

РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ У ДЕТЕЙ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Пашнина И.А.

ГБУЗ СО Областная детская клиническая больница №1, г. Екатеринбург, Россия
ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Обследованы дети и подростки 7-17 лет: с ювенильным артритом (n=99), с реактивным артритом (n=21), с ювенильной склеродермией (n=16), с системной красной волчанкой (n=14), условно здоровые (n=32). Методом проточной цитометрии выявлено снижение количества регуляторных Т-лимфоцитов (CD4⁺CD25⁺CD127^{low/neg}) у детей с реактивным артритом, ювенильными артритами, ювенильной склеродермией по сравнению со здоровыми детьми, у больных с системной красной волчанкой число Treg не отличалось от контрольного. Снижение количества регуляторных Т-клеток в большинстве обследованных групп больных указывает на участие этих лимфоцитов в развитии аутоиммунной патологии у детей. Остается открытым вопрос о том, какие причины способствуют поддержанию нормального количества Treg при СКВ, в отличие от других аутоиммунных заболеваний. Выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь между количеством Treg и индексом SLEDAI при СКВ, положительная взаимосвязь - между количеством Treg и числом пораженных суставов при РеА. Количество CD3⁺CD25⁺ и CD3⁺CD4⁺CD25⁺ лимфоцитов у обследованных детей было достоверно взаимосвязано между собой, а также с числом Treg, что обуславливает нецелесообразность определения Т-лимфоцитов и Т-хелперов, экспрессирующих CD25, в качестве самостоятельных параметров.

Ключевые слова: регуляторные Т-клетки, аутоиммунные заболевания, дети.

Введение

В настоящее время ключевая роль в негативной регуляции иммунного ответа отводится регуляторным Т-клеткам (Treg) и продуцируемым ими цитокинам. Не вызывает сомнения участие Treg в патогенезе различных аутоиммунных заболеваний, однако данные литературы относительно числа этих лимфоцитов при аутоиммунной патологии зачастую противоречивы [5]. Часть литературных источников свидетельствует о снижении числа Treg при системной красной волчанке (СКВ), склеродермии, ревматоидном артрите и ювенильном идиопатическом артрите [18, 21, 22, 23, 26, 35]. Согласно другим авторам, количество регуляторных Т-клеток при ревма-

тоидном артрите, прогрессирующем системном склерозе и СКВ, напротив, увеличено [11, 19, 30]. Существуют также данные, свидетельствующие об отсутствии изменений числа Treg при перечисленных аутоиммунных заболеваниях [7, 8, 16, 34, 38].

Противоречивость данных относительно количества Treg отчасти может объясняться различиями в методиках идентификации этих клеток, поскольку для этой цели используются разные маркеры. При исследовании Treg прежде всего было установлено, что это Т-клетки с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD25⁺, обладающие супрессорной активностью и участвующие в механизмах ауто-толерантности [31, 32, 36]. Мутация гена FoxP3 была идентифицирована в 2001 году как причина

Авторы:

Пашнина И.А. — к.б.н., зав. лабораторией иммунологии Отдела клинической иммунологии Областной детской клинической больницы №1, науч. сотр. лаборатории иммунопатофизиологии Института иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия

Адрес для переписки:

Пашнина Ирина Александровна
к.б.н., зав. лабораторией иммунологии Отдела клинической иммунологии Областной детской клинической больницы №1, науч. сотр. лаборатории иммунопатофизиологии Института иммунологии и физиологии УрО РАН
620149, Россия, г. Екатеринбург, ул. С. Дерябиной, 32, Областная детская клиническая больница №1, Отдел клинической иммунологии
Тел.: (343) 272-08-22.
E-mail: irina_pashnina@list.ru

Поступила 23.12.2013
Принята к печати 16.01.2014

© Пашнина И.А., 2014

Автор искренне благодарит врачей Областной детской клинической больницы №1 (г. Екатеринбург) Козлову Е.С., Скоробогатову О.В., Каракину М.Л. за подбор пациентов для обследования и биолога иммунологической лаборатории Областной детской клинической больницы №1 Криволапову И.М. за помощь в проведении лабораторных исследований.

развития тяжелого спонтанного аутоиммунного процесса у Scurfy-мышей [20]. Вслед за этим было выявлено, что ядерный фактор FoxP3 является ключевой молекулой для развития и функционирования Treg у человека [10]. С тех пор использование этого маркера для идентификации Treg является общепризнанным и весьма распространенным [40].

В некоторых работах показано, что только CD4⁺CD25^{high} лимфоциты человека обладают супрессорной активностью *in vitro* [9]. Однако позднее было установлено, что CD25^{intermediate} и CD25^{low/negative} также могут нести FoxP3 и обладать супрессорной активностью, и что еще одним маркером Treg является низкая экспрессия CD127 или отсутствие этого рецептора [24]. Кроме того, существуют данные, что FoxP3 может экспрессироваться не только регуляторными Т-клетками, но и другими активированными лимфоцитами [27]. В частности, при обследовании больных с ревматоидным артритом и с ювенильным идиопатическим артритом было выявлено, что не все CD4⁺CD25^{high} лимфоциты экспрессируют FoxP3⁺, в то же время CD4⁺FoxP3⁺ клетки могли быть CD25^{low} и CD25^{neg} [19, 29].

