

## ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

Зафранская М.М.<sup>1,2</sup>, Адамович А.Ю.<sup>1</sup>, Воробей А.В.<sup>1</sup>,  
Старостин А.М.<sup>1</sup>, Нижегородова Д.Б.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup> Международный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

**Резюме.** В последнее время активно изучаются механизмы распознавания и эффекторных реакций звеньев иммунной системы в инициации и поддержании иммуно-медиированного воспаления и повреждения ткани при воспалительных заболеваниях кишечника, к которым относятся болезнь Крона и язвенный колит. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что аномальный иммунный ответ против микроорганизмов кишечной флоры является причиной заболевания у генетически восприимчивых людей. Несмотря на накопившиеся данные об особенностях иммунных нарушений при язвенном колите и болезни Крона, остаются открытыми вопросы вовлечения минорных популяций лимфоцитов и различных функционально активных молекул, которые играют фундаментальную роль в распознавании и инициации иммунного ответа и могут рассматриваться как биомаркеры патологического процесса при воспалительных заболеваниях кишечника. Наибольший интерес представляют популяции Т-лимфоцитов с  $\gamma\delta$ Т-клеточным рецептором, В1-клетки и НКТ-лимфоциты; среди функционально активных молекул рассматриваются TLRs (toll-like receptors), CD89, CD314 и др. Принимая во внимание прогресс в изучении природы распознавания и активации клеток иммунной системы, в работе представлена фенотипическая и функциональная характеристика основных и минорных популяций лимфоцитов периферической крови 25 пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, находившихся на стационарном лечении в хирургическом отделении учреждения здравоохранения «Минская областная клиническая больница» (Республика Беларусь) в период 2018–2020 гг. Выявленные изменения в фенотипе лимфоцитов периферической крови пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника позволяют предположить различный иммунологический профиль, преобладающий в механизмах повреждения при болезни Крона и язвенном колите: у пациентов с болезнью Крона в патогенез заболевания вовлекаются В1-лимфоциты с фенотипом CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>, НК-клетки в сочетании с увеличением CD56<sup>bright</sup> популяции и НК-Т-клетки с провоспалительной/регуляторной направленностью, в то время как при язвенном колите патогенетическую роль в поддержании хронического воспаления играют Т-, В-, НК-лимфоциты с провоспалительным фенотипом и Т-лимфоциты с  $\gamma\delta$  Т-клеточным рецептором. Учитывая функциональную значимость

### Адрес для переписки:

Зафранская Марина Михайловна  
Белорусская медицинская академия  
последипломного образования  
223040, Республика Беларусь, Минская обл.,  
Минский р-он, а-г. Лесной, 31.  
Тел.: +375 (296) 31-25-48.  
E-mail: zafranskaya@gmail.com

### Address for correspondence:

Zafranskaya Marina M.  
Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education  
223040, Republic of Belarus, Minsk Region, Lesnoy  
Village, 31.  
Phone: +375 (296) 31-25-48.  
E-mail: zafranskaya@gmail.com

### Образец цитирования:

М.М. Зафранская, А.Ю. Адамович, А.В. Воробей,  
А.М. Старостин, Д.Б. Нижегородова  
«Фенотипический профиль лимфоидных клеток  
периферической крови пациентов с воспалительными  
заболеваниями кишечника» // Медицинская  
иммунология, 2020. Т. 22, № 6. С. 1131-1140.  
doi: 10.15789/1563-0625-PP0-2080

© Зафранская М.М. и соавт., 2020

### For citation:

M.M. Zafranskaya, H.Yu. Adamovich, A.U. Varabei,  
A.M. Starastin, D.B. Nizheharodava "Phenotypic profile  
of peripheral blood lymphocytes in patients with inflammatory  
bowel diseases", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya  
Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 6, pp. 1131-1140.  
doi: 10.15789/1563-0625-PP0-2080

DOI: 10.15789/1563-0625-PP0-2080

активационных рецепторов, количество TLR4- и CD89-позитивных клеток может использоваться для разработки иммунологических критериев/биомаркеров оценки терапевтической эффективности новых лекарственных средств. Изучение взаимодействия между различными компонентами врожденной и адаптивной иммунной системы откроет новые перспективы в понимании иммунологических нарушений, связанных с хроническим воспалением желудочно-кишечного тракта.

