

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*, *FOXP3* И *ROR γ* В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

Аторин Д.А.¹, Жулай Г.А.¹, Топчиева Л.В.¹, Курбатова И.В.¹,
Дуданова О.П.²

¹ Институт биологии – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

² ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Резюме. Развитие язвенного колита (ЯК) сопровождается активацией пуриnergического сигнального пути и повышением уровня внеклеточного аденозина. Аденозин участвует в регуляции баланса провоспалительных Т-хелперов типа 17 (Th17) и иммуносупрессорных регуляторных Т-клеток (Treg), нарушение которого, как считается, является одним из основных иммунных факторов данного заболевания. Тем не менее вопрос о том, как изменяется экспрессия генов, кодирующих транскрипционные факторы Treg-клеток и Th17 (*FOXP3* и *ROR γ* соответственно), и генов, кодирующих участников CD39/CD73/A2AR сигнального пути (*ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*), в периферической крови больных ЯК малоизучен. Цель исследования – изучить уровень экспрессии генов *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*, *FOXP3* и *ROR γ* при язвенном колите. Обследован 41 человек, из которых 23 пациента с диагнозом «ЯК» (18 пациентов, находящихся на базисной терапии производными 5-АСК (группа ЯК1) и 5 пациентов, принимающих преднизолон (группа (ЯК2)), 18 условно здоровых людей. Тотальную РНК выделяли из лейкоцитов периферической крови (ЛПК). Уровень транскриптов генов изучали методом ПЦР в режиме реального времени. Содержание мРНК гена *ENTPD1* у больных ЯК, находящихся на базисной терапии производными 5-АСК, было выше, чем у здоровых людей ($p = 0,0045$). Уровень транскриптов гена *NT5E* и *ADORA2A* в ЛПК пациентов группы ЯК1 оказался выше, чем у пациентов из группы ЯК2 ($p = 0,0486$ и $p = 0,0289$ соответственно) и здоровых индивидов ($p = 0,0007$ и $p < 0,001$ соответственно). У группы пациентов ЯК1 содержание мРНК гена *FOXP3* в ЛПК было выше, чем у условно здоровых людей ($p = 0,0093$). Уровень экспрессии гена *ROR γ* в ЛПК пациентов из групп ЯК1 и ЯК2 был выше, чем у здоровых индивидов ($p = 0,0005$). В ЛПК больных ЯК, находящихся на базисной терапии, наблюдалось повышение уровня экспрессии генов *FOXP3* и *ROR γ* , представляющих собой транскрипционные факторы Treg- и Th17-клеток соответственно, тогда как уровень экспрессии

Адрес для переписки:

Аторин Даниил Алексеевич
Институт биологии
185003, Россия, Республика Карелия,
г. Петрозаводск, пр. А. Невского, 50.
Тел.: 8 (8142) 57-18-79.
Факс: 8 (8142) 76-98-10.
E-mail: atorin98@mail.ru

Address for correspondence:

Dannil A. Atorin
Institute of Biology
50 A. Nevsky Ave
Petrozavodsk, Republic of Karelia
185003 Russian Federation
Phone: +7 (8142) 57-18-79.
Fax: +7 (8142) 76-98-10.
E-mail: atorin98@mail.ru

Образец цитирования:

Д.А. Аторин, Г.А. Жулай, Л.В. Топчиева, И.В. Курбатова, О.П. Дуданова «Уровень экспрессии генов *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*, *FOXP3* и *ROR γ* в периферической крови больных язвенным колитом» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 1. С. 197-206. doi: 10.15789/1563-0625-ENA-2976

© Аторин Д.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

D.A. Atorin, G.A. Zhulai, L.V. Topchieva, I.V. Kurbatova, O.P. Dudanova "ENTPD1, NT5E, ADORA2A, FOXP3 and ROR γ gene expression in peripheral blood of patients with ulcerative colitis", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 1, pp. 197-206.
doi: 10.15789/1563-0625-ENA-2976

© Atorin D.A. et al., 2025

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-ENA-2976

этих генов у больных ЯК на преднизолоне не отличался от контроля. В контрольной группе и группе ЯК1 выявлены корреляционные связи между уровнем экспрессии некоторых из исследуемых генов.

Ключевые слова: язвенный колит, воспаление, пуриnergический сигнальный путь, аденозин, FoxP3, ROR γ

ENTPD1, NT5E, ADORA2A, FOXP3 AND ROR γ GENE EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS

**Atorin D.A.^a, Zhulai G.A.^a, Topchieva L.V.^a, Kurbatova I.V.^a,
Dudanova O.P.^b**

^a Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

^b Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Abstract. Development of ulcerative colitis (UC) is accompanied by activation of the purinergic signaling pathway and an increased level of extracellular adenosine. Adenosine is involved in regulating the balance of pro-inflammatory T-helper type 17 (Th17) cells and immunosuppressive regulatory T-cells (Treg). Their disturbance is believed to be one of the main immune factors causing this disease. However, expression of genes encoding Treg cell and Th17 transcription factors (*FOXP3* and *ROR γ* , respectively) and genes encoding members of the CD39/CD73/A2AR signaling pathway (*ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*) in peripheral blood has not been studied enough. The purpose of our study was to evaluate the expression levels of *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*, *FOXP3* and *ROR γ* genes in ulcerative colitis (UC). Thirty-eight patients were examined including 20 patients diagnosed with UC (15 patients on a basic therapy with 5-ASA derivatives, UC1 group); 5 patients treated with Prednisone (group UC2), and 18 apparently healthy people. Total RNA was isolated from peripheral blood leukocytes (PBLCs). The levels of gene transcripts were studied by real-time PCR technique. The *ENTPD1* gene mRNA content in UC patients on a basic therapy with 5-ASA derivatives was higher than in healthy people ($p = 0.0045$). The levels of *NT5E* and *ADORA2A* transcripts in the PBLCs of patients in the UC1 group were higher than those of patients in the UC2 group ($p = 0.0486$ and $p = 0.0289$, respectively) and healthy individuals ($p = 0.0007$ and $p < 0.001$, respectively). The mRNA content of *FOXP3* gene in PBLCs of the UC1 group of patients was higher than in conditionally healthy individuals ($p = 0.0093$). The level of *ROR γ* gene expression in PBLCs of the patients from UC1 and UC2 groups was higher than in healthy individuals ($p = 0.0005$). Increased levels of *FOXP3* and *ROR γ* gene expression (the transcription factors of Treg and Th17 cells, respectively), were observed in PBLCs of UC patients on baseline therapy, whereas expression levels of these genes in prednisolone-treated UC patients did not differ from controls. Correlations between the expression levels of some genes under study were revealed in control persons and in the UC1 group.

Keywords: ulcerative colitis, inflammation, purinergic signaling pathway, adenosine, FoxP3, ROR γ

Исследования проводились в рамках выполнения НИР (FMEN-2022-0009) ИБ КарНЦ РАН на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Введение

Язвенный колит (ЯК) – хроническое воспалительное аутоиммунное заболевание кишечника [22]. В последнее время большое внимание при изучении патогенеза данного заболевания уделяется внеклеточному аденозину как основному

компоненту пуриnergического сигнального пути в иммунных клетках, регулирующего процессы воспаления. Повышенное содержание аденозина характерно для многих иммунновоспалительных заболеваний, в том числе и при ЯК [10]. Однако его роль в патогенезе данного заболевания изучена недостаточно [21]. Внеклеточный аденозин модулирует функции клеток адаптивного и врожденного иммунитета, его уровень имеет решающее значение для поддержания иммунного гомеостаза [3]. Известно, что уровень аденозина связан с иммуносупрессорной функцией Т-клеток, поляризацией макрофагов M1 и M2, дифференциров-

кой CD8⁺T-лимфоцитов [3, 26]. Таким образом, пуринергический сигнальный путь регулирует уровень системного и местного воспаления, а нарушение баланса АТФ/аденозин может быть ключевым фактором дисрегуляции иммунного ответа при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК), и в частности ЯК [24]. Образование аденозина происходит внутри и внеклеточно за счет активности ряда ферментов, участвующих в метаболизме нуклеотидфосфатов (АТФ, АДФ, АМФ). Также аденозин может образовываться из S-аденозилгомоцистеина под действием фермента гидролазы S-аденозилгомоцистеина. Уровень аденозина в периферической крови и тканях в условиях воспаления повышается, как правило, либо вследствие его выхода во внеклеточное пространство в результате гибели клеток, либо в результате усиления активности ферментов, расположенных на поверхности ряда иммунных клеток (таких, как моноциты, нейтрофилы и лимфоциты): эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза-1 (NTPD1, CD39), кодируемый геном *ENTPD1*, и экто-5'-нуклеотидаза (5'-NT, CD73), кодируемый геном *NT5E* [8].

Внеклеточный аденозин является лигандом для четырех рецепторов, связанных с G-белком (A1R, A2AR, A2BR, A3R), которые экспрессируются на поверхности многих клеток [11]. В частности, для T-лимфоцитов характерна экспрессия A2AR и A2BR [16]. Считается, что A2AR опосредует противовоспалительные эффекты аденозина, например, путем снижения передачи сигналов T-клеточных рецепторов [4]. Передача сигналов от A2AR ингибирует пролиферацию и экспансию T-клеток, цитотоксическую активность и высвобождение провоспалительных медиаторов [7, 20]. Этот рецептор кодируется геном *ADORA2A*. Передача сигналов через A2AR может регулировать баланс провоспалительных T-хелперов типа 17 (Th17) и иммуносупрессорных регуляторных T-клеток (Treg) в сторону повышения пула Treg-клеток [17]. Вследствие этого, влияние аденозина на баланс Treg/Th17 можно рассматривать как важное звено патогенеза таких аутоиммунных заболеваний, как системная красная волчанка, ревматоидный артрит, диабет первого типа и ВЗК [24].