Пластичность маркеров Treg, таких как CD25 и FoxP3, в настоящее время широко обсуждается в литературе, так же, как и пластичность самих Treg, и их способность трансформироваться в другие типы Т-хелперов в зависимости от микроокружения [15]. Результатом этих работ явилось то, что для идентификации Treg в настоящее время все чаще используется комбинация моноклональных антител CD4⁺CD25⁺CD127^{low/neg}. По некоторым оценкам, использование поверхностных маркеров для типирования Treg предпочтительнее, чем определение FoxP3 на CD4⁺ лимфоцитах, поскольку позволяет избежать этапов фиксации и пермеабиллизации клеток, которые могут снижать интенсивность сигнала от других антител при цитометрическом анализе [17].

Целью работы явилась оценка количества регуляторных Т-клеток у детей с различными аутоиммунными заболеваниями и реактивными артритами в сравнении с условно-здоровыми детьми.

Материалы и методы

Обследованы дети и подростки 7-17 лет: с ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА, n=99), с реактивным артритом (РеА, n=21), с ювенильной склеродермией (ЮСД, локализованная форма, n=16), с системной красной волчанкой (СКВ, n=14), условно здоровые (группа сравнения, n=32). Диагноз ЮИА установлен согласно критериям Международной лиги обществ ревматологии (ILAR, Durban, 1997); диагноз РеА — в соответствии с критериями Международного совещания по реактивным артритам (Berlin, 1997); диагноз ЮСД — согласно предварительным

классификационным критериям, принятым Международной согласительной конференцией детских ревматологов (2004); диагноз СКВ — в соответствии с критериями Американского колледжа ревматологов (ACR, 1997).

В группу с ЮИА было включено 45 больных с олигоартикулярным ювенильным артритом (30 — с персистирующим, 15 — с распространенным), 22 — с полиартикулярным ювенильным артритом, 20 — с артритами, ассоциированными с энтезитом, 12 — с системным вариантом ювенильного артрита. Дети с различными вариантами ЮИА были объединены в общую группу, поскольку в ходе предварительных исследований не было выявлено различий по исследованным параметрам между разными формами данной патологии [3].

Дети с РеА, СКВ и большинство больных с ЮИА (79 человек) находились в стадии активности заболевания, 20 пациентов с ЮИА — в стадии ремиссии. Большинство больных с ЮСД (11 человек) имели подострую форму заболевания, три ребенка — острую форму. Все дети с РеА, ЮСД и СКВ, а также 82 ребенка с ЮИА получали соответствующую болезнь-модифицирующую терапию, 9 детей с ЮИА в стадии ремиссии заболевания не получали лекарственных препаратов. Глюкокортикостероиды принимали все дети с СКВ, 7 из 14 детей с СКВ, 3 ребенка с ЮИА.

При оценке клинического состояния больных с ЮИА и РеА учитывалось число пораженных суставов (болезненные, припухшие, с ограничением движения), больных с ЮСД — степень поражения кожных покровов. Для детей с ЮИА высчитывался индекс DAS28-CRP, для пациентов с СКВ — индекс SLEDAI. Для всех пациентов — длительность заболевания. Данные получены из амбулаторных карт пациентов.

Подсчет количества CD45, CD3, CD4, CD25, CD127 на лимфоцитах проведен методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США). Учитывалась доля (процентное содержание) CD3⁺CD25⁺ от CD3⁺ лимфоцитов, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺CD127^{low/neg} (Treg) и CD4⁺CD25⁺CD127⁺ от CD4⁺ лимфоцитов. Подсчет абсолютного количества клеток проведен методом проточной цитометрии с применением счетных частиц Flow-Count (Beckman Coulter, США). Для оценки межгрупповых различий использовали метод множественных сравнений Краскела-Уоллиса, для оценки взаимосвязей между параметрами — ранговый корреляционный анализ Спирмена.

Результаты

Для оценки взаимосвязи между количеством клеток в различных субпопуляциях Т-лимфоцитов и исключения дублирующих друг друга данных проведен корреляционный анализ. Выявлены положительные корреляционные за-

висимости с высоким уровнем значимости между количеством $CD3^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^+$ во всех группах обследованных детей (табл. 1). Более того, количество $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^+CD127^{low/neg}$ также коррелировало между собой в трех из пяти групп обследованных, и еще в одной группе (с ЮИА) была обнаружена корреляционная зависимость на уровне тенденции ($p < 0,1$). Количество $CD3^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^+CD127^{low/neg}$ в меньшей степени были связаны друг с другом, тем не менее, корреляционные взаимосвязи были выявлены у здоровых детей и у больных с СКВ, а в группе с реактивным артритом обнаружена тенденция к согласованному изменению данных параметров. Кроме того, $CD4^+CD25^+$ составили большую часть всех $CD3^+CD25^+$ лимфоцитов. У здоровых детей доля $CD4^+CD25^+$ среди всех $CD3^+CD25^+$ была равна 97%; у больных с РеА – 64%, с ЮИА – 75%, с ЮСД – 72%, с СКВ – 77%. Во всех группах больных значение этого параметра значимо отличалось от контрольного уровня ($p < 0,001$). Поскольку число $CD3^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^+$ лимфоцитов оказалось значимо коррелировано между собой (а также с числом Трег), в дальнейшем эти параметры не анализировались. Не выявлена взаимосвязь между числом лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^+CD127^+$ (активированные Т-хелперы) и численностью других субпопуляций Т-лимфоцитов ни в одной из обследованных групп.

