

МЕДИЦИНСКАЯ ЭКОЛОГИЯ

MEDICAL ECOLOGY

УДК 616.34-002:612.112.94

СУБПОПУЛЯЦИИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ $\gamma\delta$ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

Д. Б. НИЖЕГОРОДОВА^{1), 2)}, Д. А. ЦЕХАНОВИЧ¹⁾, А. М. СТАРОСТИН²⁾,
О. Г. ДЫБОВ²⁾, А. В. ВОРОБЕЙ²⁾, М. М. ЗАФРАНСКАЯ^{1), 2)}

¹⁾Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова,
Белорусский государственный университет,
ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

²⁾Белорусская медицинская академия последипломного образования,
ул. Петруся Бровки, 3, корп. 3, 220023, г. Минск, Беларусь

Образец цитирования:

Нижегородова ДБ, Цеханович Да, Старостин АМ, Дыбов ОГ, Воробей АВ, Зафранская ММ. Субпопуляции циркулирующих $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*. 2022;4:79–88.
<https://doi.org/10.46646/2521-683X/2022-4-79-88>

Авторы:

Дарья Борисовна Нижегородова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры иммунологии¹⁾; ведущий научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий²⁾.

Дмитрий Александрович Цеханович – студент кафедры иммунологии.

Андрей Михайлович Старостин – аспирант кафедры хирургии.

Олег Геннадьевич Дыбов – аспирант кафедры хирургии.

Александр Владимирович Воробей – доктор медицинских наук, профессор; заведующий кафедрой хирургии.

Марина Михайловна Зафранская – доктор медицинских наук, доцент; заведующий кафедрой иммунологии¹⁾; главный научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий²⁾.

For citation:

Nizheharodava DB, Tsekhanovich DA, Starastsin AM, Dybau AG, Vorobei AV, Zafranskaya MM. Circulating $\gamma\delta$ T-lymphocytes subsets in patients with inflammatory bowel diseases. *Journal of the Belarusian State University. Ecology*. 2022;4:79–88. Russian.
<https://doi.org/10.46646/2521-683X/2022-4-79-88>

Authors:

Darya B. Nizheharodava, PhD (biology), docent; associate professor at the department of immunology^a; leading researcher at the department of immunology and biomedicine technology^b. nzh@tut.by

Dmitry A. Tsekhanovich, student at the department of immunology. dima29non@gmail.com

Andrey M. Starastsin, postgraduate student at the department of surgery. dept-surg@hotmail.com

Oleg G. Dybau, postgraduate student at the department of surgery. dept-surg@hotmail.com

Alexander V. Vorobei, doctor of science (medicine), full professor; head of the department of surgery. dept-surg@hotmail.com

Marina M. Zafranskaya, doctor of science (medicine), docent; head of the department of immunology^a; primary investigator at the department of immunology and biomedicine technology^b. zafranskaya@gmail.com

В связи с высоким ростом воспалительных заболеваний кишечника (болезнь Крона, язвенный колит) и на фоне неблагоприятных экологических факторов актуальным остаются исследования иммунопатогенетических механизмов, в том числе Т-клеточной природы, приводящих к повреждению желудочно-кишечного тракта. Особое значение представляют $\gamma\delta$ T-лимфоциты, роль которых в дисрегуляции звеньев врожденного и приобретенного иммунного ответа на комменсальныебактерии у генетически восприимчивых людей до сих пор полностью не изучена. В данном исследовании представлены количественные и функциональные показатели $\gamma\delta$ T-лимфоцитов у пациентов с болезнью Крона и язвенным колитом, свидетельствующие об усилении иммунологического надзора при воспалительных заболеваниях кишечника. В периферической крови пациентов выявлено повышение цитотоксического и активационного фенотипического профиля циркулирующих $\gamma\delta$ T-лимфоцитов, а также перераспределение их состава с выходом в циркуляцию преимущественно ткане-резидентных субпопуляций, что может являться ключевыми звенями в иммунопатогенезе болезни Крона и язвенного колита. Установленные корреляции с тяжестью заболеваний позволяют использовать фенотипические и функциональные особенности $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в качестве диагностических и прогностических маркеров развития аутоиммунного воспаления, при дифференциальной диагностике аутоиммунной патологии, а сами $\gamma\delta$ T-лимфоциты рассматривать как терапевтическую мишень при разработке новых протоколов патогенетической терапии воспалительных заболеваний кишечника.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника; аутоиммунная патология; экологический фактор; $\gamma\delta$ T-лимфоциты; проточная цитофлуориметрия.

CIRCULATING $\gamma\delta$ T-LYMPHOCYTES SUBSETS IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

D. B. NIZHEHARODAVA^{a,b}, D. A. TSEKHANOVICH^a, A. M. STARASTSIN^b,
A. G. DYBAU^b, A. V. VOROBEI^b, M. M. ZAFRANSKAYA^{a,b}

^aInternational Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University,
23/1 Daūhabrodskaja Street, Minsk 220070, Belarus

^bBelarusian Medical Academy of Postgraduate Education
3 Petrusia Broūki Street, 3 building, Minsk 220013, Belarus
Corresponding author: D. B. Nizheharodava (nzh@tut.by)

Due to the high growth of inflammatory bowel diseases (Crohn's disease and ulcerative colitis) with unfavorable environmental factors in the background, studies of immunopathogenetic mechanisms including T-cells response resulted in gastrointestinal tract damage are of immediate interest. $\gamma\delta$ T-lymphocytes are of particular importance as their role in the dysregulation of the innate and acquired immune response to commensal bacteria in genetically susceptible people has not yet been fully studied. This paper presents the quantitative and functional parameters of $\gamma\delta$ T-lymphocytes in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis, indicating an enhancement of immunological surveillance in inflammatory bowel diseases. The increase of the cytotoxic and activation phenotype expression in circulating $\gamma\delta$ T-lymphocytes as well as a redistribution of their composition with dominating of tissue-resident cells subsets were revealed in patients what may be key links in the immunopathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. The established correlations with the severity of diseases allow to consider the use of phenotypic and functional $\gamma\delta$ T-lymphocytes features as diagnostic and prognostic markers for the development of autoimmune inflammation as well as for a differential diagnosis of gut autoimmune pathology. While $\gamma\delta$ T-lymphocytes themselves can be used as a therapeutic target in the development of new protocols for the pathogenetic therapy of inflammatory bowel diseases.

