

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НК-КЛЕТОК И NKG2D-ПОЗИТИВНЫХ ЛИМФОЦИТОВ КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ КРОНА

Шуленина Е.А.^{1,2}, Абакушина Е.В.³, Лысюк Е.Ю.^{1,4,5}

¹ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный Медицинский университет имени И.М. Сеченова», Москва, Россия

³ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁴ ФГБУН «Институт биологии гена» РАН, Москва, Россия

⁵ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Открытие полиморфизмов генов NOD2, ATG16L1, IRGM, ассоциированных с нарушением процесса аутофагии у пациентов с болезнью Крона (БК), позволило по-новому взглянуть на вопрос этиологии данного заболевания. На фоне генетически обусловленной дисфункции макрофагов все более вероятной представляется важная роль патогенов в индукции БК, что подтверждается данными о широком распространении среди пациентов с БК случаев хронической инфекции внутриклеточными патогенами *Mycobacterium paratuberculosis* и *E. coli*. Потеря макрофагами способности уничтожать внутриклеточные микроорганизмы ведет к хронической инфекции с повышенной продукцией провоспалительных цитокинов и повреждением собственных тканей.

Контроль за работой макрофагов осуществляют НК-клетки: связывание NKG2D-рецептора с молекулами MICA на поверхности макрофагов приводит к лизису последних. Передача сигнала через рецептор NKG2D может повысить функциональную активность НК в отношении дефектных макрофагов и, таким образом, усиливать их элиминацию. Кроме того, ввиду повышенной численности NKG2D⁺ лимфоцитов у пациентов с БК, использование растворимых форм MICA может изменить соотношение между цитотоксическими и регуляторными лимфоцитами в пользу последних и снизить продукцию провоспалительных цитокинов, которые поддерживают в кишечнике состояние хронического воспаления. В данном обзоре рассмотрены перспективные направления в изучении и терапии БК.

Ключевые слова: NKG2D, НК, MICA, макрофаги, аутоиммунитет, болезнь Крона

Адрес для переписки:

Шуленина Екатерина Алексеевна
ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ
117133, Россия, Москва, ул. Теплый стан, 21, корп. 1/232.
Тел.: 8 (915) 216-09-46.
E-mail: Ekaterina.shu.moscow@gmail.com

Address for correspondence:

Shuleniina Ekaterina A.
Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology
117133, Russian Federation, Moscow, Teply Stan 21, bldg 1, apt 232.
Phone: 7 (915) 216-09-46.
E-mail: Ekaterina.shu.moscow@gmail.com

Образец цитирования:

Е.А. Шуленина, Е.В. Абакушина, Е.Ю. Лысюк
«Перспективы использования НК-клеток и NKG2D-позитивных лимфоцитов как мишень для терапии болезни Крона» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 461–470. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-461-470

© Шуленина Е.А. и соавт., 2017

For citation:

E.A. Shuleniina, E.V. Abakushina, E.Yu. Lyssuk “Potential usage of NK cells and NKG2D-positive lymphocytes as targets in therapy of Crohn’s disease”, *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 461–470. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-461-470

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-461-470

POTENTIAL USAGE OF NK CELLS AND NKG2D-POSITIVE LYMPHOCYTES AS TARGETS IN THERAPY OF CROHN'S DISEASE

Shulenina E.A.^{a, b}, Abakushina E.V.^c, Lyssuk E.Yu.^{a, d, e}

^a Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

^b First Moscow I.M. Sechenov State Medical University, Moscow, Russian Federation

^c A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, Branch of National Medical Research Radiological Centre, Moscow, Russian Federation

^d Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^e Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Autoimmune mechanisms of Crohn's disease have been extensively studied, following discovery of NOD2, ATG16L1, IRGM genetic polymorphisms associated with Crohn's disease. These genes play an important role in innate immune response against intracellular bacteria, in particular, due to their direct participation in a process known as autophagy. Due to mentioned genetic traits, the CD patients are more susceptible to chronic infections caused by intracellular pathogens. Recent studies revealed high incidence of intracellular infection with *Mycobacterium paratuberculosis* and *E. coli* in the intestinal tissue specimens and blood macrophages obtained from the CD patients. Such a chronic, non-resolved infection may disturb the immune cell properties and affect the balance of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, thus resulting into chronic inflammation, a hallmark of Crohn disease.

In this view, potential usage of NK cells aimed for influencing macrophage activity represents a new approach in understanding and treatment of autoimmune pathologies. The macrophages are controlled by NK cells. I.e., binding of NKG2D receptor to the MICA molecules on the macrophage surface causes their lysis.

A signal transfer via NKG2D receptor may increase functional activity of NK against defective macrophages, and hence, promote their elimination. Moreover, in Crohn patients with usually elevated NKG2D⁺ lymphocyte numbers, a stimulation of NKG2D⁺ cells by soluble MICA (sMICA) may influence the balance between cytotoxic and regulatory lymphocytes, and reduce pro-inflammatory cytokine secretion, in order to attenuate chronic inflammation of gut tissues. This review is aimed to discuss a role of NKG2D⁺ NK cells in Crohn's disease pathology and their possible implications for management and treatment of this disorder.

Keywords: NKG2D, NK, MICA, macrophages, autoimmunity, Crohn's disease

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-35-00105) и гранта Президента НШ-9069.2016.4.

