя.

Методы статистической обработки

Статистическая обработка и визуализация данных производилась с использованием программы GraphPad Prism 7.03. Среднее (Mean) и стандартное отклонение (SD), а также медиана (Me) и интерквартильный размах (IQR) вычислялись для выборок с соответствующим распределением. Для проверки типа распределения выборки использовался критерий Шапиро-Уилка. Сравнение двух независимых выборок проводилось с помощью критерия Стьюдента или критерия Манна-Уитни в соответствии с распределением. Множественное сравнение зависимых и независимых выборок проводилось с использованием дисперсионного анализа (RM-ANOVA и one-way ANOVA соответственно). Если данные выборок не соответствовали нормальному распределению, использовался ранговый тест Фридмана – в случае зависимых выборок, и критерий Краскела-Уоллиса – в случае независимых. Апостериорный анализ проводился с помощью параметрического критерия Тьюки и непараметрического критерия Данна. Корреляционный анализ проводился методом ранговой корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фенотипические характеристики Treg у доноров и пациентов с РА

На момент исследования ни у доноров, ни у пациентов не наблюдалось признаков лимфопении, абсолютное и относительное содержание лимфоцитов соответствовало референсным значениям по общему анализу крови. Содержание CD3⁺ и CD3⁺CD4⁺-клеток не отличалось между донорами и пациентами.

Содержание CD25⁺FoxP3⁺ клеток периферической крови среди CD4⁺-лимфоцитов у здоровых доноров составило 6,05% (5 – 6,8) и не отличалось от пациентов с РА – 5,25% (3,7 – 6,9). Однако при этом у пациентов наблюдалось значимо более высокое содержание Treg с низкой экспрессией молекулы CD25 и значимо более низкое содержание Treg с высокой экспрессией CD25 (Рис. 1).

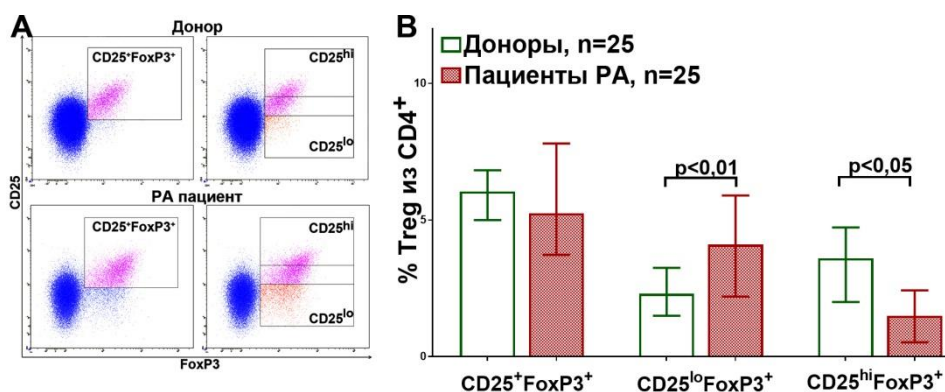


Рис. 1. Образец гейтирования (А) и фенотипические характеристики Treg из ПК доноров и пациентов (В). *Примечание: Ме, IQR; критерий Манна-Уитни.*

Ранее было показано, что Treg с низкой экспрессией CD25 имеют повышенную предрасположенность к потере экспрессии FoxP3 и склонны к дифференцировке в exFoxP3-RORyt⁺-лимфоциты [Komatsu et al., 2014]. Таким образом, выявленное повышение числа CD25^{lo}FoxP3⁺Treg в периферической крови пациентов может быть связано с повышенной дифференцировкой этих клеток в exFoxP3-RORyt⁺-лимфоциты, которые играют важную роль в патогенезе РА [Komatsu et al., 2014].

Хорошо известна ключевая роль IL-2R/Jak/STAT5 пути для поддержания стабильности экспрессии FoxP3 [Mahmud et al., 2013], и снижение экспрессии CD25 (IL-2R) на Treg у пациентов с РА может негативно влиять на стабильность экспрессии FoxP3. В условиях воспаления при РА под влиянием цитокинов IL-6 и TGF-β [Li et al., 2016; Pohlers et al., 2007] в Treg может индуцироваться экспрессия транскрипционного фактора RORyt и происходит дифференцировка Treg в exFoxP3-Th17 [Komatsu et al., 2014]. Эти клетки участвуют в патогенезе воспаления при РА за счет высокой продукции воспалительных цитокинов (IL-17, IL-21 и IL-22) [Komatsu et al., 2014; Shufeng et al., 2017]. Поэтому на следующем этапе изучалось содержание CD4⁺RORyt⁺-клеток и переходных FoxP3⁺RORyt⁺-лимфоцитов в периферической крови. У пациентов с РА содержание, как CD4⁺RORyt⁺-клеток, так и FoxP3⁺RORyt⁺-лимфоцитов было значимо повышено (Рис. 2В) и сильно коррелировало с индексом DAS-28 (Рис. 2С). Образование CD4⁺RORyt⁺-лимфоцитов может происходить также из Th0-клеток и Th1-лимфоцитов в различных условиях. В этом контексте важно подчеркнуть, что у пациентов с РА содержание CD4⁺RORyt⁺FoxP3⁻-лимфоцитов сильно коррелировало с содержанием переходных форм Treg с фенотипом CD4⁺FoxP3⁺RORyt⁺, что подтверждает важность процесса трансдифференцировки Treg в Th-17, как источника новых Th-17 при РА (Рис. 2С).

