



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.3.006>

УДК 616.344-002-031.84:[611.34.018.73+612.112.94]:575.21



Нижегородова Д.Б.^{1,2}✉, Цеханович Д.А.², Шулейко А.Ч.¹, Старостин А.М.¹,
Ванслав М.И.¹, Иванчик Г.И.¹, Величко А.В.^{1,2}, Зафранская М.М.^{1,2}

¹ Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Минск, Беларусь

² Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

Методологический подход к фенотипированию лимфоидных клеток слизистой оболочки кишки у пациентов с болезнью Крона

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, проведение иммунологических исследований и статистическая обработка данных, написание исходного варианта и окончательное редактирование текста рукописи – Нижегородова Д.Б.; проведение иммунологических исследований и статистическая обработка данных, написание исходного варианта текста – Цеханович Д.А.; сбор и статистическая обработка клинических и морфологических данных, забор биологического материала – Старостин А.М.; проведение иммунологических исследований – Ванслав М.И.; проведение диссоциации ткани и гематологических исследований – Иванчик Г.И.; проведение диссоциации ткани – Величко А.В.; концепция и дизайн исследования, окончательное редактирование текста рукописи – Зафранская М.М.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ «Биотехнологии-2», подпрограмма 3.1 «Молекулярные и клеточные биотехнологии-2», № госрегистрации 20230295.

Подана: 31.03.2023

Принята: 12.09.2023

Контакты: nzh@tut.by

Резюме

Введение. В настоящее время общепринятым подходом к оценке иммунного статуса является характеристика лимфоидных клеток периферической крови. Вместе с тем актуальными остаются исследования показателей локального мукозального иммунитета желудочно-кишечного тракта при иммунопатологических состояниях и последующее сопоставление полученных данных с таковыми циркулирующих лимфоидных клеток – для выявления взаимосвязи локальных реакций с системными эффектами. В статье представлена методология выделения и предложен алгоритм фенотипирования интраэпителиальных лимфоидных клеток (IEL) и лимфоидных клеток собственной пластинки слизистых оболочек (LPL) тонкой и толстой кишки у пациентов с болезнью Крона.

Цель. Оценить фенотипический состав лимфоидных клеток периферической крови и слизистой оболочки тонкой и толстой кишки у пациентов с болезнью Крона.

Материалы и методы. Материал исследования – биопсийный материал тонкой и толстой кишки, а также периферическая кровь 10 пациентов с болезнью Крона в возрасте 28,0 (22,7÷36,8) года, из них – 6 мужчин и 4 женщины. Мукозальные лимфоидные клетки получали путем комбинированной программной диссоциации тканей кишки. Иммунофенотипирование лимфоидных клеток осуществляли с использованием набора моноклональных антител и проточного цитометра. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 8.0.

Результаты. Основная популяция мукозальных лимфоидных клеток тонкой и толстой кишки у пациентов с болезнью Крона представлена CD3⁺Т-лимфоцитами, долевое содержание которых коррелировало с количеством Т-лимфоцитов периферической крови ($R=0,7$; $p<0,05$). При этом среди Т-клеток IEL тонкой кишки выявлена инверсия Т-хелперов и Т-киллеров. В обоих отделах кишки установлено увеличение количества минорных популяций $\gamma\delta$ IEL (преимущественно за счет V δ 1⁺Т-клеток) относительно LPL ($p<0,01$) и мукозально-ассоциированных CD161⁺Т-клеток относительно периферической крови ($p<0,05$). Мукозальные В-лимфоциты и NK-клетки локализовались преимущественно среди LPL-компартамента, при этом в толстой кишке большая половина В-клеток определялась как В₁-лимфоциты ($p<0,01$).

Заключение. С использованием предложенного алгоритма фенотипирования у пациентов с болезнью Крона выявлены изменения в основных и минорных популяциях мукозальных лимфоидных клеток врожденного и приобретенного иммунитета, которые, предположительно, вовлекаются в формирование аутоиммунного воспаления в тонкой и толстой кишке, а также циркулируют в периферической крови и могут являться диагностически значимыми маркерами развития рецидива заболевания.

Ключевые слова: мукозальные лимфоидные клетки, диссоциация, алгоритм фенотипирования, болезнь Крона, аутоиммунная патология

Darya B. Nizheharodava^{1,2}✉, Dmitriy A. Tsekhanovich², Anatoliy Ch. Shuleika¹,
Andrey M. Starastin¹, Marharyta I. Vanslau¹, Galina I. Ivanchyk¹, Alesia V. Vialichka^{1,2},
Marina M. Zafranskaya^{1,2}

¹ Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

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

Methodological Approach to the Mucosal Lymphoid Cells Phenotyping in Patients with Crohn's Disease

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept and study design, conducting immunological studies and statistical data processing, writing the original version and final editing of the manuscript – Darya B. Nizheharodava; immunological studies, writing the original text version – Dmitriy A. Tsekhanovich; clinical and morphological data collection and statistical processing, sampling of biological material – Anatoliy Ch. Shuleika; clinical and morphological data collection and statistical processing, sampling of biological material – Andrey M. Starastin; immunological studies – Marharyta I. Vanslau; tissue dissociation and hematological studies – Galina I. Ivanchyk; tissue dissociation – Alesia V. Vialichka; concept and study design, final editing of the manuscript – Marina M. Zafranskaya.

Funding. The work was financially supported by the state research program "Biotechnologies-2", subprogram 3.1 "Molecular and cellular biotechnologies-2", registration number 20230295.

Submitted: 31.03.2023

Accepted: 12.09.2023

Contacts: nzh@tut.by

Abstract

Introduction. Currently the generally accepted approach to the immune status assessment is the characterization of lymphoid cells in the peripheral blood. However, the investigation of local mucosal gut immunity under immunopathological conditions



remain highly relevant as well as its following comparison with circulating lymphoid cells for the identification the relationship between local reactions and systemic effects. This article presents a methodology for mucosal cells isolation and proposed an algorithm for the phenotyping of intraepithelial lymphoid cells (IEL) and lamina propria lymphoid cells (LPL) obtained from the small and large intestine in patients with Crohn's disease.