Обнаружено снижение процентного содержания регуляторных Т-клеток ($CD4^+CD25^+CD127^{low/neg}$) у больных с заболеваниями суставов различной этиологии: реактивным артритом и ювенильными артритами (табл. 2, рис. 1), а также у детей с ювенильной склеродермией. У больных с СКВ количество этих клеток находилось на уровне такового в контрольной группе. Доля $CD4^+CD25^+CD127^+$ от $CD4^+$ лимфоцитов у об-

следованных пациентов и здоровых детей оказалось примерно в 5 раз меньше, чем Трег (табл. 2). Значимые различия с группой сравнения были выявлены у больных с ЮИА и с РеА, у которых число $CD4^+CD25^+CD127^+$ было меньше, чем у здоровых детей.

Изменения абсолютного количества исследованных субпопуляций Т-лимфоцитов повторяли изменения их относительного количества (в таблице не показано): в случае значимых различий по процентному содержанию, такие различия (либо тенденция к различию, $p < 0,1$) наблюдались и по абсолютному количеству.

Выявлены корреляционные зависимости между количеством Трег и числом пораженных суставов при РеА ($R=0,52$; $p < 0,05$), между количеством Трег и индексом SLEDAI при СКВ ($R = -0,54$; $p < 0,05$). Число активированных Т-хелперов не было взаимосвязано с клиническими параметрами. Не обнаружено различий по количеству Трег и активированных Т-хелперов между больными с ЮИА, получавшими и не получавшими болезнь-модифицирующую терапию, между больными с ЮСД, принимавшими и не принимавшими глюкокортикостероиды.

Обсуждение

Определение количества $CD3^+CD25^+$ лимфоцитов широко используется в клинической практике для оценки ранней активации Т-лимфоцитов [1, 6]. Однако данная популяция клеток весьма разнородна, поскольку CD25 может экспрессироваться на Т-хелперах ($CD3^+CD4^+$), цитотоксических лимфоцитах ($CD3^+CD8^+$) и дубль-негативных Т-клетках ($CD3^+CD4^-CD8^-$) [6]. Хотя клетки с фенотипом $CD3^+CD4^+CD25^+$ у обследованных нами детей составили подавляющую часть от всех CD25 позитивных Т-лимфоцитов,

ТАБЛИЦА 1- КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ (R) И УРОВЕНЬ ЗНАЧИМОСТИ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ МЕЖДУ ОТНОСИТЕЛЬНЫМ КОЛИЧЕСТВОМ Т-КЛЕТОК С РАЗЛИЧНЫМ ФЕНОТИПОМ У ДЕТЕЙ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ И ИЗ ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ

Субпопуляции Т-лимфоцитов	$CD3^+CD25^+$; $CD4^+CD25^+$	$CD3^+CD25^+$; $CD4^+CD25^+CD127^{low/neg}$	$CD3^+CD25^+$; $CD4^+CD25^+CD127^+$	$CD4^+CD25^+$; $CD4^+CD25^+CD127^{low/neg}$	$CD4^+CD25^+$; $CD4^+CD25^+CD127^+$	$CD4^+CD25^+CD127^{low/neg}$; $CD4^+CD25^+CD127^+$
Группа сравнения	0,69***	0,55**	-0,08	0,79***	0,03	0,26
РеА	0,86***	0,51*	0,54*	0,41	0,56*	0,39
ЮИА	0,51***	0,12	0,11	0,21*	0,18	0,05
ЮСД	0,76**	0,39	0,31	0,76**	0,04	-0,21
СКВ	0,86***	0,63**	0,38	0,80***	0,37	0,20

Примечание: уровень значимости корреляционных взаимосвязей: * - $p < 0,1$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