Ключевым транскрипционным фактором для Treg-клеток является forkhead box P3 (FoxP3), кодируемый геном *FOXP3*. *FOXP3* играет важную роль в развитии и функционировании Treg-клеток. Транскрипционный фактор RAR-related orphan receptor gamma (*RORγ*), кодируемый геном *RORγ*, играет ключевую роль в дифференцировке и поддержании эффекторных субпопуляций Th17 [16].

В настоящее время вопрос о количественном и качественном соотношении экспрессии генов *FOXP3* и *RORγ* в периферической крови больных ЯК малоизучен, и данные, полученные другими авторами так же, как и по отношению к генам *ENTPD1*, *NT5E* и *ADORA2A*, весьма малочисленны и противоречивы. Так, в одних работах отмечено повышение количества циркулирующих и кишечных Treg-клеток у пациентов с ЯК при сравнении с условно здоровыми людьми [23]. Тогда как другими авторами отмечено снижение пула Treg-клеток в периферической крови при ЯК [14].

Пациентам с ЯК назначают терапию производными на основе 5-АСК (5-аминосалициловой кислоты) и/или стероидными препаратами (такими как преднизолон). Кроме того, лечение больных ЯК предполагает использование и других терапевтических стратегий для снижения воспалительного процесса в кишечнике, например назначение особой диеты, хирургическое лечение, иммунотерапию и др. [1]. Однако вопрос о том, как влияют эти препараты на экспрессию генов *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*, *FOXP3* и *RORγ*, изучен еще слабо.

Цель исследования – изучить уровень экспрессии генов *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*, *FOXP3* и *RORγ* в лейкоцитах периферической крови больных ЯК, находящихся на терапии производными на основе 5-АСК, на терапии стероидным препаратом (преднизолоном), и условно здоровых людей.

Материалы и методы

В исследование включены условно здоровые люди и пациенты с диагнозом «ЯК». Всего было исследовано 41 человек, из которых 23 человека были больны ЯК (табл. 1). Больные ЯК были разделены на две группы, в зависимости от терапии. Группа ЯК1 (n = 18), медиана возраста которых составила 42 (34-52) года, находились на базисной терапии производными 5-АСК: салофальк, сульфасалазин (длительностью не менее 3 месяцев). Дозировка составляла 3-4 грамма в сутки в зависимости от распространенности и степени активности воспалительного процесса в слизистой оболочке толстой кишки. Больные группы ЯК2 (n = 5) принимали в качестве терапии стероидные гормоны, в частности преднизолон, медиана их возраста составила 35 (30-39) лет. Дозировка препарата составляла 1 мг на кг в сутки и зависела от распространенности воспаления (или формы ЯК) и клинико-эндоскопических показателей больных. Диагноз «ЯК» устанавливали общепринятыми методами диагностики с учетом комплекса клинических данных и резуль-

татов лабораторных, эндоскопических и гистологических исследований. Активность иммуновоспалительного процесса в слизистой толстой кишки оценивалась по данным клинической картины по традиционной шкале Truelove and Witts с учетом частоты стула, примеси крови, температуры и частоты пульса, уровня гемоглобина и скорости оседания эритроцитов. Учитывались эндоскопические признаки согласно индексу Шредера – наличие эритемы, контактной кровоточивости, эрозий, язв, спонтанной кровоточивости. При гистологическом исследовании оценивалась степень воспалительной инфильтрации собственной пластинки, наличие нейтрофилов, эозинофилов, крипт-абсцессов, повреждение

крипт, уменьшение числа бокаловидных клеток, наличие эрозий и язв.

В группу контроля были отобраны 18 условно здоровых людей, возраст которых составлял 39 (35–47) лет. Возраст индивидов из групп исследования значимо не различался ($p < 0,05$). Критерии исключения из исследования для группы здоровых людей: наличие хронических иммуновоспалительных заболеваний, в том числе сахарного диабета второго типа, злоупотребление алкоголем, курение табака, перенесенные в последние два месяца инфекционные заболевания.

Использовали периферическую кровь, взятую натощак. Тотальную РНК (тотРНК) из лейкоцитов периферической крови выделяли с помощью набора ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия). Фракцию лейкоцитов периферической крови получали после лизиса клеток крови раствором, содержащим хлорид аммония. ТотРНК обрабатывали ДНКазой (1 е. а.). кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипции с обратной транскриптазой Magnus (ЗАО «Евроген», Россия). Качество тотРНК оценивали после электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Количество тотРНК определяли на спектрофотометре SmartSpecPlus (Bio-Rad, США).

Уровень транскриптов генов изучали методом ПЦР в режиме реального времени на приборе LightCycler (Roche, Германия), используя набор PCRmix-HS SYBR (ЗАО «Евроген», Россия). Каждую ПЦР повторяли не менее 2 раз. Смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала 1нг кДНК, по 50 пкМ прямого и обратного праймеров, 4 мкл реакционной смеси и 13,4 мкл деонизованной воды, свободной от нуклеаз. Протокол ПЦР: денатурация кДНК 5 мин при 95 °С; 45 циклов: денатурация при 95 °С 30 с; отжиг при 58 °С (для генов *FOXP3* и *RORγ*) и при 64 °С (для генов *ENTPD1*, *NT5E* и *ADORA2A*) 30 с; элонгация при 72 °С 30 с. Гены *GAPDH* и *18S rRNA* использовали в качестве референсных. Последовательность праймеров дана в таблице 2. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов. Эффективность ПЦР оценивали по стандартной кривой.

