

**ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА $\gamma\delta$ T-ЛИМФОЦИТОВ
У ПАЦИЕНТОВ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА**
 **$\gamma\delta$ T-LYMPHOCYTES PHENOTYPE
IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES**

**Д. Цеханович^{1,2}, А. Старостин³, О. Дыбов³, Д. Нижегородова^{1,2,3}
D. Tsekhonovich^{1,2}, A. Starastsin³, A. Dybau³, D. Nizheharodava^{1,2,3}**

¹Белорусский государственный университет, БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

²Учреждение образования «Международный государственный экологический институт
имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
kaf_immunal@iseu.by

³Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск, Республика Беларусь

¹Belarusian State University, BSU, Minsk, Republic of Belarus

²International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU
Minsk, Republic of Belarus

³Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

Роль $\gamma\delta$ T-клеток в воспалительных заболеваниях кишечника до сих пор полностью не изучена: с одной стороны, считается, что они участвуют в дисрегуляции иммунного ответа на комменсальные бактерии желудочно-кишечного тракта у генетически восприимчивых индивидуумов, а, с другой стороны, $\gamma\delta$ T-клетки могут инициировать репарацию повреждения эпителия кишечника и проявлять иммунорегуляторное действие. В данном исследовании охарактеризован субпопуляционный состав Т-лимфоцитов ($\alpha\beta$ T-клетки, $\gamma\delta$ T-клетки) и экспрессия функциональных молекул (TLR4+, CD314+, CD8+, CD45RO+) на циркулирующих $\gamma\delta$ T-клетках у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника. Показано повышение $\gamma\delta$ T-клеток, преимущественно экспрессирующих цитотоксический профиль, наряду с истощением популяции $\gamma\delta$ T-клеток памяти в периферической крови у пациентов с болезнью Крона и язвенным колитом, что может являться отражением нарушения механизмов толерантности и результатом хронической стимуляции к аутоантигенам.

$\gamma\delta$ T-cells role in inflammatory bowel disease is still not fully investigated: on the one hand, they are thought to be involved in dysregulation of the immune response to gastrointestinal commensal bacteria in genetically susceptible individuals and, on the other hand, $\gamma\delta$ T-cells may initiate repair of damaged intestinal epithelium and exhibit immunoregulatory effects. The composition of T-lymphocytes subsets ($\alpha\beta$ T-cells, $\gamma\delta$ T-cells) and the expression of functional molecules (TLR4+, CD314+, CD8+, CD45RO+) on circulating $\gamma\delta$ T-cells in patients with inflammatory bowel disease were characterized in this study. An increase of $\gamma\delta$ T-cells numbers predominantly expressing a cytotoxic phenotype along with a depletion of $\gamma\delta$ T-cells memory population in peripheral blood of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis has been shown, what may reflect impaired tolerance mechanisms and results from chronic stimulation to autoantigens.

Ключевые слова: $\gamma\delta$ T-лимфоциты, аутоиммунное воспаление, болезнь Крона, язвенный колит, проточная цитометрия, фенотип.

Keywords: $\gamma\delta$ T-lymphocytes, autoimmune inflammation, Crohn's disease, ulcerative colitis, flow cytometry, phenotype.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2022-2-68-71>

Введение. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – это группа аутоиммунных заболеваний, которые характеризуются прогрессирующим хроническим воспалительно-деструктивным поражением желудочно-кишечного тракта. Выделяют два распространенных воспалительных заболеваний кишечника: язвенный колит (ЯК) – хроническое воспалительное заболевание слизистой оболочки толстого кишечника, возникающее в результате дисбаланса иммунной системы и сопровождающееся продукцией антител к собственному эпителию слизистой оболочки, и болезнь Крона (БК) – хроническое неспецифическое аутоиммунное гранулематозное воспаление желудочно-кишечного тракта, локализирующее почти во всех его отделах и характеризующееся большой выработкой цитотоксических цитокинов: интерферон гамма (IFN- γ), фактор некроза опухолей альфа (TNF- α) и интерлейкин 12 (IL-12) иммунокомпетентными клетками, в частности, субпопуляциями Т-клеток.