*Ключевые слова:* воспалительные заболевания кишечника, фенотип, лимфоидные клетки

## PHENOTYPIC PROFILE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

Zafranskaya M.M.<sup>a, b</sup>, Adamovich H.Yu.<sup>a</sup>, Varabei A.U.<sup>a</sup>, Starastin A.M.<sup>a</sup>, Nizheharodava D.B.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

<sup>b</sup> International Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

**Abstract.** Mechanisms of recognition and effector responses of immune system upon initiation and maintenance of immune-mediated inflammation and tissue damage in inflammatory bowel diseases, including Crohn's disease and ulcerative colitis (UC), have been actively studied over recent time. Existing evidence suggests these diseases to be caused by abnormal immune response against intestinal flora microorganisms in genetically susceptible individuals. Despite available data on the features of immune disorders in ulcerative colitis and Crohn's disease, there are still many questions about the involved minor lymphocyte subpopulations and contribution of various functionally active molecules, which play a key role in recognition and initiation of the immune response and can be considered biomarkers of a pathological process in inflammatory bowel diseases. The populations of T lymphocytes with  $\gamma\delta$ T cell receptor, B1 cells and NK T lymphocytes are of greatest interest, as well as functionally active TLRs (Toll-like receptors), CD89, CD314, etc. Due to substantial progress in studying the nature of recognition and activation of the immune cells, the paper presents phenotypic and functional characteristics of major and minor subpopulations of peripheral blood lymphocytes observed in 25 patients treated at the Surgery Department of the State Institution "Minsk Regional Clinical Hospital" (Republic of Belarus) from 2018 to 2020. The detected changes in peripheral blood lymphocyte phenotype of inflammatory bowel diseases patients suggest distinct immunological profiles prevailing in the damage mechanisms in Crohn's disease and ulcerative colitis. I.e., in Crohn's disease patients, B1 lymphocytes with CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> and NK cells in combination with increased CD56<sup>bright</sup> population, as well as NK T cells with anti-inflammatory and regulatory activity are involved into genesis of the disease. In ulcerative colitis, T, B, NK lymphocytes with pro-inflammatory phenotype and T lymphocytes with  $\gamma\delta$  T cell receptor may play a pathogenetic role in maintenance of chronic inflammation. With respect to functional significance of activating receptors, the number of TLR4- и CD89-positive cells may be used for developing immunological criteria/biomarkers of therapeutic efficacy of new drugs. Studying interactions between innate and adaptive immunity will open new perspectives in understanding immunological disorders associated with chronic gastrointestinal inflammation.

*Keywords:* inflammatory bowel disease, phenotype, lymphoid cells

## Введение

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), к которым относятся болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК), представляют собой гетерогенную группу хронических аутоим-

мунных заболеваний, при которых поражается желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) в результате дисрегуляции врожденного и адаптивного иммунного ответа по отношению к компонентам нормальной микрофлоры на фоне генетической предрасположенности и воздействия факторов

окружающей среды. Актуальность проблемы ВЗК подтверждается отсутствием специфического эффективного лечения. Для разработки и использования новых лекарственных средств селективного действия требуется детальное исследование патогенеза ВЗК [1].

Иммунный ответ является эффекторным звеном, опосредующим воспаление, и понимание его функции для ЖКТ и его нарушение при БК и ЯК являются основой, позволяющей раскрыть механизмы хронического кишечного воспаления [10]. Изменение активационного статуса лимфоидных клеток и реакции миелоидных клеток на цитокиновые и микробные стимулы приводит к формированию абберантного иммунного ответа, который играет решающую роль в развитии ВЗК [2].

Несмотря на накопившиеся данные об особенностях иммунных нарушений при ЯБ и БК, остаются открытыми вопросы вовлечения минорных популяций лимфоцитов и роли экспрессии различных функционально активных молекул, которые играют фундаментальную роль в распознавании и инициации иммунного ответа и могут рассматриваться как биомаркеры патологического процесса при ВЗК. Наибольший интерес представляют популяции Т-лимфоцитов с  $\gamma\delta$ Т-клеточным рецептором, В1-клетки и NKT-лимфоциты; среди функционально активных молекул рассматриваются TLRs (toll-like receptors), CD89, CD314 и др. [8, 12, 23, 28].

Принимая во внимание прогресс в изучении природы распознавания и активации клеток иммунной системы, цель исследования заключалась в изучении фенотипа и функционального состояния по экспрессии TLR4, CD89 и CD314 рецепторов основных и минорных популяций

лимфоцитов периферической крови пациентов с БК и ЯК.

## Материалы и методы

Характеристика исследуемых пациентов с ВЗК и контрольной группы

В исследование включено 25 пациентов (17 мужчин и 8 женщин, медианный возраст – 32,0 (22,0–47,0) лет, средняя продолжительность заболевания – 4,0 (2,0–6,0) лет) с ВЗК, находившихся на стационарном лечении в хирургическом отделении УЗ «Минская областная клиническая больница» (Республика Беларусь) в период 2018–2020 гг.: 18 пациентов с БК и 7 пациентов с ЯК. Диагнозы «болезнь Крона» и «язвенный колит» верифицированы на основании индекса активности болезни Крона (Crohn's disease activity index, CDAI) (0 – клиническая ремиссия, 1 – низкая активность, 2 – умеренная активность, 3 – высокая активность) [5, 6], и эндоскопической активности ЯК по балльной шкале Mayo Endoscopic Score (0 – ремиссия, 1 – минимальная активность, 2 – умеренная активность, 3 – выраженная активность) [11, 29]. Все пациенты находились на противовоспалительной и иммуносупрессивной терапии. Группу сравнения (ГС) составили 22 здоровых донора (11 мужчин и 11 женщин, медианный возраст – 40,0 (36,0–47,2) лет). Клинико-демографическая характеристика пациентов с ВЗК представлена в таблице 1.

