

Цитокиновый профиль и иммунологический статус у пациентов с язвенным колитом

С.В.Кононова^{1,2}, Т.Я.Вахитов¹, И.В.Кудрявцев¹, Н.М.Лазарева^{1,3}, Т.С.Салль¹,
М.И.Скалинская^{1,4}, И.Г.Бакулин⁴, А.И.Хавкин^{5,6}, С.И.Ситкин^{1,4,7}

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

²Институт белка РАН, Пушкино, Российская Федерация;

³Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П.Павлова, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

⁴Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

⁵Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, Москва, Российская Федерация;

⁶Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Российская Федерация;

⁷Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А.Алмазова, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Цель. Рост заболеваемости и распространенности язвенного колита (ЯК) остается общемировой тенденцией. В иммунопатогенезе ЯК участвуют как Т-хелперы и синтезируемые ими цитокины, так и другие клетки иммунной системы. Целью настоящего исследования явилось изучение иммунологического статуса и цитокинового профиля у пациентов с ЯК. Ввиду значимых половых различий в иммунном ответе при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК) в исследование были включены только мужчины.

Пациенты и методы. В исследование были включены 25 пациентов с ЯК и 26 условно здоровых добровольцев (группа контроля), не имеющих ВЗК. Основные субпопуляции Т-лимфоцитов были выявлены при помощи многоцветной проточной цитометрии. Анализ содержания цитокинов и хемокинов в периферической крови был проведен методом мультиплексного иммуноферментного анализа.

Результаты. Содержание CD3⁺-Т-лимфоцитов было значимо повышено у больных ЯК по сравнению с группой контроля. У пациентов с ЯК выявлено снижение доли «наивных» цитотоксических Т-клеток (Тсyt) и Тсyt центральной памяти (СМ) при значимом увеличении содержания популяций CD3⁺CD8⁺ зрелых высокодифференцированных Тсyt TEMRA (терминально-дифференцированные CD45RA-позитивные Т-клетки эффекторной памяти). Субпопуляции СМ-регуляторных Т-клеток (Трег) показали значимую отрицательную корреляцию с тяжестью течения ЯК, воспроизводимую в субпопуляциях CD73⁺CD39⁺-Трег и CD73⁺CD39⁺-Трег. Доля фолликулярных Т-хелперов 2 (Тfh2) у пациентов с ЯК была значимо повышена по сравнению с группой контроля. Анализ цитокинового профиля показал значимое повышение концентраций интерлейкинов IL-5, IL-7, IL-12, IL-10 и хемокинов CCL3/MIP-1α, CXCL8/IL-8, CXCL11/I-TAC и CX3CL1/Fractalkine.

Заключение. Получены новые данные о значимых изменениях в составе Т-лимфоцитов периферической крови и цитокиновом профиле у мужчин с ЯК, которые оказались более характерными для Th2-ответа. Важным результатом исследования явились выявленные у больных ЯК нарушения в субпопуляционном составе циркулирующих фолликулярных Т-хелперов памяти, связанные со значимым увеличением доли Тfh2, способных переключать класс синтезируемых В-клетками антител с IgM на IgG и IgA. Кроме того, было показано значимое увеличение плазменных концентраций цитокина IL-7 и хемокина CXCL11/I-TAC у пациентов с ЯК.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника, язвенный колит, субпопуляции Т-хелперов, цитокины, хемокины

Для цитирования: Кононова С.В., Вахитов Т.Я., Кудрявцев И.В., Лазарева Н.М., Салль Т.С., Скалинская М.И., Бакулин И.Г., Хавкин А.И., Ситкин С.И. Цитокиновый профиль и иммунологический статус у пациентов с язвенным колитом. Вопросы практической педиатрии. 2021; 16(6): 52–62. DOI: 10.20953/1817-7646-2021-6-52-62

Для корреспонденции:

Вахитов Тимур Яшерович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник научной группы «Метабомика неинфекционных заболеваний» Института экспериментальной медицины, руководитель проекта РФФ № 20-65-47026

Адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

Телефон: (812) 234-6868

E-mail: tim-vakhitov@yandex.ru

ORCID: 0000-0001-8221-6910

Статья поступила 28.11.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

For correspondence:

Timur Ya.Vakhitov, PhD, DSc in Biological Sciences, Chief Researcher, Non-Infectious Disease Metabolomics Group, Institute of Experimental Medicine; Supervisor for the RSF Project No 20-65-47026

Address: 12 Akademician Pavlov str., Saint Petersburg, 197376, Russian Federation

Phone: (812) 234-6868

E-mail: tim-vakhitov@yandex.ru

ORCID: 0000-0001-8221-6910

The article was received 28.11.2021, accepted for publication 27.12.2021

Cytokine profile and immunological status of patients with ulcerative colitis

S.V.Kononova^{1,2}, T.Ya.Vakhitov¹, I.V.Kudryavtsev¹, N.M.Lazareva^{1,3},
T.S.Sall¹, M.I.Skalinskaya^{1,4}, I.G.Bakulin⁴, A.I.Khavkin^{5,6}, S.I.Sitkin^{1,4,7}

¹Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russian Federation;

²Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, Russian Federation;

³Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russian Federation;

⁴I.I.Mechnikov North-Western State Medical University, Saint Petersburg, Russian Federation;

⁵N.I.Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation;

⁶Belgorod National Research University, Belgorod, Russian Federation;

⁷V.A.Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russian Federation

Objective. The increase in the incidence and prevalence of ulcerative colitis (UC) continues to be a worldwide trend. Both T-helpers and produced cytokines, as well as other cells of the immune system, are involved in the immunopathogenesis of UC. The aim of this study was to explore the immunological status and cytokine profile in patients with UC. Since there are significant gender differences in an immune response in inflammatory bowel disease (IBD), only men were included in this study.

Patients and methods. 25 male patients with ulcerative colitis and 26 male healthy controls (HC) without IBD were enrolled in the study. T cell subsets were assessed by multicolor flow cytometry. Analysis of cytokines and chemokines in peripheral blood was performed by multiplex enzyme immunoassay.

Results. The percentage of CD3⁺ T lymphocytes was significantly increased in UC patients compared with HC. In patients with UC, a decrease in the naive cytotoxic T lymphocytes (T_{cyt}) and central memory (CM) T_{cyt} was revealed with a significant increase in the CD3⁺CD8⁺ highly differentiated T_{cyt} TEMRA (terminally differentiated CD45RA-positive effector memory T-cells). CM regulatory T cells (T_{reg}) subpopulations showed a significant negative correlation with the severity of UC, reproduced in the CD73⁺CD39⁺ T_{reg} and CD73⁺CD39⁺ T_{reg} subpopulations. The proportion of T follicular helper 2 cells (T_{fh2}) in patients with UC was significantly increased compared to HC. Analysis of the cytokine profile showed a significant increase in the concentrations of interleukins IL-5, IL-7, IL-12, IL-10, and chemokines CCL3/MIP-1 α , CXCL8/IL-8, CXCL11/I-TAC, and CX3CL1/Fractalkine.

Conclusion. New data were obtained on significant changes in peripheral blood T-lymphocytes and cytokine profile in male patients with UC, which turned out to be more characteristic of the Th2 response. Changes in the subpopulation composition of circulating follicular T-helpers in UC were associated with a significant increase in the percentage of T_{fh2}, which can switch the class of antibodies synthesized by B-cells from IgM to IgG and IgA. In addition, a significant increase in plasma concentrations of the cytokine IL-7 and the chemokine CXCL11/I-TAC was shown in patients with UC.