Дисфункция макрофагов в патогенезе болезни Крона

В 1977 г. М. Ward впервые предложил идею о «диспепсии макрофагов» как об этиологическом факторе болезни Крона (БК). Однако в силу отсутствия достаточной доказательной базы в пользу этой теории на первый план вышли инфекционная и аутоиммунная теории происхождения БК. Природа БК до сих пор остается не раскрытой, и в настоящее время появляется все больше данных, указывающих на первостепенную роль функциональной несостоятельности макрофагов. Возвращение к идее, предложенной еще в 70-х гг., связано в первую очередь

с результатами крупномасштабного исследования Genome-Wide Association study, которое выявило связь между БК и полиморфизмами в генах аутофагии *ATG16L1* and *IRGM*. Продукты этих генов выполняют ключевую роль в защите организма от внутриклеточных микроорганизмов. Предполагается, что нарушение работы этих генов в клетках моноцитарного ряда значительно снижает сопротивляемость организма к инфекциям, вызванным внутриклеточными микроорганизмами. В результате бактерии получают возможность длительно персистировать в клетках организма-хозяина. Внутриклеточная инфекция вызывает повышенную секрецию провоспалительных цитокинов, а зараженные клетки, в свою очередь, теряют способность адекватно отвечать на сигналы от окружающих тканей. Это приводит к снижению восприимчивости клетки к молеку-

лам-индукторам апоптоза. На этом фоне воспаление приобретает хронический характер, что в итоге ведет к извращению работы иммунной системы. Одними из основных регуляторов работы макрофагов в организме являются NK-клетки. Они усиливают литическую функцию инфицированных внутриклеточными патогенами макрофагов, а при наличии необратимых изменений запускают апоптоз клеток. Взгляд на основные вопросы этиопатогенеза БК с позиции несостоятельности аутофагии макрофагов открывает новые перспективы в изучении и терапии БК.

Полиморфизмы в генах аутофагии *NOD2*, *ATG16L1*, *IRGM* ***NOD2***

Относится к группе внутриклеточных паттерн-распознающих рецепторов, которые обеспечивают первую линию иммунной защиты при попадании патогена внутрь клетки. *NOD2* экспрессируется преимущественно в тканях кишечника: энтероцитах, клетках Панета и резидентных макрофагах собственной пластинки слизистой оболочки [25, 34]. *NOD2* непосредственно участвует в распознавании и элиминации внутриклеточных патогенов. У 40% пациентов с БК в странах Западной Европы были найдены полиморфизмы гена *NOD2*, ассоциированные с дефектом распознавания компонента бактериальной стенки — мурамилдипептида (MDP) [15, 22]. В норме образование комплекса *NOD2* с MDP в антиген-презентирующих клетках запускает процесс аутофагии [14]. Помимо этого, захваченные бактериальные антигены вместе с комплексом молекул МНС II транспортируются на мембрану клетки и служат для активации CD4⁺Т-лимфоцитов.

Потеря функциональной активности *NOD2* приводит к значительным дефектам в работе врожденного иммунитета. При этом нарушаются процессы презентации антигена [14], продукции антимикробных пептидов [43], уничтожения внутриклеточных патогенов [26]. Мутации в гене *NOD2* также ассоциированы с развитием синдрома Блау — системного заболевания, протекающего с образованием множественных гранулем [31].

***ATG16L1*^{T300A}**

Найденный полиморфизм T300A (Thr300Ala) в гене *ATG16L1* (autophagy related 16-like 1) ассоциирован исключительно с БК. Предполагается, что этот ген участвует в индукции аутофагии в клетках кишечника. Под влиянием *NOD2* внутри клетки происходит транспорт белка *ATG16L1* к месту прохождения бактерии через мембрану

клетки и запускается процесс ксенофагии [40]. У мышей с аналогичной мутацией гена *ATG16L1* нарушается внутриклеточный сигнальный путь и, как следствие, иммунный ответ в отношении внутриклеточных бактерий [27]. *ATG16L1* нарушает внутриклеточную передачу провоспалительных сигналов от рецепторов *NOD1* и *NOD2*.

IRGM

Процесс аутофагии также обеспечивает ген *IRGM*. Полиморфизм в гене *IRGM* стойко ассоциирован с БК [30]. Мышиный ген *Irgm*, аналог человеческого *IRGM*, обеспечивает защиту клетки от внутриклеточных бактерий. Дефекты *Irgm1* приводят к снижению сопротивляемости животных к инфекциям, вызванным возбудителями *Toxoplasma gondii*, *Salmonella typhimurium*, *L. monocytogenes*, and *Mycobacterium tuberculosis* [20, 29]. «Выключение» гена *IRGM* в человеческих макрофагах также приводит к нарушению иммунного ответа в отношении внутриклеточных микроорганизмов [38]. Другой известный дефект работы гена *IRGM* связан с его прочным соединением с микроРНК, что приводит к пониженной экспрессии *IRGM*. Этот вариант обнаруживается у пациентов с БК, ассоциированной с инфекцией адгезивно-инвазивной *E. coli* (AIEC) [32].

Инфекционные агенты как этиологические факторы БК

Дефекты в генах аутофагии сами по себе не являются этиологическим фактором болезни Крона, однако их наличие значительно снижает способность макрофагов элиминировать внутриклеточные патогены, что значительно увеличивает вероятность развития хронической внутриклеточной инфекции. В данном контексте представляется весьма вероятным наличие связи между генетическим дефектом системы врожденного иммунитета и инфекции, развивающейся на ее фоне, которые вместе приводят к развитию характерной клинической картины БК.