Purpose. To evaluate the phenotype of peripheral blood and mucosal lymphoid cells of the small and large intestine in patients with Crohn's disease.

Materials and methods. The study material was biopsy of the ileum and colon as well as peripheral blood from 10 patients with Crohn's disease, aged 28.0 (22.7÷36.8) years, including 6 men and 4 women. Mucosal lymphoid cells were obtained by combined mechanical and enzymatic dissociation of intestinal tissues. Lymphoid cells were immunophenotyped using a set of monoclonal antibodies and a flow cytometer. Statistical data processing was done using the Statistica 8.0 program.

Results. The major population of mucosal lymphoid cells in the small and large intestine of patients with Crohn's disease was represented by CD3⁺T-lymphocytes, the percentage of which correlated with the number of peripheral blood T-lymphocytes ($R=0.7$; $p<0.05$). At the same time, the inversion of T-helpers and T-killers was revealed among T-cells of enteric IEL. An increase in the number of minor $\gamma\delta$ IEL subsets (mainly due to V δ 1⁺T-cells) as compared to LPL ($p<0.01$) and mucosa-associated CD161⁺T-cells as compared to peripheral blood ($p<0.05$) was established in both parts of the intestine. Mucosal B-lymphocytes and NK-cells were localized predominantly among the LPL compartment, while more than half of the B-cells were defined as B1-lymphocytes in the colon ($p<0.01$).

Conclusion. Using the proposed phenotyping algorithm changes in the major and minor subsets of mucosal lymphoid cells of innate and acquired immunity were detected in patients with Crohn's disease, assuming their involvement in the gut autoimmune inflammation as well as circulation in the peripheral blood what may be used as diagnostic significant markers for disease progression.

Keywords: mucosal lymphoid cells, dissociation, phenotyping algorithm, Crohn's disease, autoimmune pathology

■ ВВЕДЕНИЕ

В последнее время внимание исследователей все больше привлекает мукозальная иммунная система, а также открывающиеся новые возможности использования ее отдельных компонентов (М-клетки, дендритные клетки, интраэпителиальные лимфоциты, изолированные лимфоидные фолликулы, Пейеровы бляшки и др.) в качестве таргетной терапии [1]. Система мукозального иммунитета представляет собой лимфоидную ткань, ассоциированную со слизистыми оболочками, которая является отдельной и самой большой (более 400 м²) автономной структурой иммунной системы, эволюционно сформировавшейся как первая линия защиты организма и выполняющей как протективную, так и иммунорегуляторную роль. Имунокомпетентная ткань слизистых оболочек представлена организованными структурами и отдельными клеточными элементами, при этом около 80% всех иммунокомпетентных клеток организма локализовано именно в слизистой оболочке желудочно-кишечного

тракта (ЖКТ), а их роль в формировании и поддержании иммунопатологических состояний до сих пор остается предметом активных дискуссий [2, 3].

Современная классификация выделяет интраэпителиальные лимфоидные клетки (IEL – англ. Intraepithelial Lymphoid Cells) и лимфоидные клетки собственной пластинки слизистых оболочек (LPL – англ. Lamina Propria Cells), включающих гетерогенные популяции Т- и В-лимфоцитов, NK-клеток, мукозально-ассоциированных и врожденных лимфоидных клеток, иммунобиология которых до сих пор остается предметом активного изучения и выходит за рамки классической иммунологии [4].

Спектр функций лимфоидных клеток варьирует от иммунорегуляции и формирования периферической толерантности к потенциальным аутоантигенам до эффекторного поражения ткани. Контактруя с иммунными и неиммунными клетками в тканях, мукозальные лимфоциты участвуют в иммунологическом надзоре, активации воспалительной реакции, тканевом гомеостазе, метаболизме, морфогенезе, репарации и регенерации (ремоделировании) тканей, выполняют барьерную функцию, а также активно взаимодействуют с нервной системой и микробиотой [5, 6]. В то же время неконтролируемое действие лимфоидных клеток может привести к повреждению тканей, хроническому воспалению, метаболическим заболеваниям, аутоиммунитету и онкопатологическим процессам, что определяется тонкой регуляцией лимфоцит-медиированного ответа для поддержания целостности организма [7, 8].

В настоящее время особый интерес представляют лимфоидные клетки, которые непосредственно активно вовлекаются в патогенез воспалительных заболеваний кишечника, в том числе аутоиммунной природы – болезнь Крона (БК), язвенный колит, целиакия. До сих пор не выяснено, каким образом субпопуляционный состав IEL и LPL изменяется при инициации и развитии аутоиммунных процессов, ассоциированных со слизистыми оболочками организма, и каковы его отличия от физиологического распределения клеток. Результаты исследования экспериментальных моделей указывают на роль IEL и LPL в поддержании аберрантного иммунного ответа на микробиоту и последующем развитии БК, первичная заболеваемость которой в Республике Беларусь составляет 1,5:100 000 [9]. Во время хронического воспаления ЖКТ воспалительными дендритными клетками и макрофагами синтезируется избыточный уровень провоспалительных интерлейкинов (IL-12, IL-18, IL-23 и IL-1 β), что приводит к аккумуляции и активации врожденных лимфоидных клеток, секретирующих повышенный уровень цитокинов Th1- и Th17-профиля, инициации хемотаксиса нейтрофилов и повреждению или трансформации ткани, одним из исходов которых может являться колит-ассоциированный рак. Лимфоидные клетки слизистых оболочек способны также вступать во взаимодействие с неиммунными клетками (эпителиальными клетками и фибробластами), иницируя секрецию медиаторов воспаления (IL-18) и реорганизацию ткани, в том числе эпителиальную пролиферацию и фиброз [10–12]. При этом слизистые оболочки являются местом развития не только индукторной, но и эффекторной фазы мукозального иммунитета [13].

Принимая во внимание отсутствие единого подхода к фенотипированию лимфоидных клеток слизистой оболочки кишки при иммунопатологических состояниях, актуальным представляется изучение особенностей гетерогенной популяции мукозальных клеток в локальном микроокружении аутоиммунного воспаления при БК. В данной статье представлена методология выделения и предложен алгоритм фенотипирования IEL и LPL тонкой и толстой кишки у пациентов с БК.