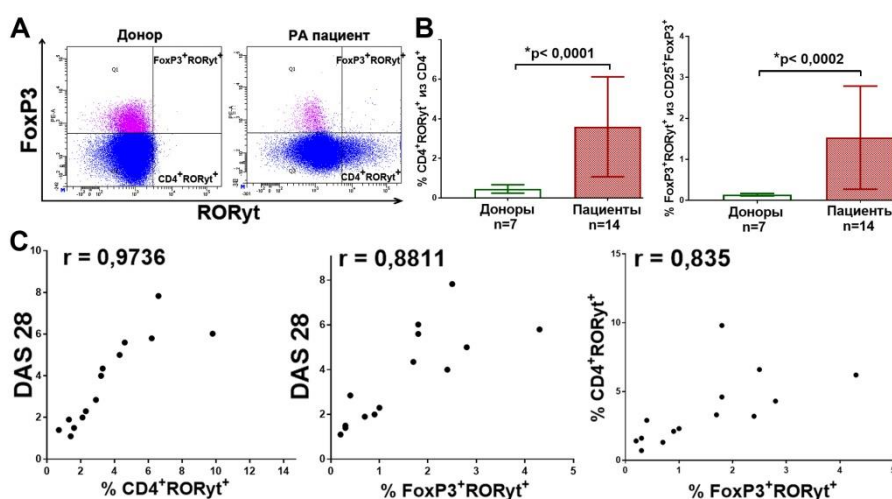


Рис. 2. Образец гейтирования CD4⁺RORyt⁺ и FoxP3⁺RORyt⁺ клеток на примере донора и пациента с РА (А). Содержание CD4⁺RORyt⁺ и FoxP3⁺RORyt⁺ клеток в ПК доноров и пациентов, Mean±SD (В). Корреляция между содержанием RORyt⁺Treg и индексом DAS-28, а также между содержанием CD4⁺RORyt⁺FoxP3⁻ и CD4⁺FoxP3⁺RORyt⁺ клеток (С).

Для сравнительной оценки супрессорного потенциала Treg между донорами и пациентами с РА изучали экспрессию молекул, участвующих в механизмах контактной супрессии: PD-1/PD-L1, CTLA-4, молекулы хоуминга CCR4, молекулы ранней контактной супрессии Treg – HLA-DR, и молекул костимуляции CD80/86, как маркеров активности взаимодействия Treg с антигенпрезентирующими клетками (APC) [Qureshi et al., 2011].

При анализе было выявлено значимое снижение содержания CTLA-4⁺Treg у пациентов (Рис. 3). Некоторые авторы связывают низкую экспрессию молекулы CTLA-4 у пациентов с РА с повышенным метилированием промотора гена *ctla-4* и соотносят это со снижением функциональной активности Treg [Cribbs et al., 2014]. Но при исследовании внутриклеточной экспрессии молекулы CTLA-4 в Treg не было выявлено значимых отличий между группами доноров 84,5% (84 – 92) и пациентов с РА 86,8% (82 – 94). По-видимому, такие изменения в экспрессии CTLA-4 следует связывать с увеличением активности CTLA-4 опосредованного механизма супрессии, что приводит к более выраженной интернализации молекул CTLA-4 [Qureshi et al., 2011]. Однако это предположение требует дополнительных исследований.

Выявленный повышенный уровень CCR4⁺Treg в крови пациентов с РА (Рис. 3) согласуется с предыдущими исследованиями [Kravchenko et al., 2016; Li et al., 2015]. Кроме того, CCR4⁺Treg в обеих группах имели более высокий уровень экспрессии FoxP3 (MFI). Ранее было установлено, что пул CCR4⁺Treg представлен преимущественно активированными эффекторными CD45RA⁺Treg, и молекулу CCR4 можно использовать в качестве маркера эффекторных Treg [Sugiyama et al., 2013]. Таким образом, помимо повышенной миграционной способности в сайты воспаления, популяция Treg при РА характеризовалась увеличением содержания эффекторных Treg в сравнении с донорами, что говорит о вовлеченности Treg в процессы, связанные с ингибированием воспаления при РА.

При оценке числа Treg, экспрессирующих PD-1/PD-L1, CD80/86 и HLA-DR в периферической крови не было выявлено значимых отличий между группами доноров и пациентов (Рис. 3). Это может свидетельствовать о сохранении потенциала Treg к контактной супрессии, опосредованной через ось PD-1/PD-L1 и HLA-DR у пациентов с РА.

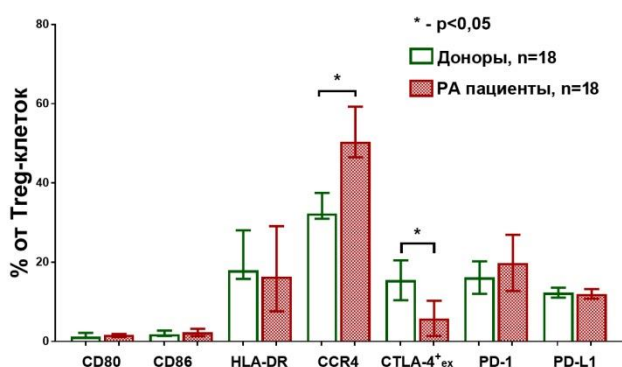


Рис. 3. Экспрессия различных функциональных молекул Treg периферической крови доноров и пациентов с РА

Примечание: Me, IQR; критерий Манна-Уитни.

Влияние гуморальных факторов ГП на Treg

На следующем этапе исследования проводилось изучение влияния гуморальных факторов ГП – IL-7 и IL-15 на фенотипические характеристики Treg, а также на их пролиферативную активность *in vitro* у доноров и пациентов с РА. Для этого изучалась экспрессия различных функциональных молекул Treg и их пролиферация в общих культурах МНК, а также на клетках, выделенных с помощью иммуномагнитной сепарации в культурах Treg: МНК.

