

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092

Тодосенко Н.М.¹, Юрова К.А.¹, Хазиахматова О.Г.¹, Малинина И.П.², Литвинова Л.С.¹

Влияние дексаметазона на процессы активации и созревания CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ Т-клеток при ревматоидном артрите *in vitro*

¹ ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта», 236016, г. Калининград, Россия, ул. Боткина, д. 3

² ГБУЗ «Областная клиническая больница Калининградской области», 236019, г. Калининград, Россия, ул. Клиническая, д. 74

Цель — исследование влияния глюкокортикоида дексаметазона (Dex) на процессы активации и генерации терминально-дифференцированных эффекторных CD4⁺ Т-лимфоцитов (TEMRA) в культурах CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток в условиях, имитирующих стимуляцию Т-клеточного рецептора *in vitro* в норме и при ревматоидном артрите (РА). **Методика.** Исследовали мононуклеарные лейкоциты (МНК) из венозной гепаринизированной крови 50 пациентов с ревматоидным артритом. Методом проточной цитофлуориметрии проанализировано изменение иммунофенотипа Т-лимфоцитов; иммуноферментным анализом оценена секреция CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетками цитокина IL-2; методом полимеразной цепной реакции определена экспрессия мРНК генов *hTERT*, *U2af114* и *Gfi1* в CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетках. **Результаты.** Полученные данные демонстрируют, что *in vitro* на фоне TCR-активации CD3⁺CD45RO⁺ культур Т-клеток, Dex (в разной степени выраженности) участвует в формировании субпопуляции терминально-дифференцированных эффекторов (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁻CD28⁻ TEMRA), характеризующихся низкой теломеразной активностью, потерей молекул костимуляции (CD28) и активации (CD25) и реэкспрессирующих высокомолекулярную изоформу рецептора CD45 — CD45RA в норме и у больных РА. **Заключение.** Сделано заключение, что популяция CD3⁺CD4⁺CD45RO⁻CD28⁻ лимфоцитов является ключевым участником в патогенезе РА, ускоренно приобретающая свой негативный потенциал на фоне глюкокортикоидной терапии, способствуя прогрессии заболевания, в частности, за счет мощного выброса провоспалительных медиаторов.

Ключевые слова: Т-клетки памяти; ревматоидный артрит; глюкокортикоидный гормон; дексаметазон; активация; дифференцировка; созревание.

Для цитирования: Тодосенко Н.М., Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малинина И.П., Литвинова Л.С. Влияние дексаметазона на процессы активации и созревания CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ Т-клеток при ревматоидном артрите *in vitro*. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(4): 87—97.

DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8528

Для корреспонденции: Литвинова Лариса Сергеевна, доктор мед. наук, зав. лаб. иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, e-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности («дорожной карты») и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/6.7» Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Поступила 22.06.2017

Todosenko N.M.¹, Yurova K.A.¹, Khaziakhmatova O.G.¹, Malinina I.P.², Litvinova L.S.¹

The *in vitro* effect of dexamethasone on maturation and differentiation of CD4⁺CD45RO⁺ T-cells in rheumatoid arthritis

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University, Botkina Str. 3, Kaliningrad 236016, Russia

² Regional Clinical Hospital, Klinicheskaya Str. 74, Kaliningrad 236019, Russia

Aim. To study the effect of dexamethasone (Dex) on activation and generation of terminally differentiated effector CD4⁺ T-lymphocytes (TEMRA) in cultured CD3⁺CD45RO⁺ T cells under the conditions mimicking stimulation of the T-cell receptor *in vitro* as it occurs in health and rheumatoid arthritis (RA). **Methods.** The study was performed on mononuclear leukocytes isolated from heparinized venous blood of 50 patients with rheumatoid arthritis. Changes in the T-lymphocyte immunophenotype were detected using flow cytometry. Secretion of cytokine IL-2 by CD3⁺CD45RO⁺ cells was assessed by ELISA. Expression of *hTERT*, *U2af114*, and *Gfi1* gene mRNA in CD3⁺CD45RO⁺ T cells was measured by polymerase chain reaction. **Results.** During the *in vitro* TCR activation of cultured CD3⁺CD45RO⁺ T cells, Dex participated to a variable extent in formation of a subpopulation of terminally differentiated effectors (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁻CD28⁻ TEMRA), which are characterized by low telomerase activity, loss of costimulation (CD28) and activation (CD25) molecules, and

re-expression of the high molecular weight CD45-CD45RA receptor isoform both in healthy individuals and RA patients. **Conclusion.** The population of CD3⁺CD4⁺CD45RO⁻CD28⁻ lymphocytes is a key participant in the pathogenesis of RA by accelerating their negative impact during the glucocorticoid therapy. This lymphocyte population contributes to RA progression particularly due to the powerful discharge of proinflammatory mediators.

Keywords: memory T-cells; rheumatoid arthritis; glucocorticoid hormone; dexamethasone; activation; differentiation; maturation.

For citation: Todosenko N.M., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Malinina I.P., Litvinova L.S. The *in vitro* effect of dexamethasone on maturation and differentiation of CD4⁺CD45RO⁺ T-cells in rheumatoid arthritis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(4): 87–97. (in Russian). DOI: 10.25557/IGPP.2017.4.8528

For correspondence: Larisa S. Litvinova, Dr. Sci. Med., Head of Laboratory immunology and cells biotechnology of Immanuel Kant Baltic Federal University. E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Conflict of interests. The authors state that there is no conflict of interest.

Acknowledgment. Work is performed under the program of increase of competitiveness («road maps») and subsidies «Organization of scientific research 20.4986.2017/6.7» Immanuel Kant Baltic Federal University.

Information about authors:

Todosenko N.M., <http://orcid.org/0000-0001-7468-4861>

Yurova K.A., <http://orcid.org/0000-0001-6146-3330>

Malinina I.P., <http://orcid.org/0000-0001-7068-8208>

Litvinova L.S., <http://orcid.org/0000-0001-5231-6910>

Received 22.06.2017

Введение

Ревматоидный артрит (РА) — хроническое мультисистемное аутоиммунное заболевание, характеризующееся стойким синовиальным воспалением, приводящим к хрящевой и костной деструкции [1, 2]. Основными участниками патологического процесса при РА являются аутореактивные CD4⁺ Т-лимфоциты [3, 4], продуцирующие провоспалительные факторы [1], имеющие признаки репликативного старения [5] и терминальной дифференцировки [3, 4, 6].

Общепринято, что процессы дифференцировки и созревания Т-клеток тесно ассоциированы с молекулой CD45 — критическим регулятором их функциональной активности [7]. Изоформы молекулы CD45, генерированные путем альтернативного сплайсинга экзонов, отражают процесс дифференцировки Т-клеток во время антигензависимой активации иммунокомпетентных клеток и обладают разными свойствами при взаимодействии с лигандом [8]. Предполагают, что регуляция механизма альтернативного сплайсинга гена *Ptprc* (кодирующего молекулу CD45), индуцированная стимуляцией агентами инфекционной и неинфекционной природы, осуществляется за счет изменения активности генов — *U2af114* и *Gfi1*, что, в конечном итоге, находит отражение в конверсии фенотипа Т-клеток и свидетельствует об процессах их дифференцировки и созревания [9].