За последнее десятилетие механизмы, инициирующие и поддерживающие воспаление при ВЗК, остаются не до конца изученными, а методы лечения в большинстве случаев – симптоматические. Необходимость в улучшении диагностики и поиске новых патогенетических мишеней обусловлена растущей заболеваемостью ВЗК в мире за последние 30 лет, в том числе и Республике Беларусь, а также экономическими затратами, связанными с их терапией и улучшением качества жизни пациентов. Современная концепция этиологии ВЗК рассматривает роль инфекции (микобактерии, вирусы), токсинов, диеты в развитии аутоиммунного воспаления. Данные многих

авторов свидетельствуют в пользу иммунорегуляторной теории этиологии ВЗК, и генетической детерминированности иммунных расстройств [2]. Известно, что основную роль в инициации и усилении воспаления играет активация Т-клеток, среди которых особый интерес представляет популяция $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, циркулирующих в крови и локализирующихся также в периферических органах, в основном в эпителии, где они могут составлять до 40% слизистой оболочки кишечника. Исключительная пластичность и иммунорегуляторные свойства делают их ключевыми клетками на первой линии защиты от инфекций и при заживлении ран.

$\gamma\delta$ Т-лимфоциты имеют цитотоксический потенциал, реагируют на IL-2, продуцируя IFN- γ и TNF- α , что предполагает их роль в уничтожении инфицированных клеток, опухолевых клеток или стресс-модифицированных в результате воспалительной реакции. При этом для $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов характерна как прямая цитотоксичность, при которой они вступают в контакт с клеткой-мишенью, так и опосредованная – за счет активации других иммунных клеток. $\gamma\delta$ Т-клетки способны, подобно антиген-презентирующим клеткам, распознавать аутоантигены, что подчеркивает их исключительную роль в механизме повреждения тканей при БК. Наряду с этим повышенная способность $\gamma\delta$ Т-клеток к распознаванию специфических антинейтрофильных цитоплазматических антител при ЯК способствует дополнительной стимуляции IL-5 Т-хелперами 2 типа, что обуславливает избыточную регенерацию эпителия.

Непрерывная стимуляция на аутоантигены ведет к хроническому истощению клеток памяти. В результате идет процесс нарушения толерантности к собственным антигенам, что подтверждается избыточной экспрессией $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами TLR4+ рецептора, способного связывать антигены грамотрицательных бактерий или эндогенные молекулы, образующиеся в результате повреждения тканей. Однако, несмотря на многочисленные исследования $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов у экспериментальных животных и человека, их клиническое значение до сих пор полностью не установлено, что и определяет актуальность данного исследования.

Материалы и методы исследования. Периферическая венозная кровь получена у пациентов с БК (n = 25) и ЯК (n=10), а также здоровых доноров (n=20), характеристика которых представлена в таблице 1. Диагнозы подтверждены морфологическим исследованием биопсийного материала.

Таблица 1 – Характеристика исследуемых групп

Группы	Количество, n	Пол, М/Ж	Возраст, года
Пациенты с ЯК	10	5/5	51,0 [22,0 ÷ 47,5]
Пациенты с БК	25	21/4	30,0 [21,0 ÷ 47,0]
Доноры	20	10/9	40,0 [36,0÷45,0]

Имунофенотипирование выполняли методом проточной цитометрии. Выявление и анализ кластеров дифференцировки (CD-антигенов) производился с помощью конъюгированных с флуорохромами моноклональных антител путем детекции флуоресцентного сигнала проточным цитофлуориметром Cytoflex (Beckman Coulter, США). Для имунофенотипирования в пробирку добавляли 2×10^5 клеток и 10 мкл моноклональных антител: CD3-FITC, CD314-PE, CD45RO-ECD, CD8-PC5, TLR4-APC, TCR $\gamma\delta$ -PC7 (Beckman Coulter, США) и инкубировали в течении 15 минут в темном месте при температуре 18–25 °С. Для последующего лизирования эритроцитов использовали раствор VersaLyse (Beckman Coulter, США). Регистрацию результатов выполняли на проточном цитометре на 1000 $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов.

Анализ данных проводили в программе CytExpert (Beckman Coulter, США). Для отделения дуплетов (клеточных конгломератов) использовали двухпараметрическую гистограмму FS-Area против FS-Height (рис. 1А). На точечном графике зависимости CD45-KRO от SSC, выделили гейт лимфоцитов (рис. 1В), среди которого построили гистограмму CD3-AA750 и выделили область CD3+Т-клеток (рис. 1С), а затем создали точечный график $\alpha\beta$ TCR-PE и $\gamma\delta$ TCR-FITC, с выделением CD3+Т-клеточных субпопуляций: $\alpha\beta$ Т-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки (рис. 1D). В последствии экспрессию функциональных молекул (TLR4+, CD314+, CD8+, CD45RO+) оценивали среди гейта $\gamma\delta$ Т-клеток. Результаты представляли в виде медианы и 25-го и 75-го перцентилей. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 8.0.