■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить фенотипический состав лимфоидных клеток периферической крови и слизистой оболочки тонкой и толстой кишки у пациентов с БК.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования явился биопсийный материал тонкой и толстой кишки, а также периферической крови 10 пациентов с БК в возрасте 28,0 (22,7÷36,8) года, из них – 6 мужчин и 4 женщины, находившихся на лечении в хирургическом отделении УЗ «Минская областная клиническая больница». Диагноз подтверждался морфологическим исследованием биопсийного материала. Пациенты имели следующие особенности локализации патологического процесса: толстокишечное поражение (3 пациента), тонкокишечное (4 пациента), тонко-толстокишечное (3 пациента). Из них у 2 пациентов определялся воспалительный фенотип заболевания, у 4 – стенозирующий/стриктурирующий и у 3 – пенетрирующий/свищевой фенотип; у 2 пациентов диагностировалось перианальное повреждение. Все исследуемые пациенты предоставили информированное согласие на взятие биологического материала и участие в выполнении научного исследования.

Выделение лимфоидных клеток

Для выделения IEL слизистую оболочку отделяли от биопсийного материала и измельчали на мелкие куски размером 0,5 см², которые инкубировали в растворе для первичной диссоциации, содержащем 5 mM этилендиаминуксусной кислоты (Sigma, Германия), 5%-й эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Gibco, Германия), 1 mM дитиотреитола (Sigma, Германия) (рис. 1.1) в течение 20 мин. при 37 °C при непрерывном помешивании (рис. 1.2). Полученную суспензию фильтровали через сетчатый фильтр CellStrainer с порами 100 мкм, отмывали при 300 g в течение 10 мин. и разводили для иммунофенотипирования (рис. 1.3).

Для выделения LPL использовали ткань кишки после первичной диссоциации и набор ферментов Lamina Propria Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Германия). Образцы ткани инкубировали в культуральной среде RPMI-1640 (Gibco, Германия) в объеме 0,3 г/мл с добавлением 200 мкл фермента D, 100 мкл фермента R и 25 мкл фермента A в течение 30 мин. при 37 °C при непрерывном перемешивании (рис. 1.4). После инкубации пробирки с образцами помещали в программный диссоциатор gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec, Германия) и выполняли дезагрегацию ткани (рис. 1.5). Полученную клеточную суспензию LPL центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. (рис. 1.6) и разводили для иммунофенотипирования (рис. 1.7).

Мононуклеары периферической крови выделяли методом центрифугирования на градиенте плотности Histopaque-1077 (Sigma, Германия) при 300 g в течение 30 мин. с последующим 2-кратным отмыванием клеток в физиологическом растворе с добавлением 5% ЭТС.

Жизнеспособность выделенных клеток определяли по окрашиванию трипановым синим.

Метод проточной цитометрии

Субпопуляции лимфоцитов определяли с применением панелей моноклональных антител CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5, CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/



Рис. 1. Методология выделения IEL и LPL из ткани кишки у пациентов с БК
Fig. 1. Methodology of IEL and LPL isolation from CD patients' gut tissue

CD3-PC5, $\gamma\delta$ TCR-FITC/ $\alpha\beta$ TCR-PE/ δ 1TCR-PC7/ δ 2TCR-PB/CD3-APC-A750/ CD45-KrO, CD5-PC7, CD161-PB450, CD45-BrV (Beckman Coulter, США) и проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для иммунофенотипирования 100 мкл цельной крови или клеточной суспензии IEL или LPL добавляли в пробирку с моноклональными антителами, перемешивали и инкубировали в течение 15 мин. при температуре 18–25 °C. В периферической крови эритроциты лизировали раствором VersaLyse (Beckman Coulter, США) в течение 10 мин. Результаты регистрировали на проточном цитометре на 10 000 лимфоидных клеток.



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 $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Алгоритм фенотипирования лимфоидных клеток ткани кишки и периферической крови методом проточной цитометрии

В ходе проведенной механической и ферментативной диссоциации тканей тонкой и толстой кишки получены IEL и LPL, которые наряду с выделенными лимфоидными клетками периферической крови фенотипировали для определения основных и минорных популяций иммунных клеток (табл. 1), принимая во внимания их возможную патогенетическую роль в развитии аутоиммунного воспаления ЖКТ.

Лимфоидные клетки являются гетерогенной популяцией и включают натуральные киллеры (NK-клетки), Т- и В-лимфоциты, среди которых выделяют различные субпопуляции. Среди клеток врожденного иммунитета исследовали NK-клетки, TNK-клетки, $\gamma\delta$ T-клетки ($V\delta 1^+$ T-, $V\delta 2^+$ T- и $V\delta 3^+$ T-клеточные субпопуляции), MAIT-клетки и B1-клетки, а приобретенного иммунитета – Т-лимфоциты (Т-хелперы, Т-киллеры) и B₂-клетки (основная популяция В-лимфоцитов).

Интерпретацию результатов проточной цитометрии проводили согласно алгоритму фенотипирования субпопуляций лимфоидных клеток, представленному на рис. 1. Для выделения гейта единичных клеток и отделения дуплетов и клеточного дебриса анализ начинали с построения точечной диаграммы плотности параметров области и высоты прямого светорассеяния (рис. 2А) среди всех клеточных событий.