### Выделение мононуклеаров периферической крови (МПК) пациентов

МПК выделяли путем наслаивания разведенной в физиологическом растворе периферической крови на градиент плотности ROTI®Sep 1077 (Carl Roth, Германия) с последующим центрифугированием в течение 30 мин при

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИКО-ДЕМОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП

TABLE 1. CLINICAL AND DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS OF STUDY GROUPS

Исследуемые группы Study groups	n	Пол, м/ж Gender, m/f	Возраст, лет Age, y. o.	Тяжесть заболевания, n Clinical severity score, n (0/1/2/3 score)	Продолжительность заболевания, лет Duration of the disease, years
Пациенты с БК CD patients	18	13/5	31,0 (21,2–47,0)	10/4/4/0*	4,0 (2,0–5,0)
Пациенты с ЯК UC patients	7	4/3	37,0 (24,5–48,0)	1/3/3/0**	6,0 (4,0–6,0)
Доноры Control group	22	11/11	40,0 (36,0–47,2)	–	–

Примечание. \* – клиническая активность БК по индексу Беста; \*\* – эндоскопическая активность ЯК по балльной шкале Mayo Endoscopic Score.

Note. \*, CDAI adapted by Best; \*\*, Mayo Endoscopic Score.

1500 об/мин. Далее клеточный осадок дважды отмывали в физиологическом растворе (10 мин при 1500 об/мин).

#### Метод проточной цитофлуориметрии

Для фенотипирования цельной периферической крови использовали 2 панели моноклональных антител (МАТ): CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 и CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (Beckman Coulter, США). К 100 мкл биологического образца добавляли коктейли МАТ согласно инструкции производителя. Инкубацию проб с МАТ осуществляли в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Для последующего лизирования эритроцитов использовали раствор VersaLyse (Beckman Coulter, США).

Поверхностный фенотип выделенных на градиенте плотности МПК определяли с использованием МАТ TLR4-FITC, CD89-FITC, CD5-PE, CD314-PE, CD19-PC5,  $\gamma\delta$ TCR-PC5, CD56-PC7, CD3-APC (Beckman Coulter, США; R&D, Канада). Регистрацию результатов выполняли на

50000 клеток с использованием проточных цитометров FC500 и CytoFlex (Beckman Coulter, США).

#### Метод статистической обработки данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 8.0. Статистически значимые различия определяли при уровне  $p < 0,05$ . Для описательной статистики исследуемых групп использовали показатели медианы, нижнего и верхнего процентилей ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ). Сравнение групп и определение статистически значимых различий осуществляли непараметрическим U-критерием Манна-Уитни для независимых переменных. Корреляционный анализ выполняли по Спирмену с расчетом коэффициентов ранговой корреляции (R).

## Результаты

Фенотипическая характеристика лимфоцитов периферической крови пациентов с ВЗК представлена в таблице 2.

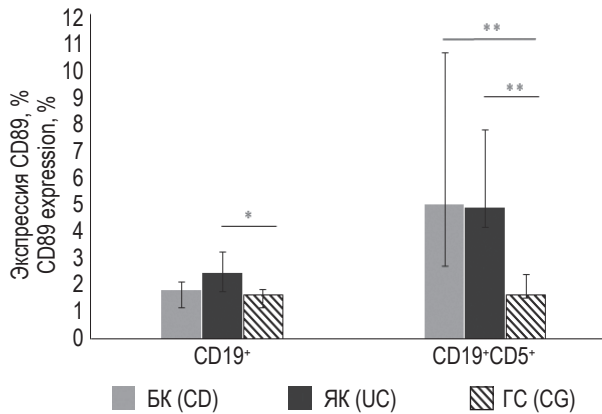
**ТАБЛИЦА 2. ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ВЗК, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )**

TABLE 2. PHENOTYPE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOID CELLS IN IBD PATIENTS, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