Синтетические аналоги глюкокортикоидных гормонов (ГК) занимают лидирующее место среди ле-

карственных препаратов, направленных на снижение воспалительной реакции организма при аутоиммунных заболеваниях, в частности, при РА [10, 11]. Однако долгосрочное воспаление при АИЗ в сочетании с ГК терапией может способствовать развитию системных осложнений и коморбидных патологий, затрудняющих реабилитацию и приводящих к инвалидизации этой категории пациентов, значительно сокращая продолжительность их жизни [12, 13]. Кроме того, частые рецидивы РА на фоне терапии ГК [14] позволили предположить их участие в формировании пула аутореактивных терминально-дифференцированных Т-клеток, усугубляющих течение аутоиммунного процесса. В представленной работе в системе *in vitro* была проведена оценка влияния ГК дексаметазона (Dex) на процессы активации и созревания TCR-стимулированных CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ Т-клеток в норме и при РА.

Методика

Исследование проводилось согласно Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., получено разрешение локального этического комитета при БФУ им. И. Канта №2 от 11 ноября 2014 г. Материалом для исследования служили мононуклеарные лейкоциты (МНК), выделенные из венозной гепаринизированной крови, полученной от 50 больных ревматоидным артритом (РА) (38 жен-

щин и 12 мужчин в возрасте $36,4 \pm 7,2$ года) и 20 условно здоровых доноров — 10 женщин и 10 мужчин в возрасте $35,3 \pm 8,9$ года. Верификация диагноза ревматоидного артрита была выполнена согласно приказу №21 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным ревматоидным артритом» от 13 января от 2006 г. Группы обследованных лиц были сопоставимы по возрастным и гендерным характеристикам, со всеми пациентами было подписано добровольное информационное согласие на исследование.

*Выделение МНК из цельной крови.
Сепарация CD3⁺CD45RO⁺ лимфоцитов*

Выделение мононуклеарных клеток (МНК) проводили методом центрифугирования на фиколл-урографинном градиенте (плотность 1.077 г/см^3 , Schering, Испания и Pharmacia, Швеция) по стандартной методике. Культуры CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток из МНК получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS® (MidiMACS Separator, LS Columns, MiltenyiBiotec, Германия) и моноклональных антител к CD14 и CD45RO с парамагнитными частицами (MicroBeads human, Miltenyi Biotec, Германия), согласно протоколу фирмы-изготовителя. Подсчёт числа клеток в полученных культурах проводили с помощью автоматического счётчика клеток (Countess™ Automated Cell Counter, Invitrogen, США), используя краситель трипановый синий (0,4%, Invitrogen, США). Использовали клеточные культуры, чистота которых после магнитной сепарации составляла в среднем $97,5 \pm 2,12\%$ (фенотип CD3⁺CD45RO⁺CD14⁻CD19⁻) (далее, CD3⁺CD45RO⁺- клетки). Число живых клеток в культурах составляло не менее 98%.

Культивирование CD3⁺CD45RO⁺-лимфоцитов

CD3⁺CD45RO⁺-клетки (10^6 кл/мл) культивировали в 48-луночной планшете в бессывороточной среде Искова (Sigma, США) в присутствии синтетического ГК (Dex) (Ogion Pharma, Россия) в разных концентрациях или без него (контроль) с добавлением антибиотитиновых частиц, конъюгированных с антителами к CD2, CD3, CD28 (T-Cell Activation/Expansion Kit human, Miltenyi Biotec, Германия) (далее Ac/Exp) при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂ в течение 48 ч. Реагент Ac/Exp добавляли в пробы в количестве 5 мкл, которые содержали — $0,5 \cdot 10^6$ анти-биотиновых MACSiBead™ частиц; соотношение клеток и активирующих частиц составило 1:2.

Варианты культивирования: 1) в среде без добавок (контроль); 2) в среде, содержащей Ac/Exp; 3) в среде, содержащей Ac/Exp ($0,5 \cdot 10^6$ MACSiBead™ частиц) и Dex (2; 8; 16; 32; 64 мг). Дозы ГК, используемые в эксперименте были определены, ис-

ходя из математической фармакокинетической двухкамерной модели, где учитывался расчётный объём распределения ГК в организме (т.е. гипотетический объём жидкости организма (Vd), в котором лекарственное вещество распределено равномерно и находится в концентрации, равной концентрации (Q) данного вещества в плазме крови (C_p ; $Vd = Q/C_p$; для ГК величина Vd составляет $\sim 0,35 \text{ л/кг}$). Таким образом, добавляемые нами концентрации Dex на 1 млн культивируемых Т-клеток/мл, составили (10^{-6}M ; $2 \cdot 10^{-6}\text{M}$; $4 \cdot 10^{-6}\text{M}$; $8 \cdot 10^{-6}\text{M}$; $1,6 \cdot 10^{-5}\text{M}$), что соответствует действию Dex в концентрациях 2; 8; 16; 32; 64 мг/мл, распределённых условно в 5 л крови.

Иммуноферментный анализ

Содержание IL-2 в супернатантах культур CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток оценивали методом иммуноферментного анализа с использованием стандартного набора реактивов, согласно протоколу фирмы-производителя («Вектор-Бест», Россия) на приборе Microplate Reader 680 (Bio-Rad, США).

Проточная лазерная цитометрия

Регистрацию жизнеспособности и подсчёт числа клеток в клеточных культурах проводили методом проточной лазерной цитометрии на цитофлюориметре Guava EasyCite Plus (Millipore, США) с использованием реагента Guava ViaCount и одноименной программы (Millipore, США) согласно протоколу производителя. Число клеток, несущих поверхностные маркеры (CD45RO, CD3, CD4, CD28, CD25, CD71) определяли методом проточной лазерной цитометрии с помощью моноклональных антител, конъюгированных с Viablue (CD45RO); аллофикоцианином (APC; CD3) (Miltenyi Biotec, Германия); фикоэритрином (PE; CD4) (Abcam, Cambridge, Великобритания); с конъюгатом PE с цианином (PE-Cy7; CD25, CD71) (e-Bioscience, США) согласно методикам производителя. Регистрацию результатов проводили на проточном цитофлюориметре MACSQuant («Miltenyi Biotec», Германия). Все результаты цитометрического анализа оценивали с помощью программы KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США).