Статистическая обработка данных выполнена в пакете программ Statgraphics Centurion XVI (version 16.1.11) и GraphPad Prism (version 7.0). Значимость различий медиан оценивали с помощью U-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Проводили корреляционный анализ по Спирмену.

Исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования ФИЦ КарНЦ РАН.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ ЛЮДЕЙ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF SURVEYED PEOPLE

Характеристика Characteristic	Контроль Control	ЯК UC
Обследовано человек, n Examination of person, n	18	23
Мужчины, n (%) Men, n (%)	7 (38,9)	13 (56,5)
Женщины, n (%) Women, n (%)	11 (61,1)	10 (43,5)
Возраст, Me Age, Me	39 (35–47)	38 (33–44)
Терапия, n (%) Therapy, n (%) производными 5-АСК 5-ASA derivatives преднизолоном prednisolone	– –	18 (78,3) 5 (21,7)
Активность, n (%) Activity, n (%) высокая high умеренная moderate слабая weak	– – –	7 (30,4) 4 (17,4) 12 (52,2)
Форма ЯК, n (%) Forms UC, n (%) левосторонний left-side панколит pancolitis	– –	16 (69,6) 7 (30,4)

ТАБЛИЦА 2. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

TABLE 2. PRIMER SEQUENCES FOR DETERMINING RELATIVE GENE EXPRESSION

Ген Gene	Последовательность праймеров 5' – 3' Primer sequence 5' – 3'		Размер ПЦР продукта, п. о. PCR product size, b. p	Источник Source
	Прямой Forward	Обратный Reverse		
18SrRNA	AGAAACGGCTACCACATCCA	CACCAGACTTGCCCTCCA	119	Собственный дизайн Own design
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTTC	226	Собственный дизайн Own design
ENTPD1	AGCAGCTGAAATATGCTGGC	GAGACAGTATCTGCCGAAGTCC	200	Собственный дизайн Own design
NT5E	ATTGCAAAGTGGTTCAAAGTCA	ACACTTGGCCAGTAAATAGGG	123	Собственный дизайн Own design
ADORA2A	CTTGGGTTCTGAGGAAGCAG	CAGCAGCTCCTGAACCCTAG	253	Собственный дизайн Own design
FOXP3	GCCACAACCTGAGTCTGC	GTTTCGTCCATCCTCCTTTCC	172	Собственный дизайн Own design
RORγt	CCAAGGCAGGGCTCAATG	GAAGTCCACATCGGTCAGG	123	Собственный дизайн Own design

Результаты

Проанализирован уровень мРНК генов *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*, *FOXP3* и *ROR γ* в ЛПК больных ЯК, находящихся на базисной терапии производными 5-АСК и на терапии преднизолоном, в сравнении с условно здоровыми людьми.

Обнаружены значимые различия в содержании мРНК гена *ENTPD1* у больных груп-

пы ЯК1 при сравнении с контрольной группой ($p = 0,0045$) (рис. 1). Уровень транскриптов гена *NT5E* в ЛПК пациентов группы ЯК1 оказался выше, чем в у пациентов группы ЯК2 ($p = 0,0486$) и контрольной группы ($p = 0,0007$) (рис. 1). Установлены значимые различия в содержании мРНК гена *ADORA2A* между контролем и ЯК1 и контролем и ЯК2. Уровень транскриптов этого гена в ЛПК больных группы ЯК1 был выше, чем

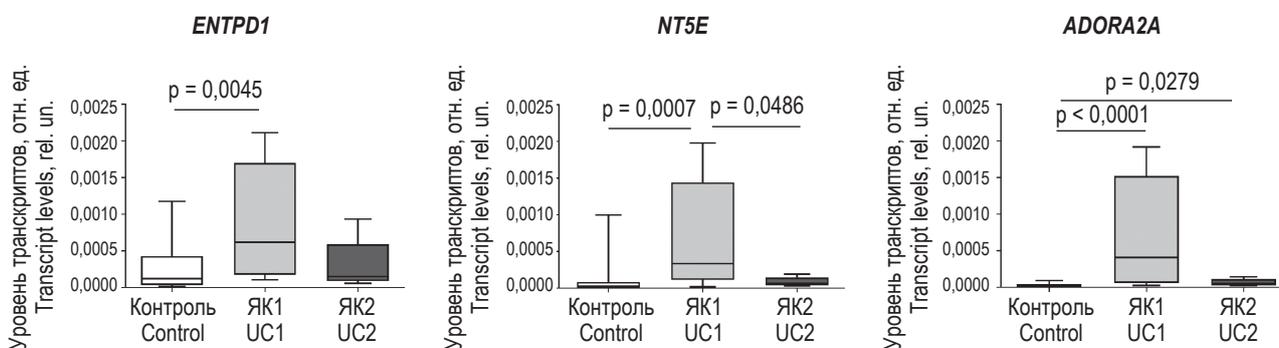


Рисунок 1. Уровень мРНК генов *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A* в ЛПК условно здоровых людей и больных ЯК