В общих культурах МНК (материалы и методы - протокол №1), полученных от здоровых доноров, во всех условиях стимуляции наблюдался значимо более высокий процент $CD25^{+}FoxP3^{+}$ -лимфоцитов, чем в контроле без стимуляции. Уменьшение процентного содержания $CD25^{+}FoxP3^{+}$ -лимфоцитов в контроле является следствием потери фенотипических характеристик популяции Treg из-за снижения экспрессии CD25 и нарушения экспрессии транскрипционного фактора FoxP3 в отсутствие необходимых факторов стимуляции. При этом под влиянием комбинации IL-2 с анти-CD3-антителами процентное содержание Treg было незначительно выше ($p=0.075$), чем под влиянием факторов ГП. При этом в контроле без стимуляции содержание Treg было также значимо ниже, чем в образцах до стимуляции (Рис. 4).

Аналогичная динамика содержания $CD25^{+}FoxP3^{+}$ -лимфоцитов наблюдалась в культурах МНК, полученных от пациентов с РА, однако данные изменения носили характер тенденции (тест Фридмана – $p=0,0076$, апостериорный тест Данна – $p=0,06$), что может быть связано с малым объёмом выборки. При этом во всех условиях культивирования значимых отличий между группами доноров и пациентов с РА не наблюдалось (Рис. 4).

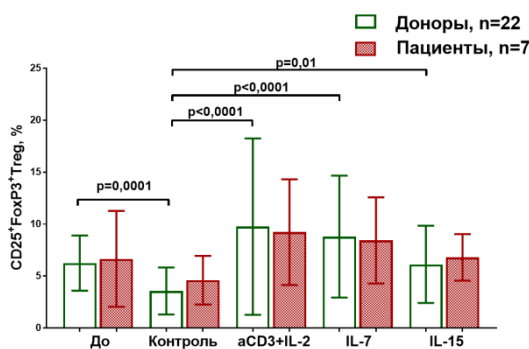


Рис. 4. Процент Treg из $CD4^{+}$ культурах МНК доноров и пациентов.

Примечание: Me, IQR; критерий Манна-Уитни для независимых групп; тест Фридмана с апостериорным тестом Данна – для зависимых групп.

На следующем этапе изучалась способность IL-7 и IL-15 вызывать пролиферацию Treg. Выяснилось, что эти цитокины способны вызывать слабую пролиферацию Treg (в сравнении с анти-CD3+IL-2) в обеих группах, при этом у пациентов с РА пролиферация Treg под влиянием IL-7 и IL-15 оказалась значимо слабее, чем у здоровых доноров (Рис. 5). Это может негативно сказываться на восполнении популяции Treg при лимфопении у пациентов с РА в условиях дефицита IL-2. Однако природа этого феномена неизвестна и требует дополнительных исследований. Возможно, это связано с терапией, применяемой при РА, однако стоит отметить, что пролиферативная активность $CD4^{+}$ и $CD8^{+}$ -лимфоцитов не отличалась между донорами и пациентами.

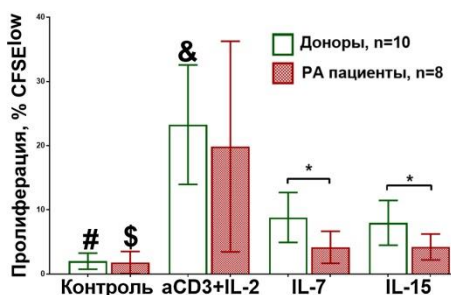


Рис. 5. Пролиферация Treg в группах доноров и пациентов с РА.

Примечание: Me, IQR; критерий Манна-Уитни для независимых групп; тест Фридмана с апостериорным тестом Данна – для зависимых групп.

* - $p<0.05$;

- $p<0.05$ – отличие от всех условий стимуляции в группе доноров;

\$ - $p<0.05$ – отличие от всех условий стимуляции в группе пациентов;

& - $p<0.05$ – отличие от стимуляции IL-7 и IL-15 в группе доноров;

Таким образом, опираясь на полученные данные, можно сделать вывод, что цитокины ГП способны не только поддерживать экспрессию FoxP3 в Treg, сохраняя их фенотип, но также обеспечивать восполнение их пула путём пролиферации. Это может играть важную физиологическую роль в условиях лимфопении при дефиците IL-2, продуцентами которого являются Tconv-лимфоциты.

При оценке экспрессии функциональных молекул Treg было выявлено, что стимуляция анти-CD3+IL-2 значительно увеличивает содержание PD-L1⁺Treg, HLA-DR⁺Treg и CCR4⁺Treg в группе доноров; процент CTLA-4⁺Treg, а также MFI PD-L1 и CTLA-4 в обеих группах. При этом стимуляция IL-7 или IL-15 увеличивала только MFI PD-L1 в обеих группах. Как и в ПК, содержание CCR4⁺Treg в группе пациентов также было значительно выше, чем у доноров.

При оценке концентраций TGF- β и IL-10 в кондиционных средах было выявлено, что стимуляция анти-CD3+IL-2 значительно увеличивает продукцию этих цитокинов в обеих группах. При этом IL-7 и IL-15 значительно увеличивали продукцию TGF- β в группе РА. Важно подчеркнуть, что продукция обоих цитокинов под влиянием анти-CD3+IL-2 была значительно выше в группе пациентов.

Учитывая, что IL-7 и IL-15 не увеличивали содержание PD-L1⁺Treg и CTLA-4⁺Treg, можно сделать вывод, что цитокины ГП не могут обеспечивать такой же уровень супрессорной активности Treg, как стимуляция анти-CD3+IL-2. Учитывая, что молекула CCR4 также может использоваться в качестве потенциального маркера эффекторных лимфоцитов Treg [Sugiyama et al., 2013], повышенная экспрессия этой молекулы вместе с молекулой CTLA-4 указывает на способность стимуляции анти-CD3+IL-2 вызывать активацию и переход Treg в эффекторные Treg.