*Выделение общей РНК
из CD3⁺CD45RO⁺-лимфоцитов.
Проведение обратной транскрипции.
Постановка ПЦР-реакции*

После инкубации клеточных культур тотальную РНК выделяли с использованием водного раствора фенола и гуанидин-изотиоцианата (ExtractRNA kit «Евроген», Россия), согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию проводили с исполь-

зованием набора реагентов MMLV RT kit («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. В качестве затравки использовали олигонуклеотидный праймер (oligo(dT23), 20 мкМ) («Бигль», Россия). Для определения уровней относительной экспрессии генов проводили мультиплексный анализ ПЦР с использованием специфичных зондов TaqMan («Бигль», Россия). ПЦР проводили с использованием реагентов qPCRMixHS («Евроген», Россия) и праймеров, в концентрации 10 пМ. В качестве матрицы использовали 4 мкл кДНК, в качестве референсного гена — ген GAPDH.

Предварительную оценку специфичности праймеров, ампликонов и зондов проводили с помощью on-line программы BLAST.

Использовали следующие олигонуклеотидные праймеры:

GFI1_for 5'-TGGAGCAGCACAAAGCC-3'
 GFI1_rev 5'-GACAGTGTGGATGACCTCTTG-3'
 GFI1_probe FAM-5'-CGCAGGAACGGAGCTTTGACTGTA-3'~BHQ-1 (зонд)
 U2af14_for 5'-CTTACAACAAGCCGACATTC-3'
 U2af14_rev 5'-CAAGGTTGTCGCACACATTC-3'
 U2af14_probe FAM-5'-CCAGGAGGTGTTACAGAACTGCA-3'~BHQ-1 (зонд)
 TERT_for 5'-TGACACSTCACSTCACCCACC-3'
 TERT_rev 5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCACC-3'
 TERT_probe FAM-5'-ACCSTGGTCCGAGGTGTCCCTGAG-3'~BHQ-1 (зонд)
 GAPDH_for 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
 GAPDH_rev 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'
 GAPDH_probe HEX-5'-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3'~BHQ-1 (зонд)

ПЦР-реакцию проводили в 3 повторах с использованием амплификатора LightCycler 480 Real-Time PCR («Roche», Швейцария). Температура плавления продукта амплификации определялась индивидуально для каждой пары праймеров, при анализе кривой плавления. Расчеты уровней относительной экспрессии исследуемых генов производили с помощью модифицированной формулы Пфаффа для разных эффективностей амплификации. В нашем случае эффективность реакции (E) была равна 2.

$$\text{Относительный уровень экспрессии} = \frac{\text{Еиссл}^{\Delta\text{СРиссл(контр-иссл)}}}{\text{Ереф}^{\Delta\text{СРреф(контр-иссл)}}$$

Статистическая обработка полученных результатов

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез. При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (Колмогорова—Смирнова). Для каждой выборки вычисляли средневывборочные характеристики: медиану (Me), первый и третий квартили (Q₁, Q₃). Для оценки статистической значимости различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали критерии Вилкоксона (для зависимых выборок) и Манна—Уитни (для независимых выборок). С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный (путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r)) и регрессионный (с вычислением коэффициента регрессии — r²) анализы. Различия считались значимыми при p < 0,05.

Результаты и обсуждение

По окончании срока инкубации (48 ч) в интактных культурах CD3⁺CD45RO⁺ лимфоцитов здоровых доноров число CD4⁺ клеток, несущих поверхностные молекулы CD28, CD25 и CD71, а также содержание IL-2 в супернатантах исследуемых культур статистически значимо превышали аналогичные показатели больных РА (таблица, рис. 1). Содержание CD3⁺CD4⁺CD28⁺CD45RO⁻ лимфоцитов оказалось выше в культурах больных РА.

Добавление в среду культивирования TCR-активатора (Ac/Exp) сопровождалось статистически значимым увеличением числа CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ клеток, несущих маркеры активации (CD25) и пролиферации (CD71), ростом содержания IL-2 в супернатантах исследуемых культур; тогда как количество CD4⁺CD28⁺ лимфоцитов статистически значимо снижалось в обеих группах по сравнению с интактными значениями (таблица). Активация способствовала статистически значимому росту числа CD3⁺CD4⁺CD28⁻CD45RO⁻ клеток в культурах здоровых доноров и больных РА (таблица). Действие TCR-активатора инициировало снижение уровня экспрессии мРНК гена *hTERT* в CD3⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитах (в 3,7 раза в культурах здоровых до-

норов, в 23,5 раза — больных РА) (рис. 1, рис. 3). Анализ транскрипции мРНК генов (*Gfi1* и *U2af114*), регулирующих альтернативный сплайсинг гена *PTPRC* (кодирующего молекулу CD45), позволил выявить увеличение их экспрессии более чем в 2 раза у больных РА, тогда как в культурах здоровых доноров регистрировалось резкое угнетение транскрипции мРНК гена *U2af114* (более чем в 35 раз), а уровень экспрессии мРНК гена *Gfi1* был сопоставим с контрольным (рис. 2, рис. 4).

Сочетанное действие TCR-активатора и Dex приводило к дозозависимому снижению числа CD4⁺ T-кле-

ток, экспрессирующих молекулы — CD25 и CD71 в обеих группах исследования ($p < 0,05$), тогда как содержание CD3⁺CD4⁺CD28⁺CD45RO⁻ T-лимфоцитов значительно увеличивалось в обеих группах (таблица). Следует отметить существенно более высокие значения изучаемого показателя в пробах больных РА, по сравнению с образцами здоровых доноров. Комбинация Ac/Exp и Dex во всем диапазоне концентраций приводила к снижению концентрации IL-2 в супернатантах клеточных культур обеих групп (рис. 1).

Уровень экспрессии мРНК гена каталитической субъединицы теломеразы *hTERT* снижался в культу-

Таблица

Содержание CD4-позитивных клеток (%), экспрессирующих молекулы CD25, CD71, CD28, CD45RO⁻ в культурах CD3⁺CD45RO⁺ лимфоцитов, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, на фоне TCR-стимуляции, в условиях инкубации с разными концентрациями дексаметазона (Dex)