Таблица 1

Фенотип основных и минорных популяций мукозальных и циркулирующих лимфоидных клеток

Table 1

Phenotype of major and minor mucosal and circulating lymphoid cells populations

Субпопуляции лимфоидных клеток		Фенотип
Натуральные киллеры	NK-клетки	CD45 ⁺ CD56 ⁺
	TNK-клетки	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ⁺
$\alpha\beta$ T-лимфоциты	T-клетки	CD45 ⁺ CD3 ⁺
	T-хелперы	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺
	T-киллеры	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺
	MAIT-клетки	CD45 ⁺ Lin ⁻ CD127 ⁺ CD161 ⁺
$\gamma\delta$ T-лимфоциты	$\gamma\delta$ T-клетки	CD45 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ TCR ⁺
	$V\delta 1^+$ T-клетки	CD45 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ TCR ⁺ $V\delta 1^+$
	$V\delta 2^+$ T-клетки	CD45 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ TCR ⁺ $V\delta 2^+$
	$V\delta 3^+$ T-клетки	CD45 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ TCR ⁺ $V\delta 1^-V\delta 2^-$
В-лимфоциты	B ₂ -клетки	CD45 ⁺ CD19 ⁺
	B ₁ -клетки	CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺

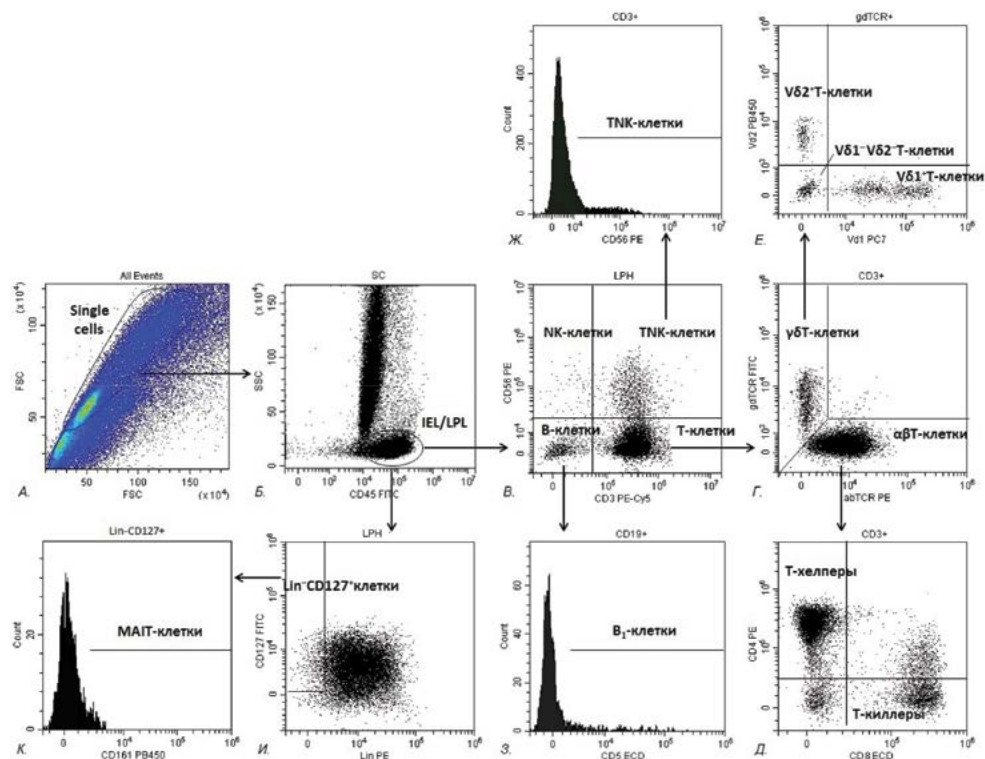


Рис. 2. Алгоритм фенотипирования мукозальных (IEL, LPL) и циркулирующих лимфоидных клеток у пациентов с БК

Fig. 2. The algorithm of mucosal (IEL, LPL) and circulating lymphoid cells phenotyping in CD patients

Примечание: А – гейт единичных клеток, Б – CD45⁺лимфоидные клетки, В – основные популяции лимфоидных клеток (CD56⁺NK-клетки, CD3⁺CD56⁺NK-клетки, CD3⁺T-лимфоциты и CD19⁺B-лимфоциты), Г – субпопуляции αβТ- и γδТ-лимфоцитов, Д – CD3⁺CD4⁺Т-хелперы и CD3⁺CD8⁺Т-киллеры среди гейта αβТ-лимфоцитов, Е – субпопуляции Vδ1⁺T-, Vδ2⁺T- и Vδ1⁺Vδ2⁺(Vδ3⁺)Т-клетки среди гейта γδТ-лимфоцитов, Ж – CD3⁺CD56⁺TNK-клетки среди гейта Т-лимфоцитов, З – субпопуляция CD19⁺CD5⁺ В₁-клеток среди гейта CD19⁺В-лимфоцитов, И – гейт Lin⁺CD127⁺ клеток, К – субпопуляция CD161⁺MAIT-клеток среди гейта Lin⁺CD127⁺ клеток.

Лимфоидные клетки (IEL, LPL или лимфоциты периферической крови) идентифицировали по яркой флуоресценции общего лейкоцитарного антигена CD45 и низкому боковому рассеянию (рис. 2Б), среди которых выделяли основные популяции: CD56⁺NK-клетки, CD3⁺T-лимфоциты и CD19⁺В-лимфоциты (рис. 2В).

В зависимости от экспрессии типа Т-клеточного рецептора (αβTCR⁺γδTCR⁻ или αβTCR⁻γδTCR⁺) среди Т-клеток различали субпопуляции αβТ- и γδТ-лимфоцитов (рис. 2Г). Анализ клеточного состава основных αβТ-лимфоцитов включал определение CD3⁺CD4⁺Т-хелперов и CD3⁺CD8⁺Т-киллеров (рис. 2Д), в то время как среди минорных γδТ-лимфоцитов по экспрессии δ-цепи Т-клеточного рецептора идентифицировали субпопуляции Vδ1⁺T-, Vδ2⁺T- и Vδ1⁺Vδ2⁺(Vδ3⁺)Т-клетки (рис. 2Е). Наряду с этим в общем гейте Т-лимфоцитов оценивали количество CD3⁺CD56⁺TNK-клеток, комбинирующих рецепторный аппарат и свойства NK-клеток и Т-лимфоцитов (рис. 2Ж),



а в общем гейте В-лимфоцитов определяли минорную популяцию $CD19^+CD5^+B_1^-$ -клеток (рис. 23). Популяцию лимфоидных клеток, экспрессирующую α -цепь рецептора интерлейкина-7 ($CD127$, рис. 2И) и активирующий рецептор $CD161$ (рис. 2К) при отсутствии экспрессии линейных маркеров (Lin^-), определяли как мукозально-ассоциированные инвариантные МАИТ-клетки.