Keywords: inflammatory bowel disease; autoimmune pathology; environmental factor; $\gamma\delta$ T-lymphocytes; flow cytometry.

Введение

За последнее десятилетие механизмы, инициирующие аутоиммунные реакции при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК), остаются не до конца исследованными, в связи с чем актуальным является расширение представлений об иммунопатогенезе ВЗК для улучшения их диагностики и терапии. Согласно классификации к ВЗК относят: болезнь Крона (БК) – идиопатическое хроническое воспалительное заболевание, при котором вовлекается любой отдел желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), и язвенный колит (ЯК) – хроническое воспалительное рецидивирующее заболевание толстой кишки с распространением поражения непрерывно от прямой кишки в проксимальном направлении [1]. Среди этиологических факторов ВЗК, наряду с генетической предрасположенностью, ярко выражена роль антропогенного воздействия, включающего влияние неблагоприятной окружающей среды, неправильное питание, длительный прием лекарственных препаратов, вредные привычки, высокий уровень психологического стресса,

нарушение состава микробиоты, инфекции ЖКТ, а также дисрегуляция иммунной системы [2]. При этом экологические факторы играют триггерную роль в инициации и поддержании воспалительной реакции, опосредованной Т-лимфоцитами, в том числе популяцией $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, циркулирующих в крови и преимущественно локализующихся в периферических лимфоидных органах, главным образом, в слизистой оболочке ЖКТ, которые обладают функциями клеток как врожденного, так и приобретенного иммунитета [3].

В связи с уникальной функциональной пластичностью и иммунорегуляторными свойствами $\gamma\delta$ Т-лимфоциты представляют собой первую линию защиты против инфекционных и опухолевых антигенов, а также участвуют в репарации ткани в ЖКТ посредством синтеза фактора роста кератиноцитов [4]. Показано, что для $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов характерен хоуминг в ЖКТ, особенно в условиях микробной стимуляции. В отличии от других ткане-резидентных лимфоцитов интестинальные $\gamma\delta$ Т-клетки способны мигрировать через кишечный эпителий и *lamina propria* посредством окклюдин-зависимого механизма [5] и вовлекаться в прогрессирование заболевания [6]. В ЖКТ $\gamma\delta$ Т-лимфоциты могут распознавать антигены как МНС-зависимым, так и МНС-независимым путем. При этом $\gamma\delta$ Т-лимфоциты активируются микробными антигенами (например, метаболитами изопренOIDного биосинтеза, образующиеся в большинстве грамм-негативных бактерий и некоторых грамм-позитивных бактерий), а также собственными антигенными структурами – фосфоантigenами (например, изопентенилпирофосфатом). Иммунорегуляторные функции $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в ЖКТ заключаются в переключении синтеза антител и поддержании продукции иммуноглобулина класса A (IgA), гомеостаза эпителия посредством взаимодействия с $\alpha\beta$ Т-лимфоцитами, эпителиальными клетками и клиренса некротических клеток, а также в участии формирования периферической толерантности за счет синтеза интерлейкина-10 (ИЛ-10). Кроме того, на экспериментальных моделях ВЗК продемонстрирована протективная роль $\gamma\delta$ Т-клеток, характеризующаяся лимитированием воспалительной реакции посредством синтеза противовоспалительных цитокинов, привлечением нейтрофилов в очаг воспаления, а также предотвращением транслокации инвазивных коменсальных и патогенных бактерий через эпителий ЖКТ за счет стимуляции синтеза antimикробных пептидов клетками Панета [7; 8].

Несмотря на то, что экспериментальные исследования подтверждают вовлечение $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в патогенез ВЗК, их клиническое значение до конца не выяснено. В связи с этим в последнее время актуальным стали исследования роли механизмов распознавания и эффекторных реакций врожденного звена иммунитета в инициации и поддержании иммуно-медиированного воспаления и повреждения ткани при ВЗК. В частности, рядом авторов продемонстрирована взаимосвязь развития ВЗК с изменением экспрессии паттерн-распознающих толл-подобных рецепторов (TLRs, toll-like receptors), которые играют фундаментальную роль в распознавании патогенных или стресс-индукцируемых молекул и инициации развития иммунного ответа для осуществления иммунологического надзора в организме, в том числе и ЖКТ. TLRs-медиированные сигнальные пути контролируют не только врожденный клеточный иммунный ответ, но также регулируют работу приобретенного иммунитета, например, активацию Т-лимфоцитов и определяют индивидуальный состав микробиоты ЖКТ. При этом изменения в экспрессии TLRs не только на миелоидных, но и на лимфоидных клетках врожденного иммунитета, в том числе на $\gamma\delta$ Т-лимфоцитах во многом может определять эффективность терапии заболевания [9]. Наряду с этим распознавание активационным рецептором цитотоксичности NKG2D (natural killer group 2 member D, CD314) своих лигандов приводит к функциональной активации интестинальных эффекторных Т-лимфоцитов, экспрессирующих $\gamma\delta$ Т-клеточный рецептор, предполагая их роль в модулировании иммунного ответа в ЖКТ и его дисрегуляции при развитии аутоиммунных и воспалительных заболеваний [10]. Однако фенотипические особенности $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, обладающих цитотоксическим потенциалом, до конца не установлены, как и закономерности формирования их пула клеток-памяти. Кроме того, единичные публикации свидетельствуют о способности $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов функционировать в качестве антиген-презентирующих клеток, процессируя при этом широкий спектр антигенов и праймируя другие лимфоидные клетки [11]. Таким образом, изменение активационного и функционального статуса $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, наряду с реакциями иных лимфоидных и миелоидных клеток, приводит к формированию абберантного иммунного ответа, который может играть решающую роль в развитии ВЗК.