Показатель	Условия культивирования	Здоровые доноры	Больные РА	
CD4 ⁺ CD25 ⁺	Без активации	3,11 (2,99—3,14)	1,95 (1,60—2,70)	
	Ac/Exp	35,22 (30,19—36,29)*	25,13 (15,75—27,52)*	
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	35,92 (30,79—37,02)**	19,75 (13,48—23,08)**
		8	34,87 (29,89—35,93)**	19,48 (12,70—22,18)**
		16	26,68 (22,87—27,49)**	15,58 (9,85—17,54)**
		32	21,35 (18,29—21,99)**	16,37 (10,87—19,87)**
64	22,15 (18,99—22,82)**	12,78 (9,05—15,80)**		
CD4 ⁺ CD71 ⁺	Без активации	4,70 (4,58—5,43)	0,64 (0,35—0,85)	
	Ac/Exp	15,04 (12,45—17,38)*	8,04 (5,42—11,02)*	
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	12,43 (10,29—14,36)**	6,60 (4,02—8,61)**
		8	10,37 (8,59—11,98)**	5,29 (3,06—6,77)**
		16	9,77 (8,08—11,28)**	4,73 (2,61—5,37)**
		32	5,19 (4,29—5,99)**	4,68 (3,14—4,97)**
64	3,39 (2,80—3,91)**	3,60 (2,53—4,47)**		
CD4 ⁺ CD28 ⁺	Без активации	48,53 (46,40—49,32)	33,31 (29,65—37,65)	
	Ac/Exp	41,98 (41,3—42,10)*	31,24 (26,65—36,65)	
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	41,74 (39,23—43,23)	30,01 (24,87—33,60)
		8	42,25 (39,98—44,38)	28,88 (23,98—31,87)
		16	38,20 (37,22—38,42)**	25,59 (22,90—29,80)
		32	31,20 (30,29—31,62)**	21,52 (18,00—24,70)**
64	26,14 (25,43—26,40)**	13,39 (12,30—14,98)**		
CD4 ⁺ CD45RO ⁻	Без активации	2,50 (2,07—3,09)	5,59 (4,46—6,82)	
	Ac/Exp	6,48 (5,96—7,15)*	8,70 (8,37—8,75)*	
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	6,92 (6,46—7,32)	9,87 (9,56—10,04)**
		8	7,15 (6,63—7,75)	11,54 (11,18—12,25)**
		16	7,95 (7,44—8,50)**	14,15 (13,62—14,98)**
		32	9,13 (8,91—9,55)**	16,26 (15,54—16,93)**
64	10,75 (9,60—12,31)**	19,25 (17,57—20,73)**		

Примечание. Данные представлены в виде медианы, в скобках первый и третий квартили. * $p < 0,05$ — в сравнении с T-клетками, культивированными без активирующими частиц; ** $p < 0,05$ — в сравнении с T-клетками, культивированными с активирующими частицами без Dex

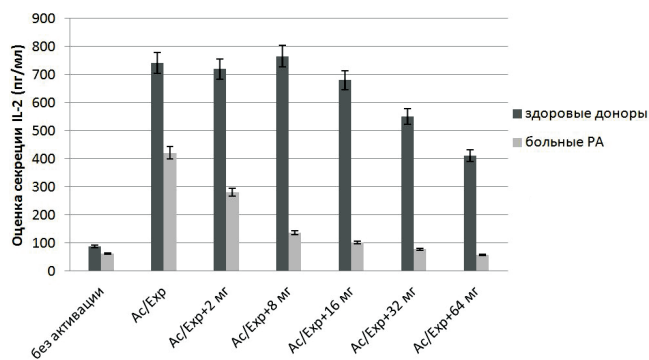


Рис. 1. Изменение секреции IL-2 (пг/мл) в культурах CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитов, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, на фоне TCR-стимуляции, в условиях инкубации с разными концентрациями дексаметазона (Dex).

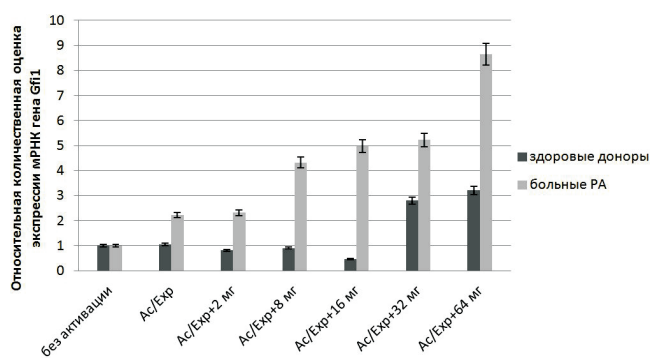


Рис. 2. Уровень относительной экспрессии мРНК гена *Gfi1* в культурах CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитов, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, на фоне TCR-стимуляции, в условиях инкубации с разными концентрациями дексаметазона (Dex).

рах здоровых доноров и больных РА, тогда как уровень транскрипции мРНК генов *Gfi1* и *U2af114*, напротив, возрастал с увеличением действующей концентрации Dex (рис. 2—4). Изменения носили однонаправленный характер, но имели разную степень выраженности.

Общепринято, что процессы клеточного гомеостаза Т-лимфоцитов оценивают по изменению экспрессии поверхностных молекул активации, костимуляции, пролиферации и апоптоза, а также продукции медиаторов, отражающих каскад реакций, направленных на изменение функционального статуса лимфоцитов в результате активации Т-клеточного рецептора (TCR) [15]. TCR/CD28-стимуляция опосредует вступление покоящихся Т-клеток в G₁-фазу клеточного цикла, для которой характерна активация системы IL-2-IL-2Ra за счет связывания транскрипционных факторов (NFAT, NF-KB и AP-1) в CD28-регулирующем элементе и смежном NF-IL-2B AP-1-сайте в промоторе гена IL-2 [16—18], тогда как появление рецептора к трансферрину (CD71/TfR1) на мембране Т-лимфоцита обеспечивает транспорт в активированную клетку ионов железа и свидетельствует об индукции процесса пролиферации, менее зависимого от аутокринного воздействия IL-2 [19, 20].

В связи с вышесказанным, реакция CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ культур клеток (обеих групп) на активатор была вполне закономерной [16, 21, 22] и сопровождалась увеличением числа CD4⁺ Т-лимфоцитов, экспрессирующих поверхностные молекулы активации (CD25) и пролиферации (CD71), снижением содержания CD4⁺CD28⁺ Т-клеток, а также ростом продукции Т-клетками IL-2 (таблица). В свою очередь, индуцированное TCR-активатором снижение уровня относительной экспрессии мРНК

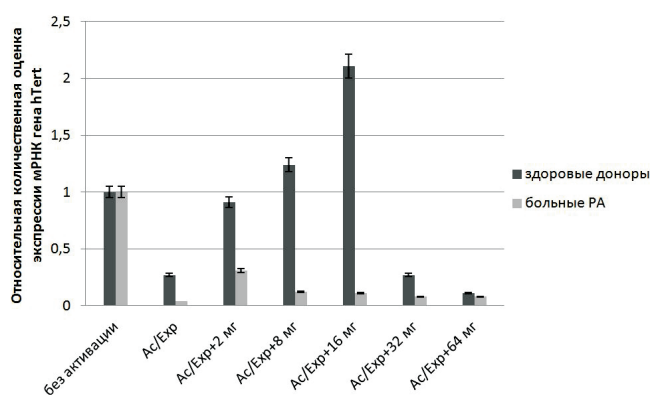


Рис. 3. Уровень относительной экспрессии мРНК гена *hTert* в культурах CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитов, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, на фоне TCR-стимуляции, в условиях инкубации с разными концентрациями дексаметазона (Dex).