Идея об инфекционной природе БК была высказана в конце прошлого века и вплоть до настоящего времени ее придерживаются многие исследователи по всему миру. В качестве этиологического фактора развития БК были предложены различные микроорганизмы, однако наибольшее количество данных было получено в отношении *Mycobacterium paratuberculosis* и *E. coli*. Общими для данных микроорганизмов свойствами являются: алиментарный путь заражения, способность проникать через эпителиальный барьер кишечной стенки и инфицировать макрофаги с развитием длительно персистирующей инфек-

ции. Для этих микроорганизмов была доказана способность уменьшать экспрессию сигнальных молекул с целью защиты инфицированных макрофагов хозяина от цитотоксического действия НК-клеток и Т-лимфоцитов.

E. coli

В популяционных исследованиях было выявлено, что в кишечной флоре пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) чаще, чем у пациентов из контрольной группы, обнаруживаются штаммы адгезивно-инвазивной *E. coli* (АИЕС) [13, 26]. Ассоциированные с БК штаммы АИЕС проявляют адгезивные свойства по отношению к щеточной каемке энтероцитов тонкой кишки пациентов с БК, но не здоровых индивидумов [9]. АИЕС способны проникать через мукозальный барьер стенки кишечника, выживать в макрофагах и индуцировать секрецию TNF α и формирование гранул [6].

Mycobacterium avium paratuberculosis

Гипотеза об этиологической роли микобактерии при БК впервые была высказана 20 лет назад на основании сходства клинической картины поражения тонкого кишечника при БК и болезни Джона (John's diseases) у крупного рогатого скота [28]. Болезнь Джона представляет собой гранулематозный илеит с доказанным этиологическим агентом — *Mycobacterium avium paratuberculosis* (МАР).

Различным группам ученых удавалось выделить микобактерии из тканей пациентов с БК. Количество доказательств в пользу роли МАР продолжает расти. В результате масштабного геномного исследования более 75 тысяч образцов были получены данные о значительном проценте общих генов, ассоциированных с повышенной восприимчивостью к микобактерии и риском развития БК [23].

В этом году группа исследователей из Новой Зеландии под руководством John Atiken заявили о том, что им удалось выделить из макрофагов пациентов с БК L-форму *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Согласно неопубликованным данным, культуры микобактерий без клеточной стенки были получены более чем у 98% пациентов с БК. Новые доказательства в пользу этиологической роли МАР были также получены группой ученых из Лондона под руководством John Hermon-Taylor: для диагностики МАР инфекции у пациентов с БК использовали МАР специфические флуоресцентные антитела. В клиническом исследовании REDHill BIO (International study NCT01951326) было изучено влияние антибио-

тиков, активных в отношении МАР, на частоту и продолжительность ремиссий заболевания у пациентов с БК. Первые результаты были опубликованы в 2013 году, согласно которым полная ремиссия заболевания наблюдалась в 44-88,5% случаев. В похожем исследовании с участием пациентов детского возраста сообщалось о ремиссии заболевания у 80% пациентов.

Важной характеристикой МАР и адгезивно-инвазивной *E. coli* является способность образовывать гранулемы — один из ключевых диагностических критериев БК. Наличие гранул во многих случаях позволяет отличить БК от неспецифического язвенного колита (НЯК). Гранулемы обнаруживают у 50-87% в стенке кишечника и у 20-38% в лимфатических узлах пациентов с БК [21].

Опубликованное в 2014 году исследование взаимоотношений между макрофагами и микобактериями позволяет по-новому взглянуть на патогенетическое значение гранул. Ранее считалось, что гранулемы представляют собой клеточный вал, отграничивающий патогенный микроорганизм от окружающих тканей, тем самым предотвращает диссеминацию возбудителя. Однако было показано, что первоначальные гранулемы, возникающие при микобактериальной инфекции, напротив, способствуют распространению возбудителя по организму [39]. Иницирующим сигналом для формирования гранул служит продукт гена *ESX1*, который представлен в консервативном участке всех патогенных микобактерий. Другие продукты бактерий стимулируют работу металлопротеаз в окружающих эпителиальных клетках, которые привлекают макрофаги в очаг инфекции. Инфицированные в первичном очаге макрофаги затем покидают первичные гранулемы и циркулируют по организму, создавая поздние гранулемы, или вторичные очаги, в других тканях.

Роль молекул МІСА в регуляции работы макрофагов и лимфоцитов

Макрофаги-резиденты кишечной стенки играют значительную роль в поддержании гомеостаза в кишечнике: удаляют фрагменты клеток, подвергшихся апоптозу, стимулируют репарацию энтероцитов и за счет продукции IL-10 поддерживают функциональную активность регуляторных Т-клеток [33].

Работа макрофагов регулируется механизмами врожденного иммунитета. Среди клеток, участвующих в регуляции работы макрофагов и дендритных клеток, особое место занимают

НК-клетки, которые способны напрямую или с помощью цитокинов усиливать фагоцитирующие и антигенпрезентирующие способности макрофагов. Одним из механизмов, направленных на предотвращение избыточного иммунного ответа, является регуляция незрелых или патологически измененных макрофагов с помощью NKG2D-MICA сигнала [37]. NKG2D относится к поверхностным активирующим рецепторам и преимущественно экспрессируется на НК-клетках, CD8⁺ и CD4⁺Т-лимфоцитах и некоторых антигенпрезентирующих клетках. Основным лигандом NKG2D являются «стресс-индуцированные» молекулы MICA и MICB, экспрессия которых увеличивается в клетках при повреждении, вирусной инфекции, опухолевой трансформации [1, 16].