Субпопуляции лимфоидных клеток Lymphoid cells subsets	Исследуемые группы Study groups			p
	БК CD	ЯК UC	ГС CG	
	1	2	3	
Т-клетки (CD3 <sup>+</sup> ), % T cells (CD3 <sup>+</sup> ), %	79,8 (68,3-85,2)	77,6 (65,1-86,0)	74,9 (68,2-77,4)	$p_{1-3} = 0,07$
Th (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ), %	68,8 (57,9-71,4)	57,3 (50,1-61,3)	65,1 (59,2-70,3)	$p_{2-3} = 0,07$
CTL (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ), %	25,7 (23,3-30,8)	31,7 (23,4-33,5)	28,0 (22,5-33,8)	n/s
DN (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> ), %	5,5 (3,6-8,0)	8,7 (7,2-17,8)	4,9 (3,6-7,0)	$p_{1-2} = 0,03$ $p_{2-3} = 0,003$
В-клетки (CD19 <sup>+</sup> ), % B-cells (CD19 <sup>+</sup> ), %	8,8 (6,1-14,1)	8,8 (6,6-10,7)	10,1 (7,5-12,6)	$p_{1-3} = 0,07$
В1-клетки (CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> ), % B1 cells (CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> ), %	4,2 (3,4-13,3)	11,1 (7,1-13,8)	16,5 (13,7-27,7)	$p_{1-3} = 0,015$
НК (CD56 <sup>+</sup> ), %	6,5 (5,1-13,4)	9,5 (6,5-19,8)	13,3 (11,6-17,9)	$p_{1-3} = 0,001$
НК <sup>bright</sup> (CD56 <sup>bright</sup> ), %	6,2 (3,6-14,0)	2,7 (1,7-3,2)	3,5 (2,3-4,8)	$p_{1-2} = 0,04$ $p_{1-3} = 0,02$
НКТ (CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> ), %	6,3 (2,6-11,0)	2,2 (1,4-5,8)	1,5 (0,8-3,4)	$p_{1-3} = 0,001$
$\gamma\delta$ Т-клетки (CD3 <sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR <sup>+</sup> ), % $\gamma\delta$ T cells (CD3 <sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR <sup>+</sup> ), %	3,0 (2,5-5,5)	10,3 (5,3-11,9)	3,1 (2,1-5,5)	$p_{2-3} = 0,03$

Примечание. n/s – отсутствие статистически значимых различий.

Note. n/s, significant differences are absent.



**Рисунок 1.** Количество CD89-позитивных В- и В1-лимфоцитов в периферической крови пациентов исследуемых групп

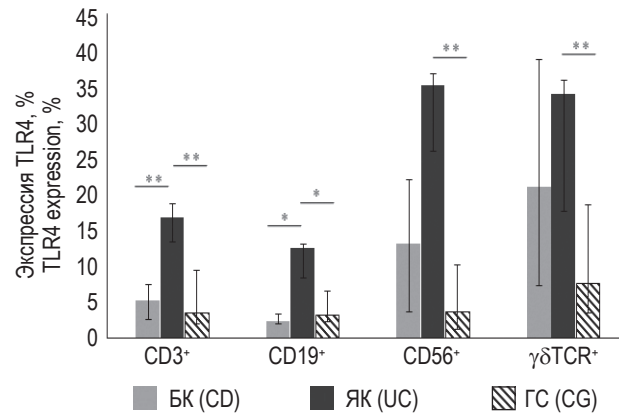
Примечание. \* – статистически значимые различия с уровнем  $p < 0,05$ ; \*\* – с уровнем  $p < 0,01$ .

Figure 1. Number of CD89-positive B and B1 lymphocytes in the peripheral blood of study groups

Note. \*, statistically significant differences with  $p$ -level  $< 0.05$ ; \*\*, with  $p$ -level  $< 0.01$ .

Статистически значимых различий в количестве лейкоцитов, лимфоцитов и основных популяций Т- и В-лимфоцитов у пациентов с БК и ЯК по сравнению с ГС не установлено. При этом у пациентов с БК отмечается снижение количества В1-клеток с фенотипом CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> ( $p = 0,015$ ) и CD56<sup>+</sup>NK-клеток ( $p = 0,001$ ), наряду с увеличением количества CD56<sup>bright</sup>NK-клеток и CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>NKT-клеток ( $p = 0,02$  и  $0,001$  соответственно).

У пациентов с ЯК по сравнению с ГС не выявлено изменений в количестве минорных по-



**Рисунок 2.** Количество TLR4 позитивных Т-, В-, НК- и  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов исследуемых групп

Примечание. \* – статистически значимые различия с уровнем  $p < 0,05$ ; \*\* – с уровнем  $p < 0,01$ .

Figure 2. Number of TLR4-positive T, B, NK and  $\gamma\delta$ T lymphocytes in the peripheral blood of study groups

Note. \*, statistically significant differences with  $p$ -level  $< 0.05$ ; \*\*, with  $p$ -level  $< 0.01$ .

пуляций лимфоидных клеток за исключением статистически значимого увеличения «двойных негативных» Т-лимфоцитов с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (DN) и Т-лимфоцитов с  $\gamma\delta$ Т-клеточным рецептором. При этом процентное содержание  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов с ВЗК прямо пропорционально коррелировало с количеством CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>Т-лимфоцитов ( $R = 0,74$ ;  $p = 0,0001$ ).