Количественная характеристика мукозальных и циркулирующих лимфоидных клеток у пациентов с БК

С использованием описанного алгоритма фенотипирования проведено определение количественного содержания IEL, LPL в тонкой и толстой кишке, а также циркулирующих лимфоидных клеток в периферической крови у пациентов с БК. Результаты исследования представлены в табл. 2.

Установлено, что в тонкой кишке пациентов с БК количество $CD3^+$ Т-клеток среди IEL статистически значимо увеличивалось по сравнению с таковым среди LPL, а также IEL толстой кишки и коррелировало с процентным содержанием Т-лимфоцитов в периферической крови ($R=0,7$; $p<0,05$). При этом в субпопуляционном составе Т-клеток наблюдалась выраженная инверсия Т-хелперов и Т-киллеров среди IEL тонкой кишки ($p<0,05$), соотношение которых составило 1:2, в то время как в остальных тканевых компартментах тонкой и толстой кишки количество Т-клеточных субпопуляций оставалось равным (1:1) и отличалось от стандартного соотношения в периферической крови, определяемое как 2:1.

Полученные результаты согласуются с данными других авторов, свидетельствующими об абсолютном большинстве $CD3^+$ Т-лимфоцитов среди IEL и снижении их процента в LPL, но при этом демонстрирующими активное вовлечение Т-лимфоцитов обоих компартментов в патогенез воспалительных заболеваний кишечника [14–16]. Локализация IEL способствует их быстрому реагированию на антигенные структуры, в том числе компоненты микробиоты, контактирующие с эпителием ЖКТ. Т-лимфоциты слизистых оболочек имеют преимущественно эффекторный фенотип, проявляют различную цитотоксическую активность, включая аллореактивную и вирус-специфическую, обеспечивают помощь В-клеткам, играют роль в поддержании толерантности и регулируют функцию эпителиальных клеток, тем самым осуществляя роль иммунного надзора или первой линии защиты. Однако присутствие среди Т-клеток аутореактивных клонов у пациентов с БК приводит к тому, что вместо первой линии защиты происходит повреждение эпителия в результате нарушения баланса между иммунологической толерантностью и эффекторным иммунным ответом [17, 18].

Если в здоровых тканях $\alpha\beta$ Т-лимфоциты представлены в основном цитотоксическими $CD3^+CD8^+$ Т-клетками, играющими важную защитную роль в обнаружении и устранении поврежденных эпителиальных клеток и противоинфекционной защите, то при БК наблюдается инфильтрация эпителиального слоя слизистых оболочек $CD3^+CD4^+$ Т-хелперами. Это, предположительно, связано с хронической антигенной стимуляцией условно-патогенными бактериями ЖКТ и свидетельствует об аутоиммунной воспалительной реакции. В выполненном исследовании Т-хелперы преимущественно определялись в толстой кишке пациентов с БК (табл. 2). $CD4^+$ Т-хелперы являются основными медиаторами клеточного иммунитета и играют ключевую роль в активации других иммунных клеток, таких как В-клетки и цитотоксические Т-клетки,

Таблица 2
Содержание лимфоидных клеток в тонкой, толстой кишке и периферической крови у пациентов с БК, Me (25÷75)%
Table 2
The number of lymphoid cells in the ileum and colon as well as in peripheral blood of CD patients, Me (25÷75)%

Популяции лимфоидных клеток	Тонкая кишка		Толстая кишка		Периферическая кровь	p
	IEL	LPL	IEL	LPL		
	1	2	3	4		
CD3 ⁺ T-cells, %	88,0 (59,8÷94,0)	67,0 (50,3÷82,9)	74,7 (65,1÷80,1)	86,9 (70,8÷90,2)	68,2 (66,3÷68,3)	p ₁₋₂ <0,01 p ₁₋₅ <0,01
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-helpers, %	28,1 (13,9÷35,6)	55,3 (47,2÷67,3)	47,9 (17,9÷54,7)	49,6 (38,7÷54,1)	63,2 (59,8÷65,6)	p ₁₋₂ <0,05
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-killers, %	64,7 (60,0÷76,3)	58,9 (36,7÷62,4)	47,1 (36,3÷51,1)	48,9 (40,9÷56,8)	33,4 (25,5÷33,7)	p ₁₋₂ <0,01
γδTCR ⁺ T-cells, %	9,3 (5,3÷10,8)	1,2 (1,0÷9,5)	24,0 (17,3÷35,6)	1,4 (0,6÷6,2)	8,5 (2,5÷10,6)	p ₁₋₂ =0,06 p ₃₋₄ <0,01
CD19 ⁺ B-cells, %	6,6 (4,7÷14,2)	30,8 (17,0÷46,2)	21,1 (14,9÷26,3)	13,3 (8,8÷15,0)	12,8 (11,8÷14,7)	p ₁₋₂ <0,05
CD19 ⁺ CD5 ⁺ B ₁ -cells, %	4,8 (2,3÷7,4)	9,3 (5,6÷20,3)	5,6 (3,7÷10,0)	54,7 (29,8÷62,1)	16,8 (14,9÷19,7)	p ₃₋₄ <0,01
CD56 ⁺ NK-cells, %	12,6 (11,1÷19,3)	4,7 (4,3÷8,2)	14,1 (11,8÷19,8)	34,4 (19,9÷38,9)	14,3 (12,8÷17,9)	p ₁₋₂ <0,01 p ₃₋₄ <0,05
CD3 ⁺ CD56 ⁺ TNK-cells, %	12,1 (10,2÷17,9)	20,3 (13,1÷54,7)	13,7 (3,8÷19,3)	37,7 (27,0÷39,8)	0,2 (0,1÷0,3)	p ₃₋₄ <0,05
CD161 ⁺ cells, %	24,3 (4,8÷46,8)	н/о	24,1 (20,7÷34,7)	н/о	5,4 (1,3÷8,1)	p ₁₋₅ <0,05 p ₃₋₅ <0,05

Примечания: Me (25÷75)% – медиана, 25-й и 75-й процентиля; IEL – интраэпителиальные лимфоциты; LPL – лимфоциты собственной пластинки; p-значение – уровень статистически значимых различий; н/о – значение не определялось; CD – кластер дифференцировки; TCR – T-клеточный рецептор; NK-клетки – натуральные киллеры.