Взаимодействие NKG2D рецептора на НК-клетках с MICA на клетках моноцитарного ряда приводит к лизису последних [11, 37]. Экспрессия MICA на макрофагах увеличивается под влиянием провоспалительных цитокинов, в частности IL-10. Данный механизм лежит в основе защиты от аутоиммунных реакций, которые могут возникать в результате презентации макрофагами антигенов собственных тканей организма и активации аутореактивных клонов лимфоцитов. У пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, к которым относятся болезнь Крона и неспецифический язвенный колит, были найдены полиморфизмы в гене *IL-10*, ассоциированные с пониженной продукцией IL-10. При низком уровне IL-10 значительно снижается эффективность НК-опосредованной элиминации макрофагов, что в условиях нарушенной аутофагии приводит к персистенции внутриклеточных патогенов в организме и развитию хронического воспалительного процесса. Активация НК-клеток и восстановление работы системы иммунологического надзора является перспективным направлением в лечении БК. На это указывают данные о положительном эффекте IL-10 в качестве терапии индуцированного колита у животных.

Стимуляция рецептора NKG2D на НК-клетках и Т-лимфоцитах у пациентов с БК может оказать комплексный терапевтический эффект, обусловленный одновременным воздействием на несколько звеньев патогенеза БК. В первую очередь эти эффекты связаны с прямым влиянием MICA на функциональную активность клеток иммунной системы.

В организме MICA существует в двух формах: поверхностной и растворимой (sMICA). Благо-

даря этой особенности молекулы MICA могут оказывать множественные эффекты в организме. Увеличение экспрессии поверхностной MICA происходит в условиях клеточного стресса, при инфекции или злокачественной трансформации клетки. Повышение поверхностной плотности MICA способствует активации иммунной системы и приводит к элиминации поврежденных клеток. В трансформированных клетках экспрессия MICA возрастает на ранних этапах опухолевого роста. Это служит активирующим сигналом для цитотоксических NKG2D⁺CD8⁺Т-лимфоцитов и НК-клеток, стимулирует их пролиферацию и повышает цитотоксические свойства [10, 43]. У пациентов с низким уровнем экспрессии MICA опухолевыми клетками прогностические показатели заболевания (продолжительность ремиссии, общая продолжительность жизни) достоверно уступают таковым у пациентов с сохраненной экспрессией MICA [45]. Однако по мере прогрессии опухолевого заболевания в периферической крови могут быть обнаружены молекулы sMICA. Появление sMICA связано со способностью опухолевых клеток «сбрасывать» с поверхности молекулы MICA.

В отличие от поверхностной формы MICA повышение уровня sMICA препятствует адекватной работе иммунной системы и является одним из механизмов ускользания опухоли от иммунного ответа [1, 2, 3, 36]. За счет уменьшения плотности стрессовых молекул опухолевые клетки становятся менее заметными для иммунной системы. Более того, при избыточной стимуляции NKG2D рецептора молекулами sMICA запускается эндцитоз и внутриклеточная деградация рецептора. Добавление sMICA к выделенным от пациентов цитотоксическим NKG2D⁺CD4⁺Т-лимфоцитам способно остановить пролиферацию клеток. Это ведет к потере функциональной активности цитотоксических лимфоцитов и НК-клеток [3, 17, 41]. Данный феномен позволяет опухолевым клеткам оказывать дистанционное ингибиторное действие на лимфоциты и НК-клетки, позволяя, таким образом, ускользать опухоли от иммунного надзора [1, 5].

Параллельно с подавлением активности цитотоксических клеток sMICA стимулирует пролиферацию регуляторных Т-лимфоцитов: пропорционально увеличению уровня sMICA растет численность регуляторных NKG2D⁺CD4⁺Т-лимфоцитов. Клинически данные изменения проявляются в виде отсутствия ответа пациента на клеточную адоптивную терапию [4]. Данный механизм подавления иммунной системы

был также описан для некоторых аутоиммунных заболеваний: у пациентов с ювенильной формой системной красной волчанки (СКВ) из периферической крови были выделены NKG2D⁺CD4⁺ лимфоциты, проявляющие регуляторные свойства [18]. Высокие значения численности NKG2D⁺CD4⁺T-лимфоцитов были ассоциированы с ремиссией заболевания. У пациентов с ювенильной формой СКВ количество NKG2D⁺CD4⁺T-лимфоцитов было прямо пропорционально плазменному уровню sMICA [8], что указывает на роль NKG2D стимулирующего сигнала в активации регуляторных лимфоцитов.