В данной статье представлена характеристика субпопуляционного состава циркулирующих $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, их фенотипических и функциональных особенностей у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования явилась периферическая венозная кровь пациентов с ВЗК ($n = 37$): в исследование включены пациенты с БК и ЯК, которые находились на лечении в хирургическом отделении УЗ «Минская областная клиническая больница». Диагнозы «болезнь Крона» и «язвенный колит» верифицированы

на основании индекса активности БК (Crohn's disease activity index, CDAI) (0 – клиническая ремиссия, 1 – низкая активность, 2 – умеренная активность, 3 – высокая активность) и эндоскопической активности ЯК по балльной шкале Mayo Endoscopic Score (0 – ремиссия, 1 – минимальная активность, 2 – умеренная активность, 3 – выраженная активность) [12]. Группу сравнения составили здоровые доноры, сопоставимые по возрасту и полу (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, г. Минск, Республика Беларусь). Клинико-демографическая характеристика исследуемых групп представлена в табл. 1.

Таблица 1

Клинико-демографическая характеристика пациентов с ВЗК и группы сравнения, Me (25 ÷ 75 %)

Table 1

Clinical and demographic characteristics of patients with inflammatory bowel diseases and control group, Me (25 ÷ 75 %)

Группа	Количество, n	Возраст	Пол, м/ж
Пациенты с БК	27	29,0 [22,0÷40,0]	21/6
Пациенты с ЯК	10	38,5 [25,0÷47,5]	5/5
Здоровые доноры	30	36,0 [25,0÷44,0]	13/17

Метод проточной цитометрии. Субпопуляции Т-лимфоцитов определяли с применением панелей моноклональных антител CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5, CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5, $\gamma\delta$ TCR-FITC/ $\alpha\beta$ TCR-PE/HLA-DR-ECD/V δ 1TCR-PC7/V δ 2TCR-PB/CD3-APC-A750/CD45-KrO, TLR4-FITC, CD314-PE, CD56-PE, CD45RO-ECD, CD8-PC5, $\gamma\delta$ TCR-PC7 (Beckman Coulter, США) и проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для иммунофенотипирования 100 мкл цельной крови добавляли в пробирку с моноклональными антителами, перемешивали и инкубировали в течение 15 мин при температуре 18–25 °С. Эритроциты лизировали раствором VersaLyse (Beckman Coulter, США) в течение 10 мин. Результаты регистрировали на проточном цитометре на 1000 $\gamma\delta$ T-лимфоцитов.

Иммуноферментный анализ. Концентрацию общих иммуноглобулинов (Ig) класса M, G, A и E определяли в сыворотке крови исследуемых групп методом твердофазного иммуноферментного анализа согласно инструкции производителей с использованием коммерческих наборов «Иммуноскрин-G, M, A-ИФА-БЕСТ» (A-8674, Вектор-Бест, РФ) и «IgE общий-ИФА-БЕСТ» (A-8660, Вектор-Бест, РФ). Результаты регистрировали на иммуноферментном анализаторе «Thermo Fischer» (Германия) при $\lambda = 450$ нм с поправкой на $\lambda = 650$ нм.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных выполняли в программе STATISTICA 8.0. Сравнение независимых групп проводили с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни. Корреляционный анализ осуществляли с применением рангового коэффициента корреляции непараметрических данных Спирмена (R). За уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$ (*) и $p < 0,01$ (**).

Результаты исследования и их обсуждение

Количественная характеристика лимфоидных клеток у пациентов с ВЗК. Для характеристики лимфоидных клеток, циркулирующих в периферической крови пациентов с ВЗК и группы сравнения, исследовано количественное содержание следующих популяций: натуральных киллерных клеток (CD56⁺NK-клетки); CD19⁺В-лимфоцитов; CD3⁺Т-лимфоцитов и их основных субпопуляций, различающихся по экспрессии цепей Т-клеточного рецептора ($\alpha\beta$ T-клетки и $\gamma\delta$ T-клетки). Сравнительная характеристика относительного содержания популяций лимфоидных клеток в исследуемых группах представлена в табл. 2.

У пациентов с ВЗК отмечалось снижение количества NK-клеток ($p < 0,05$), вовлекающиеся в механизмы реализации врожденного неспецифического иммунитета, наряду с увеличением Т-лимфоцитов ($p < 0,05$), участвующих в формировании приобретенного специфического клеточного иммунитета, относительно группы сравнения. При этом как у пациентов с БК, так и ЯК общее количество Т-клеток статистически значимо повышалось, главным образом, за счет популяции лимфоцитов, экспрессирующих $\gamma\delta$ T-клеточный рецептор. В исследуемых группах ВЗК отсутствовали изменения в процентном содержании В-лимфоцитов, но при этом регистрировалось статистически значимое увеличение всех классов сывороточных иммуноглобулинов у пациентов с БК и повышение IgM, IgA, IgE – у пациентов с ЯК относительно группы сравнения (табл. 2).

Таблица 2

Иммунологические показатели периферической крови у пациентов с ВЗК и группы сравнения

Table 2

Immunological parameters in patients with inflammatory bowel disease and comparative group

Иммунологический показатель	Болезнь Крона	Язвенный колит	Группа сравнения	<i>p</i>
CD56 ⁺ NK-клетки, %	7,87 [4,97÷13,33]	7,22 [5,48÷11,82]	12,66 [10,97÷15,56]	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$
CD19 ⁺ B-клетки, %	7,17 [5,38÷12,25]	7,87 [6,22÷9,33]	8,94 [7,25÷12,79]	
CD3 ⁺ T-клетки, %	81,59 [68,29÷85,77]	86,00 [71,01÷86,79]	75,65 [68,90÷78,69]	$p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$
$\alpha\beta$ TCR ⁺ CD3 ⁺ T-клетки, %	72,51 [57,99÷79,46]	77,76 [65,30÷81,98]	70,69 [67,06÷75,65]	
$\gamma\delta$ TCR ⁺ CD3 ⁺ T-клетки, %	6,81 [2,59÷11,86]	6,31 [3,81÷11,12]	3,24 [2,16÷5,32]	$p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,01$
IgM, г/л	2,29 [1,69÷3,50]	2,14 [1,42÷2,68]	1,20 [0,68÷1,37]	$p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,01$
IgG, г/л	17,85 [11,98÷23,55]	13,71 [10,34÷17,69]	13,14 [9,81÷15,84]	$p_{1-3} < 0,05$
IgA, г/л	3,72 [3,05÷5,95]	3,91 [3,02÷4,77]	1,73 [1,30÷2,78]	$p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,01$
IgE, МЕ/л	25,67 [12,20÷42,93]	15,09 [11,68÷38,70]	5,75 [2,31÷18,41]	$p_{1-3} < 0,0001$ $p_{2-3} < 0,01$