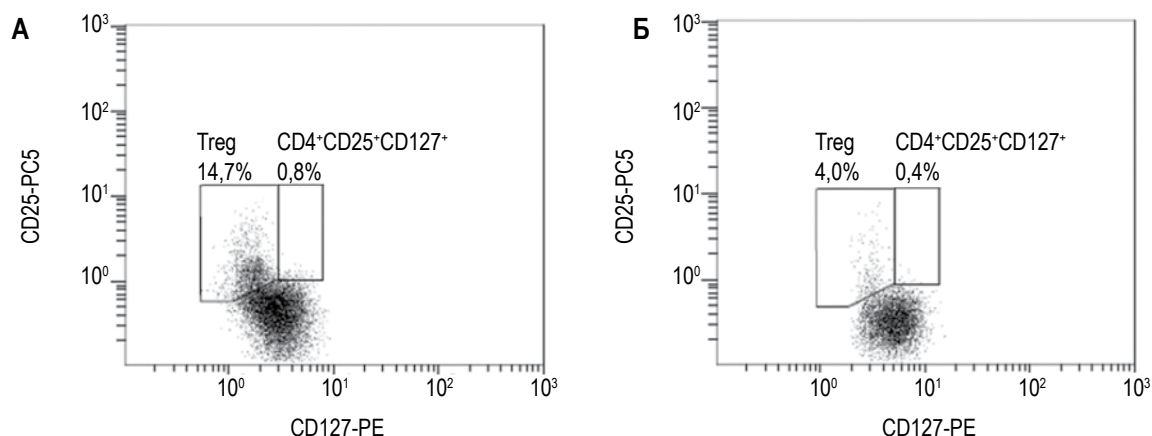


Рисунок 1. Результаты цитометрического анализа $CD4^+CD25^+CD127^{low/neg}$ (Treg) и $CD4^+CD25^+CD127^+$ (активированных Т-лимфоцитов): а) ребенок из контрольной группы; б) больной с ЮИА. На цитограммах показаны только $CD45^+CD3^+CD4^+$ лимфоциты.

ТАБЛИЦА 2. СУБПОПУЛЯЦИИ $CD4^+$ ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ И В ГРУППЕ СРАВНЕНИЯ (% ОТ $CD4^+$)

Группа	$CD4^+CD25^+CD127^{low/neg}$ (Treg)		$CD4^+CD25^+CD127^+$	
	Медиана	Нижняя квартиль – верхняя квартиль	Медиана	Нижняя квартиль – верхняя квартиль
Группа сравнения	10,2	8,3-12,2	1,8	1,2-2,2
РеА	5,6***	3,6-7,3	1,0*	0,8-1,5
ЮИА	5,8***	4,7-7,0	1,2*	0,8-1,8
ЮСД	6,1***	4,5-6,9	1,7	1,0-2,0
СКВ	9,4	7,1-11,7	1,9	1,3-2,2

Примечание: различия с группой сравнения: * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$

их доля в группах с различными заболеваниями оказалась значительно ниже, чем в контрольной. То есть пропорция клеток с различными фенотипами внутри субпопуляции $CD3^+CD25^+$ в норме и при различных патологических состояниях может значительно различаться. Даже при одинаковом количестве $CD3^+CD25^+$, состав этих клеток у разных пациентов может весьма варьировать, и, соответственно, будет различаться клиническая значимость полученных лабораторных данных.

В свою очередь, Т-хелперы, позитивные по CD25, включают и активированные эффекторные лимфоциты, и регуляторные клетки, обладающие различными функциями. Несмотря на то, что CD25 является активационным маркером лимфоцитов, трактовать повышение количества $CD4^+CD25^+$ как признак активации иммунной системы, не вполне правомерно, поскольку Treg, составляющие основную часть этой субпопуляции, призваны снижать интенсивность иммунного ответа. В то же время, хотя при подсчете числа $CD4^+CD25^+$ в основном оценивается количество регуляторных Т-клеток, но эффекторные CD25позитивные лимфоциты также вносят свой вклад в эту цифру, что затрудняет интерпретацию данных. В связи с этим представляется более целесообразным отдельно оценивать количество регуляторных и эффекторных $CD3^+CD4^+CD25^+$

лимфоцитов, а также, при необходимости, — количество $CD3^+CD8^+CD25^+$ клеток.

У обследованных детей с ювенильным артритом, реактивным артритом и ювенильной склеродермией выявлено снижение числа регуляторных Т-клеток по сравнению с контрольными значениями. Кроме того, в обеих группах детей с заболеваниями суставов (с РеА и ЮИА) количество активированных $CD4^+$ лимфоцитов ($CD4^+CD25^+CD127^+$) было ниже контрольного уровня. Ранее нами было установлено, что около одной трети детей с реактивными артритами имеют позитивные результаты при определении антинуклеарных антител [2], что значительно выше, чем у здоровых детей, хотя и ниже, чем у детей с ЮИА, у которых положительные результаты данного теста определяются более чем в 60% случаев [4]. Схожие изменения лабораторных иммунологических показателей при ЮИА и РеА могут указывать на общность патогенетических механизмов этих заболеваний.

Одним из объяснений снижения количества Treg в периферической крови при аутоиммунных заболеваниях суставов является их миграция в место воспаления, поскольку множество авторов наблюдали повышенную инфильтрацию синовиальной жидкости пораженных суставов этими клетками при ювенильных артритах и ревмато-

идном артрите [21, 28, 13, 29]. Несмотря на то, что в ряде работ не выявлено различий между больными с ревматоидным артритом и здоровыми донорами по количеству Treg периферической крови, было обнаружено существенное увеличение числа регуляторных Т-клеток в синовиальной жидкости больных с артритом [12, 22, 38]. При этом регуляторные Т-клетки синовиального происхождения *in vitro* были способны к супрессии митоген-стимулированной пролиферации лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25⁻, в отличие от Treg периферической крови.