Значительное увеличение популяции NKG2D⁺T-лимфоцитов было обнаружено в периферической крови и ткани кишечника у животных с экспериментальным колитом, вызванным пересадкой донорских лимфоцитов [24]. Продemonстрирована прямая корреляция между уровнем экспрессии NKG2D рецептора и повышением продукции провоспалительных цитокинов IFN γ , IL-17 и TNF α . Введение животным анти-NKG2D антител приводило к уменьшению воспаления и улучшению течения заболевания в случаях умеренной формы колита. Клинические данные подтверждают результаты экспериментальных работ, свидетельствующих в пользу роли NKG2D⁺CD4⁺T-лимфоцитов в патогенезе воспаления при БК. У пациентов с БК отмечается увеличение экспрессии MICA на энтероцитах [7], а в выделенных из собственной пластинки слизистой оболочки NKG2D⁺CD4⁺ лимфоцитах происходит увеличение уровня экспрессии NKG2D [24]. Помимо этого, наблюдается заметное увеличение популяции NKG2D⁺CD4⁺T-лимфоцитов в крови и слизистой кишечника [12].

Протективное действие NK-клеток на стенку кишечника было доказано в модели CD4⁺T-индуцированного колита. У животных без NK-клеток пересадка CD4⁺T-лимфоцитов донора заканчивалась развитием тяжелой формы колита по сравнению с отсутствием признаков воспаления у животных с нормальным содержанием NK-клеток. Вероятно, что в основе данной иммунной реакции лежит активация NK-клеток, которые оказывают супрессивное действие на цитотоксические CD4⁺T-лимфоциты. Протективные свойства NK-клеток также были продемонстрированы в модели DSS-индуцированного колита [19].

Мишенью для sMICA также могут являться Th17-лимфоциты. Увеличение популяции Th17-лимфоцитов считается одной из причин развития воспаления при БК. Th17 являются

источником цитокинов IL-17A, IL-17F, IL-22, TNF α , которые известны своей способностью потенцировать развитие аутоиммунных реакций. Созревание Th17-лимфоцитов происходит под действием IL-17. Терапия, направленная на уменьшение активности Th17-клеток, была признана эффективной в лечении псориаза, ревматоидного артрита, анкилозирующего спондилита. Эффективность использования комбинированной терапии антителами к IL-17A и IL-17F была продемонстрирована на животной модели T-индуцированного колита [42]. Считается, что основным источником IL-17 являются NKG2D⁺CD4⁺T-лимфоциты. Уровень экспрессии IL-17 в NKG2D⁺CD4⁺T-лимфоцитах, выделенных из собственной пластинки пациентов с БК, значительно превышает таковой у здоровых доноров. Увеличение экспрессии IL-17 происходит пропорционально увеличению экспрессии NKG2D [35]. Снижение функциональной активности NKG2D⁺CD4⁺T-лимфоцитов при помощи MICA-опосредованного сигналинга может уменьшить продукцию IL-17 и предотвратить созревание и пролиферацию Th17-лимфоцитов.

Заключение

С каждым годом появляется все больше данных, указывающих на этиологическую роль патогенных микроорганизмов в патогенезе БК. В биоптате кишечной стенки пациентов с БК с большей частотой, чем у здоровых индивидов обнаруживают *Mycobacterium paratuberculosis* и патогенные штаммы *E. coli*. По последним данным, L-форма *M. paratuberculosis* определяется в крови у подавляющего большинства пациентов с БК. Эти патогены объединяет способность инфицировать клетки макрофагального ряда и нарушать программу апоптоза, что способствует длительной персистенции патогенов в организме. Сильным аргументом в пользу данной теории стало открытие ассоциированных с развитием БК полиморфизмов генов *NOD2*, *ATG16L1*, *IRGM*, функция которых непосредственно связана с защитой от внутриклеточных микробов. В клинической практике гастроэнтерологи давно отметили эффективность лечения пациентов с БК антибиотиками широкого спектра действия, к которым чувствительны нетуберкулезные микобактерии.

В связи с этим чрезвычайно актуальным становится изучение особенностей врожденного иммунитета пациентов с БК, в частности NK-клеток, осуществляющих контроль за работой

лимфоидных клеток, включая клетки моноцитарного ряда. Особый интерес представляет активирующий рецептор NKG2D, который находится на мембране НК-клеток и Т-лимфоцитов. К лигандам NKG2D относятся стресс-индуцированные молекулы MICA, экспрессия которых усиливается в клетках, подвергшихся инфицированию или злокачественной трансформации. Повышение экспрессии MICA активирует НК-клетки и способствует элиминации измененных клеток. У пациентов с БК отмечается увеличение общего числа NKG2D⁺ лимфоцитов. Стимуляция NKG2D рецептора НК-клеток и Т-лимфоцитов у пациентов с БК может оказать комплексный терапевтический эффект, обуслов-

ленный одновременным воздействием на несколько звеньев патогенеза БК. MICA-NKG2D сигнал в НК-клетках может повысить их функциональную активность в отношении дефектных макрофагов. Использование sMICA также может способствовать росту популяции регуляторных Т-лимфоцитов и, таким образом, снизить продукцию провоспалительных цитокинов, которые в кишечнике поддерживают состояние хронического воспаления.

Таким образом, использование MICA-опосредованного сигналинга с целью модификации функциональной активности НК-клеток и Т-лимфоцитов представляет новый перспективный подход в изучении и терапии БК.