Key words: inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, T helper cell subsets, cytokines, chemokines

For citation: Kononova S.V., Vakhitov T.Ya., Kudryavtsev I.V., Lazareva N.M., Sall T.S., Skalinskaya M.I., Bakulin I.G., Khavkin A.I., Sitkin S.I. Cytokine profile and immunological status of patients with ulcerative colitis. *Vopr. prakt. pediatri. (Clinical Practice in Pediatrics)*. 2021; 16(6): 52–62. (In Russian). DOI: 10.20953/1817-7646-2021-6-52-62

Рост заболеваемости и распространенности язвенного колита (ЯК), относящегося, наряду с болезнью Крона (БК) и недифференцированным колитом, к воспалительным заболеваниям кишечника (ВЗК), остается общемировой тенденцией. Прямые и косвенные годовые затраты, связанные с ЯК, достигают 29,1 млрд евро в европейских странах и до 14,9 млрд долларов в США [1]. ЯК представляет собой многофакторное иммуноопосредованное воспалительное заболевание толстой кишки, в основе патогенеза которого лежат генетическая предрасположенность, воздействие факторов окружающей среды, дисбиотические изменения микробиоты кишечника и неадекватные иммунные ответы [2]. В иммунопатогенезе ЯК участвуют как Т-хелперы (1-го и 17-го типов) и синтезируемые ими цитокины, так и другие клетки иммунной системы [3, 4]. Дисбиоз оказывает значимое влияние на целостность кишечного барьера, праймирование и регуляцию иммунной системы организма, включая участие в «поляризации» (дифференцировке) Т-хелперов [3–5].

В связи с этим представляет интерес более детальное изучение иммунологического статуса и цитокинового про-

филя у пациентов с ЯК, ставшее **целью** настоящего клинического исследования. Поскольку существуют значимые половые различия в иммунном ответе при ВЗК [6, 7], в том числе обусловленные гендер-специфической функциональной регуляцией рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом (PPAR) в Т-клетках [8], в исследование были включены только мужчины.

Пациенты и методы

Исследуемая когорта. Исследуемая когорта состояла из 51 мужчины – 25 пациентов с ЯК (пациенты) и 26 условно здоровых добровольцев (группа контроля), не имеющих ВЗК. Средний возраст пациентов – 38,4 $\pm$ 2,1 года, условно здоровых добровольцев – 29,3 $\pm$ 2,7 года.

У пациентов с ЯК диагноз был установлен не менее чем за 6 мес. до начала исследований, среднее время длительности заболевания составило 8,76 $\pm$ 1,69 года. Средний возраст дебюта ЯК по группе составил 30,5 $\pm$ 1,8 года.

У пациентов с установленным в соответствии с международными критериями диагнозом ЯК проведен отбор об-

разцов венозной крови и фекалий. Оценка активности заболевания на момент включения в исследование проводилась в соответствии с национальными и международными руководящими принципами и включала рассмотрение симптомов, клинических признаков и объективных показателей, включая анализы крови (С-реактивный белок, скорость оседания эритроцитов, концентрацию гемоглобина и сывороточный альбумин), маркеров стула (фекальный кальпротектин) и оценки слизистой оболочки (с помощью гибкой сигмоидоскопии или колоноскопии), где это было необходимо.

Классической категоризацией пациентов с ЯК можно считать оценку индекса DAI, однако для удобства сравнения наши пациенты на момент взятия биоматериала были распределены на две подгруппы по степени активности текущей атаки: больные с активностью от легкой до умеренной (подгруппа 1; $n = 14$; 56%) и с высокой активностью воспалительного процесса (подгруппа 2; $n = 11$; 44%).

Поскольку эндоскопическая активность воспалительного процесса в кишке не всегда соответствует клиническому индексу, этот параметр учитывался отдельно: на момент взятия проб у 24% ($n = 6$) пациентов отмечена минимальная эндоскопическая активность или ремиссия, у 48% ($n = 12$) – умеренная эндоскопическая активность, у 28% ($n = 7$) – выраженная эндоскопическая активность (индекс эндоскопической активности по Schroeder – 0–1, 2 и 3 балла соответственно [9, 10]).

Распределение пациентов по локализации воспалительного процесса с учетом Монреальской классификации [11]: проктит и левостороннее поражение – 40% ($n = 10$), изолированный проктит – 4% ($n = 1$), тотальное поражение – 56% ($n = 14$).