модулируя антиген-специфический иммунный ответ. При этом аутоиммунное воспаление при БК в основном ассоциируется с повышенной активацией и аберрантной пролиферацией Т-хелперов 1-го и 17-го типов, эффекторные реакции которых опосредованы продукцией провоспалительных цитокинов (IL-12, IL-23, IFN-γ и IL-17). Пилотные исследования показывают эффективность блокады или истощения CD4⁺Т-клеток в процессе лечения пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника [19].

Тем не менее все больше доказательств свидетельствует о роли механизмов цитотоксичности в повреждении ткани кишечника, что согласуется с выявленным в данном исследовании превалированием Т-киллеров в тонкой кишке у пациентов с БК. Т-киллеры реализуют свои эффекторные реакции посредством таких высокоактивных биомолекул, как перфорин, гранзимы, гранулизин, Fas-лиганд и фактор некроза опухоли-α. Более того, провоспалительные цитокины, высвобождаемые Т-киллерами, могут быть вовлечены в разрушение эпителиального барьера, индуцируя апоптоз эпителиальных клеток, что приводит к увеличению проницаемости кишечника. Высокие уровни цитотоксичности подтверждают существующую концепцию о том, что при болезни Крона поражается весь желудочно-кишечный тракт [20].

Наряду с описанными изменениями в слизистой оболочке общего количества Т-лимфоцитов установлена тенденция к повышению относительного количества



неклассических интраэпителиальных клеток, экспрессирующих $\gamma\delta$ T-клеточный рецептор ($\gamma\delta^+$ IEL), в тонкой кишке ($p=0,06$) и выявлено статистически значимое увеличение процента данной популяции в эпителии толстой кишки относительно такового в lamina propria (табл. 2). Наряду с этим удельное содержание мукозальных интраэпителиальных $\gamma\delta$ T-клеток коррелировало с количеством аналогичных клеток, циркулирующих в периферической крови пациентов с БК ($R=0,6$; $p<0,05$). Во всех случаях повышение тканевых $\gamma\delta^+$ IEL происходило преимущественно за счет субпопуляции $V\delta 1^+$ T-клеток, количество которых составило более 40% в тонкой кишке и более 60% в толстой кишке. При этом общее количество $\gamma\delta^+$ IEL коррелировало с локализацией патологического процесса ($R=-0,6$; $p<0,05$) и тяжестью течения заболевания ($R=0,7$; $p<0,01$).

Выявленное повышение минорной популяции $\gamma\delta$ T-лимфоцитов не только в периферической крови, но и в тканях согласуются с Regner et al. [21], характеризующих внелимфическое происхождение некоторых лимфоидных клеток слизистой оболочки ЖКТ, достигающих в отдельных случаях до 50% от лимфоидных клеток. В отличие от $\alpha\beta$ T-лимфоцитов, $\gamma\delta$ T-клетки комбинируют в себе свойства клеток врожденного и приобретенного иммунитета: их рецепторный аппарат частично схож с таковым у антигенпрезентирующих клеток и NK-клеток по экспрессии паттерн-распознающих и киллерных/ингибиторных рецепторов, однако, обладая специфическим T-клеточным рецептором, данная популяция способна распознавать антигенные структуры, подобно классическим T-лимфоцитам [22].

Экспериментальные исследования достаточно противоречивы в подтверждении вовлечения $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в патогенез БК, что частично объясняется высокой гетерогенностью данной популяции, в связи с чем их клиническое значение до конца не выяснено. При этом функции субпопуляций $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в тонкой и толстой кишке могут различаться, что объясняется их высокой функциональной пластичностью, а про- или противовоспалительный профиль клеток может определяться локальным микроокружением, в том числе выраженностью аутоиммунного воспаления слизистых оболочек [23].

Большинство авторов поддерживают гипотезу об иммунорегуляторной функции $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в ЖКТ, которая заключается в переключении синтеза антител на продукцию иммуноглобулина класса A (IgA), поддержании гомеостаза эпителия посредством взаимодействия с $\alpha\beta$ T-лимфоцитами, эпителиальными клетками и клиренса некротических клеток, регуляции барьерной функции и участия в формировании периферической толерантности. На экспериментальных моделях ВЗК продемонстрирована протективная роль $\gamma\delta$ T-клеток, характеризующаяся лимитированием воспалительной реакции посредством синтеза противовоспалительных цитокинов и факторов роста, а также предотвращением транслокации инвазивных комменсальных и патогенных бактерий через эпителий ЖКТ за счет стимуляции синтеза антимикробных пептидов клетками Панета [24]. Тем не менее воспалительное микроокружение, формируемое изменением субпопуляционного состава $\alpha\beta$ T-лимфоцитов в слизистых оболочках кишки, наряду с микробной стимуляцией, может приводить к aberrантной активации $\gamma\delta$ T-лимфоцитов, их активному хоумингу через кишечный эпителий и lamina propria посредством окклюдин-зависимого механизма и вовлечению в прогрессирование заболевания путем реализации своих цитотоксических эффекторных реакций. Кроме того, избыточная регенерация эпителия, медиированная

γδТ-клетками, способствует образованию псевдоподиев, атипичной зазубренной поверхности и развитию серьезных осложнений заболевания, таких как колоректальный рак [25].

Помимо характеристики клеточных механизмов адаптивного иммунитета проведен анализ гуморального звена специфического иммунитета. У пациентов с БК установлена преимущественная локализация В-клеток среди LPL тонкой кишки ($p < 0,05$) и субпопуляции В1-клеток среди LPL толстой кишки относительно IEL-компартамента ($p < 0,01$) (табл. 2). При этом количество последних коррелировало с наличием у пациентов периаанального повреждения ($R = 0,8$; $p < 0,01$).