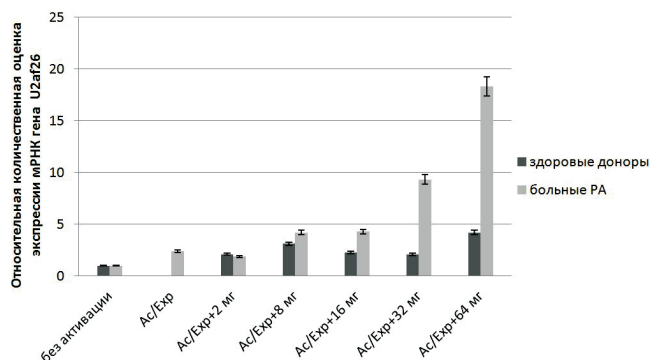


Рис. 4. Уровень относительной экспрессии мРНК гена *U2af26* в культурах CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитов, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, на фоне TCR-стимуляции, в условиях инкубации с разными концентрациями дексаметазона (Dex).

гена каталитической субъединицы теломеразы (*hTERT*) в Т-клетках подтверждает роль стойкой/хронической стимуляции в подавлении активности фермента теломеразы [23], способствуя, тем самым укорочению длины теломер и завершая репликативный потенциал антиген-специфических Т-клеток [24]. Более выраженное снижение изучаемого показателя в пробах больных РА (в 23,5 раза по сравнению с интактными), обусловлено, вероятно, «поломкой» в теломерном механизме, приводящем к изменению функции Т-клеток и преждевременной эрозии теломер при РА [25].

В свою очередь, выявленное нами уменьшение содержания $CD3^+CD4^+CD28^+$ лимфоцитов может свидетельствовать об участии TCR-активации в созревании и дифференцировке $CD4^+CD45RO^+$ клеток в эффекторы, в том числе терминально-дифференцированные, реэкспрессирующие высокомолекулярную изоформу рецептора CD45 — CD45RA (T_{EMRA}). Последние отличаются низкой теломеразной активностью, способностью продуцировать провоспалительные молекулы (в частности, $TNF\alpha$), высокой экспрессией поверхностного маркера CD57, а также ростом содержания перфорина и гранзима А внутри клетки [26]. Как уже упоминалось ранее, различные изоформы молекулы CD45, генерируемые в результате альтернативного сплайсинга, обуславливают активность Т-клеток во время иммунного ответа [27, 28]. В свою очередь, соотношение вариантов общелейкоцитарного рецептора CD45 определяется антагонистическими взаимодействиями факторов: сплайсинга *U2AF26* (*U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1-like 4*, *U2af1l4*) и транскрипции *Gfi1* (*growth factor independent*) [1]. Предполагая, что активация может оказывать влияние на процессы созревания и дифференцировки $CD4^+CD45RO^+$ Т-клеток, мы оценили взаимосвязь между изменением уровней экспрессии мРНК генов *U2af1l4* и *Gfi1* и фенотипическими маркерами созревания Т-клеток, индуцированных ТCR-активатором.

Согласно полученным результатам, культивирование $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток в присутствии активатора, сопровождалось повышением уровня экспрессии гена *Gfi1* (способствует формированию высокомолекулярной изоформы — CD45RA) в Т-лимфоцитах в обеих исследуемых группах, по сравнению с интактными проблемами (рис. 1). Интересно, что активатор значимо угнетал экспрессию мРНК гена *U2af1l4* (способствует образованию низкомолекулярных изоформ рецептора CD45RO) в Т-клетках здоровых доноров (в 35,43 раза); напротив, в культурах, полученных у больных РА, данный показатель возрос (в 2,2 раза) по отношению к пробам без активатора (рис. 2). Инкубация с активатором, как и

ожидалось, приводила к повышению числа $CD4^+CD45RO^+CD28^-$ Т-лимфоцитах в $CD3^+CD45RO^+$ культурах здоровых доноров и больных РА (таблица). Корреляционный анализ позволил выявить позитивные ассоциации между числом $CD4^+CD45RO^+CD28^-$ Т-клеток и уровнем экспрессии мРНК гена *Gfi1* в TCR-активированных пробах обеих групп ($r = 0,347$ и $r = 0,560$, $p < 0,05$ у здоровых доноров и больных РА соответственно), негативные между содержанием $CD4^+CD28^+$ Т-клеток и экспрессией гена *Gfi1* в Т-клетках только в пробах больных РА ($r = -0,874$, $p < 0,05$). Интересно, что нами также были обнаружены отрицательные ассоциации между уровнем экспрессии мРНК гена *hTERT* и *Gfi1* в Т-клетках, в пробах контроля и больных РА, а также экспрессией гена *hTERT* и числом $CD4^+CD45RO^+CD28^-$ Т-клеток у больных РА. Выявленные нами изменения исследуемых показателей, а также обнаруженные взаимосвязи могут свидетельствовать о генерации терминально-дифференцированных эффекторов ($CD3^+CD4^+CD28^-CD45RO$), реэкспрессирующих молекулу CD45RA на фоне стимуляции Т-клеточного рецептора в норме и при РА, в системе *in vitro* (таблица, рис. 2, рис. 3).

Не менее интересные результаты нами были получены при культивировании TCR-активированных $CD3^+CD45RO^+$ Т-клеток с синтетическим ГК — дексаметазоном. Обладая мощным противовоспалительным потенциалом, ГК оказывают комплексное воздействие на клетки иммунной системы: блокируют высвобождение молекул воспаления, оказывают влияние на пролиферативную, миграторную и функциональную активность Т-лимфоцитов модулируют их апоптотическую гибель [29, 30].

Сочетанное действие Т-клеточного активатора и Дек сопровождалось дозозависимым снижением числа лимфоцитов, экспрессирующих молекулу костимуляции CD28 ($r^2 = -0,901$, $p < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r^2 = -0,910$, $p < 0,05$ — в культурах больных РА), маркеры активации CD25 ($r^2 = -0,887$, $p < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r^2 = -0,852$, $p < 0,05$ — в культурах больных РА) и пролиферации CD71 ($r^2 = -0,945$, $p < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r^2 = -0,959$, $p < 0,05$ — в культурах больных РА), а также продукции IL-2 в обеих исследуемых группах ($r^2 = -0,835$, $p < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r^2 = -0,946$, $p < 0,05$ — в культурах больных РА), что согласуется с данными литературы, и в целом, характеризует супрессивное действие ГК на клетки иммунной системы [31]. Так, ГК ингибируют транскрипцию и снижают стабильность мРНК гена IL-2 [32], а также препятствуют образованию димерных

комплексов (NFAT+AP-1) и предотвращают их взаимодействие с промоторными областями гена IL-2 [33]. Очевидно, что снижение продукции IL-2 способствует супрессии IL-2-зависимых процессов активации Т-лимфоцитов, что подтверждено обнаруженными нами положительными ассоциациями между содержанием IL-2 и числом CD4⁺CD28⁺ клеток в CD3⁺CD45RO⁺ культурах ($r = 0,794$, $p < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r = 0,921$, $p < 0,05$ — в культурах больных РА) и содержанием CD4⁺CD25⁺ лимфоцитов ($r = 0,901$, $p < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r = 0,900$, $p < 0,05$ — в культурах больных РА), а также уровнем IL-2 и числом CD4⁺CD71⁺ клеток ($r = 0,894$, $p < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r = 0,900$, $p < 0,05$ — в культурах больных РА) во всем спектре действующих концентраций Dex в сочетании с анти-CD2/CD3/CD28-частицами.