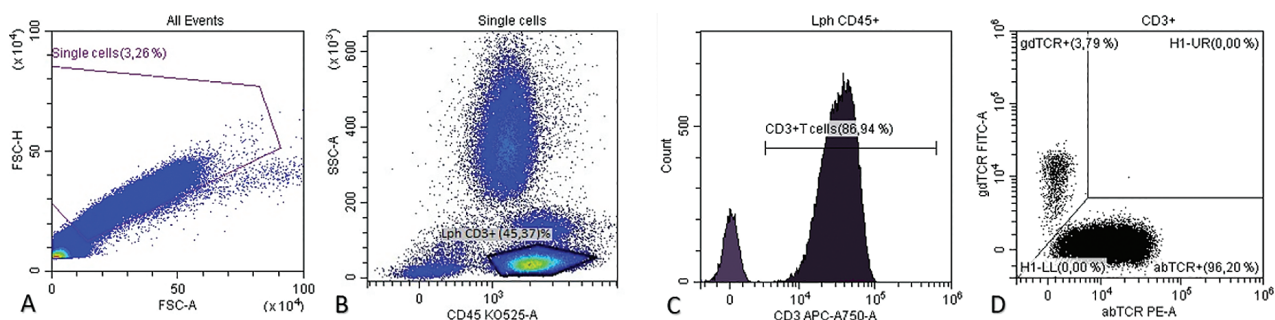


Рисунок 1 – Имунофенотипирование Т-лимфоцитов методом проточной цитометрии:
А – область лейкоцитов, В – гейт лимфоцитов, С – область CD3+Т-клеток, D – $\alpha\beta$ Т-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки

Результаты и обсуждение. Для определения количественного содержания субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с ЯК и БК, а также у здоровых доноров, исследованы следующие субпопуляции лимфоцитов: CD3+Т-клетки, $\alpha\beta$ Т-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика субпопуляций Т-лимфоцитов в исследуемых группах

Т-лимфоциты	Язвенный колит	Болезнь Крона	Доноры	p
	1	2	3	
CD3+Т-клетки, %	76,81 [62,0÷82,8]	75,38 [64,4÷82,7]	70,58 [67,2÷76,8]	$p_{1-3}=0,4$ $p_{2-3}=0,6$
$\alpha\beta$ Т-клетки, %	95,0 [88,9÷96,8]	94,7 [88,1÷97,5]	97,4 [94,4÷98,0]	$p_{1-3}=0,4$ $p_{2-3}=0,9$
$\gamma\delta$ Т-клетки, %	6,54 [3,47÷11,7]	5,23 [2,5÷11,9]	2,86 [2,0÷5,6]	$p_{1-3}=0,05$ $p_{2-3}=0,02$

Показано, что относительное количество Т-лимфоцитов достоверно не отличалось у пациентов с ВЗК по сравнению с контрольной группой. Исследование субпопуляций Т-клеток на основе типа экспрессии Т-клеточного рецептора ($\alpha\beta$ Т-клетки или $\gamma\delta$ Т-клетки) выявило статистически значимое увеличение количества $\gamma\delta$ Т-клеток у пациентов с ЯК и БК по сравнению с контрольной группой (табл. 2), что предполагает вовлечение $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в иммунопатогенез ВЗК и характеризует нарушение нормальное распределение Т-лимфоцитов. Данные результаты согласуются с литературными данными Kadivar M. и соавт., которые в том числе продемонстрировали, что повышенная концентрация $\gamma\delta$ Т-клеток в слизистой оболочке ведет к воспалительной активации и срыву толерантности к нормальной микрофлоре кишечника и развитию изъязвления стенки кишечника [1]. Другие авторы также описывают количественное изменение $\gamma\delta$ Т-клеток, что обеспечивается провоспалительными цитокинами (IL-1, 6, TNF- α , GM-CSF, IL-17), индуцирующими воспаление.