Увеличенное содержание CCR4⁺Treg, а также повышенная продукция TGF- β и IL-10 у пациентов может указывать на активированный статус Treg при РА из-за компенсаторной реакции на продолжительное воспаление или иметь связь с используемой терапией. Это может найти отражение в более высокой, чем у доноров супрессорной активности этих клеток. Для проверки этого предположения на следующем этапе исследований оценивалась супрессорная функция Treg по способности подавлять пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов *in vitro*.

Влияние гуморальных факторов ГП на супрессорную активность Treg

При сравнении групп доноров и пациентов с РА ни для CD4⁺, ни для CD8⁺ лимфоцитов не было выявлено значимых отличий по индексу супрессии при стимуляции с помощью комбинации анти-CD3+IL-2 или факторами ГП – IL-7 и IL-15. При этом наибольший индекс супрессии в отношении обеих субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов наблюдался в группе доноров при стимуляции IL-7. В группе пациентов наблюдался аналогичный паттерн: индекс супрессии в отношении CD4⁺ лимфоцитов был значительно выше при стимуляции IL-7, чем под влиянием анти-CD3+IL-2, и для CD8⁺ лимфоцитов – под воздействием IL-7 – выше, чем при стимуляции IL-15. В то же время отличий по индексу супрессии между стимуляцией анти-CD3+IL-2 и IL-15 не наблюдалось ни в группе доноров, ни в группе пациентов с РА, как для CD4⁺, так и для CD8⁺-лимфоцитов (Рис. 6).

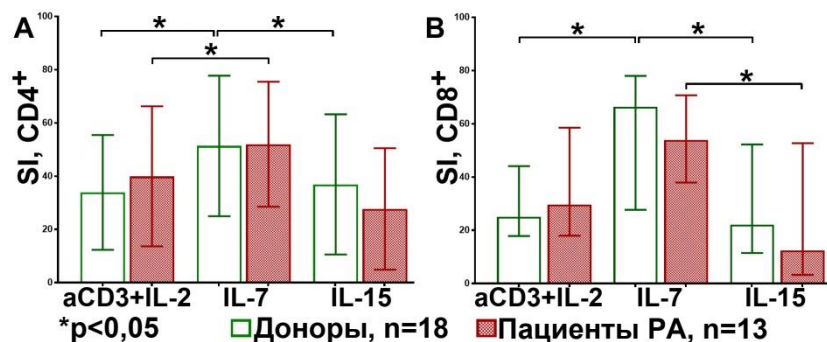


Рис. 6. Супрессорный индекс (SI) Treg в отношении CD4⁺ (А) и CD8⁺-клеток (В) для доноров и пациентов с РА.

Примечание: Ме, IQR; критерий Манна-Уитни для независимых групп; тест Фридмана с апостериорным тестом Данна – для зависимых групп.

Учитывая высокую патогенетическую гетерогенность РА, было решено оценить супрессорную активность Treg в зависимости от активности и продолжительности заболевания. Однако при сравнении супрессорного индекса Treg у пациентов с разной активностью и продолжительностью заболевания не было выявлено значимых отличий между исследуемыми группами при стимуляции анти-CD3+IL-2 (Рис. 7). Аналогично стимуляции анти-CD3+IL-2 под влиянием IL-7 или IL-15 не было выявлено значимых отличий между исследуемыми группами (данные не представлены). Стоит отметить, что разделение общей группы пациентов в зависимости от продолжительности заболевания на группы с продолжительностью менее и более года не случайно, т.к. после года зачастую наблюдается формирование паннуса, который начинает играть важную роль в патогенезе РА.