Figure 1. mRNA levels of the genes *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A* in PBL of healthy people and patients with UC

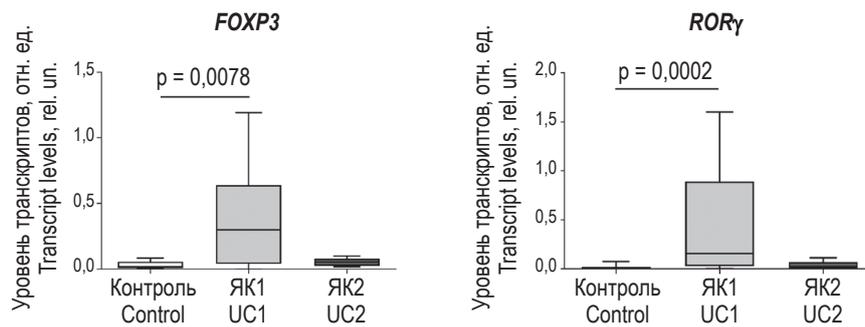


Рисунок 2. Уровень мРНК генов *FOXP3* и *RORγ* в ЛПК условно здоровых людей и больных ЯК

Figure 2. mRNA levels of the *FOXP3* and *RORγ* genes in PBL of healthy people and patients with UC

в ЛПК пациентов из группы ЯК2 ($p = 0,0289$) и контрольной группой условно здоровых людей ($p < 0,001$) (рис. 1).

В ЛПК индивидов группы ЯК1 содержание мРНК гена *FOXP3* было выше, чем у контрольной группы ($p = 0,0093$) (рис. 2). Выявлены различия уровня экспрессии гена *RORγ* в ЛПК пациентов в группе ЯК1 и пациентов из группы ЯК2 ($p = 0,0005$). Как оказалось, содержание мРНК этого гена было выше у пациентов с ЯК при сравнении со здоровыми людьми. Соотношение уровня мРНК генов *RORγ* и *FOXP3* ($RORγ/FOXP3$) между группами исследования не различалось: при сравнении групп ЯК1 и ЯК2 с контрольной группой ($p = 0,4000$); при сравнении групп ЯК1 и ЯК2 ($p = 0,8000$).

Проведен ранговый корреляционный анализ по Спирмену. В контрольной группе выявлена корреляция уровня экспрессии генов *FOXP3* и *RORγ* ($r = 0,5973$, $p = 0,0254$), *RORγ* и *NT5E* ($r = 0,5987$, $p = 0,0251$), *RORγ* и *ADORA2A* ($r = 0,6005$, $p = 0,0264$), *ENTPD1* и *NT5E* ($r = 0,7036$, $p = 0,0085$), *ENTPD1* и *ADORA2A* ($r = 0,7321$, $p = 0,062$). В группе пациентов ЯК1, выявлена тесная связь по шкале Чеддока уровня мРНК гена *RORγ* с уровнем мРНК гена *NT5E* ($r = 0,7590$, $p = 0,0446$).

Обсуждение

Патология ЯК связана с хроническим воспалением и чрезмерным иммунным ответом на резидентную микробиоту и/или пищевые антигены. Клетки врожденного и адаптивного иммунного ответа играют важную роль в развитии заболевания. В последнее время особое внимание уделяется балансу провоспалительных $RORγ^+Th17$ и противовоспалительных $FoxP3^+Treg$ -клеток в регуляции воспаления.

Как показано в нашем исследовании, в ЛПК больных ЯК, находящихся на базисной терапии производными 5-АСК, наблюдалось повышение

уровня экспрессии генов *FOXP3* и *RORγ*, представляющих собой транскрипционные факторы Treg- и Th17-клеток соответственно. Однако в нашем исследовании различий в соотношении уровня транскриптов этих генов в ЛПК больных и здоровых людей не выявлено, хотя, согласно данным литературы, у больных ВЗК происходит изменение баланса Th17/Treg-клеток [17].

Представленные данные свидетельствуют об активации Т-клеточного звена адаптивного иммунитета у больных ЯК и коррелируют с результатами других исследований. Так, повышение уровня экспрессии гена *RORγ*, а также увеличение количества Th17-клеток и продукции IL-17 наблюдается в периферической крови и в собственной пластинке слизистой толстой кишки у пациентов с ЯК, а также у мышей с экспериментально вызванным ЯК [9, 16]. Отмечается повышение количества Treg-клеток в слизистой толстой кишки пациентов с ЯК и у мышей с экспериментально вызванным заболеванием [13, 27]. Причем этот показатель у больных людей положительно коррелировал с активностью заболевания и уровнем С-реактивного белка в сыворотке [13]. Однако сведения об экспрессии *FOXP3* и количестве Treg-клеток в периферической крови при ЯК противоречивые. Показано, что в периферической крови, брыжеечных лимфатических узлах, собственной пластинке слизистой толстой кишки мышей с экспериментально вызванным ЯК количество Treg-клеток было увеличено, тогда как уровни мРНК *FoxP3* и *IL10* уменьшались [19, 27]. У молодых пациентов с ЯК количество циркулирующих и кишечных Treg-клеток было значительно выше, чем у индивидов из контрольной группы [23]. Более того, у больных людей уровень Treg-клеток в кишечнике был значительно выше, чем циркулирующих Treg [23]. Другие авторы отмечают снижение пула Treg-клеток в периферической крови при ЯК [14]. Эти противоречия, а также парадоксальный эффект повышения количества Treg-клеток в слизистой