Поскольку $\gamma\delta$ Т-лимфоциты обладают свойствами клеток врожденного иммунитета, изучена экспрессия паттерн-распознающего рецептора TLR4+ у пациентов с ВЗК. TLR4+ представляет собой ключевой рецептор, распознающий как инфекционные, так и неинфекционные стимулы, вызывая провоспалительный ответ. Установлено повышение $\gamma\delta$ Т-клеток с TLR4+ в периферической крови пациентов с ЯК (21,01 (10,3÷37,9) %) и пациентов с БК (20,93 (16,4÷31,9) %) по сравнению со здоровыми донорами (9,04 (4,7÷26,6) %, $p<0,01$), что отражает иммунологическую активность врожденного клеточного иммунитета по отношению к внеклеточным антигенам, включая компоненты нормальной кишечной микробиоты (рис. 2). Опосредованное TLR4 воспаление, запускаемое экзогенными или эндогенными лигандами, играет ключевую роль в качестве триггера воспалительной реакции.

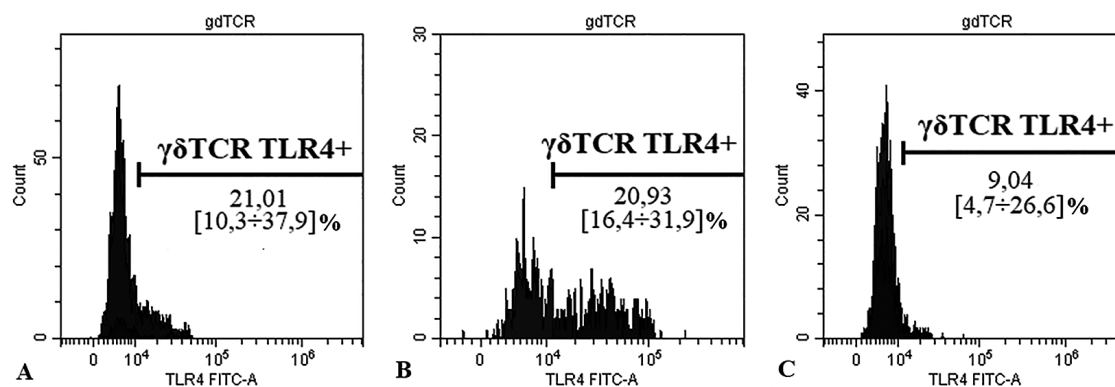


Рисунок 2 – Экспрессия $\gamma\delta$ Т-клеток с TLR4+ у пациентов с ЯК, БК и у здоровых доноров: А - ЯК, В - БК, С – Доноры

Для оценки цитотоксического функционального статуса $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов определяли экспрессию корцепторной молекулы CD8+ и киллерного рецептора NKG2D (CD314+). Количество CD314+ $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов повышалось в обеих группах (92,8 (89,8÷94,4) % и 91,4 (88,7÷93,4) % у пациентов с ЯК и БК, соответственно) относительно контрольной группы (84,9 (73,8÷90,2) %, $p<0,01$), тогда как экспрессия CD8+ (рис. 3) увеличивалась только у пациентов с ЯК (43,83 (32,8÷48,2) %) и статистически значимо не различалась у пациентов с БК (31,58 (18,5÷48,3) %) по сравнению с контролем (23,44 (18,9÷37,5) %, $p<0,05$). После активации антигеном цитотоксические клетки связываются с антигенами на поверхности клеток и разрушают их с помощью перфорин-гранзимового эффекторного механизма. Повышенная цитотоксичность приводит к нарушению жизнеспособности клетки, но не угнетает иммунный ответ, что отражает усиление иммунного надзора и возможные причины атрофии ворсинок и гиперплазии крипт.

Учитывая, что $\gamma\delta$ Т-клетки могут действовать как клетки адаптивного иммунитета, исследовано количество CD45RO+ $\gamma\delta$ Т-клеток памяти. Показано достоверное снижение процентного содержания клеток CD45RO+ $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов у пациентов с ЯК (21,32 (11,5÷50,0) %) и у пациентов с БК (19,77 (10,6÷55,6) %) по сравнению со здоровыми донорами (28,27 (21,0÷55,8) %, $p<0,01$), что указывает на дальнейшую дифференцировку эффекторных

клеток в терминально дифференцированные эффекторные клетки памяти, которые теряют экспрессию CD45RO+ и начинают реэкспрессировать CD45RA+ (рис. 4). Нарушения иммунологической памяти могут играть важную роль при ВЗК. Изменение фенотипического состава Т-клеток памяти может приводить к нарушению толерантности к собственным антигенам, что подтверждает наличие хронического воспалительного процесса в тканях кишечника, у пациентов с ВЗК.