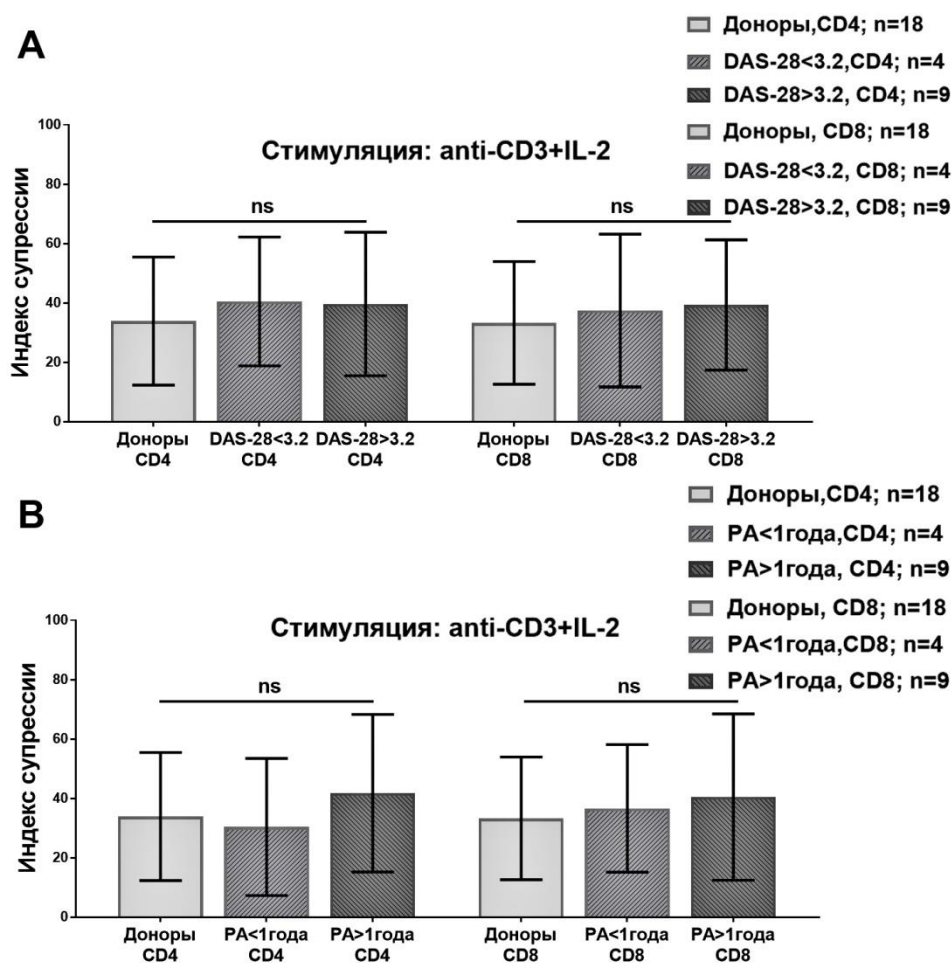


Рис. 7. Супрессорный индекс Treg в отношении CD4⁺ и CD8⁺-лимфоцитов для групп доноров и пациентов с РА с различной активностью (А) и продолжительностью заболевания (Б).

Примечание: Mean \pm SD; сравнение проводилось с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA), post hoc анализ проводился с помощью теста Тьюки.

Из полученных данных следует, что, Treg доноров и пациентов с РА способны эффективно подавлять, по крайней мере, медленную поликлональную пролиферацию Т-клеток, опосредованную IL-7, и не менее эффективно, чем под влиянием анти-CD3+IL-2, подавлять пролиферацию, индуцированную IL-15. Стоит отметить, что такая пролиферация может протекать *in vivo* и носит название медленной ГП. Она направлена на постепенное восполнение пула Т-лимфоцитов, практически не зависит от TCR-сигнала и носит поликлональный характер, сохраняя разнообразие репертуара TCR. Помимо медленной ГП, в условиях глубокой лимфопении может происходить быстрая пролиферация Т-лимфоцитов, направленная на экстренное численное восполнение пула Т-клеток. Она носит название быстрой ГП, сильно зависит от TCR-сигнала и в меньшей степени от цитокинов IL-7 и IL-15, и приводит к сужению разнообразия репертуара TCR. Поэтому в следующих экспериментах с целью приближения к процессу быстрой ГП изучалась супрессорная активность Treg в

условиях аналогичных сильной стимуляции TCR Т-лимфоцитов с помощью анти-CD3-антител [Hawse et al., 2019], а также при стимуляции анти-CD3-антителами в комбинации с IL-7 или IL-15. Также с целью оценки прямого влияния IL-7 на супрессорную активность Treg, CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}-клетки, выделенные с помощью магнитной сепарации, обрабатывались IL-7 в течение двух часов, а затем переносились к МНК и культивировались в описанных условиях под влиянием стимуляции анти-CD3-антителами.

Интересно, что в результате статистического анализа в группе доноров не было обнаружено значимых отличий по супрессорной активности Treg в отношении CD4⁺ и CD8⁺-лимфоцитов между стимуляцией анти-CD3-антителами, комбинацией анти-CD3+IL-2, IL-7 и IL-15. При этом условия приближенные к процессу быстрой ГП значительно снижали супрессорную активность Treg: индекс супрессии в условиях стимуляции анти-CD3+IL-7 и анти-CD3+IL-15 был значимо ниже, чем при стимуляции анти-CD3, анти-CD3+IL-2 и цитокинами IL-7 и IL-15 по отдельности. При этом стоит отметить, что обработка Treg IL-7 также приводила к значимому снижению супрессорной активности в сравнении со стимуляцией анти-CD3-антителами, комбинацией анти-CD3+IL-2, IL-7 и IL-15 и не отличалась от стимуляции анти-CD3+IL-7 и анти-CD3+IL-15 (Рис. 8).

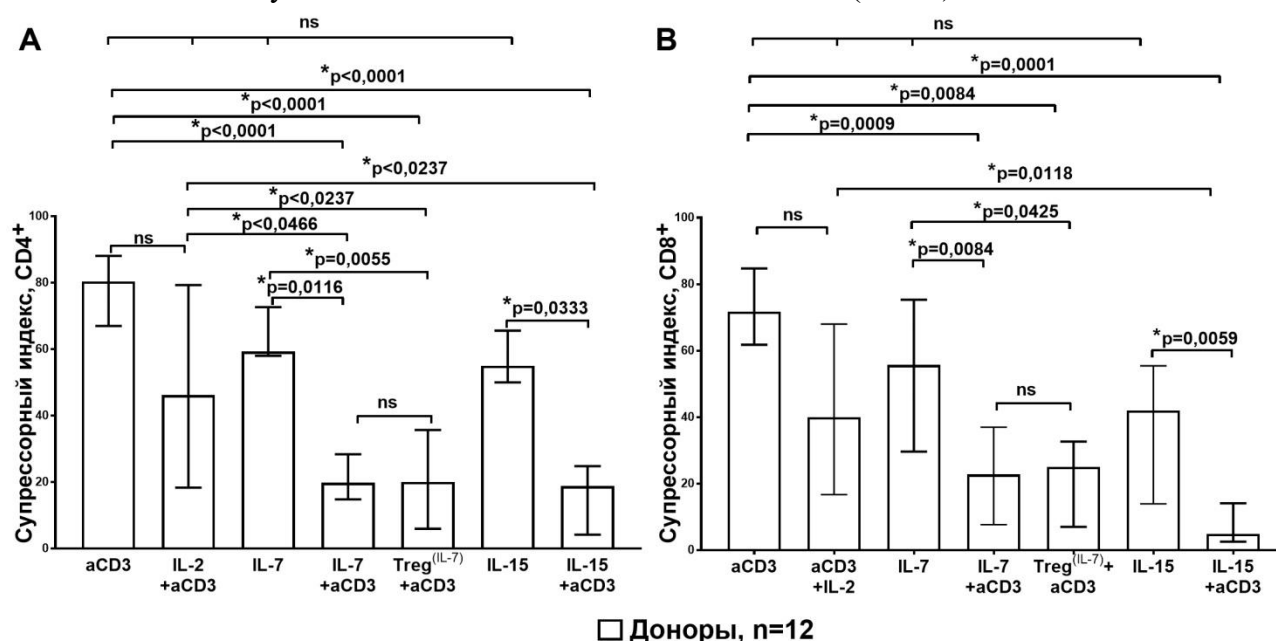


Рис. 8. Супрессорный индекс Treg в отношении CD4⁺ (А) и CD8⁺-лимфоцитов (Б) в группе доноров.