Согласно литературным данным, ключевыми участниками патогенеза ВЗК являются Т-лимфоциты и их субпопуляции. Являясь регуляторами воспаления и гомеостаза, Т-клетки поддерживают иммунологическую толерантность в общем иммунологическом профиле слизистой оболочки кишечника, что сопровождается синтезом противовоспалительных цитокинов ИЛ-10 и трансформирующего фактора роста β . Однако при патологическом воздействии, патохимических и патофизиологических условиях происходит нарушение иммунорегуляторных механизмов. Т-клетки непосредственно участвуют в трансмуральном воспалении, инициируя патологический процесс с помощью выделяемых ими медиаторов воспаления и ряда таких эффекторных цитокинов, как γ -интерферон (γ ИФН) и фактора некроза опухоли α (ФНО α), которые запускают каскадные реакции, вовлекая другие иммунные клетки. Это ведет к развитию гиперстимуляции и аутоиммунной агрессии с преобладанием цитотоксического и провоспалительного микрокружения у пациентов с ВЗК [13].

На основе экспрессии типа Т-клеточного рецептора ($\alpha\beta$ Т- или $\gamma\delta$ Т-клеточный рецептор) все Т-лимфоциты разделяют на 2 популяции – классические и неклассические [3]. Если роль классических Т-лимфоцитов, экспрессирующих $\alpha\beta$ Т-клеточный рецептор, хорошо изучена в патогенезе ВЗК, то функциональные особенности, как и фенотипический состав неклассических $\gamma\delta$ Т-клеток, остаются предметом активных исследований. На сегодняшний день в литературе имеются противоречивые данные о вовлечение $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в аутоиммунный ответ при ВЗК. С одной стороны, на экспериментальных моделях животных и у пациентов с БК и ЯК выявлены изменения в нормальной микробиоте и/или повышение уровня провоспалительных цитокинов, которые могут способствовать активации эффекторных функций $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов и инициации каскада аутоиммунных реакций на уровне слизистой оболочки. Обладая специфическими характеристиками подвижности и повышенной экспрессией хемокинового рецептора CCR9, обеспечивающим миграцию в ЖКТ, активированные $\gamma\delta$ Т-клетки способны накапливаться в интестинальных лимфоидных структурах и поврежденной ткани слизистых оболочек пациентов с ВЗК, что коррелирует с тяжестью развития заболевания. С другой стороны, данная субпопуляция клеток вовлекается в регуляцию таких компонентов мукозальной иммунной системы, как продукция IgA, индукция пероральной толерантности, синтез фактора роста кератиноцитов, способствуя заживлению и репарации ткани ЖКТ [14; 15]. Таким образом, выявленные в нашем исследовании количественные изменения данной лимфоидной популяции согласуются с многими авторами, работы которых свидетельствуют о повышении

уровня $\gamma\delta$ T-лимфоцитов не только в циркуляции, но и в поврежденных участках тонкой и толстой кишки, их активации и накоплении в лимфоидной ткани пациентов с ВЗК [3; 16], что демонстрирует связь количества $\gamma\delta$ T-лимфоцитов с тяжестью аутоиммунного воспаления.

Субпопуляционный состав $\gamma\delta$ T-лимфоцитов у пациентов с ВЗК. $\gamma\delta$ T-лимфоциты являются гетерогенной популяцией, среди которой по экспрессии δ -цепи Т-клеточного рецептора выделяют субпопуляции $V\delta 1^+$, $V\delta 2^+$, $V\delta 3^+$ T-клеток, отличающиеся локализацией в организме и функциональными свойствами [17]. На рис. 1 представлены оригинальные цитограммы результатов проточной цитометрии субпопуляционного состава $\gamma\delta$ T-лимфоцитов у пациентов с БК (рис. 1 *a*), ЯК (рис. 1 *b*) и донора (рис. 1 *c*), которые отражают общую тенденцию распределения $V\delta 1^+$, $V\delta 2^+$, $V\delta 3^+$ T-клеток в исследуемых группах (рис. 1 *г*).

У пациентов с БК выявлено увеличение содержания $V\delta 1^+$ T-клеток в 2,1 раза, а у пациентов с ЯК установлено повышение процента $V\delta 1^+$ и $V\delta 3^+$ T-клеток, соответственно, в 2,3 и 3,4 раза наряду со статистически значимым снижением количества $V\delta 2^+$ T-клеток во всех группах ВЗК относительно группы сравнения (рис.1). Известно, что в норме, доминирующей субпопуляцией (> 70 %) среди циркулирующих в периферической крови $\gamma\delta$ T-лимфоцитов являются $V\delta 2^+$ T-клетки, которые в основном распознают фосфоантителы микробных или трансформированных клеток и обладают выраженной цитотоксичностью. В то время как $V\delta 1^+$ и $V\delta 3^+$ T-клетки преимущественно локализуются в эпителии ЖКТ, коже, селезенке, печени и распознают липид-презентирующие МНС-подобные молекулы семейства CD1 или стресс-индукционные молекулы, выполняя при этом преимущественно репаративную и регуляторную функции [11; 18].