В снижении числа Treg и изменении их функционального статуса также могут быть задействованы регуляторные механизмы, в частности, цитокин-опосредованные. Было показано снижение супрессорного эффекта (в отношении пролиферации CD4⁺CD25⁻ *in vitro*) регуляторных Т-лимфоцитов, изолированных из периферической крови пациентов с ревматоидным артритом, но при обработке препаратами против TNF- α , их функциональная активность восстанавливалась [16]. При экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите у мышей было выявлено, что TNF- α ингибирует дифференцировку Treg, после нейтрализации этого цитокина антителами эффект ингибирования снимался [39].

Обращает на себя внимание, что при наиболее тяжелом аутоиммунном заболевании из исследованных нами — системной красной волчанке — количество Treg было сравнимо с контрольным уровнем. В. Alvarado-Sanchez и соавторы [8] также не обнаружили различий по количеству Treg между здоровыми донорами и пациентами с СКВ. Ряд авторов выявили снижение числа CD4⁺25^{high} у больных с активной формой СКВ, однако при низкой активности заболевания количество Treg не отличалось от контрольных значений [23, 26, 37]. Согласно другим данным [7], число CD4⁺FoxP3⁺ лимфоцитов у пациентов с СКВ было даже больше, чем в контрольной группе. То есть, при СКВ количество Treg в значительной степени зависит от стадии и активности заболевания.

Взаимосвязь между регуляторными Т-клетками и состоянием больных подтверждает отрицательная корреляция между количеством Treg и индексом SLEDAI, отражающим активность заболевания. Необходимо отметить, что при РеА число Treg было тем выше, чем более выражены были клинические симптомы болезни (больше пораженных суставов), а при СКВ наблюдалась обратная закономерность. При этом при РеА количество Treg было снижено по сравнению с контрольной группой, а при СКВ — в норме. Вероятно, разная направленность корреляционных зависимостей связана со степенью дисбаланса иммунорегуляторных механизмов при разных заболеваниях, поскольку РеА — заболевание смешанного инфекционно-аутоиммунного генеза и характеризуется более мягким

течением, чем такое тяжелое и длительное протекающее аутоиммунное заболевание как СКВ.

Отсутствие различий по количеству Treg у больных с СКВ и здоровых детей можно было бы объяснить влиянием терапии глюкокортикоидными препаратами, поскольку все пациенты из этой группы (в отличие от других групп больных) получали стероидные противовоспалительные препараты. Так, в экспериментальных исследованиях на Т-лимфоцитах показано увеличение *in vitro* количества Treg и их функциональной активности при добавлении дексаметазона [14]. Тенденцию к росту числа Treg (CD4⁺CD25⁺) наблюдали после лечения ритуксимабом больных с активным люпус-нефритом [33]. Е. Lyssuk и соавторы [25] выявили снижение количества регуляторных Т-клеток только у пациентов с дебютом СКВ, не получавших терапию, в то время, как после лечения количество этих клеток у больных было на уровне контрольного. То есть, успешная терапия может приводить к восстановлению ранее сниженного количества регуляторных Т-клеток при аутоиммунной патологии. Однако половина обследованных нами больных с ЮСД также принимали глюкокортикоиды, но различий по содержанию Treg у этих детей и детей с аналогичным диагнозом, не получавших указанные препараты, не обнаружено. Кроме того, пациенты с ЮИА с медикаментозной и немедикаментозной ремиссией не отличались по количеству Treg как между собой, так и от больных в острой стадии заболевания, получавших базисную терапию.

Таким образом, выявлено снижение количества регуляторных Т-лимфоцитов (CD4⁺CD25⁺CD127^{low/neg}) у детей с реактивным артритом, ювенильными артритами, ювенильной склеродермией по сравнению со здоровыми детьми, у больных с системной красной волчанкой число Treg не отличалось от контрольного. Количество активированных Т-хелперов (CD4⁺CD25⁺CD127⁺) у детей с артритами различной этиологии было ниже, чем в контрольной группе. Снижение количества регуляторных Т-клеток в большинстве обследованных групп больных указывает на участие этих лимфоцитов в развитии аутоиммунной патологии у детей. Выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь между количеством Treg и индексом SLEDAI при СКВ, положительная взаимосвязь — между количеством Treg и числом пораженных суставов при РеА. Остается открытым вопрос о том, какие причины способствуют поддержанию (либо восстановлению) нормального количества Treg при СКВ, в отличие от других аутоиммунных заболеваний. Количество CD3⁺CD25⁺ лимфоцитов и CD3⁺CD4⁺CD25⁺ лимфоцитов у обследованных детей было значимо взаимосвязано между собой, а также с числом Treg, что обуславливает нецелесообразность определения Т-лимфоцитов и Т-хелперов, экспрессирующих CD25, в качестве самостоятельных параметров.