Примечание: Ме, IQR; сравнение проводилось с помощью теста Фридмана с апостериорным тестом Данна

Механизм, с помощью которого цитокины IL-7 и IL-15 могут снижать способность Treg подавлять пролиферацию лимфоцитов в условиях стимуляции анти-CD3-антителами, может быть связан как с прямым влиянием на Treg, так и с влиянием на эффекторные Т-клетки. Кроме того, есть данные, что сильная стимуляция TCR приводит к увеличению продукции гранзима-В Тconv-лимфоцитами и сопровождается повышенной гибелью Treg вследствие усиления контактной цитотоксичности [Ashley et al., 2009]. Поэтому вместе с анализом супрессорной активности Treg оценивалось содержание мертвых или поврежденных Treg с помощью красителя 7-AAD. При этом не наблюдалось увеличения гибели Treg или уменьшение их числа в различных условиях стимуляции. Что свидетельствует о том, что снижение подавления пролиферации Тconv-лимфоцитов не связано со снижением численности Treg. Для дальнейшего изучения этого вопроса, было

решено предварительно обрабатывать Treg IL-7, чтобы напрямую оценить влияние этого цитокина на супрессорную активность Treg. Такая обработка приводила к снижению индекса супрессии, как в отношении $CD4^+$, так и в отношении $CD8^+$ -лимфоцитов. Супрессорный индекс при этом не отличался от стимуляции комбинацией анти-CD3+IL-7. Эти данные свидетельствуют о том, что прямое влияние IL-7 на Treg способно снижать способность последних подавлять пролиферацию эффекторных Т-клеток.

Для пациентов с РА было проведено исследование в тех же условиях стимуляции. Профиль супрессорной активности Treg, как в отношении $CD4^+$, так и в отношении $CD8^+$ -лимфоцитов у пациентов с РА был аналогичен здоровым донорам, при этом наименьший супрессорный индекс наблюдался при комбинации IL-7 или IL-15 с анти-CD3 антителами, или при предварительной обработке Treg IL-7 (Рис. 9).

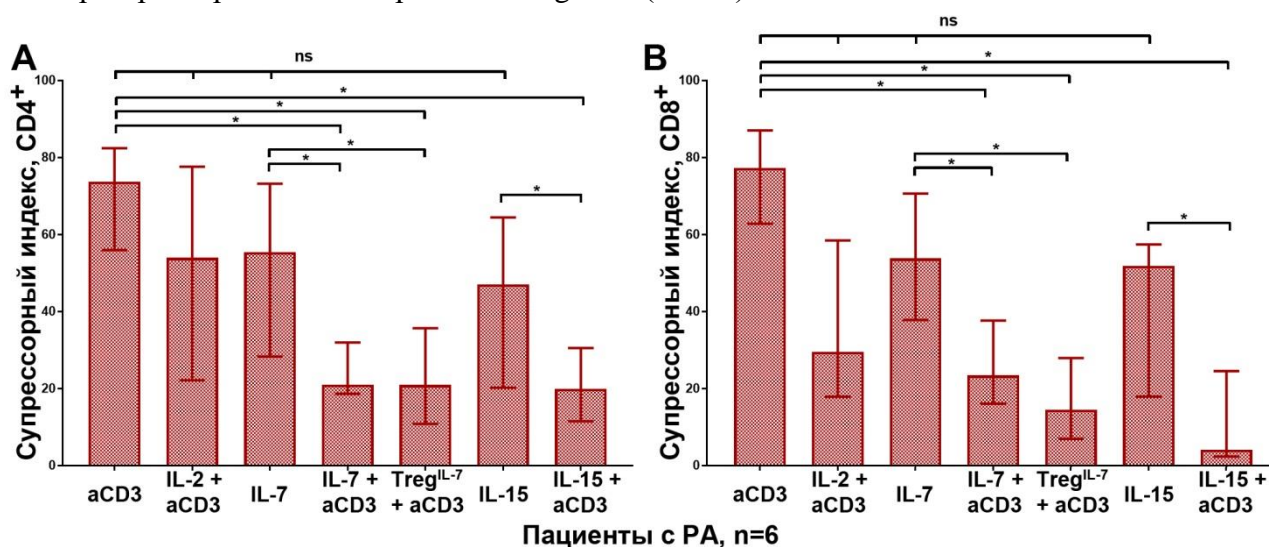


Рис. 9. Супрессорный индекс Treg в отношении $CD4^+$ (А) и $CD8^+$ -лимфоцитов (В) в группе пациентов.

Примечание: Me, IQR; сравнение проводилось с помощью теста Фридмана с апостериорным тестом Данна

Интересно, что не было обнаружено достоверных отличий по супрессорной активности общего пула Treg периферической крови между донорами и пациентами с РА во всех тестируемых условиях.