Несмотря на отсутствие статистически значимых различий в количестве, функционально В-лимфоциты пациентов с ЯК характеризовались

**ТАБЛИЦА 3. КОЛИЧЕСТВО CD314-ПОЗИТИВНЫХ Т-, ТНК- И  $\gamma\delta$ Т-ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП, Ме ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )**

TABLE 3. NUMBER OF CD314-POSITIVE T, TNK AND  $\gamma\delta$ T LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF STUDY GROUPS, Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )

Субпопуляции лимфоидных клеток Subpopulations of lymphoid cells	Исследуемые группы Study groups			p
	БК CD	ЯК UC	ГС CG	
	1	2	3	
CD3 <sup>+</sup> CD314 <sup>+</sup> , %	36,84 (31,47-41,55)	43,58 (40,96-44,15)	36,88 (28,36-43,25)	$p_{1-2} = 0,03$ $p_{2-3} = 0,02$
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD314 <sup>+</sup> , %	91,03 (87,63-92,23)	82,84 (80,81-84,87)	58,24 (38,71-81,44)	$p_{1-3} = 0,0001$ $p_{2-3} = 0,016$
CD3 <sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR <sup>+</sup> CD314 <sup>+</sup> , %	91,17 (83,75-93,39)	92,78 (90,95-94,62)	84,92 (72,50-90,13)	$p_{1-3} = 0,02$ $p_{2-3} = 0,03$

увеличением экспрессии CD89 и процентное содержание CD19<sup>+</sup>CD89<sup>+</sup> лимфоцитов составило 2,46 (1,78-3,25) % по сравнению со здоровыми донорами (1,62 (1,17-1,85) %,  $p = 0,021$ ) (рис. 1). Увеличенное количество CD89-позитивных В1-клеток отмечалось как у пациентов с БК, так и у пациентов с ЯК ( $p = 0,003$  и  $p = 0,009$  соответственно).

Патогенез ВЗК характеризуется дисфункцией иммунной системы, ассоциированной со слизистыми оболочками ЖКТ, в отношении резидентной микробиоты и других токсических антигенов в результате нарушения баланса мукозального иммунитета и нормальной микрофлоры организма, взаимодействие между которыми частично опосредуется через TLRs. Статистически значимое увеличение количества Т-, В-, НК- и  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, экспрессирующих TLR4, наблюдалось только у пациентов с ЯК (рис. 2).

Цитотоксическая направленность лимфоидных клеток оценивалась по экспрессии CD314 (табл. 3). У пациентов исследуемых групп в разной степени выраженности установлено статистически значимое увеличение CD314-позитивных Т-, НК- и  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов.

## Обсуждение

В последнее время активно изучаются механизмы распознавания и эффекторных реакций звеньев иммунной системы в инициации и поддержании иммуно-медиированного воспаления и повреждения ткани при ВЗК. Изменения иммунитета при БК и ЯК имеют общую направленность: БК описывается как Th1/Th17-медиированное заболевание, в то время как при ЯК характерны черты атипичного Th2-клеточного иммунного ответа [18]. Классически считается, что адаптивный иммунный ответ играет основную роль в патогенезе ВЗК [3]. Тем не менее последние достижения в области иммунологии и генетики прояснили, что врожденный иммунный ответ одинаково важен для индукции воспаления кишечника у пациентов [14]. Проведенные нами исследования не выявили изменений в количестве CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> и CD19<sup>+</sup> лимфоцитов периферической крови пациентов с БК и ЯК по сравнению с группой здоровых доноров при обнаружении статистически значимых различий только в группе пациентов с БК в количестве так называемых минорных популяций, к которым относятся В1-лимфоциты, НК-клетки в сочетании с CD56<sup>bright</sup> и NKT-клетки.

В1-клетки располагаются, в основном, в плевральной и перитонеальной полостях, фенотипически и функционально отличаются от

классических В2-клеток периферической крови, продуцируют полиреактивные низкоаффинные антитела в ответ на бактериальные патогены и апоптотические продукты, IL-10, усиливают антигенный процессинг и презентацию, тем самым могут играть определенную роль в патогенезе аутоиммунных болезней [12]. НК-клетки рассматриваются как врожденные лимфоидные клетки 1 (ILCs – innate lymphoid cells), вследствие их способности продуцировать IFN $\gamma$  [4]. CD56<sup>bright</sup> относятся к регуляторной популяции НК-клеток, которая заселяет, в основном, перифолликулярные зоны вторичных лимфоидных органов, характеризуется отсутствием / низкой экспрессией литических гранул, высокой пролиферативной и цитокин-продуцирующей активностью, влияя тем самым на иммунный ответ (двойственная роль: провоспалительный IFN $\gamma$  и регуляторный – TNF $\beta$ , IL-5, IL-10, и IL-13 профили) [20, 22, 23]. Кроме того, в последнее время рассматривается двойственная роль NKT-клеток при ВЗК, которые активируются как экзогенными, так эндогенными липидными лигандами, участвуют в поддержании кишечного гомеостаза и могут инициировать воспаление в слизистой [28]. Таким образом, выявленные изменения в количестве минорных популяций лимфоидных клеток периферической крови у пациентов с БК дополняют имеющиеся данные о вовлечении клеток адаптивного и врожденного иммунного ответа в патогенез болезни.