Список литературы / References

1. Козлов В.А., Борисов А.Г., Смирнова С.В., Савченко А.А. Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений: руководство для врачей. Новосибирск: Наука, 2009. 274 с. [Kozlov V.A., Borisov A.G., Smirnova S.V., Savchenko A.A. *Prakticheskie aspekty diagnostiki i lecheniya immunnykh narusheniy: rukovodstvo dlya vrachey* [Practical Aspects of Diagnostics and Treatment of Immune Malfunctions: Handbook for physician]. Novosibirsk: Science, 2009. 274 p.]
2. Криволапова И.М., Пашнина И.А., Скоробогатова О.В., Козлова Е.С. Спектр аутоантител у детей с ювенильным артритом и реактивным артритом // Вестник уральской медицинской академической науки. 2012. № 4 (41). С. 126-127. [Krivolapova I.M., Pashnina I.A., Skorobogatova O.V., Kozlova E.S. Spektr autoantitel u detey s yuvenil'nym artritam i reaktivnym artritom [Spectra of autoantibodies in children with juvenile arthritis and reactive arthritis]. *Vestnik ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of Ural Medical Academic Science*, 2012, no. 4 (41), pp. 126-127.]
3. Пашнина И.А. Количество регуляторных Т-клеток у детей с ювенильными артритом // Российский иммунологический журнал. 2013. Т. 7 (16), № 2-3 (1). С. 74-76. [Pashnina I.A. Kolichestvo regulatorynykh T-kletok u detey s yuvenil'nymi artritam [The amount of regulatory T-cells in children with juvenile arthritis]. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2013, Vol. 7 (13), no. 2-3 (1), pp. 74-76.]
4. Пашнина И.А., Криволапова И.М., Козлова Е.С., Скоробогатова О.В., Тузанкина И.А., Черешнев В.А. Аутоантитела при ювенильных артритом у детей // Российский иммунологический журнал. 2013. Т. 7 (16), № 4. С. 437-444. [Pashnina I.A., Krivolapova I.M., Kozlova E.S., Skorobogatova O.V., Tuzankina I.A., Chereshev V.A. Autoantitela pri yuvenil'nykh artritakh u detey [Autoantibodies in children with juvenile arthritis]. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2013, Vol. 7 (16), no. 4, pp. 437-444.]
5. Торгашина А.В., Быковская С.Ю., Соловьев С.К., Насонов Е.Л. Т регуляторные клетки при системной красной волчанке и ревматоидном артрите // Научно-практическая ревматология. 2009. № 3. С. 50-59. [Torgashina A.V., Bykovskaya S.Yu., Solov'ev S.K., Nasonov E.L. T regulatorynye kletki pri sistemnoy krasnoy volchanke i revmatoidnom artrite [T regulatory cells at rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus]. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2009, no. 3, pp. 50-59.]
6. Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 352 с. [Haitov R.M., Pinegin B.V., Yarilin A.A. *Rukovodstvo po klinicheskoy immunologii. Diagnostika zabolevaniy immunnoy sistemy: rukovodstvo dlya vrachey* [Handbook in Clinical Immunology: Diagnostics of Immune System Diseases: Handbook for physicians]. Moscow: GEOTAR-Media, 2009. 352 p.]
7. Alexander T., Sattler A., Templin L., Kohler S., Gro C., Meisel A., Sawitzki B., Burmester G.-R., Arnold R., Radbruch A., Thiel A., Hiepe F. FoxP3⁺ Helios⁺ regulatory T cells are expanded in active systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.*, 2013, Vol. 72, pp. 1549-1558.
8. Alvarado-Sanchez B., Hernandez-Castro B., Portales-Perez D., Baranda L., Layseca-Espinosa E., Abud-Mendoza C., Cubillas-Tejeda A.C., Gonzalez-Amaro R. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity*, 2006, Vol. 27, pp. 110-118.
9. Baecher-Allan, C., Brown J.A., Freeman G.J., Hafler D.A. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, pp. 1245-1253.
10. Bennett C.L., Christie J., Ramsdell F., Brunkow M.E., Ferguson P.J., Whitesell L., Kelly T.E., Saulsbury F.T., Chance P.F., Ochs H.D. The immune dysregulation polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of Foxp3. *Nat. Genet.*, 2001, Vol. 27, no. 1, pp. 20-21.
11. Bonelli M., von Dalwigk K., Savitskaya A., Smolen J.S., Scheinecker C. FoxP3 expression in CD4⁺ T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic analysis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2008, Vol. 67, pp. 664-671.
12. Cao D., Malmstrom V., Baecher-Allan C., Hafler D., Klareskog L., Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*, 2003, Vol. 33, pp. 215-223.
13. Cao D., van Vollenhoven R., Klareskog L., Hafler D., Klareskog L., Trollmo C. CD25^{bright}CD4⁺ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis. Res. Ther.*, 2004, Vol. 6, pp. 335-346.
14. Chunga I.Y., Dong H.F., Zhang X., Hassaneina N.M.A., Howard O.M.Z., Oppenheimer J.J., Chen X. Effects of IL-7 and dexamethasone: Induction of CD25, the high affinity IL-2 receptor, on human CD4⁺ cells. *Cellular Immunology*, 2004, Vol. 232, Issues 1-2, pp. 57-63.
15. Coomes S.M., Pelly V.S., Wilson M.S. Plasticity within the ab⁺CD4⁺ T-cell lineage: when, how and what for? *Open Biol.*, 2013, Vol. 3, pp. 120-157.