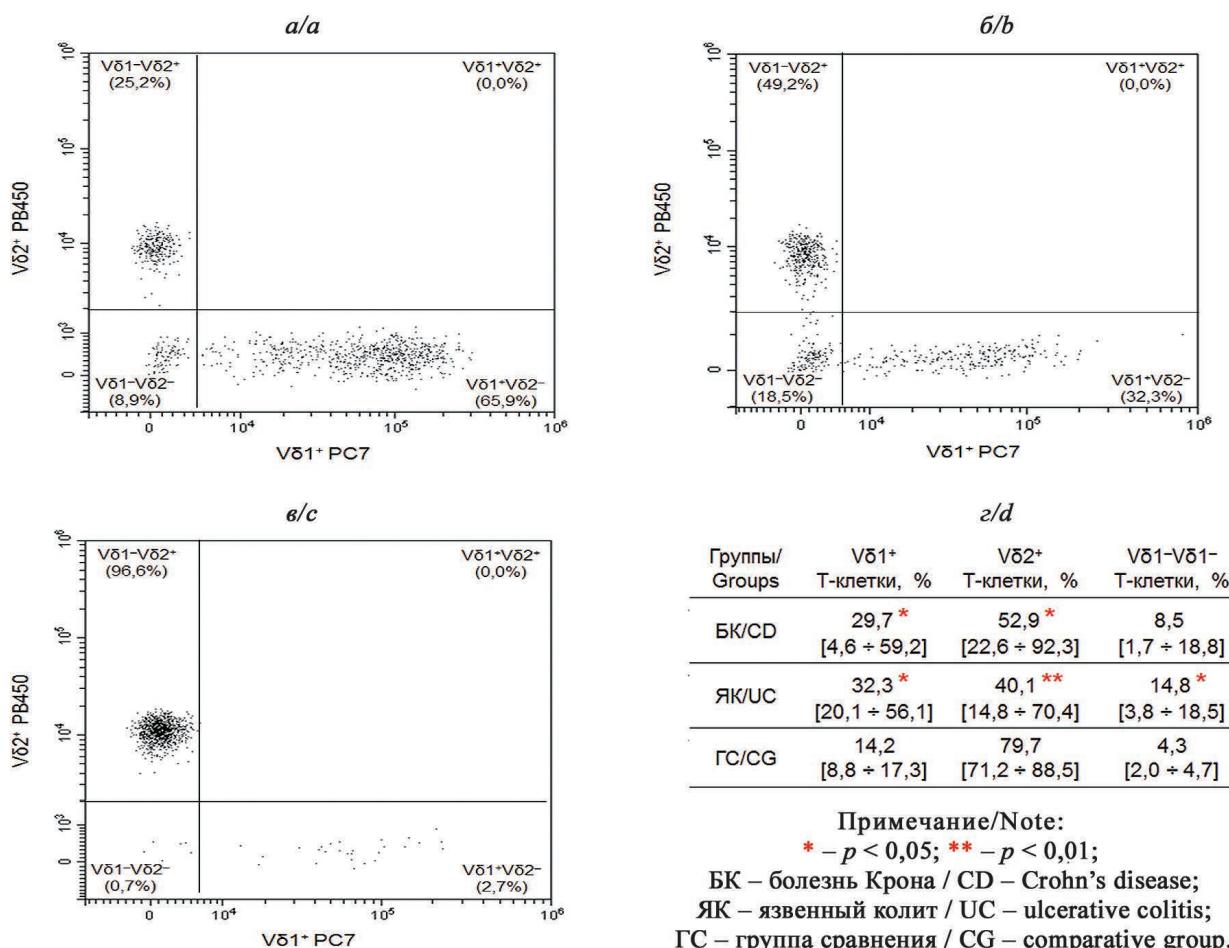


Рис. 1. Оригинальные цитограммы типичного распределения $V\delta 1^+$, $V\delta 2^+$, $V\delta 1-V\delta 2^-$ ($V\delta 3^+$) $\gamma\delta$ T-клеточных субпопуляций в исследуемых группах: *a* – пациент с болезнью Крона; *b* – пациент с язвенным колитом; *c* – здоровый донор; *г* – статистическая обработка количественного распределения субпопуляций $\gamma\delta$ T-лимфоцитов у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника относительно группы сравнения

Fig. 1. Original dot-plots of typical $V\delta 1^+$, $V\delta 2^+$, $V\delta 1-V\delta 2^-$ ($V\delta 3^+$) T-cells subsets distribution in investigated groups:
a – patient with Crohn's disease; *b* – patient with ulcerative colitis; *c* – healthy donor;
d – statistical analysis of $\gamma\delta$ T-cells subsets numbers in patients with inflammatory bowel disease as compared with healthy donors

Выявленные у пациентов с ВЗК изменения субпопуляционного состава $\gamma\delta$ T-лимфоцитов свидетельствуют о перераспределении V δ 2 $^+$ T-клетки предположительно в пораженные участки ткани, что может способствовать прогрессированию аутоиммунного воспаления в слизистых оболочках. Это подтверждается установленной корреляционной взаимосвязью: с уменьшением количества циркулирующих V δ 2 $^+$ T-клеток в периферической крови пациентов с БК увеличивается активность заболевания по индексу Беста ($R = 0,79$; $p < 0,05$). Наряду с этим у пациентов с ЯК с повышением количества V δ 1 $^+$ T-клеток увеличивалась степень эндоскопической активности заболевания по шкале Schroeder ($R = 0,68$; $p < 0,05$). Согласно литературным данным тканевые V δ 2 $^+$ T-клетки экспрессируют больше ФНО α у пациентов с ранним началом заболевания, а также ФНО α и ИЛ-17 – у пациентов с поздним началом и длительным течением ВЗК [19]. Кроме того, рядом авторов отмечается пролиферация V δ 1 $^+$ и V δ 3 $^+$ T-клеток в ответ на нормальную микробиоту кишечника в результате срыва механизма толерантности в организме [20]. В нашем исследовании установлено, что количество V δ 1 $^+$ T-клеток у пациентов с ВЗК по-разному коррелировало с уровнем сывороточного IgA: при БК отмечалась прямая корреляция ($R = 0,49$; $p < 0,05$), в то время как при ЯК наблюдалась обратная зависимость ($R = -0,68$; $p < 0,05$), что отражает различные механизмы участия данной субпопуляции в регуляции гуморального иммунитета слизистых оболочек. Принимая во внимание, что V δ 1 $^+$ и V δ 3 $^+$ T-клетки являются основным источником γ ИФН, можно заключить, что их перераспределение способствует не только инициации, но и поддержанию хронической воспалительной реакции аутоиммунной природы [21].