Известно, что В-клетки могут непосредственно усиливать Т-клеточный ответ, продуцируя цитокины и синтезируя антитела, в частности секреторный IgA для контроля кишечной микробиоты в ЖКТ, а также функционировать в качестве локальных антигенпрезентирующих клеток и организовывать образование третичных лимфоидных структур, поддерживающих долговременный иммунитет. В-лимфоциты могут играть незаменимую роль в представлении антигена слизистой оболочке и выполнять иммунорегуляторную роль в контроле аутоагрессивного воспаления ЖКТ при БК. При низкой концентрации данной популяции в слизистой оболочке происходит нарушение распознавания антигенов кишечника, что ставит под угрозу первую линию защиты – снижение антителообразования и нарушение формирования иммунологической памяти. Кроме того, снижение антигенпрезентирующей функции В-клеток может способствовать превращению Т-лимфоцитов в аутореактивные клетки. С другой стороны, повышение количества популяции В₁-клеток усиливает продукцию низкоаффинных антител в ответ на бактериальные патогены, способные выступать в роли аутоантител и участвовать в антитело-опосредованном повреждении слизистых оболочек при БК [26].

Еще одна популяция врожденного иммунитета – NK-клетки – характеризовалась повышением их процентного содержания среди LPL толстой кишки. При этом более 50% клеток идентифицировались как TNK-клетки. В тонкой кишке не выявлено статистически значимых изменений в количестве NK- и TNK-клеток (табл. 2). В отличие от других лимфоцитов, NK-клетки не экспрессируют антиген-специфические рецепторы, но обладают сильным цитотоксическим потенциалом, подобно CD8⁺Т-клеткам, и осуществляют первую линию защиты наряду с γδТ-лимфоцитами. Помимо этого, для них характерна продукция большого количества Т-клеточных цитокинов, играющих важную роль в модуляции адаптивного иммунитета и способных опосредовать как эффекторные, так и иммуносупрессивные реакции. NK-клетки не являются ключевыми в повреждении ткани при БК, однако, синтезируя большое количество γ-интерферона и фактора некроза опухоли-α, способствуют нарушению кишечной толерантности и тем самым усиливают Т-клеточный ответ [27]. Большее внимание авторов привлекает субпопуляция TNK-клеток, коэкспрессирующая Т-клеточный рецептор и типичные для NK-клеток поверхностные рецепторы и, подобно γδТ-лимфоцитам, проявляющая свойства как врожденного, так и приобретенного иммунитета. TNK-клетки распознают фосфо- или гликолипиды и реализуют быструю защиту путем продукции широкого спектра цитокинов. Парадоксальность биологической функции заключается в том, что TNK-клетки могут быстро высвобождать большое количество Th1-, Th2-, Th17- и регуляторных цитокинов, в связи с чем способствуют как развитию, так и супрессии клеточно-медиированного иммунного



ответа в зависимости от распознаваемых антигенов и локального микроокружения. Согласно данным литературы, количество TNK-клеток увеличивается в воспаленной lamina propria у пациентов с БК, что полностью согласуется с полученными нами результатами [28].

В данном исследовании среди IEL как тонкой, так и толстой кишки ¼ часть клеток определялась как мукозально-ассоциированные CD161⁺Т-лимфоциты (табл. 2), которые сохраняют способность реагировать только на воспалительные цитокины [29]. Показано, что количество CD161⁺Т-клеток в ткани кишки превышало удельное содержание таковых в периферической крови пациентов ($p < 0,05$), что согласуется также с исследованиями Iiai T. et al., которые предполагают участие CD161⁺Т-лимфоцитов в усилении воспалительной реакции и хронизации процесса при БК, а также выявили корреляцию количества CD161⁺клеток с клинической активностью заболевания [30]. В связи с этим уровень экспрессии CD161⁺ на Т-клетках у пациентов с БК может служить еще одним маркером активности аутоиммунного интестинального воспаления.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из современных подходов к персонифицированной медицине, изучение функционирования отдельных компонентов системы мукозального иммунитета представляется перспективным с точки зрения поиска новых терапевтических мишеней или биомаркеров патологического процесса с использованием предложенного алгоритма фенотипирования клеток при БК. Выявленные изменения субпопуляционного состава лимфоидных клеток в тонкой и толстой кишке у пациентов с БК также различались в зависимости от их локализации (эпителиальный компартмент или lamina propria). Показано преимущественное вовлечение основных и минорных популяций интраэпителиальных Т-лимфоцитов в развитие аутоиммунного воспаления, в то время как в lamina propria патогенетически значимыми могут являться В-лимфоциты и NK-клетки, что требует дальнейших исследований для установления их роли в патогенезе БК.

Принимая во внимание, что в нормальных условиях кишечная среда толерантна к большинству чужеродных нетоксичных антигенов, выявленные изменения количественного состава лимфоидных субпопуляций могут являться триггерными механизмами нарушения целостности слизистого барьера, транслокации кишечных бактерий и увеличения числа местных и системных воспалительных реакций. При этом установленная корреляционная взаимосвязь дает основание предполагать миграцию мукозальных лимфоидных клеток и их циркуляцию в периферической крови, что может использоваться в качестве диагностически значимых маркеров прогрессирования заболевания и открывает новые возможности применения мукозальных лимфоидных клеток в таргетной терапии и профилактической медицине.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Wu R., Zhang D., Tu E. The mucosal immune system in the oral cavity-an orchestra of T cell diversity. *The International Journal of Oral Science*. 2014;6(3):125–32. DOI: 10.1038/ijos.2014.48.
2. Kabat A.G., Pott J., Maloy K.J. The Mucosal Immune System and Its Regulation by Autophagy. *Frontiers in Immunology*. 2016;7:240. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00240.
3. Wiarda J., Loving C.L. Intraepithelial lymphocytes in the pig intestine: T cell and innate lymphoid cell contributions to intestinal barrier immunity. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:1048708. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1048708.