Как уже упоминалось ранее, Т-клетки в процессе репликативного старения, ассоциированного с непрерывной TCR-стимуляцией (вирусной или антигенной) или в условиях длительного провоспалительного цитокинового микроокружения, постепенно утрачивают экспрессию молекулы коактивации CD28 [34—36]. Логично, что снижение числа Т-клеток, экспрессирующих CD28, приводит к ингибированию последовательных процессов активации и пролиферации. Вышесказанное подтверждают выявленные нами ассоциации между содержанием CD4⁺CD28⁻ и CD4⁺CD25⁺ Т-клеток в CD3⁺CD45RO⁺ культурах ($r = -0,794$, $p < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r = -0,804$, $p < 0,05$ — в культурах больных РА); CD4⁺CD28⁻ и CD4⁺CD71⁺ ($r = -0,731$, $p < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r = -0,704$, $p < 0,05$ — в культурах больных РА); CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD71⁺ ($r = 0,892$, $p < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r = 0,471$, $p < 0,05$ — в культурах больных РА) при действии Dex (во всем диапазоне концентраций) на фоне TCR-стимуляции. Согласно данным научной периодики, снижение числа CD3⁺CD28⁺, индуцированное хронической активацией, отражает процессы образования популяции аутореактивных CD3⁺CD4⁺CD28⁻ лимфоцитов, способных к немедленной реализации эффекторных функций [34], которые отличаются высоким провоспалительным потенциалом и короткими теломерами [26].

Добавление Dex в культуры TCR-активированных Т-клеток способствовало повышению уровня относительной экспрессии мРНК гена *Gfi1*, продукт которого отвечает за формирование высокомолекулярных изоформ рецептора — CD45RA, в пробах здоровых доноров ($r^2 = 0,563$, $p < 0,05$) и больных РА ($r^2 = 0,873$, $p < 0,05$). Выявленные изменения

в обеих группах носили дозозависимый характер. Обнаруженное нами повышение числа CD3⁺CD4⁺CD45RO⁻ лимфоцитов в TCR-активированных культурах здоровых доноров ($r^2 = 0,954$, $p < 0,05$) и больных РА ($r^2 = 0,975$, $p < 0,05$), ассоциированное с уровнем экспрессии мРНК гена *Gfi1* в Т-клетках ($r = 0,892$ и $r = 0,892$, $p < 0,05$ соответственно) при действии Dex подтверждает предположение о роли продукта гена *Gfi1* в процессах альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*, кодирующего общелейкоцитарный рецептор — CD45.

Интересно, что Dex также способствовал относительно равномерному повышению уровня экспрессии гена *U2af114* (оказывающему противоположное *Gfi1* действие на альтернативный сплайсинг гена *Ptprc*) в Т-клетках здоровых доноров и дозозависимому росту исследуемого показателя в пробах больных РА ($r^2 = 0,680$, $p < 0,05$). Мы предполагаем, что высокая экспрессия гена *U2af114* в CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетках, способствует сохранению / поддержанию экспрессии низкомолекулярной формы рецептора — CD45RO Т-лимфоцитами при действии ГК, на фоне стимуляции Т-клеточного рецептора.

Вместе с тем, обнаруженное нами снижение транскрипции мРНК гена *hTERT* ($r^2 = -0,976$, $p < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r^2 = -0,976$, $p < 0,05$ — в культурах больных РА) наряду с уменьшением содержания CD4⁺CD28⁺ лимфоцитов, в ответ на сочетанное действие Т-клеточного активатора и Dex, а также выявленные корреляционные взаимосвязи между CD4⁺CD28⁻CD45RO⁻ и CD4⁺CD28⁺ ($r = -0,728$; $p < 0,05$ — в культурах здоровых доноров, $r = -0,690$; $p < 0,05$ — в культурах больных РА), CD4⁺CD28⁻CD45RO⁻ и *hTERT* ($r = -0,891$; $p < 0,05$ — в культурах больных РА), CD4⁺CD28⁺ и *hTERT* ($r = 0,94$; $p < 0,05$ — в культурах больных РА) также подтверждают участие ГК, в частности Dex, в созревании CD4⁺CD45RO⁺ клеток в T_{EMRA} эффекторы в норме и при РА.

Заключение

В целом, анализируя данные литературы и полученные нами результаты, следует резюмировать, что постоянная аутоантигенная стимуляция Т-лимфоцитов при РА способствует значительному снижению экспрессии гена *hTERT* и как следствие, эрозии теломер [10], накоплению терминально-дифференцированных CD4⁺CD28⁻CD45RA⁺ Т-клеток [24], приобретающих устойчивость к апоптозу и конкурирующих с вновь образованными лимфоцитами [37]. Проведенное нами исследование убедительно доказывает, что в системе *in vitro* ГК (Dex), на фоне TCR-акти-

вазии, способствуют созреванию и дифференцировке Т-клеток в популяцию аутореактивных терминальных эффекторов (Т_{ЕМРА}), которые характеризуются потерей костимулирующей молекулы CD28, реэкспрессией высокомолекулярной изоформы молекулы CD45 — CD45RA, а также низкой теломеразной активностью. Мы предполагаем, что популяция CD3⁺CD4⁺CD45RO⁻CD28⁻ Т-клеток является ключевым участником в патогенезе РА, ускоренно приобретающая свой негативный потенциал на фоне ГК терапии, способствуя прогрессии заболевания, в частности, за счет мощного выброса провоспалительных факторов.