толстой кишки при ЯК отчасти можно объяснить значительной гетерогенностью популяции FoxP3⁺T-клеток, которые могут включать в себя покоящиеся или не супрессорные T-клетки [16, 19]. Возможно, обнаруженный нами более высокий уровень экспрессии *FOXP3* в ЛПК больных ЯК обусловлен повышением количества активированных эффекторных T-клеток, которые могут временно экспрессировать FoxP3 и не обладать супрессорной способностью.

В литературе имеются данные о том, что противовоспалительная терапия, в частности анти-TNF α , быстро увеличивает содержание функциональных FoxP3⁺Treg в крови и усиливает их супрессорную функцию [5, 12]. Как обнаружено в нашем исследовании, у пациентов с ЯК, принимающих преднизолон (ЯК2), уровень транскриптов генов *FOXP3* и *ROR γ* не отличается от этих показателей у контрольной группы, что, вероятно, свидетельствует о большей эффективности данной терапии в отношении активности T-клеток по сравнению с группой пациентов с ЯК, находящихся на базисной терапии производными 5-АСК (ЯК1).

Чрезмерная иммунная активация при ВЗК приводит к тканевому повреждению, что способствует высвобождению АТФ в межклеточное пространство и накоплению внеклеточного аденозина [2, 25], который обладает иммуносупрессорным эффектом. В связи с этим в работе было исследовано содержание транскриптов генов эктонуклеотидаз *ENTPD1*, *NT5E* и аденозинового рецептора *ADORA2A* в ЛПК пациентов с ЯК. Показано, что у лиц, находящихся на базисной терапии производными 5-АСК, содержание транскриптов генов *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A* было выше, чем в ЛПК здоровых людей и больных, принимающих преднизолон. Повышение уровня мРНК генов CD39/CD73/A2AR сигнального пути свидетельствует об активации метаболизма аденозина, что согласуется с данными литературы о высоком по сравнению с нормой содержании аденозина в плазме больных ЯК [2, 10]. Обнаруженная нами тесная корреляция экспрессии генов *ENTPD1* и *NT5E*, *ENTPD1* и *ADORA2A* в ЛПК здоровых людей свидетельствует об их взаимной связи в нормальных физиологических условиях.

Эктонуклеотидазы CD39 и CD73 экспрессируются многими типами клеток. Экспрессия CD39 характеризует иммуносупрессорные Treg-клетки, к которым также относят и FoxP3⁺ROR γ ⁺supTh17 клетки, которые обнаруживают в большом количестве в слизистой кишечника [17]. Разнообразие супрессорных T-клеток в барьерных тканях необходимо для поддержания иммунологической толерантности, в частности к пищевым антигенам и антигенам микрофлоры.

Экспериментальные исследования на мышинных моделях демонстрируют защитную роль сверхэкспрессии *ENTPD1* [6, 24]. У больных ВЗК отмечается сниженное количество supTh17-клеток во фракции мононуклеаров периферической крови и в собственной пластинке слизистой кишечника, а также CD39-экспрессирующих CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}FoxP3⁺Treg-клеток на периферии [12, 17]. Кроме того, исследование Libera и соавт. [15] показало снижение количества еще одной защитной популяции клеток – CD39⁺ γ δ T-клеток у больных с ВЗК. С другой стороны, при ВЗК отмечено увеличение других CD39⁺ клеток. Так, в собственной пластинке кишечника пациентов с ВЗК количество CD39⁺ клеток в популяции FoxP3⁺T-лимфоцитов оказалось выше, чем у здоровых людей [18]. Число активированных CD4⁺Th и цитотоксических CD8⁺T-клеток положительно коррелировало у больных ВЗК [15]. Наши данные не выявили связи уровня мРНК генов *ENTPD1* с *FOXP3* и *ROR γ* , что свидетельствует о большем вкладе в экспрессию *ENTPD1* других клеточных популяций ЛПК.

Согласно данным литературы, повышенная экспрессия гена *NT5E* и увеличение количества CD73⁺ клеток при ЯК наблюдается как в периферической крови, так и в тканях кишечника [8]. Однако усиление экспрессии CD73 часто связывают с негативным эффектом при ВЗК. Блокада CD73 ингибирует экспрессию провоспалительных цитокинов, но способствует выработке противовоспалительных цитокинов в макрофагах [26]. *In vivo* блокада CD73 заметно облегчала колит, вызванный DSS, у мышей, что характеризовалось снижением потери веса, снижением частоты диареи и уменьшением количества кровавого стула [26]. Периферические CD73⁺CD4⁺T-клетки при ВЗК были обогащены IL-17A-продуцирующими клетками [8]. Вероятно, повышенный уровень CD73 при ЯК характерен для провоспалительных T-клеток, о чем также свидетельствует выявленная в нашем исследовании тесная связь между уровнем транскриптов гена *NT5E* и гена *ROR γ* .