Список литературы / References

1. Абакушина Е.В. Роль стресс-индуцированных молекул MICA/B в противоопухолевом иммунном ответе // Злокачественные опухоли, 2012. Т. 2, № 2. С. 103-105. [Abakushina E.V. The role of stress-induced molecules MICA/B in the anti-tumor immune response. *Zlokachestvennyye opukholi = Malignant Tumors*, 2012, Vol. 2, no. 2, pp. 103-105. (In Russ.)]
2. Абакушина Е.В., Абакушин Д.Н., Неприна Г.С., Пасова И.А., Бердов Б.А., Клинова А.В., Коваленко Е.И., Каприн А.Д. Повышение уровня цитокинов и стресс-индуцированных молекул MICA в сыворотке крови больных раком желудка и толстой кишки // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 1. С. 63-67. [Abakushina E.V., Abakushin D.N., Neprina G.S., Pasova I.A., Berdov B.A., Klinkova A.V., Kovalenko E.I., Kaprin A.D. Elevation of serum levels of cytokines and stress-induced molecules MICA in patients with gastric and colon cancer. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, Vol. 14, no. 1, pp. 63-67. (In Russ.)]
3. Абакушина Е.В., Клинова А.В., Каневский Л.М., Коваленко Е.И. Увеличение растворимых форм стресс-индуцированных молекул MICA при онкологических заболеваниях // Молекулярная медицина, 2014. № 3. С. 34-38. [Abakushina E.V., Klinkova A.V., Kanevskiy L.M., Kovalenko E.I. Elevation of serum levels of soluble forms of stress-induced molecules MICA in oncological diseases. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2014, no. 3, pp. 34-38. (In Russ.)]
4. Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Пасова И.А., Козлов И.Г., Каприн А.Д. Критерии отбора пациентов больных меланомой для иммунотерапии активированными лимфоцитами на основе исходного уровня стресс-индуцированных молекул MICA // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, Специальный выпуск, № 3. С. 153-154. [Abakushina E.V., Marizina J.V., Pasova I.A., Kozlov I.G., Kaprin A.D. Selection criteria for patients with melanoma for immunotherapy by activated lymphocytes based on initial level of stress-induced molecules MICA. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 3s, pp. 153-154. (In Russ.)]
5. Закеева И.Р., Бережной А.Е., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Ларин С.С. Ингибиторные рецепторы лимфоцитов и их роль в противоопухолевом иммунитете // Вопросы онкологии, 2007. Т. 2, № 53. С. 140-149. [Zakeyeva I.R., Berezhnoy A.E., Gnuchev N.V., Georgiev G.P. Lymphocyte inhibitory receptors functioning in anti-tumor immune response. *Voprosy onkologii = Problems of Oncology*, 2007, Vol. 2, no. 53, pp. 140-149. (In Russ.)]
6. Agus A., Massier S., Darfeuille-Michaud A., Billard E., Barnich N. Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease: opening up new therapeutic strategies. *Biomed Res Int.*, 2014, Art. ID 567929, 16 p.
7. Allez M., Tieng V., Nakazawa A., Treton X., Pacault V., Dulphy N., Caillat-Zucman S., Paul P., Gornet J.M., Douay C., Ravet S., Tamouza R., Charron D., Lémann M., Mayer L., Toubert A. CD4⁺NKG2D⁺ T cells in Crohn's disease mediate inflammatory and cytotoxic responses through MICA interactions. *Gastroenterology*, 2007, Vol. 132, no. 7, pp. 2346-2358.
8. Baecher-Allan C., Hafler D.A. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol. Rev.*, 2006, Vol. 212, pp. 203-216.