Список литературы

1. Luterek-Puszynska K., Malinowski D., Paradowska-Gorycka A., Safranow K., Pawlik A. CD28, CTLA-4 and CCL5 gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2017; 36(5): 1129-1135.
2. Mateen S., Zafar A., Moin S., Khan A.Q., Zubair S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta.* 2016; 455: 161-171.
3. VanderBorghet A., Geusens P., Raus J., Stinissen P. The autoimmune pathogenesis of rheumatoid arthritis: role of autoreactive T cells and new immunotherapies. *Semin Arthritis Rheum.* 2001; 31(3): 160-175.
4. Spreafico R., Rossetti M., Whitaker J.W., Wang W., Lovell D.J., Albani S. Epipolymorphisms associated with the clinical outcome of autoimmune arthritis affect CD4⁺ T cell activation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113(48): 13845-13850.
5. Thewissen M., Linsen L., Somers V., Geusens P., Raus J., Stinissen P. Premature immunosenescence in rheumatoid arthritis and multiple sclerosis patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1051: 255-262.
6. Тодосенко Н.М., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Малинина И.П., Литвинова Л.С. Влияние метилпреднизолона на процессы активации CD4⁺CD45RO⁺ Т-клеток при ревматоидном артрите (in vitro). *Цитология.* 2017; 59 (6): 421-427.
7. Heyd F., ten Dam G., Moroy T. Auxiliary splice factor U2AF26 and transcription factor Gfi1 cooperate directly in regulating CD45 alternative splicing. *Nat. Immunol.* 2006; 7 (8): 859-867.
8. Butte M.J., Lee S.J., Jesneck J., Keir M.E., Haining W.N., Sharpe A.H. CD28 costimulation regulates genome-wide effects on alternative splicing. *PLoS ONE.* 2012; 7 (6): e40032.
9. Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Сохоневич Н.А., Гончаров А.Г., Литвинова Л.С. Альтернативный сплайсинг молекулы CD45 в механизмах молекулярно-генетического контроля дифференцировки Т-клеток. *Российский иммунологический журнал.* 2015; 9 (1): 186-193.
10. Baschant U., Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2010; 120 (2-3): 69-75.
11. Gutsol A.A., Sokhnevich N.A., Yurova K.A., Khaziahmatova O.G., Shupletsova V.V., Litvinova L.S. Dose-dependent effects of dexamethasone on functional activity of T-lymphocytes with different grades of differentiation. *Molecular Biology.* 2015; 49 (1): 130-137.
12. Jeong H., Baek S.Y., Kim S.W., Eun Y.H., Kim I.Y., Kim H. et al. Comorbidities of rheumatoid arthritis: Results from the Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *PLoS One.* 2017; 12 (4): e0176260.
13. Anderson A.E., Swan D.J., Wong O.Y., Buck M., Eltherington O., Harry R.A. et al. Tolerogenic dendritic cells generated with dexamethasone and vitamin D3 regulate rheumatoid arthritis CD4⁺ T cells partly via transforming growth factor-β1. *Clin Exp Immunol.* 2017; 187 (1): 113-123.
14. Сытыбалдиев А.М. Лечение ревматической полимиалгии. *Современная ревматология.* 2013; 1: 66-72.
15. Motamedi M., Xu L., Elahi S. Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers. *J Immunol Methods.* 2016; 437: 43-52.
16. Kim H.P., Imbert J., Leonard W.J. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006; 17 (5): 349-366.
17. Miller J., Baker C., Cook K., Graf B., Sanchez-Lockhart M., Sharp K. et al. Two pathways of costimulation through CD28. *Immunol Res.* 2009; 45 (2-3): 159-172.
18. Beyersdorf N., Kerkau T., Hunig T. CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *Immunotargets Ther.* 2015; 4: 111-122.
19. Marsee D.K., Pinkus G.S., Yu H. CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol.* 2010; 134 (3): 429-435.
20. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплетцова В.В. и др. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов. *Медицинская иммунология.* 2014; 16 (1): 7-26.
21. Stauber D.J., Debler E.W., Horton P.A., Smith K.A., Wilson I.A. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103 (8): 2788-2793.
22. Goudy K., Aydin D., Barzaghi F., Gambineri E., Vignoli M., Ciullini Mannurita S. et al. Human IL2RA null mutation mediates immunodeficiency with lymphoproliferation and autoimmunity. *Clin Immunol.* 2013; 146 (3): 248-261.
23. Horikawa I., Barrett J.C. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis.* 2003; 24 (7): 1167-1176.
24. Weyand C.M., Fujii H., Shao L., Goronzy J.J. Rejuvenating the immune system in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2009; 5 (10): 583-588.
25. Koetz K., Bryl E., Spickschen K., O'Fallon W.M., Goronzy J.J., Weyand C.M. T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97 (16): 9203-9208.
26. Matsuki F., Saegusa J., Miyamoto Y., Misaki K., Kumagai S., Morinobu A. CD45RA-Foxp3(high) activated/effector regulatory T cells in the CCR7 + CD45RA-CD27 + CD28+ central memory subset are decreased in peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 438 (4): 778-783.
27. Ярилин А.А. *Иммунология.* М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010.

28. Yurova K.A., Sokhnevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Litvinova L.S. Cytokine-mediated of expression of Gfi1 and U2afll4 genes by activated T-cells with various differentiation status in vitro. *Biochemistry (Moscow) Supplement series B: Biomedical Chemistry*. 2015; 9 (2): 165-172.

29. Makrygiannakis D., Revu S., Neregard P., af Klint E., Snir O., Grundtman C. et al. Monocytes are essential for inhibition of synovial T-cell glucocorticoid-mediated apoptosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008; 10 (6): R147.

30. Davis T.E., Kis-Toth K., Szanto A., Tsokos G.C. Glucocorticoids suppress T cell function by up-regulating microRNA-98. *Arthritis Rheum*. 2013; 65 (7): 1882-1890.

31. Baschant U., Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010; 120 (2-3): 69-75.

32. Liberman A.C., Refojo D., Druker J., Toscano M., Rein T., Holsboer F. et al. The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. *Faseb J*. 2007; 21 (4): 1177-1188.

33. Elshabrawy H.A., Chen Z., Volin M.V., Ravella S., Virupannavar S., Shahrara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis*. 2015; 18 (4): 433-448.

34. Pieper J., Johansson S., Snir O., Linton L., Rieck M., Buckner J.H. et al. Peripheral and site-specific CD4 + CD28 null T cells from rheumatoid arthritis patients show distinct characteristics. *Scand J Immunol*. 2014; 79 (2): 149-155.

35. van Leeuwen E.M., Remmerswaal E.B., Vossen M.T., Rowshani A.T., Wertheim-van Dillen P.M., van Lier R.A., ten Berge I.J. Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *Journal of immunology*. 2004, 173(3), 1834-1841.

36. Vallejo A.N., Schirmer M., Weyand C.M., Goronzy J.J. Clonality and longevity of CD4+CD28null T cells are associated with defects in apoptotic pathways. *Journal of immunology*. 2000; 165 (11): 6301-6307.

37. Fujii H., Shao L., Colmegna I., Goronzy J.J., Weyand C.M. Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106 (11): 4360-4365.

References

1. Luterek-Puszynska K., Malinowski D., Paradowska-Gorycka A., Safranow K., Pawlik A. CD28, CTLA-4 and CCL5 gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2017; 36(5): 1129-35.

2. Mateen S., Zafar A., Moin S., Khan A.Q., Zubair S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*. 2016; 455: 161-71.

3. VanderBorghet A., Geusens P., Raus J., Stinissen P. The autoimmune pathogenesis of rheumatoid arthritis: role of autoreactive T cells and new immunotherapies. *Semin Arthritis Rheum*. 2001; 31(3): 160-75.

4. Spreafico R., Rossetti M., Whitaker J.W., Wang W., Lovell D.J., Albani S. Epipolymorphisms associated with the clinical outcome of autoimmune arthritis affect CD4+ T cell activation pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113(48): 13845-50.

5. Thewissen M., Linsen L., Somers V., Geusens P., Raus J., Stinissen P. Premature immunosenescence in rheumatoid arthritis and multiple sclerosis patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1051: 255-62.