Экспрессия функциональных маркеров на $\gamma\delta$ T-лимфоцитах у пациентов с ВЗК. Для исследования роли $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в распознавании антигенов, инициации иммунного ответа и реализации эффекторных реакций на поздних стадиях развития аутоиммунного воспаления при ВЗК исследован функциональный фенотип клеток, включающий экспрессию паттерн-распознающего рецептора TLR4, антиген-презентирующей молекулы HLA-DR, рецептора естественной цитотоксичности CD314, адгезивной молекулы CD56 и ко-рецепторной молекулы CD8, характеризующие перфорин-гранзимовую цитотоксичность, а также CD45RO маркера клеток-памяти. На рис. 2 представлены результаты фенотипа $\gamma\delta$ T-лимфоцитов у пациентов с БК и ЯК по сравнению с контрольной группой.

У пациентов с ВЗК установлено увеличение экспрессии рецепторов врожденного иммунитета TLR4 и NKG2D на $\gamma\delta$ T-лимфоцитах относительно группы сравнения (рис. 2), что отражает их вовлечение в распознавание чужеродных структур и участие в первой линии иммунологической защиты [9; 10]. Многими авторами продемонстрирована повышенная экспрессия TLRs при ВЗК на большинстве интестинальных иммунных клетках, включая дендритные клетки и эпителиальные клетки [9], однако данные о $\gamma\delta$ T-лимфоцитах отсутствуют. Известно, что измененная экспрессия и постоянная стимуляция TLRs способствует продукции провоспалительных цитокинов, привлечению воспалительных клеток в ЖКТ и может являться одной из причин развития хронического воспаления в патогенезе аутоиммунных заболеваний ЖКТ [22]. В нашем исследовании уровень $\gamma\delta$ TCR $^+$ TLR4 $^+$ T-клеток в периферической крови коррелировал с тяжестью заболевания по индексу Беста у пациентов с БК ($R = 0,60$; $p < 0,05$). В свою очередь, повышение конститтивно экспрессирующегося активационного рецептора NKG2D (CD314) на $\gamma\delta$ T-лимфоцитах пациентов с ВЗК (рис. 2), распознающего клеточный стресс или повреждение, способствует усилиению таких эффекторных функций киллерных клеток, как цитотоксичность, продукция провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также поддерживает их пролиферацию и выживаемость [23]. Согласно Pariente et al., у пациентов с БК (но не с ЯК) увеличивалось количество CD4 $^+$ CD314 $^+$ T-клеток, которые приобретали специфическую цитотоксическую активность и начинали синтезировать ИЛ-17, тем самым поддерживая хроническое воспаление с массовой нейтрофильной инфильтрацией [24]. Установленное повышение экспрессии киллерного рецептора на $\gamma\delta$ T-лимфоцитах у пациентов с БК также может способствовать избыточному синтезу ИЛ-17, что в свою очередь определяет пластичность классических Т-лимфоцитов и их дифференцировку в патогенные Т-хелперы 17-го типа. В то же время, выявленное увеличение процента CD314 $^+$ $\gamma\delta$ T-клеток у пациентов с ЯК коррелировало с уровнем сывороточного IgG ($R = 0,73$; $p < 0,05$), что предполагает иные механизмы функциональной активации Т-лимфоцитов, в частности, стимуляцию Т-хелперов 2-го типа, способствующие развитию гуморального иммунного ответа и синтезу антител.

Для подтверждения цитотоксического профиля $\gamma\delta$ T-клеток у пациентов с ВЗК изучена экспрессия ко-рецепторных молекул CD56 и CD8. Установлено, что у пациентов с БК превалируют $\gamma\delta$ TCR $^+$ CD56 $^+$ T-клетки, в то время как у пациентов с ЯК повышенено относительное количество $\gamma\delta$ TCR $^+$ CD8 $^+$ T-лимфоцитов, что подтверждает различия молекулярных механизмов цитотоксичности (рис. 2). В ряде исследования обнаружено, что в слизистой оболочке пациентов с БК присутствует значительно большее количество клеток с поверхностными маркерами CD56 или CD16, которые могут играть непосредственную роль в анти-тело-зависимой клеточной цитотоксичности, преимущественно характерной для НК-клеток врожденного иммунитета [25]. Это может быть связано с особенностями воспалительного микроокружения ткани ЖКТ

и подтверждает существующую концепцию о поражении преимущественно всего ЖКТ при БК, в связи с чем уровень цитотоксичности в мононуклеарных клетках, полученных из слизистой оболочки пациентов с БК, значительно выше [26]. В то же время выявленный профиль $\gamma\delta$ T-лимфоцитов у пациентов с ЯК свидетельствует о преимущественно перфорин-гранзимовом эффекторном механизме цитотоксичности, который более характерен для классических цитотоксических Т-лимфоцитов и специфического иммунного ответа, наряду с которыми $\gamma\delta$ T-клетки могут также участвовать в повреждении ткани ЖКТ. При этом, чем меньше продолжительность заболевания, тем больше количество субпопуляций $V\delta 1^+$ и $V\delta 3^+$ T-клеток, экспрессирующих CD8, выявляется в периферической крови пациентов с ЯК ($R = -0,74$; $p < 0,05$).