9. Barnich N., Carvalho F.A., Glasser A.L., Darcha C., Jantschke P., Allez M., Peeters H., Bommelaer G., Desreumaux P., Colombel J.F., Darfeuille-Michaud A. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J. Clin. Invest.*, 2007, Vol. 117, no. 6, pp. 1566-1574.
10. Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J.H., Lanier L.L., Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 1999, Vol. 285, no. 5428, pp. 727-729.
11. Braunstein J., Qiao L., Autschbach F., Schürmann G., Meuer S. T cells of the human intestinal lamina propria are high producers of interleukin-10. *Gut*, 1997, Vol. 41, no. 2, pp. 215-220.
12. Camus M., Esses S., Pariente B., Le Bourhis L., Douay C., Chardin V., Mocan I., Benlagha K., Clave E., Toubert A., Mayer L., Allez M. Oligoclonal expansions of mucosal T cells in Crohn's disease predominate in NKG2D-expressing CD4 T cells. *Mucosal Immunol.*, 2014, Vol. 7, no. 2, pp. 325-334.
13. Conte M., Longhi C., Marazzato M., Conte A.L., Aleandri M., Lepanto M.S., Zagaglia C., Nicoletti M., Aloisi M., Totino V., Palamara A.T., Schippa S. Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features. *BMC Res. Notes*, 2014, Vol. 7, no. 1, p. 748.
14. Cooney R., Baker J., Brain O., Danis B., Pichulik T., Allan P., Ferguson D.J., Campbell B.J., Jewell D., Simmons A. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat. Med.*, 2010, Vol. 16, no. 1, pp. 90-97.
15. Cuthbert A.P., Fisher S.A., Mirza M.M., King K., Hampe J., Croucher P.J., Mascheretti S., Sanderson J., Forbes A., Mansfield J., Schreiber S., Lewis C.M., Mathew C.G. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2002, Vol. 122, no. 4, pp. 867-874.
16. González S., Groh V., Spies T. Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2006, Vol. 298, no. 121-138.
17. Groh V., Smythe K., Dai Z., Spies T. Fas-ligand-mediated paracrine T cell regulation by the receptor NKG2D in tumor immunity. *Nat. Immunol.*, 2006, Vol. 7, no. 7, pp. 755-762.
18. Groh V., Wu J., Yee C., Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*, 2002, Vol. 419, no. 6908, pp. 734-738.
19. Hall L.J., Murphy C.T., Quinlan A., Hurley G., Shanahan F., Nally K., Melgar S. Natural killer cells protect mice from DSS-induced colitis by regulating neutrophil function via the NKG2A receptor. *Mucosal Immunol.*, 2013, Vol. 6, no. 5, pp. 1016-1026.
20. Henry S.C., Daniell X., Indaram M., Whitesides J.F., Sempowski G.D., Howell D., Oliver T., Taylor G.A. Impaired macrophage function underscores susceptibility to Salmonella in mice lacking Irgm1 (LRG-47). *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 10, pp. 6963-6972.
21. Heresbach D., Alexandre J.L., Branger B., Bretagne J.F., Cruchant E., Dabadie A., Dartois-Hoguin M., Girardot P.M., Jouanolle H., Kerneis J., Le Verger J.C., Louvain V., Politis J., Richecoeur M., Robaszekiewicz M., Seyrig J.A. Frequency and significance of granulomas in a cohort of incident cases of Crohn's disease. *Gut*, 2005, Vol. 54, no. 2, pp. 215-222.
22. Inohara N., Ogura Y., Fontalba A., Gutierrez O., Pons F., Crespo J., Fukase K., Inamura S., Kusumoto S., Hashimoto M., Foster S.J., Moran A.P., Fernandez-Luna J.L., Nuñez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278, no. 8, pp. 5509-5512.
23. Jostins L., Ripke S., Weersma R.K., Duerr R.H., McGovern D.P., Hui K.Y., Lee J.C., Schumm L.P., Sharma Y., Anderson C.A., Essers J., Mitrovic M., Ning K., Cleynen I., Theate E., Spain S.L., Raychaudhuri S., Goyette P., Wei Z., Abraham C., Achkar J.P., Ahmad T., Amininejad L., Ananthakrishnan A.N., Andersen V., Andrews J.M., Baidoo L., Balschun T., Bampton P.A., Bitton A., Boucher G., Brand S., Büning C., Cohain A., Cichon S., D'Amato M., De Jong D., Devaney K.L., Dubinsky M., Edwards C., Ellinghaus D., Ferguson L.R., Franchimont D., Fransen K., Gearry R., Georges M., Gieger C., Glas J., Haritunians T., Hart A., Hawkey C., Hedl M., Hu X., Karlsen T.H., Kupcinskis L., Kugathasan S., Latiano A., Laukens D., Lawrance I.C., Lees C.W., Louis E., Mahy G., Mansfield J., Morgan A.R., Mowat C., Newman W., Palmieri O., Ponsioen C.Y., Potocnik U., Prescott N.J., Regueiro M., Rotter J.I., Russell R.K., Sanderson J.D., Sans M., Satsangi J., Schreiber S., Simms L.A., Sventoraityte J., Targan S.R., Taylor K.D., Tremelling M., Verspaget H.W., De Vos M., Wijmenga C., Wilson D.C., Winkelmann J., Xavier R.J., Zeissig S., Zhang B., Zhang C.K., Zhao H., Silverberg M.S., Annese V., Hakonarson H., Brant S.R., Radford-Smith G., Mathew C.G., Rioux J.D., Schadt E.E., Daly M.J., Franke A., Parkes M., Vermeire S., Barrett J.C., Cho J.H. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 2012, Vol. 491, no. 7422, pp. 119-124.