Помимо активности обострения ЯК проводилась также оценка тяжести заболевания. Среди пациентов: 36% ($n = 9$) – с легким течением ЯК, 40% ($n = 10$) – со среднетяжелым, 24% ($n = 6$) – с тяжелым течением заболевания. У 80% больных течение заболевания можно охарактеризовать как рецидивирующее, 20% ($n = 5$) имели непрерывную активность ЯК.

Для сопоставления групп пациентов между собой принято решение учесть не только текущую клиническую и эндоскопическую активность атаки, но и характер течения ВЗК в целом, что подразумевает принятие во внимание тяжести ЯК, длительности анамнеза заболевания (>5 лет), частоты рецидивов (>2 за последний год, либо непрерывная активность ЯК), наличие внекишечных проявлений любой локализации с одновременным текущим обострением умеренной либо высокой активности и индексом Schroeder текущей атаки не менее 2 баллов [9]. Таким образом, нам удалось разделить пациентов с ЯК на 2 категории: 1) условно мягкое/благоприятное течение и 2) серьезное/неблагоприятное течение.

У всех пациентов перед проведением процедуры забора биологических материалов (образцы крови, фекалий) было подписано добровольное информированное согласие с соблюдением всех процедур GCP и в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации пересмотра 2013 г. Проведение исследования одобрено локальным этическим коми-

тетом ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России (протокол №7 от 07.10.2020).

Определение иммунного профиля

Анализ основных клеточных популяций иммунных клеток

Объектом исследования служила венозная кровь, полученная путем пункции периферической вены и собранная в вакуумные пробирки с содержанием стабилизатора КЗЭДТА. Все цитофлуориметрические исследования проводили в день взятия крови. Анализ образцов основных клеточных популяций иммунных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США). Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с рекомендациями Хайдукера и соавт. (2012) [12]. Иммунофенотипирование проводилось на цельной периферической крови (100 мкл на моноклональную комбинацию) по безотмывочной технологии с последующим лизированием эритроцитов с использованием лизирующего раствора VersaLyse (кат. №A09777), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (кат. №A07800). По завершении инкубации и разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали от несвязавшихся антител избытком забуференного фосфатами физиологического раствора (7 мин при 330 g), а полученный клеточный осадок ресуспендировали в 200 мкл забуференного фосфатами физиологического раствора, содержащем 2% нейтрального параформальдегида (кат. №HT5011, Sigma-Aldrich, США).

Анализ основных субпопуляций Т-лимфоцитов

и регуляторных Т-лимфоцитов периферической крови

Основные популяции Т-лимфоцитов и уровень экспрессии ими CD39 и CD73 оценивался с применением следующей панели моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами, – CD39-FITC (clone A1, cat. 328206, BioLegend, Inc., USA), CD25-PE (clone B1.49.9, cat. A07774, Beckman Coulter, USA), CD62L-ECD (clone DREG56, cat. IM2713U, Beckman Coulter, USA), CD45R0-PC5.5 (clone UCHL1, cat. IM2712U, Beckman Coulter, USA), CD4-PC7 (clone SFC12T4D11 (T4), cat. 737660, Beckman Coulter, USA), CD8-APC (clone B9.11, cat. IM2469, Beckman Coulter, USA), CD3-APC-Alexa Fluor 750 (clone UCHT1, cat. A94680, Beckman Coulter, USA), CD73-Pacific Blue (clone AD2, cat. 344012, BioLegend, Inc., USA) and CD45-Krome Orange (clone J33, cat. A96416, Beckman Coulter, USA). В каждом образце анализировалось не менее 40000 CD3⁺-Т-лимфоцитов периферической крови.

Анализ степени созревания основных популяций

Т-лимфоцитов периферической крови

Уровень дифференцировки Т-клеток оценивался по ко-экспрессии CD45RA и CD62L определяемой антителами против CD45RA (клон 2H4LDH11LDB9 (2H4)) и CD62L (клон DREG56) производства Beckman Coulter, США. Субпопуляция «наивных» (N) Т-клеток обладала фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺, клетки с фенотипами CD45RA-CD62L⁺ и CD45RA-CD62L⁻ соответствовали Т-клеткам центральной (CM) и эффекторной (EM) памяти, а «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные Т-клетки (TEMRA) определялись как CD45RA⁺CD62L⁻.