4. Mörbe M., Jørgensen P., Fenton T. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT), diversity, structure, and function. *Mucosal Immunology*. 2021 Jul;14(4):793–802. DOI: 10.1038/s4138502100389-4.
5. Quatrini L., Vivier E., Ugozzini S. Neuroendocrine regulation of innate lymphoid cells. *Immunological*. 2018;33:120–136. DOI: 10.1111/immr.12707.
6. Jakob M.O., Murugan S., Klose C.S.N. Neuro-Immune Circuits Regulate Immune Responses in Tissues and Organ Homeostasis. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:308. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00308.
7. Ebbo M., Crinier A., Vély F. Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases. *The National Center for Biotechnology*. 2017;17(11):665–678. DOI: 10.1038/nri.2017.86.
8. Sonnenburg J., Sonnenburg E. Vulnerability of the industrialized microbiota. *Science*. 2019;366(6464):9255. DOI: 10.1126/science.aaw9255.
9. Ardatskaya M.D., Stolyarova L.G., Arkhipova E.V. Metabiotics as a Natural Development of a Probiotic Concept. *Gastroenterology*. 2017;15:35–39. DOI: 10.3402/mehd.v24i0.20399. (In Russian)
10. Geremia A., Arancibia-Cárcamo C. Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:1296. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01296.
11. Li Y., Li H. Pirfenidone ameliorates lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation and fibrosis by blocking NLRP3 inflammasome activation. *Molecular Immunology*. 2018;99:134–144. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.05.003.
12. Poniewierska-Baran A., Tokarz-Deptuła B. The role of innate lymphoid cells in selected disease states – cancer formation, metabolic disorder and inflammation. *Archives of Medical Science*. 2021;17(1):196–206. DOI: 10.5114/aoms.2019.89835.
13. Vivier E., Artis D. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*. 2018;174(5):1054–1066. DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.017.
14. Hu M.D., Edelblum K.L. Sentinels at the Frontline: the Role of Intraepithelial Lymphocytes in Inflammatory Bowel Disease. *Immunology and Inflammation*. 2017;3(6):321–334. DOI: 10.1007/s40495-017-0105-2.
15. Sundin J., Rangel I. Aberrant mucosal lymphocyte number and subsets in the colon of post-infectious irritable bowel syndrome patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2014;49(9):1068–75. DOI: 10.3109/00365521.2014.926982.
16. Chiarolla C. et al. M. Pro-inflammatory innate-like T cells are expanded in the blood and inflamed intestine in Crohn's Disease. *MedRxiv*. 2022. DOI: 10.1101/2022.05.12.22274864.
17. Regner E.N., Ohri N. Functional intraepithelial lymphocyte changes in inflammatory bowel disease and spondyloarthritis have disease specific correlations with intestinal microbiota. *Arthritis Research & Therapy*. 2018;20(1):149. DOI: 10.1186/s13075-018-1639-3.
18. García-Hoz C., Crespo L., Lopez N. The Intracellular Intensity of CD3 on Aberrant Intraepithelial Lymphocytes Is a Prognostic Factor of the Progression to Overt Lymphoma in Refractory Celiac Disease Type II (Pre-Enteropathy-Associated T Cell Lymphoma). *Digestive Diseases*. 2020;38:490–499. DOI: 10.1159/000506305.
19. Chao Z., Yuan Q., Hua Y. CD4CD8α IELs: They Have Something to Say. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:2269. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02269.
20. Sandler R., Hansen J. Intraepithelial and Lamina Propria Lymphocytes Do Not Correlate With Symptoms or Exposures in Microscopic Colitis. *Clinical and Translational Gastroenterology*. 2022;13(3). DOI: 10.14309/ctg.0000000000000467.
21. Regner E. H. Functional intraepithelial lymphocyte changes in inflammatory bowel disease and spondyloarthritis have disease specific correlations with intestinal microbiota. *Arthritis Research & Therapy*. 2018;20(1):149. DOI: 10.1186/s13075-018-1639-3.
22. Vandereyken M., James O., Swamy M. Mechanisms of activation of innate-like intraepithelial T lymphocytes. *Mucosal Immunology*. 2020;13(5):721–731. DOI: 10.1038/s41385-020-0294-6.
23. Sánchez-Castañón M., Castro B. G., Toca M. Intraepithelial lymphocytes subsets in different forms of celiac disease. *Autoimmunity Highlights*. 2016;7(1):14. DOI: 10.1007/s13317-016-0085-y.
24. Nizheharodova D.B., Tsekhanovich D.A., Starostin A.M., Dybov O.G., Zafanskaya M.M. Subpopulations of circulating γδ-lymphocytes in patients with inflammatory bowel diseases. *Journal of the Belarusian State University, Ecology*. 2022;4:58–68. (In Russian)
25. Cheroutre H., Lambolez F., Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature Immunology*. 2011;11(7):445–56. DOI: 10.1038/nri3007.
26. Nizheharodova D.B., Adamovich H.Yu., Ivanchyk G.I., Dybau A.G., Kulnich S.S., Shadrina V.K., Varabei A.U., Zafanskaya M.M. Antibody profile in patients with inflammatory bowel diseases. *Immunopathology, allergology, infectology*. 2020;3:30–38. DOI: 0.14427/jipai.2020.3.30. (In Russian).
27. Jaemoon K., Heounjeong G., Won A. Benign Indolent CD56-Positive NK-Cell Lymphoproliferative Lesion Involving Gastrointestinal Tract in an Adolescent. *Journal of Pathology and Translational Medicine*. 2014;48(1):73–76. DOI: 10.4132/JKoreanJPathol.2014.48.1.73.
28. Cooper R., Papworth N.J. Counting Intraepithelial Lymphocytes: A Comparison Between Routine Staining and CD3*56* Immunohistochemistry. *International Journal of Surgical Pathology*. 2020;28(4):367–370. DOI: 10.1177/1066896919894644.
29. Haitao M., Yuan Q., Hua Y. Intestinal intraepithelial lymphocytes: Maintainers of intestinal immune tolerance and regulators of intestinal immunity. *Wiley-Blackwell*. 2020;109(2):339–347. DOI: 10.1002/JLB.3RU0220-111.
30. Iiai T., Watanabe H., Suda T. CD161+ T (NT) cells exist predominantly in human intestinal epithelium as well as in liver. *Clinical & Experimental Immunology*. 2002;129(1):92–98. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2002.01886.x