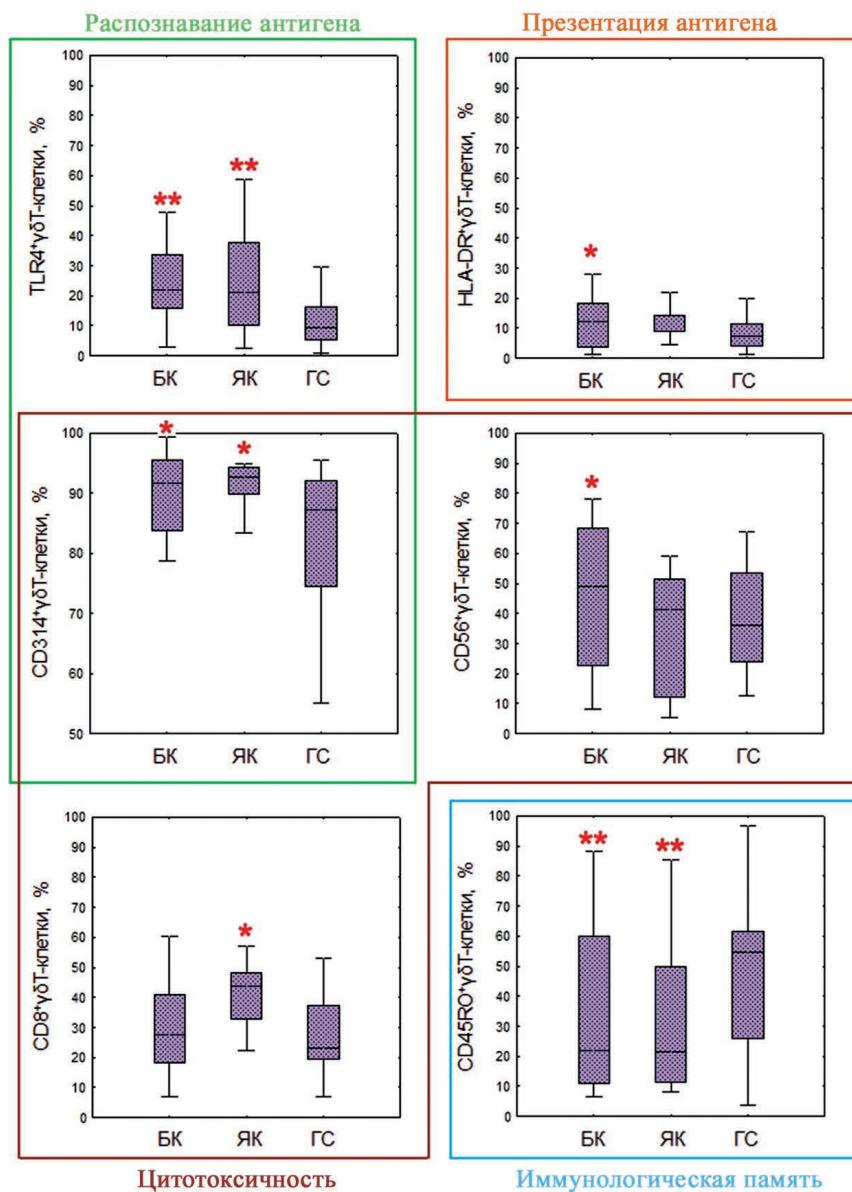


Рис. 2. Экспрессия функциональных маркеров (%) на $\gamma\delta$ T-лимфоцитах у пациентов с ВЗК и группы сравнения

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; статистические значимые различия указаны относительно группы сравнения.

Fig. 2. Functional phenotype expression (%) on $\gamma\delta$ T-lymphocytes in patient with inflammatory bowel disease and healthy donors

Note. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; significant differences as compared with healthy donors.

Наряду с рецепторами распознавания и цитотоксичности $\gamma\delta$ T-клетки пациентов с БК характеризовались статистически значимой усиленной экспрессией молекулы HLA-DR относительно группы сравнения (рис. 2), принадлежащей к главному комплексу гистосовместимости II класса (МНС II класса), являющейся маркером поздней активации и активно участвующей в презентации антигенов, что указывает на возможность $\gamma\delta$ T-лимфоцитов выступать в качестве «профессиональных» антиген-презентирующих

клеток с последующей генерацией иммунологической памяти [3; 11]. Детальное исследование субпопуляционного состава $\gamma\delta$ T-лимфоцитов показало увеличение относительного количества V δ 2 $^+$ HLA-DR $^+$ и V δ 3 $^+$ HLA-DR $^+$ T-лимфоцитов (11,58 [4,41 ÷ 17,11] % и 14,01 [2,03 ÷ 15,5] % соответственно) по сравнению с контрольной группой (5,18 [3,45 ÷ 11,68] % и 7,09 [2,57 ÷ 13,03] соответственно, $p < 0,05$), свидетельствующее о возможности презентации не только фосфоантител, но и стресс-индуцированных молекул, которые могут являться триггерами аутоиммунной реакции.

При исследовании компартмента иммунологической памяти выявлено статистически значимое снижение процентного содержания CD45RO $^+$ $\gamma\delta$ T-лимфоцитов у пациентов исследуемых групп ВЗК (рис. 2), подтверждающее дальнейшую дифференцировку эффекторных клеток в терминально дифференцированные эффекторные клетки памяти, которые теряют экспрессию молекулы CD45RO и начинают реэкспрессировать CD45RA. Полученные данные согласуются с исследованиями Gully et al., который показал, что большинство $\gamma\delta$ T-клеток при ВЗК имеют фенотипы эффекторных или терминально-дифференцированных клеток памяти и обладают наиболее выраженной супрессорной активностью по отношению к микробным, что может приводить к нарушению толерантности к собственным антигенам [27].

Заключение

Таким образом, $\gamma\delta$ T-лимфоциты играют активную многогранную иммунорегуляторную роль в координации реакций врожденного и приобретенного иммунитета для поддержания целостности слизистых оболочек и гомеостаза в ЖКТ. Однако усиление иммунологического надзора с их стороны при ВЗК может являться ключевыми звенями в иммунопатогенезе БК и ЯК. В данном исследовании выявлено увеличение относительного количества $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в периферической крови пациентов с ВЗК, субпопуляционный состав которых характеризовался преобладанием (более 50 %) ткане-резидентных клеток. В связи с этим, установленная повышенная способность $\gamma\delta$ T-лимфоцитов к распознаванию чужеродных структур может относиться как к фосфоантителам микробной природы, так и стресс-индуцируемым молекулам. При этом $\gamma\delta$ T-лимфоциты пациентов с ВЗК активно вовлекаются не только в реакции врожденного иммунитета (распознавание антигенов), но и формируют пул клеток памяти, прошедших дифференцировку до терминально-дифференцированных эффекторных клеток (реакция приобретенного иммунитета). Функциональные особенности эффекторных реакций $\gamma\delta$ T-лимфоцитов у пациентов с БК характеризуются преимущественной антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью и способностью презентацией антигенов, в то время как у пациентов с ЯК $\gamma\delta$ T-лимфоциты функционируют подобно классическим цитотоксическим Т-лимфоцитам. Выявленные корреляции с тяжестью заболеваний позволяют использовать фенотипические и функциональные изменения $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в качестве диагностических и прогностических маркеров развития аутоиммунного воспаления в ВЗК, а сами $\gamma\delta$ T-лимфоциты рассматривать как терапевтическую мишень при разработке новых протоколов патогенетической терапии.