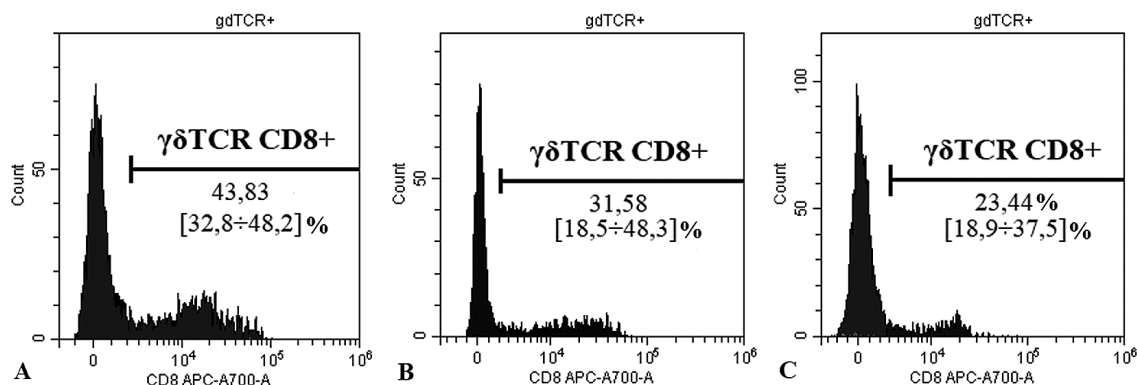


Рисунок 3 – Экспрессия $\gamma\delta\text{TCR}+\text{CD8}+$ у пациентов с ЯК, БК и у здоровых доноров: А - ЯК, В - БК, С - Доноры

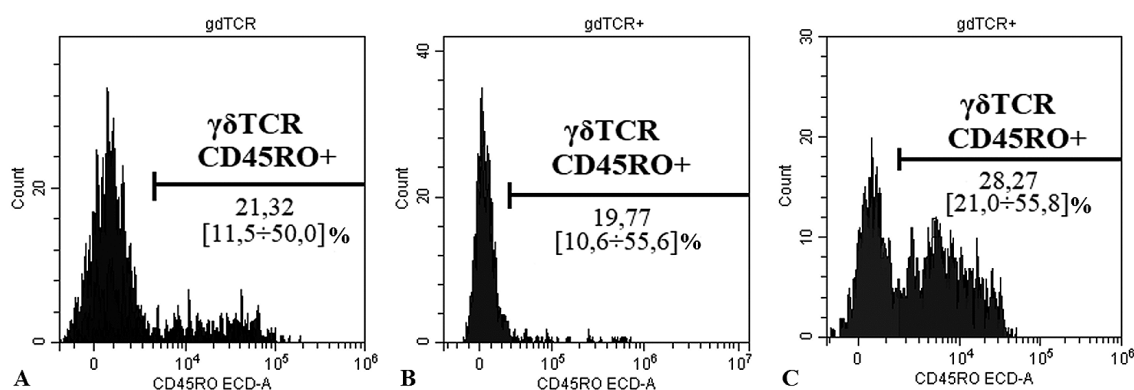


Рисунок 4 – Экспрессия $\gamma\delta\text{TCR}+\text{CD45RO}+$ у пациентов с ЯК, БК и у здоровых доноров: А – ЯК, В – БК, С – Доноры

Заключение. Таким образом, в периферической крови пациентов с БК и ЯК установлено стойкое увеличение количества $\gamma\delta\text{T}$ -лимфоцитов с усиленной экспрессией TLR4 и цитотоксическим профилем ($\text{CD314}+\text{CD8}+$), а также терминально дифференцированный фенотип эффекторных клеток памяти, что может являться одним из потенциальных механизмов повреждения слизистого барьера и воспаления кишечника, способствующих хроническим и системным реакциям на антигены микробиоты желудочно-кишечного тракта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kadivar, M. $\text{CD8}\alpha\beta^+\gamma\delta\text{T}$ Cells: A Novel T Cell Subset with a Potential Role in Inflammatory Bowel Disease / M. Kadivar; [et al.] // The Journal of Immunology. 2016. № 197. P. 4584–4592.
2. McCarthy, N. Human $\gamma\delta\text{T}$ -Cell Control of Mucosal immunity and inflammation / N. McCarthy [et al.] // Frontiers in Immunology. 2018. № 985.