14. Ehrenstein M.R., Evans J.G., Singh A., Moore S., Warnes G., Isenberg D.A., Mauri C. Compromised function of regulatory t cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF therapy. *J. Exp. Med.*, 2004, Vol. 200, pp. 277-285.
15. Fazekas de StGroth B., Zhu E., Asad S., Lee L. Flow cytometric detection of human regulatory T cells. *Regulatory T cells: Methods and protocols in Molecular Biology. Ed. Cassiotis G., Liston A. Springer Science+Business Media*, 2011, Vol. 707, pp. 273-279.
16. Fenoglio D., Battaglia F., Parodi A., Stringara S., Negrini S., Panico N., Rizzi M., Kalli F., Conteduaa G., Ghio M., De Palmac R., Indiveri F., Filaci G. Alteration of Th17 and Treg cell subpopulations co-exist in patients affected with systemic sclerosis. *Clinical Immunology*, 2011, Vol. 139, pp. 249-257.
17. Han G.M., O'Neil-Andersen N.J., Zurier R.B., Lawrence D.A. CD4⁺CD25^{high} T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cel. Immunol.*, 2008, Vol. 253, pp. 92-101.
18. Khattri R., Kasprowicz D., Cox T., Mortrud M., Appleby M.W., Brunkow M.E., Ziegler S.F., Ramsdell F. The amount of scurf protein determines peripheral T-cell. Number and responsiveness. *Journal of Immunology*, 2001, Vol. 167, pp. 6312-6320.
19. Kleer I.M., Wedderburn L.R., Taams L.S., Patel A., Varsani H., Klein M., de Jager W., Pugayung G., Giannoni F., Rijkers G., Albani S., Kuis W., Prakken B. CD4⁺ CD25^{bright} regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, pp. 6435-6443.
20. Lawson C.A., Brown A.K., Bejarano V.C., Douglas S.H., Burgoyne C.H., Greenstein A.S., Boylston A.W., Emery P., Ponchell F., Isaacset J.D. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4⁺CD25^{high} regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatology*, 2006, Vol. 45, pp. 1210-1217.
21. Lee J.-H., Wang L.-C., Lin Y.-T., Yang Y.-H., Lin D.-T., Chiang B.-L. Inverse correlation between CD4⁺ regulatory T-cell population and autoantibody levels in paediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology*, 2006, Vol. 117, pp. 280-286.
22. Liu W., Putnam A.L., Xu-yu Z., Szot G.L., Lee M.R., Zhu S., Gottlieb P.A., Kapranov P., Gingeras T.R., Fazekas de St. Groth B., Clayberger C., Soper D.M., Ziegler S.F., Bluestone J.A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ Treg cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 2006, Vol. 203, no. 7, pp. 1701-1711.
23. Lyssuk E.Yu., Torgashina A.V., Soloviev S.K., Nassonov E.L., Bykovskaia S.N. Reduced Number and Function of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. immune-mediated diseases from theory to therapy. Ed. Shurin M.R., Smolkin Y.S. Springer Science+Business Media. *Advances in experimental medicine and biology*, 2007, Vol. 601, pp. 113-119.
24. Miyara M., Amoura Z., Parizot C., Badoual C., Dorgham K., Trad S., Nochy D., Debre P., Piette J.C., Gorochov G. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*, 2005, Vol. 175, pp. 8392-8400.
25. Morgana M.E., van Bilsen J.H., Bakker A.M., Heemskerk B., Schilham M.W., Hartgers F.C., Elferink B.G., van der Zanden L., de Vries R.R., Huizinga T.W., Ottenhoff T.H., Toes R.E. Expression of FoxP3 mRNA is not confined to CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in humans. *Hum. Immunol.*, 2005, Vol. 66, pp. 3-20.
26. Mottonen M., Heikkinen J., Mustonen L., Isom ki P., Luukkainen R., Lassila O. CD4⁺CD25⁺ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2005, Vol. 140, pp. 360-367.
27. Nistala K., Moncrieffe H., Newton K.R., Varsani H., Hunter P., Wedderburn L.R. Interleukin-17-Producing T Cells Are Enriched in the Joints of Children With Arthritis, but Have a Reciprocal Relationship to Regulatory T Cell Numbers. *Arthritis and Rheumatism*, 2008, Vol. 58, pp. 875-887.
28. Radstake T.R.D.J., van Bon L., Broen J., Wenink M., Santegoets K., Deng Y., Hussaini A., Simms R., Cruikshank W.W., Lafyatis R. Increased frequency and compromised function of t regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFb expression. *PLoS ONE*, 2009, Vol. 4, Issue 6, p. 5981.
29. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunologic tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.*, 1995, Vol. 155, pp. 1151-1164.
30. Sakaguchi S., Takahashi T., Nishizuka Y. Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer. *J. Exp. Med.*, 1982, Vol. 156, pp. 1565-1576.
31. Sfrikakis P.P., Boletis J.N., Lionaki S., Vigklis V., Fragiadaki K.G., Iniotaki A., Moutsopoulos H.M. Remission of proliferative lupus nephritis following B cell depletion therapy is preceded by down-regulation of the T cell costimulatory molecule CD40 ligand. *Arthritis and rheumatism*, 2005, Vol. 52, no. 2, pp. 501-513.