Библиографические ссылки / References

1. Ma R, Yuan D, Guo Y, Yan R, & Li K. Immune effects of $\gamma\delta$ T-Cells in colorectal cancer: A Review. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:1600. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01600.
2. Do JS, Kim S, Keslar K, Jang E, Huang E, Fairchild RL, Pizarro TT, Min B. $\gamma\delta$ T-Cells coexpressing gut homing $\alpha4\beta7$ and αE integrins define a novel subset promoting intestinal inflammation. *Journal of Immunology*. 2017;198(2):908–915. DOI: 10.4049/jimmunol.1601060.
3. McCarthy NE and Eberl M. Human $\gamma\delta$ T-Cell control of mucosal immunity and inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:985. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00985.
4. Ribot JC, Lopes N, & Silva-Santos B. $\gamma\delta$ T cells in tissue physiology and surveillance. *Nature Reviews Immunology*. 2021;21:221–232. DOI: 10.1038/s41577-020-00452-4.
5. Fay NS, Larson EC and Jameson JM. Chronic Inflammation and $\gamma\delta$ T Cells. *Frontiers in Immunology*. 2016;7:210. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00210.
6. Akitsu A, & Iwakura Y. Interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T ($\gamma\delta$ 17) cells in inflammatory diseases. *Journal of Immunology*. 2018;155(4):418–426. DOI: 10.1111/imm.12993.
7. Kühl AA, Pawlowski NN, Grollich K, Loddenkemper C, Zeitz M, Hoffmann JC. Aggravation of intestinal inflammation by depletion/deficiency of gammadelta T cells in different types of IBD animal models. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007;81(1):168–75. DOI: 10.1189/jlb.1105696.
8. Cheroute H, Lambolez F, Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(7):445–456. DOI: 10.1038/nri3007.
9. Lu Y, Li X, Liu S, Zhang Y, Zhang D. Toll-like Receptors and Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Immunology*. 2018;30;9:72. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00072.
10. 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. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2012;18(10):1910–22. DOI: 10.1002/ibd.22899.
11. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(2):88–100. DOI: 10.1038/nri3384.

12. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an Integrated Clinical, Molecular and Serological Classification of Inflammatory Bowel Disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 2005;19(supplA):5A–36A. DOI:10.1155/2005/269076.
13. Guan Q. A Comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Journal of Immunology Research*. 2019; article ID7247238. DOI: 10.1155/2019/7247238.
14. Catalan-Serra I, Sandvik A, Bruland T. Gammadelta T-Cells in Crohn's Disease: a new player in the disease pathogenesis? *Journal of Crohn's and Colitis*. 2017;11(9):1135–1145. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjx039.
15. Presti E, Mitri M, Moccia F. Characterization of $\gamma\delta$ T-Cells in intestinal mucosa from patients with early-onset or long-standing inflammatory bowel disease and their correlation with clinical status. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2019;13(7):873–883. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjz015.
16. Gryglewski A, Richter P, Szczepanik M. Changes in $\gamma\delta$ T-Cells in peripheral blood of patients with Ulcerative Colitis exacerbations. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2021;69(1):18. DOI: 10.1007/s00005-021-00620-x.
17. Wu D, Wu P, Qiu F, Wei Q, Huang J. Human $\gamma\delta$ T-cell subsets and their involvement in tumor immunity. *Cellular & Molecular Immunology*. 2017;14(3):245–253. DOI: 10.1038/cmi.2016.55.
18. Mann E, McCarthy E, Peake S. Skin- and gut-homing molecules on human circulating $\gamma\delta$ T-cells and their dysregulation in inflammatory bowel disease. *Clinical & Experimental Immunology*. 2012;170(2):122–30. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04649.x.
19. Kulkarni N, Pathak M, Lal G. Role of chemokine receptors and intestinal epithelial cells in the mucosal inflammation and tolerance. *Journal of Leukocyte Biology*. 2017;101(2):377–394. DOI: 10.1189/jlb.1R0716-327R.
20. Jhita N, Raikar SS. Allogeneic gamma delta T cells as adoptive cellular therapy for hematologic malignancies. *Journal of Immunology*. 2022;23(3):334–350. DOI: 10.37349/ei.2022.00054.
21. Li M, Guo W, Dong Y, Wang X, Dai D, Liu X, et al. Elevated Exhaustion Levels of NK and CD8⁺ T Cells as Indicators for Progression and Prognosis of COVID-19 Disease. *Frontiers in Immunology*. 2020;14(11):580237. DOI: 10.3389/fimmu.2020.580237.
22. Fernandes P, MacSharry J, Darby T, Fanning A, Shanahan F, Houston A, & Brint E. Differential expression of key regulators of Toll-like receptors in ulcerative colitis and Crohn's disease: a role for Tollip and peroxisome proliferator-activated receptor gamma? *Clinical & Experimental Immunology*. 2015;183(3):358–368. DOI:10.1111/cei.12732.
23. Stojanovic A, Correia MP and Cerwenka A. The NKG2D/NKG2DL Axis in the Crosstalk Between Lymphoid and Myeloid Cells in Health and Disease. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:827. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00827.
24. Pariente B, Mocan I, Camus M, Dutertre CA, Ettersperger J, Cattan P, et al. Activation of the receptor NKG2D leads to production of Th17 cytokines in CD4⁺ T cells of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2011;141(1):217–226.e1-2. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.03.061.
25. Cohavy O, & Targan SR. CD56 Marks an Effector T Cell Subset in the Human Intestine. *Journal of Immunology*. 2007;178(9), 5524–5532. DOI:10.4049/jimmunol.178.9.5524.
26. Ng S, Plamondon S, Al-Hassi O. A novel population of human CD56⁺ human leucocyte antigen D-related (HLA-DR+) colonic lamina propria cells is associated with inflammation in ulcerative colitis. *Clinical & Experimental Immunology*. 2009;158(2):205–218. DOI: 10.1111/j.1365–2249.2009.04012.x.
27. Gully B, Rossjohn J, Davey M. Our evolving understanding of the role of the $\gamma\delta$ T cell receptor in $\gamma\delta$ T cell mediated immunity. *Biochemical Society*. 2021;49(5):1985–1995. DOI: 10.1042/BST20200890.

Статья поступила в редакцию 11.10.2022.
Received by editorial board 11.10.2022.