6. Todosenko N.M., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Malinina I.P., Litvinova L.S. Effects of methylprednisolone on process of activation and proliferation of memory CD4 + T cells of patients with rheumatoid arthritis (in vitro). *Tsitologiya*. 2017; 59 (6): 421-7. (in Russian)

7. Heyd F., ten Dam G., Moroy T. Auxiliary splice factor U2AF26 and transcription factor Gfi1 cooperate directly in regulating CD45 alternative splicing. *Nat. Immunol*. 2006; 7 (8): 859-67.

8. Butte M.J., Lee S.J., Jesneck J., Keir M.E., Haining W.N., Sharpe A.H. CD28 costimulation regulates genome-wide effects on alternative splicing. *PLoS ONE*. 2012; 7 (6): e40032.

9. Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Sokhnevich N.A., Goncharov A.G., Litvinova L.S. Alternative splicing CD45 in the process of differentiation of T memory cells. *Russiykiy Immunologicheskij zhurnal*. 2015; 9 (4): 186-93. (in Russian)

10. Baschant U., Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2010; 120 (2-3): 69-75.

11. Gutsol A.A., Sokhnevich N.A., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Litvinova L.S. Dose-dependent effects of dexamethasone on functional activity of T-lymphocytes with different grades of differentiation. *Molecular Biology*. 2015; 49 (1): 130-7.

12. Jeong H., Baek S.Y., Kim S.W., Eun Y.H., Kim I.Y., Kim H. et al. Comorbidities of rheumatoid arthritis: Results from the Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *PLoS One*. 2017; 12 (4): e0176260.

13. Anderson A.E., Swan D.J., Wong O.Y., Buck M., Eltherington O., Harry R.A. et al. Tolerogenic dendritic cells generated with dexamethasone and vitamin D3 regulate rheumatoid arthritis CD4⁺T cells partly via transforming growth factor-β1. *Clin Exp Immunol*. 2017; 187 (1): 113-23.

14. Satybaldyev A.M. Treatment for rheumatic polymyalgia. *Sovremennaya revmatologiya*. 2013; 1: 66-72. (in Russian)

15. Motamedi M., Xu L., Elahi S. Correlation of transferrin receptor (CD71) with Ki67 expression on stimulated human and mouse T cells: The kinetics of expression of T cell activation markers. *J Immunol Methods*. 2016; 437: 43-52.

16. Kim H.P., Imbert J., Leonard W.J. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006; 17 (5): 349-66.

17. Miller J., Baker C., Cook K., Graf B., Sanchez-Lockhart M., Sharp K. et al. Two pathways of costimulation through CD28. *Immunol Res*. 2009; 45 (2-3): 159-72.

18. Beyersdorf N., Kerkau T., Hunig T. CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective. *Immunotargets Ther*. 2015; 4: 111-22.

19. Marsee D.K., Pinkus G.S., Yu H. CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol*. 2010; 134 (3): 429-35.

20. Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sokhnevich N.A., Kofanova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V. et al. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Med Immun*. 2014; 16 (1): 7-26. (in Russian)

21. Stauber D.J., Debler E.W., Horton P.A., Smith K.A., Wilson I.A. Crystal structure of the IL-2 signaling complex:

paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103 (8): 2788-93.

22. Goudy K., Aydin D., Barzaghi F., Gambineri E., Vignoli M., Ciullini Mannurita S. et al. Human IL2RA null mutation mediates immunodeficiency with lymphoproliferation and autoimmunity. *Clin Immunol*. 2013; 146 (3): 248-61.

23. Horikawa I., Barrett J.C. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis*. 2003; 24 (7): 1167-76.

24. Weyand C.M., Fujii H., Shao L., Goronzy J.J. Rejuvenating the immune system in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2009; 5 (10): 583-8.

25. Koetz K., Bryl E., Spickschen K., O'Fallon W.M., Goronzy J.J., Weyand C.M. T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97 (16): 9203-8.

26. Matsuki F., Saegusa J., Miyamoto Y., Misaki K., Kumagai S., Morinobu A. CD45RA-Foxp3(high) activated/effector regulatory T cells in the CCR7 + CD45RA-CD27 + CD28+central memory subset are decreased in peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 438 (4): 778-83.

27. Yarilin A.A. *Immunology. [Immunologiya]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)

28. Yurova K.A., Sokhonevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Litvinova L.S. Cytokine-mediated of expression of Gfi1 and U2af14 genes by activated T-cells with various differentiation status in vitro. *Biochemistry (Moscow) Supplement series B: Biomedical Chemistry*. 2015; 9 (2): 165-72.

29. Makrygiannakis D., Revu S., Neregard P., af Klint E., Snir O., Grundtman C. et al. Monocytes are essential for inhibition of synovial T-cell glucocorticoid-mediated

apoptosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008; 10 (6): R147.

30. Davis T.E., Kis-Toth K., Szanto A., Tsokos G.C. Glucocorticoids suppress T cell function by up-regulating microRNA-98. *Arthritis Rheum*. 2013; 65 (7): 1882-90.

31. Baschant U., Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010; 120 (2-3): 69-75.

32. Liberman A.C., Refojo D., Druker J., Toscano M., Rein T., Holsboer F. et al. The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. *Faseb J*. 2007; 21 (4): 1177-88.

33. Elshabrawy H.A., Chen Z., Volin M.V., Ravella S., Virupannavar S., Shahrara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis*. 2015; 18 (4): 433-48.

34. Pieper J., Johansson S., Snir O., Linton L., Rieck M., Buckner J.H. et al. Peripheral and site-specific CD4 + CD28 null T cells from rheumatoid arthritis patients show distinct characteristics. *Scand J Immunol*. 2014; 79 (2): 149-55.

35. van Leeuwen E.M., Remmerswaal E.B., Vossen M.T., Rowshani A.T., Wertheim-van Dillen P.M., van Lier R.A., ten Berge I.J. Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *Journal of immunology*. 2004, 173(3), 1834-41.

36. Vallejo A.N., Schirmer M., Weyand C.M., Goronzy J.J. Clonality and longevity of CD4+CD28null T cells are associated with defects in apoptotic pathways. *Journal of immunology*. 2000; 165 (11): 6301-7.

37. Fujii H., Shao L., Colmegna I., Goronzy J.J., Weyand C.M. Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106 (11): 4360-5.

Сведения об авторах:

Тодосенко Наталья Михайловна, мл. науч. сотр., ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта», e-mail: tod_89@mail.ru;

Юрова Кристина Алексеевна, канд. мед. наук, науч. сотр. ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта», e-mail: kristina_kofanova@mail.ru;

Хазиахматова Ольга Геннадьевна, канд. биол. наук, науч. сотр. ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта», e-mail: hazik36@mail.ru;

Малинина Ирина Петровна, Заслуженный врач РФ, врач высшей категории, главный внештатный ревматолог МЗ Калининградской области, зав. отделением ревматологии ГБУЗ «Областная клиническая больница Калининградской области», e-mail: malinina@list.ru;

Литвинова Лариса Сергеевна, доктор мед. наук, зав. лаб., ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта», e-mail: larisalitinova@yandex.ru