У пациентов с ЯК наблюдалось увеличение Т-лимфоцитов с  $\gamma\delta$ Т-клеточным рецептором в сочетании с увеличением DN Т-лимфоцитов. Известно, что CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> клетки с  $\alpha\beta$ Т-клеточным рецептором обладают фенотипической и функциональной незрелостью и способны избирательно, без предварительной сенсibilизации активировать В1-клетки, продуцирующие низкоаффинные антитела класса IgM к ДНК [7]. Но в то же время процентное содержание  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов с ВЗК прямо пропорционально коррелировало с количеством CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Т-лимфоцитов, что подтверждает в основном «двойной негативный» фенотип  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов и объясняет увеличение количества DN клеток у пациентов с ЯК [7]. Роль  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в ВЗК остается до конца не ясной. Многочисленные исследования демонстрируют их протективный эффект в ЖКТ при развитии воспалительной реакции, связанный с противомикробной защитой, участием в регенерации слизистых оболочек и иммунорегуляцией локального иммунного ответа, однако также показывают активное участие  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в индукции воспалительной реакции и возможную провоспалительную роль в ВЗК, особенно V $\delta$ 2<sup>+</sup>

субпопуляции с ЖКТ-ориентированным профилем [9, 15, 21].

Подавляющим большинством исследователей признается тот факт, что иммунный ответ на кишечную микробиоту через так называемые патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP) является центральным в патогенезе ВЗК [10]. Помимо PAMP, индуцирующих классическое микроб-индуцированное воспаление, выявлен новый класс молекул, названных молекулярными паттернами, ассоциированными с повреждением (DAMP), который опосредует воспалительный ответ, запускаемый в отсутствие микробных элементов. Например, фекальный кальпротектин – один из наиболее часто применяемых маркеров активности ВЗК – представляет собой комплекс S100A8/S100A9, являющийся двумя прототипами DAMP [13, 24, 25]. PAMPs и DAMPs распознаются TLRs, которые экспрессируются на большинстве интестинальных иммунных клеток. Активация большинства TLRs приводит к вовлечению сигнальной адаптерной молекулы MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) и последующей активации сигнального пути, характеризующегося фосфорилированием и деградацией ингибитора  $\kappa$ B и последующей транслокацией в ядро транскрипционного ядерного фактора NF- $\kappa$ B, что способствует продукции провоспалительных цитокинов и привлечению воспалительных клеток в ЖКТ [19]. При оценке экспрессии TLR4 на лимфоидных клетках пациентов с ВЗК наблюдалось увеличение количества TLR4-позитивных лимфоцитов различных субпопуляций со статистически значимым превалированием у пациентов с ЯК, подтверждая вовлечение данной молекулы в иммунопатогенез болезни. Так, основная функция TLR4 заключается в инициации воспалительной реакции, обеспечивая защиту от проникающих бактерий, и поддержании интегративности слизистых оболочек. Ряд авторов демонстрируют, что активация TLR-опосредованного пути приводит к развитию каскада воспалительных реакций, сопровождающихся синтезом большого количества провоспалительных цитокинов и интерферонов, играющих важную роль в инициации и поддержании хронического воспаления при ВЗК [27]. Кроме того, TLR4-медирированный сигналинг способен напрямую приводить к синтезу ROS/RONS, а также опосредованно, за счет привлечения нейтрофилов в кишечник. ROS могут являться также интермедиаторами TLR4-зависимой активации NF- $\kappa$ B. При ВЗК нарушение проведения сигнала от TLR4 приводит к увеличению проницаемости кишечника и неадекватной репарации слизистых оболочек [17].

CD89 представляет собой Fc-рецептор IgA (Fc $\alpha$ RI) и ингибиторный ITAMi сигналинг через CD89 и мономерный IgA играет важную роль в поддержании иммунного гомеостаза. Известно, что IgA является наиболее распространенным классом антител, присутствующим в слизистой оболочке, тесно взаимодействует с кишечной микробиотой и играет пассивную защитную роль через иммунное исключение. Кроме того, опсонизированные IgA патогены активируют иммунную систему через сшивание Fc $\alpha$ RI, вызывая провоспалительные реакции со стороны иммунной системы. Увеличенное или aberrантное присутствие IgA-содержащих иммунных комплексов может привести к чрезмерной активации нейтрофилов и серьезному повреждению тканей при различных воспалительных или аутоиммунных заболеваниях, включая ВЗК [8]. Увеличение количества предшественников антитело-синтезирующих клеток, экспрессирующих CD89, свидетельствует о предрасположенности В- и В1-лимфоцитов пациентов с ВЗК к продукции IgA. Кроме того, Fc $\alpha$ RI (CD89)-IgA иммунные комплексы усиливают миграцию нейтрофилов в слизистую ЖКТ с активацией ими эффекторных функций по отношению к собственным тканям, что особенно выражено наблюдается при ЯК [16].