Таким образом, в результате сравнения супрессорной активности Treg не было обнаружено значимых отличий между группами доноров и пациентов с РА ни при каких условиях стимуляции ни в отношении $CD4^+$, ни в отношении $CD8^+$ -лимфоцитов. Также, исходя из полученных результатов, интересно отметить плеiotропное действие IL-2, который оказывает положительное действие на супрессорную активность Treg и при этом активирует и стимулирует пролиферацию Tconv-клеток. В то же время цитокины ГП IL-7 и IL-15, по-видимому, в большей степени стимулируют именно Tconv-клетки и в меньшей степени поддерживают супрессорную активность Treg в условиях поликлональной стимуляции TCR анти-CD3-антителами.

Данное исследование преследовало две основные цели: сравнить супрессорную активность Treg между донорами и пациентами с РА в различных условиях стимуляции, и оценить влияние гуморальных факторов ГП на супрессорную активность Treg. В результате проведенных экспериментов не удалось обнаружить какой-либо разницы в супрессорной активности общего пула Treg доноров и пациентов с РА. Также не было обнаружено снижения супрессорной активности Treg под влиянием IL-7 и IL-15 в условиях медленной пролиферации, вызываемой этими цитокинами. При этом было выявлено резкое снижение

способности Treg подавлять пролиферацию Т-респондеров, как CD4⁺, так и CD8⁺ в условиях быстрой пролиферации Т-лимфоцитов, индуцированной сочетанием IL-7 или IL-15 со стимуляцией анти-CD3-антителами. Как было отмечено ранее, такой вид стимуляции аналогичен условиям быстрой ГП *in vivo* на фоне глубокой лимфопении, когда одновременно присутствует большое число свободных ниш. Стоит отметить, что в этих условиях также формируется относительный дефицит IL-2, из-за снижения числа клеток-продуцентов этого цитокина, и *in vivo* это может являться дополнительным условием снижения функциональной активности Treg, которое приводит к растормаживанию пролиферации различных клонов Т-клеток, в числе которых большую часть могут занимать аутореактивные клоны [Ge et al., 2001; Theofilopoulos et al., 2001; Kassiotis et al., 2003; Kieper et al., 2004]. Как было отмечено ранее, это происходит из-за появления конкуренции между различными клонами Т-лимфоцитов за сигналы к пролиферации, в числе которых наибольшую роль начинает играть сигнал, передающийся через TCR. И в этой конкуренции преимущество принадлежит тем клонам лимфоцитов, чьи TCR с относительно более высокой аффинностью могут связать пептид в комплексе МНС. Учитывая, что одновременно в организме не может представляться всё разнообразие антигенных детерминант, и в результате кросс-презентации большую часть представляемых антигенов составляют эпитопы собственных белков, можно предположить, что в пролиферацию вступают клетки, с более высоким сродством TCR к аутопептидам, а также небольшое число клонов специфичных к чужеродным антигенам, которые в данный момент присутствуют в организме. Таким образом, в результате быстрой ГП происходит отбор аутореактивных клонов Т-клеток и их пролиферация. Это приводит к снижению разнообразия репертуара Т-клеточных рецепторов и увеличивает вероятность развития аутоиммунных заболеваний.

Как было отмечено ранее Treg доноров и пациентов с РА не отличались по способности подавлять пролиферацию Т-респондеров в различных условиях стимуляции. Это наблюдение не даёт ответ на вопрос о том, почему, несмотря на высокую инфильтрацию Treg тканей синовия не происходит разрешения воспалительного процесса и он носит персистирующий характер. Возможным объяснением этому могут служить исследования, в которых было показано, что при удалении из воспалительной среды Treg способны эффективно подавлять выработку провоспалительных цитокинов и пролиферацию Т-клеток респондеров *in vitro* [Herrath et al., 2011]. В других исследованиях также были получены аналогичные данные, о том, что эффекторных клеток, полученных из сайтов воспаления, имеют устойчивость к супрессорным влияниям со стороны Treg. И, как оказалось, такая устойчивость к ингибиторным сигналам Treg не была связана с активированным статусом APC или с фенотипом памяти эффекторных клеток, а зависела от повышенной активации протеинкиназы В (РКВ)/с-akt в эффекторных клетках под воздействием провоспалительных цитокинов TNFα и IL-6 в сайтах воспаления. При этом ингибирование этой киназы восстанавливало ответ эффекторных клеток на супрессорные влияния со стороны Treg [Wehrens et al., 2011]. Это свидетельствует о том, что изначально функции общего пула Treg при РА не нарушены, что согласуется с нашими и ранее полученными данными [Walter et al., 2016]. Важными с точки зрения понимания баланса между эффекторными и регуляторными клетками при РА представляются исследования Rossetti M. et al., в которых был проведен анализ репертуаров TCR для Treg и эффекторных Т-клеток в общем кровотоке, а также в синовиальной жидкости суставов, вовлеченных в патологический процесс. В результате исследования было выявлено несколько интересных особенностей. Во-первых,