Заключение

Таким образом, повышение транскрипционной активности генов *FOXP3* и *ROR γ* , кодирующих маркеры T-регуляторных лимфоцитов и эффекторных Th17-клеток у больных ЯК, свидетельствует о том, что патологический процесс при ЯК сопровождается изменением экспрессии этих генов. Кроме этого, показано, что при ЯК происходит активация CD39/CD73/A2AR сигнального пути, что согласуется с наблюдаемой нами повышенной экспрессией генов эктонуклеотидаз *ENTPD1*, *NT5E* и рецептора аденозина *ADORA2A* у больных, находящихся на базисной терапии производными 5-АСК.

Список литературы / References

1. Язвенный колит: клинические рекомендации. Утверждены Минздравом РФ. 2020. 56 с. Режим доступа: http://disuria.ru/_ld/9/988_kr20K51mz.pdf. [Clinical guidelines. Ulcerative colitis. Approved by the Ministry of Health of the Russian Federation]. 2020. 56 p. Available at: http://disuria.ru/_ld/9/988_kr20K51mz.pdf.
2. Beyazit Y., Koklu S., Tas A., Purnak T., Sayilir A., Kurt M., Turhan T., Celik T., Suvak B., Torun S., Akbal E. Serum adenosine deaminase activity as a predictor of disease severity in ulcerative colitis. *J. Crohns Colitis*, 2012, Vol. 6, no. 1, pp. 102-107.
3. Bono M.R., Fernández D., Flores-Santibáñez F., Roseblatt M., Sauma D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett.*, 2015, Vol. 589, no. 22, pp. 3454-3460.
4. Borg N., Alter C., Gördt N., Jacoby C., Ding Z., Steckel B., Quast C., Bönner F., Friebe D., Temme S., Flögel U., Schrader J. CD73 on T cells orchestrates cardiac wound healing after myocardial infarction by purinergic metabolic reprogramming. *Circulation*, 2017, Vol. 136, no. 3, pp. 297-313.
5. Boschetti G., Nancey S., Sardi F., Roblin X., Flourié B., Kaiserlian D. Therapy with anti-TNF α antibody enhances number and function of Foxp3⁺ regulatory T cells in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2011, Vol. 17, no. 1, pp. 160-170.
6. Crittenden S., Cheyne A., Adams A., Forster T., Robb C.T., Felton J., Ho G., Ruckerl D., Rossi A.G., Anderton S.M., Ghazal P., Satsangi J., Howie S.E., Yao C. Purine metabolism controls innate lymphoid cell function and protects against intestinal injury. *Immunol. Cell Biol.*, 2018, Vol. 96, no. 10, pp. 1049-1059.
7. Csóka B., Himer L., Selmezy Z., Vizi E.S., Pacher P., Ledent C., Deitch E.A., Spolarics Z., Németh Z.H. Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J.*, Vol. 22, no. 10, pp. 3491-3499.
8. Doherty G.A., Bai A., Hanidziar D., Longhi M.S., Lawlor G.O., Putheti P., Csizmadia E., Nowak M., Cheifetz A.S., Moss A.C., Robson S.C. CD73 is a phenotypic marker of effector memory Th17 cells in inflammatory bowel disease. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 11, pp. 3062-3072.
9. Dong Z., Du L., Xu X., Yang Y., Wang H., Qu A., Qu X., Wang C. Aberrant expression of circulating Th17, Th1 and Tc1 cells in patients with active and inactive ulcerative colitis. *Int. J. Mol. Med.*, 2013, Vol. 31, no. 4, pp. 989-997.
10. Ercan G., Yigitturk G., Erbas O. Therapeutic effect of adenosine on experimentally induced acute ulcerative colitis model in rats. *Acta Cir. Bras.*, 2019, Vol. 34, no. 12, e2019012043. doi: 10.1590/s0102-865020190120000004.
11. Fredholm B.B., IJzerman A.P., Jacobson K.A., Linden J., Müller C.E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors – An Update. *Pharmacol. Rev.*, 2011, Vol. 63, no. 1, pp. 1-34.
12. Gibson D.J., Elliott L., McDermott E., Tosetto M., Keegan D., Byrne K., Martin S.T., Rispens T., Cullen G., Mulcahy H.E., Cheifetz A.S., Moss A.C., Robson S.C., Doherty G.A., Ryan E.J. Heightened expression of CD39 by regulatory T lymphocytes is associated with therapeutic remission in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2015, Vol. 21, no. 12, pp. 2806-2814.
13. Holmén N., Lundgren A., Lundin S., Bergin A.M., Rudin A., Sjövall H., Ohman L. Functional CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2006, Vol. 12, no. 6, pp. 447-456.
14. Kulkarni N., Meitei H.T., Sonar S.A., Sharma P.K., Mujeeb V.R., Srivastava S., Boppana R., Lal G. CCR6 signaling inhibits suppressor function of induced-Treg during gut inflammation. *J. Autoimm.*, 2018, Vol. 88, pp. 121-130.
15. Libera J., Wittner M., Kantowski M., Woost R., Eberhard J.M., de Heer J., Reher D., Huber S., Haag F., zur Wiesch J.S. Decreased Frequency of Intestinal CD39⁺ $\gamma\delta$ ⁺ T Cells With Tissue-Resident Memory Phenotype in Inflammatory Bowel Disease. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 567472. doi:10.3389/fimmu.2020.567472.
16. Long Y., Zhao X., Xia C., Li X., Fan C., Liu C., Wang C. Upregulated IL-17A secretion and CCR6 co-expression in Treg subsets are related to the imbalance of Treg/Th17 cells in active UC patients. *Scand. J. Immunol.*, 2020, Vol. 9, no. 2, e87956. doi:10.1111/sji.12842.
17. Longhi M.S., Moss A., Bai A., Wu Y., Huang H., Cheifetz A., Quintana F.J., Robson S.C. Characterization of Human CD39⁺ Th17 cells with suppressor activity and modulation in inflammatory bowel disease. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 2, e87956. doi: 10.1371/journal.pone.0087956.
18. Lord J.D., Shows D.M., Chen J., Thirlby R.C. Human blood and mucosal regulatory T cells express activation markers and inhibitory receptors in inflammatory bowel disease. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 8, e0136485. doi: 10.1371/journal.pone.0136485.
19. Ma H., Gao W., Sun X., Wang W. STAT5 and TET2 cooperate to regulate FOXP3-TSDR demethylation in CD4⁺ T cells of patients with colorectal cancer. *J. Immunol. Res.*, 2018, Vol. 2018, 6985031. doi: 10.1155/2018/6985031.
20. Ohta A., Ohta A., Madasu M., Kini R., Subramanian M., Goel N., Sitkovsky M. A2A adenosine receptor may allow expansion of T cells lacking effector functions in extracellular adenosine-rich microenvironments. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 9, pp. 5487-5493.
21. Pacini E.S.A., Satori N.A., Jackson E.K., Godinho R.O. Extracellular cAMP-adenosine pathway signaling: a potential therapeutic target in chronic inflammatory airway diseases. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 866097. doi: 10.3389/fimmu.2022.866097.