Как известно, CD314 (natural killer group 2 member D, NKG2D) представляет собой сенсорную молекулу, распознающую в первую очередь клеточное повреждение и приводящее к функциональной активации интестинальных эффекторных Т-клеточных субпопуляций. Активационный рецептор NKG2D является одним из основных прототипов рецепторов врожденного иммунитета, конститутивно экспрессируется на NK- и NKT-клетках,  $\gamma\delta$ T-лимфоцитах, MAIT (mucosal associated invariant T-cells), CD8<sup>+</sup>T-клетках. NKG2D-медирированный сигнал усиливает цитотоксичность NK- и Т-клеток и продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов. Распознавание NKG2D своих лигандов приводит к функциональной активации интестинальных эффекторных Т-клеточных субпопуляций, что предполагает определенную роль NKG2D-лиганд взаимодействия в модулировании иммунного ответа в ЖКТ и его дисрегуляции при развитии аутоиммунных и воспалительных заболеваний [26]. Выявленные изменения в количестве CD314-позитивных киллерных клеток у пациентов с БК и ЯК предполагают определенную роль NKG2D-лиганд взаимодействия в модулировании иммунного ответа в ЖКТ при развитии хронического воспалительного процесса [18].

## Заключение

Принимая во внимание тот факт, что периферическая кровь косвенно отражает процессы, происходящие в иммунной системе слизистых при ВЗК, полученные результаты позволяют предположить различный иммунологический профиль, превалирующий в патогенезе БК и ЯК. Учитывая функциональную значимость популяций лимфоидных клеток, выявленные изменения в фенотипе лимфоцитов периферической крови пациентов с БК свидетельствуют о вовлечении в патогенез минорных клеточных популяций с

провоспалительной/регуляторной свойствами. При ЯК функциональные особенности лимфоидных клеток периферической крови свидетельствуют о провоспалительной направленности основных популяций (Т-, В-, НК-лимфоциты) и  $\gamma\delta$ Т-клеток и определенной их патогенетической роли в инициации и поддержании хронического воспаления, а количество TLR4- и CD89-позитивных клеток может использоваться для разработки иммунологических критериев/биомаркеров оценки терапевтической эффективности новых лекарственных средств.

## Список литературы / References

1. Столярова Т.А., Горгун Ю.В. Воспалительные заболевания кишечника: современное состояние проблемы // *Здравоохранение*, 2017. № 5. С. 65-74. [Stolyarova T.A., Gorgun Yu.V. Inflammatory bowel diseases: current state of problem. *Zdravookhranenie = Healthcare*, 2017, no. 5, pp. 65-74. (In Russ.)]
2. Ткачев А.В., Мкртчян Л.С., Никитина К.Е., Вольтинская Е.И. Воспалительные заболевания кишечника: на перекрестке проблем // *Практическая медицина*, 2012. Т. 3, № 58. С. 17-22. [Tkachev A.V., Mkrtychyan L.S., Nikitina K.E., Volynskaya E.I. Inflammatory bowel disease: crossing of the problems. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2012, Vol. 3, no. 58, pp. 17-22. (In Russ.)]
3. Ahluwalia B., Moraes L., Magnusson M.K., Öhman L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2018, Vol. 53, no. 4, pp. 379-389.
4. Bennett M.S., Round J.L., Leung D.T. Innate-like lymphocytes in intestinal infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2015, Vol. 28, no. 5, pp. 457-463.
5. Best W.R. Predicting the Crohn's disease activity index from the Harvey-Bradshaw Index. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2006, Vol. 12, no. 4, pp. 304-310.
6. Best W.R., Beckett J.M., Singleton J.W., Kern F.Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*, 1976, Vol. 70, pp. 439-444.
7. Brandt D., Hedrich C.M. TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (double negative) T cells in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2018, Vol. 17, no. 4, pp. 422-430.
8. Breedveld A., van Egmond M. IgA and Fc $\alpha$ RI: pathological roles and therapeutic opportunities. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 553. doi: 10.3389/fimmu.2019.00553.
9. Catalan-Serra I., Sandvik A.K., Bruland T., Andreu-Ballesterd J.C. Gamma delta T cells in Crohn's disease: A new player in the disease pathogenesis? *J. Crohns Colitis*, 2017, pp. 1135-1145.
10. Danese S., Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.*, 2006, Vol. 12, no. 30, pp. 4807-4812.
11. D'Haens G., Sandborn W.J., Feagan B.G., Geboes K., Hanauer S.B., Irvine E.J., Lémann M., Marteau P., Rutgeerts P., Schölmerich J., Sutherland L.R. A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2007, Vol. 132, no. 2, pp. 763-786.
12. Duan B., Morel L. Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2006, Vol. 5, no. 6, pp. 403-408.
13. Foell D., Wittkowski H., Roth J. Monitoring disease activity by stool analyses: from occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage. *Gut*, 2009, Vol. 58, pp. 859-868.
14. Guan Q.A. Comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J. Immunol. Res.*, 2019, Vol. 2019, 7247238. doi: 10.1155/2019/7247238.
15. Hu M.D., Edelblum K.L. Sentinels at the frontline: the role of intraepithelial lymphocytes in inflammatory bowel disease. *Curr. Pharmacol. Rep.*, 2017, Vol. 3, no. 6, pp. 321-334.
16. Kaser A., Zeissig S., Blumberg R.S. Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 28, pp. 573-621.
17. Kim D.H., Cheon J.H. Pathogenesis of inflammatory bowel disease and recent advances in biologic therapies. *Immune Netw.*, 2017, Vol. 17, no 1, pp. 25-40.
18. la Scaleia R., Stoppacciaro A., Oliva S., Morrone S., di Nardo G., Santoni A., Cucchiara S., Palmieri G. NKG2D/ligand dysregulation and functional alteration of innate immunity cell populations in pediatric IBD. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2012, Vol. 18, pp. 1910-1922.
19. Lu Y., Li X., Liu S., Zhang Y., Zhang D. Toll-like receptors and inflammatory bowel disease. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 72. doi: 10.3389/fimmu.2018.00072.
20. Maldonado-Bernal C., Sánchez-Herrera D. Toll-like receptors and natural killer cells. 2019. 19 p. doi: 10.5772/intechopen.86393.