пулы эффекторных и регуляторных клеток в синовии были представлены узкими репертуарами TCR, которые частично перекрывались, т.е. часть активированных Treg, связанных с воспалением в синовии имеют общую антигенную специфичность TCR с эффекторными Т-лимфоцитами, участвующими в поддержании воспаления в суставах. В противоположность этому, репертуары эффекторных и регуляторных клеток, не принадлежащие синовиальному множеству TCR не перекрывались. Это подтверждает предположение, что Treg действуют в высокой степени специфично по отношению к антигену. Стоит отметить, что эффекторные клетки, принадлежащие синовиальному множеству TCR, имели активированный фенотип, присутствовали в периферическом кровотоке и характеризовались высокой продукцией провоспалительных цитокинов. Подобно эффекторам, Treg, принадлежащие синовиальному множеству TCR, имели активированный фенотип, и были представлены в периферическом кровотоке в популяции HLA-DR⁺Treg. Супрессорная активность этих клеток была сохранена и не отличалась от остальных Treg периферического кровотока. Кроме того репертуары TCR эффекторных и регуляторных клеток, принадлежащие синовиальному множеству, были индивидуальными для каждого пациента [Rossetti et al., 2017; Spreafico et al., 2016]. Таким образом, представляется важным в дальнейшем учитывать не только субпопуляционный состав Treg, опираясь на уровень экспрессии тех или иных функциональных молекул, но также принимать во внимание гетерогенность популяции, которая определяется антигенной специфичностью TCR. Возможно, дефект в регуляторных механизмах при РА определяется не на популяционном уровне, а на уровне, ограниченном набором клонов Treg, имеющих высокую специфичность к определенным антигенам, в отношении которых происходит нарушение толерантности. В этом контексте важно учитывать, что репертуары TCR между ассоциированными с воспалением регуляторными и эффекторными клетками перекрывались лишь частично, что говорит о наличии «пробелов» в популяции Treg. Другими словами, существуют такие клоны эффекторных клеток, для которых нет Treg-клонов с соответствующей специфичностью TCR, что может представлять основу для нарушения равновесия между регуляторными и эффекторными звеньями иммунитета. Более того, для каждого пациента такое клональное несоответствие индивидуально. По-видимому, это объясняется тем, что в каждом конкретном случае в основе патологического процесса лежат разные наборы антигенных детерминант, в отношении которых нарушается толерантность.

Таким образом, автор предполагает, что в будущем идентификация антигенспецифических клонов Т-лимфоцитов, вовлеченных в нарушение ауто толерантности при РА, позволит специфически воздействовать на эти клоны с помощью моноклональных антител или CAR-Т-лимфоцитов, что обеспечит персонализированный подход к терапии этого заболевания.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с ревматоидным артритом наблюдается повышенное содержание CD4⁺RORγt⁺FoxP3⁻ и CD4⁺RORγt⁺FoxP3⁺-лимфоцитов в периферической крови, которое коррелирует с тяжестью заболевания, оцениваемой по DAS-28.
2. В отличие от здоровых доноров, в периферической крови пациентов с РА наблюдается повышенное содержание CCR4⁺Treg и пониженное количество CTLA-4⁺Treg.
3. Цитокины IL-7 и IL-15, участвующие в гомеостатической пролиферации, способны поддерживать гомеостаз популяции Treg-клеток доноров как за счет стабилизации

экспрессии транскрипционного фактора FoxP3, так и за счет индукции пролиферации этих клеток.

4. Пролиферативная активность Treg-клеток под влиянием IL-7 и IL-15 у пациентов значительно ниже, чем у здоровых доноров.

5. Супрессорная активность общего пула Treg не отличается между группами доноров и пациентов во всех тестируемых условиях стимуляции.

6. Treg способны эффективно подавлять пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺-лимфоцитов, индуцированную цитокинами гомеостатической пролиферации – IL-7 и IL-15 как в группе доноров, так и у пациентов с РА.

7. Способность Treg подавлять пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺-лимфоцитов, индуцированную IL-7 или IL-15, резко снижается в условиях стимуляции TCR, обусловленной анти-CD3-антителами как в группе доноров, так и у пациентов с РА.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Shevyrev D**, Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front Immunol.* 2020;10:3100. Published 2020 Jan 14. doi:10.3389/fimmu.2019.03100
2. **Шевырев Д.В.**, Блинова Е.А., Козлов В.А. Влияние гуморальных факторов гомеостатической пролиферации на Т-регуляторные клетки *in vitro*. Бюллетень сибирской медицины. 2019;18(1):286-293.
3. **Шевырев Д.В.**, Козлов В.А., Омельченко В.О. Влияние IL-7 и IL-15 на Т-регуляторные клетки здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом *in vitro*. Российский иммунологический журнал. 2019;22(2-1):653-656.
4. **Shevyrev D**, Sizikov A., Pashkina E., Grishina L., Kozlov V. Functional activity of T-regulatory cells in healthy donors and patients with rheumatoid arthritis, *in vitro* assay. Abstracts of the 17th International Congress of Immunology, Beijing, China, 19-23 October – 2019. P. 940-941
5. **Шевырев Д.В.**, Терещенко В.П., Козлов В.А. Гомеостатическая пролиферация: от нормы к патологии. Российский иммунологический журнал. 2018;21(2):91-105.
6. **Шевырев Д.В.** Гомеостатическая пролиферация: от нормы к патологии. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы регенеративной медицины, инновации в репродуктологии», Самара, 2018. Гены и Клетки. 2018;13(S1) С. 28-29.
7. **Shevyrev D**, Blinova E, Pashkina E, Grishina L, Kozlov V. Proliferation of T-regulatory cells and expression by them of CTLA-4 under the influence of humoral factors of homeostatic proliferation in healthy donors. Abstracts of the 5th European Congress of Immunology, Amsterdam, the Netherlands, 2-5 September – 2018. – P. 136.
8. Blinova E, Pashkina E, **Shevyrev D**, Grishina L, Sizikov A, Kozlov V. Expression of PD-1 and PD-L1 markers on T-regulatory cells during cytokine- and анти-CD3-induced proliferation in norm and rheumatoid arthritis. Abstracts of the 5th European Congress of Immunology, Amsterdam, the Netherlands, 2-5 September – 2018. – P. 358.
9. **Шевырев Д.В.** Изучение влияния гуморальных факторов гомеостатической пролиферации на Т-регуляторные клетки *in vitro*. Материалы XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук Сборник научных трудов». Томск, 2018. С. 173-175.

10. **Shevyrev D**, Blinova E, Pashkina E, Kozlov V. T-regulatory cells under cytokine-induced proliferation. Материалы международной конференции Future of Biomedicine Conference. Владивосток, 2017. С. 89