22. Padoan A., Musso G., Contran N., Basso D. Inflammation, autoinflammation and autoimmunity in inflammatory bowel diseases. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2023, Vol. 45, no. 7, pp. 5534-5557.
23. Sznurkowska K., Luty J., Bryl E., Witkowski J.M., Hermann-Okoniewska B., Landowski P., Kosek M., Szlagatys-Sidorkiewicz A. Enhancement of circulating and intestinal T regulatory Cells and their expression of helios and neuropilin-1 in children with inflammatory bowel disease. *J. Inflamm. Res.*, 2020, Vol. 13, pp. 995-1005.
24. Vuerich M., Mukherjee S., Robson S.C., Longhi M.S. Control of Gut Inflammation by Modulation of Purinergic Signaling. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 11, 1882. doi: 10.3389/fimmu.2020.01882.
25. Wan P., Liu X., Xiong Y., Ren Y., Chen J., Lu N., Guo Y., Bai A. Extracellular ATP mediates inflammatory responses in colitis via P2 × 7 receptor signaling. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 19108. doi: 10.1038/srep19108.
26. Wang R., Wang Y., Wu C., Jin G., Zhu F., Yang Y., Wang Y., Zhou G. CD73 blockade alleviates intestinal inflammatory responses by regulating macrophage differentiation in ulcerative colitis. *Exp. Ther. Med.*, 2023, Vol. 25, no. 6, 272. doi: 10.3892/etm.2023.11972.
27. Yu Q.T., Saruta M., Avanesyan A., Fleshner P.R., Banham A.H., Papadakis K.A. Expression and functional characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2007, Vol. 13, no. 2, pp. 191-199.

Авторы:

Аторин Д.А. — аспирант, стажер-исследователь лаборатории генетики, ИБ КарНЦ РАН; Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук»», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Жулай Г.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории генетики, Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук»», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Топчиева Л.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории генетики, Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук»», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Authors:

Atorin D.A., Postgraduate Student, Research Assistant, Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Zhulai G.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Topchieva L.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Курбатова И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генетики, Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр “Карельский научный центр Российской академии наук”», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Дуданова О.П. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой пропедевтики внутренних болезней и гигиены Медицинского института ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Kurbatova I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Dudanova O.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Propaedeutics of Internal Diseases and Hygiene, Institute of Medicine, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Поступила 25.03.2024

Отправлена на доработку 22.05.2024

Принята к печати 14.09.2024

Received 25.03.2024

Revision received 22.05.2024

Accepted 14.09.2024