21. McCarthy N.E., Eberl M. Human  $\gamma\delta$  T-cell control of mucosal immunity and inflammation. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, pp. 985. doi: 10.3389/fimmu.2018.00985.
22. Poggi A., Benelli R., Venè R., Costa D., Ferrari N., Tosetti F., Zocchi M.R. Human Gut-Associated Natural Killer Cells in Health and Disease. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 961. doi: 10.3389/fimmu.2019.00961.
23. Poli A., Michel T., Thérésine M., Andrès E., Hentges F., Zimmer J. CD56<sup>bright</sup> natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*, 2009, Vol. 126, no. 4, pp. 458-465.
24. Rock K.L., Latz E., Ontiveros F., Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 28, pp. 321-342.
25. Rubartelli A., Lotze M.T. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol.*, 2007, Vol. 28, pp. 429-436.
26. Stojanovic A., Correia M.P., Cerwenka A. The NKG2D/NKG2DL axis in the crosstalk between lymphoid and myeloid cells in health and disease. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 827. doi: 10.3389/fimmu.2018.00827.
27. Toiyama Y., Araki T., Yoshiyama S., Hiro J., Miki C., Kusunoki M. The expression patterns of toll-like receptors in the ileal pouch mucosa of postoperative ulcerative colitis patients. *Surg. Today*, 2006, Vol. 36, no. 3, pp. 287-290.
28. van Dieren J.M., van der Woude C.J., Kuipers E.J., Escher J.C., Samsom J.N., Blumberg R.S., Nieuwenhuis E.E. Roles of CD1d-restricted NKT cells in the intestine. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2007, Vol. 13, no. 9, pp. 1146-1152.
29. Xie T., Zhang T., Ding C., Dai X., Li Y., Guo Z., Wei Y., Gong J., Zhu W., Li J. Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCIES) versus Mayo Endoscopic Score (MES) in guiding the need for colectomy in patients with acute severe colitis. *Gastroenterol. Rep. (Oxf.)*, 2018, Vol. 6, no. 1, pp. 38-44.

---

**Авторы:**

**Зафранская М.М.** — д.м.н., доцент, главный научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий научно-исследовательской лаборатории, Белорусская медицинская академия последипломного образования; заведующая кафедрой иммунологии, Международный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

**Адамович А.Ю.** — младший научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий научно-исследовательской лаборатории, Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

**Воробей А.В.** — д.м.н., профессор, член-корр. Национальной академии наук Беларуси, заведующий кафедрой хирургии, Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

**Authors:**

**Zafranskaya M.M.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Main Research Associate, Department of Immunology and Biomedical Technologies, Research Laboratory, Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education; Head, Immunology Department, International Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

**Adamovich H. Yu.**, Junior Research Associate, Department of Immunology and Biomedical Technologies, Research Laboratory, Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

**Varabei A.U.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Belarus National Academy of Sciences, Head, Surgery Department, Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

**Старостин А.М.** — аспирант кафедры хирургии,  
Белорусская медицинская академия последипломного  
образования, Минск, Республика Беларусь

**Нижегородова Д.Б.** — к.б.н., доцент, ведущий научный  
сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских  
технологий научно-исследовательской лаборатории,  
Белорусская медицинская академия последипломного  
образования; доцент кафедры иммунологии,  
Международный экологический институт им.  
А.Д. Сахарова Белорусского государственного  
университета, Минск, Республика Беларусь

**Starastin A.M.**, Postgraduate Student, Surgery Department,  
Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education,  
Minsk, Republic of Belarus

**Nizheharodava D.B.**, PhD (Biology), Associate Professor,  
Leading Research Associate, Department of Immunology and  
Biomedical Technologies, Research Laboratory, Belarusian  
Medical Academy for Postgraduate Education; Associate  
Professor, Immunology Department, International Sakharov  
Environmental Institute, Belarusian State University, Minsk  
Region, Republic of Belarus

---

Поступила 19.06.2020  
Принята к печати 25.06.2020

---

Received 19.06.2020  
Accepted 25.06.2020