24. Kjellev S., Haase C., Lundsgaard D., Ursø B., Tornehave D., Markholst H. Inhibition of NKG2D receptor function by antibody therapy attenuates transfer-induced colitis in SCID mice. *Eur. J. Immunol.*, 2007, Vol. 37, no. 5, pp. 1397-1406.
25. Kobayashi K.S., Chamaillard M., Ogura Y., Henegariu O., Inohara N., Nuñez G., Flavell R.A. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, 2005, Vol. 307, no. 5710, pp. 731-734.
26. Lapaquette P., Bringer M-A., Darfeuille-Michaud A. Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell Microbiol.*, 2012, Vol. 14, no. 6, pp. 791-807.
27. Lassen K.G., Kuballa P., Conway K.L., Patel K.K., Becker C.E., Peloquin J.M., Villablanca E.J., Norman J.M., Liu T.C., Heath R.J., Becker M.L., Fagbami L., Horn H., Mercer J., Yilmaz O.H., Jaffe J.D., Shamji A.F., Bhan A.K., Carr S.A., Daly M.J., Virgin H.W., Schreiber S.L., Stappenbeck T.S., Xavier R.J. Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2014, Vol. 111, no. 21, pp. 7741-7746.
28. Liverani E., Scaiola E., Cardamone C., Dal Monte P., Belluzzi A. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in the etiology of Crohn's disease, cause or epiphenomenon? *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, no. 36, pp. 13060-13070.
29. MacMicking J.D., Taylor G.A., McKinney J.D. Immune control of tuberculosis by IFN-inducible LRG-47. *Science*, 2003, Vol. 302, no. 5645, pp. 654-659.
30. McCarroll S.A., Kuruvilla F.G., Korn J.M., Cawley S., Nemesh J., Wysoker A., Shapero M.H., de Bakker P.I., Maller J.B., Kirby A., Elliott A.L., Parkin M., Hubbell E., Webster T., Mei R., Veitch J., Collins P.J., Handsaker R., Lincoln S., Nizzari M., Blume J., Jones K.W., Rava R., Daly M.J., Gabriel S.B., Altshuler D. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat. Genet.*, 2008, Vol. 40, no. 10, pp. 1166-1174.
31. Miceli-Richard C., Lesage S., Rybojad M., Prieur A.M., Manouvrier-Hanu S., Häfner R., Chamaillard M., Zouali H., Thomas G., Hugot J.P. CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat. Genet.*, 2001, Vol. 29, no. 1, pp. 19-20.
32. Mimouna S., Bazin M., Mograbi B., Darfeuille-Michaud A., Brest P., Hofman P., Vouret-Craviari V. HIF1A regulates xenophagic degradation of adherent and invasive *Escherichia coli* (AIEC). *Autophagy*, 2014, Vol. 10, no. 12, pp. 2333-2345.
33. Murai M., Turovskaya O., Kim G., Madan R., Karp C.L., Cheroutre H., Kronenberg M. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat. Immunol.*, 2009, Vol. 10, no. 11, pp. 1178-1184.
34. Ogura Y., Lala S., Xin W., Smith E., Dowds T.A., Chen F.F., Zimmermann E., Tretiakova M., Cho J.H., Hart J., Greenson J.K., Keshav S., Nuñez G. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut*, 2003, Vol. 52, no. 11, pp. 1591-1597.
35. Pariente B., Mocan I., Camus M., Dutertre C.A., Ettersperger J., Cattan P., Gornet J.M., Dulphy N., Charron D., Lémann M., Toubert A., Allez M. Activation of the receptor NKG2D leads to production of Th17 cytokines in CD4⁺ T cells of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2011, Vol. 141, no. 1, pp. 217-226.
36. Salih H.R., Rammensee HH-G., Steinle A. Cutting Edge: Down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 8, pp. 4098-4102.
37. Schulz U., Kreutz M., Multhoff G., Stoelcker B., Köhler M., Andreesen R., Holler E. Interleukin-10 promotes NK cell killing of autologous macrophages by stimulating expression of NKG2D ligands. *Scand. J. Immunol.*, 2010, Vol. 72, no. 4, pp. 319-331.
38. Singh S.B., Davis A.S., Taylor G.A., Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science*, 2006, Vol. 313, no. 5792, pp. 1438-1441.
39. Torraca V., Masud S., Spaink H.P., Meijer A.H. Macrophage-pathogen interactions in infectious diseases: new therapeutic insights from the zebrafish host model. *Dis. Models Mech.*, 2014, Vol. 7, no. 7, pp. 785-797.
40. Travassos L.H., Carneiro L.A., Ramjeet M., Hussey S., Kim Y.G., Magalhães J.G., Yuan L., Soares F., Chea E., Le Bourhis L., Boneca I.G., Allaoui A., Jones N.L., Nuñez G., Girardin S.E., Philpott D.J. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, no. 1, pp. 55-62.
41. Waldhauer I., Steinle A. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res.*, 2006, Vol. 66, no. 5, pp. 2520-2526.

42. Wedebye Schmidt E.G., Larsen H.L., Kristensen N.N., Poulsen S.S., Lynge Pedersen A.M., Claesson M.H., Pedersen A.E. TH17 cell induction and effects of IL-17A and IL-17F blockade in experimental colitis. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2013. Vol. 19, no. 8, pp. 1567-1576.
43. Wehkamp J., Salzman N.H., Porter E., Nuding S., Weichenthal M., Petras R.E., Shen B., Schaeffeler E., Schwab M., Linzmeier R., Feathers R.W., Chu H., Lima H., Fellermann K., Ganz T., Stange E.F., Bevins S.L. Reduced Paneth cell – defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2005, Vol. 102, no. 50, pp. 18129-18134.
44. Zhang C., Zhang J., Wei H., Tian Z. Imbalance of NKG2D and its inhibitory counterparts: How does tumor escape from innate immunity? *Int. Immunopharmacol.*, 2005, Vol. 5, no. 7-8, pp. 1099-1111.
45. Zhang J., Xu Z., Zhou X., Zhang H., Yang N., Wu Y., Chen Y., Yang G., Ren T. Loss of expression of MHC class I-related chain A (MICA) is a frequent event and predicts poor survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2014, Vol. 7, no. 6, pp. 3123-3131.

Авторы:

Шуленина Е.А. — лаборант-исследователь лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ; обучающийся ГБОУ ВПО Первый Московский государственный Медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

Абакушина Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Лысюк Е.Ю. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генной терапии Федерального государственного бюджетного учреждения науки ФГБУН «Институт биологии гена» РАН; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии Научно-исследовательского института трансляционной медицины ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Shulenina E.A., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; Student, First Moscow I.M. Sechenov State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abakushina E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, Branch of National Medical Research Radiological Centre, Moscow, Russian Federation

Lyssuk E. Yu., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Gene Therapy, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Oncology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 12.12.2016
Отправлена на доработку 13.12.2016
Принята к печати 26.12.2016

Received 12.12.2016
Revision received 13.12.2016
Accepted 26.12.2016