32. Slobodin G., Ahmad M.S., Rosner I., Peri R., Rozenbaum M., Kessel A., Toubi E., Odeh M. Regulatory T cells (CD4⁺CD25^{bright}FoxP3⁺) expansion in systemic sclerosis correlates with disease activity and severity. *Cellular Immunology*, 2010, Vol. 261, pp. 77-80.
33. Stelmaszczyk-Emmel A., Jackowska T., Rutkowska-Sak L., Marusak-Banacka M., Wasik M. Identification, frequency, activation and function of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T cells in children with juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology*, 2012, Vol. 32, pp. 1147-1154.
34. Sugihara S., Izumi Y., Yoshioka T., Yagi H., Tsujimura T., Tarutani O. Autoimmune thyroiditis induced in mice depleted of particular T-cell subset. Requirement of Lyt-1dull L3T4bright normal T cells for the induction of thyroiditis. *J. Immunol.*, 1988, Vol. 141, pp. 105-113.
35. Valencia X., Yarboro C., Illei G., Lipsky P.E. Deficient CD4⁺CD25^{high} T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, pp. 2579-2588.
36. Van Amelsfort J.M., Jacobs K.M., Bijlsma J.W., Floris P.J., Lafeber G., Taams L.S. CD4⁺CD25⁺ Regulatory T cells in rheumatoid arthritis. differences in the presence, phenotype and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis & rheumatism*, 2004, Vol. 50, no. 9, pp. 2775-2785.
37. Zhang Q., Cui F., Fang L., Hong J., Zheng B., Zhang J.Z. TNF α impairs differentiation and function of TGF- β -induced Treg cells in autoimmune diseases through Akt and Smad3 signaling pathway. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2013, Vol. 5, pp. 85-98.
38. Ziegler S.F. FoxP3: Of Mice and Men. *Annu. Rev. Immunol.*, 2006, Vol. 24, pp. 209-226.

Meditsinskaya Immunologiya/ Medical Immunology
2014, Vol. 16, No 4, pp. 353-360

ORIGINAL ARTICLES

REGULATORY T-CELLS IN CHILDREN WITH AUTOIMMUNE DISEASES

Pashnina I.A.

Regional Children's Clinical Hospital №1, Yekaterinburg, Russian Federation

Institute of Immunology and Physiology, Urals Branch of the Russian Academy of Science, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Children and teenagers aged 10-17 years old with juvenile arthritis (n=99), with reactive arthritis (n=21), with systemic sclerosis (n=16), with systemic lupus erythematosus (n=14) and conditionally healthy (n=32) are investigated. It's revealed by the method of flow cytometry that quantity of regulatory T-cells (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low/neg}) in children with juvenile arthritis, with reactive arthritis and with systemic sclerosis was lower than in the control group. The amount of Treg in children with systemic lupus erythematosus was the same to the control level. The decrease of Treg number in most of investigated groups indicates that these cells are involved in the pathogenesis of an autoimmune diseases in children. It's remaining unknown what's the reason of normal Treg content in patients with systemic lupus erythematosus in contrast with other autoimmune diseases. There were positive correlation between the percentage of Treg and the amount of damaged joints in children with reactive arthritis and negative correlation between the amount of Treg and SLEDAI in children with systemic lupus erythematosus. The significant correlations between the numbers of CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD4⁺CD25⁺ and Treg were revealed, so there isn't any reasonability of estimation of CD3⁺ and CD4⁺ cells which are expressed CD25 as separate parameters. (*Med. Immunol.*, 2014, vol. 16, N 4, pp 353-360)

Keywords: regulatory T-cells, juvenile arthritis, autoimmune diseases, children.

Authors:

Pashnina I.A., PhD, chef of Immunological laboratory of Immunological department, Regional Children's Clinical Hospital №1; research worker of Immunopathology laboratory, Institute of Immunology and Physiology, Urals Branch of the Russian Academy of Science, Yekaterinburg, Russian Federation

Address for correspondence:

Pashnina Irina A.

PhD, chef of Immunological laboratory of Immunological department, Regional Children's Clinical Hospital №1; research worker of Immunopathology laboratory, Institute of Immunology and Physiology, Urals Branch of the Russian Academy of Science

620149, Yekaterinburg, Russian Federation, S.Deryabinoy st., 32, Regional Children's Clinical Hospital №1, Immunological department.

Phone: (343) 272-08-22.

E-mail: irina_pashnina@list.ru.

Received 23.12.2013

Accepted 16.01.2014