**Анализ основных субпопуляций «поляризованных»
Т-хелперов периферической крови**

Для выявления Т-хелперов (Th) использовали антитела против CD3 (клон UCHT1) и CD4 (клон 13B8.2), далее для разделения CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов на отдельные субпопуляции определяли коэкспрессию CD45RA и CD62L и затем у всех выявленных субпопуляций CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов при помощи моноклональных антител анализировали уровень экспрессии следующих хемокиновых рецепторов: CCR4 (CD194, клон L291H4), CCR6 (CD196, клон G034E3), CXCR3 (CD183, клон G025H7) и CXCR5 (CD185, клон J252D4) производства Biolegend, США. В каждом образце анализировалось не менее 20000 CD3⁺CD4⁺-Th-клеток периферической крови.

**Анализ основных субпопуляций В-лимфоцитов
периферической крови**

Для выявления популяции В-лимфоцитов периферической крови использовали антитела против CD45 (клон J33, кат. №A96416) и CD19 (клон J3-119, кат. №A94681), конъюгированными с Krome Orange и APC-AlexaFluor750 соответственно. Для анализа распределения В-лимфоцитов по основным субпопуляциям применяли антитела против поверхностных IgD (клон IA6-2, кат. № B30652), CD38 (клон LS198-4-3, кат. № A07779) и CD27 (клон 1A4CD27, кат. № A54823), конъюгированных с FITC, PE и PC7 соответственно. Все использованные в работе антитела были производства Beckman Coulter Inc. (США). Окраску антителами производили в соответствии с рекомендациями производителя. В каждом образце анализировалось не менее 5000 CD19⁺-В-лимфоцитов периферической крови.

**Анализ спектра цитокинов (про-, противовоспалительных
цитокинов, хемокинов) методом мультиплексного анализа**

Для определения содержания цитокинов пробирки с венозной кровью центрифугировали при 1500 об./мин в течение 10 мин, образцы плазмы больных хранили в аликвотах при температуре -80°C до проведения исследований. В день исследования образцы были разморожены при комнатной температуре. Определение цитокинов проводилось методом xMap мультиплексного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора MILLIPLEX (Millipore, артикул HSTCMAG28SPMX21, Германия) для исследования цитокинов и хемокинов Т-клеток человека в низких концентрациях (Fractalkine/CX3CL1, IL-12 (p70), GM-CSF, IL-13, IFN- γ , IL-17A/CTLA8, IL-1 β , IL-21, IL-2, IL-23, IL-4, I-TAC/CXCL11, IL-5, MIP-1 α /CCL3, IL-6, MIP-1 β /CCL4, IL-7, MIP-3 α /CCL20, IL-8/CXCL8, TNF- α , IL-10).

Определение концентрации цитокинов проводилось в лунках 96-луночного планшета, где образцы плазмы, контроли и калибраторы инкубировались с магнитными микросферами в течение 16–18 ч при 4°C и постоянном встряхивании. После этого все лунки планшета промывались два раза промывочным буфером на панели устройства с магнитной платформой (Bio-Tek Elx450, США). Далее пробы инкубировались с детектирующими антителами, меченными биотином, в течение 60 мин, а затем с конъюгатом (стрептавидин-фикоэритрин) в течение 30 мин при температуре 20–25°C и постоянном встряхивании, после чего образцы промывались как описано выше. После промывки в лунки

вносилась проточная жидкость и планшет помещался в анализатор Luminex MAGPIX для регистрации результатов реакции. Построение калибровочных кривых, определение концентраций цитокинов в образцах осуществляли с помощью программного обеспечения xPONENT.

Статистическая обработка результатов

Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.3 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку всех полученных данных проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Нормальность распределения проверяли по критерию согласия Пирсона хи-квадрат (χ^2), а также с помощью тестов Дагостино и комплексного теста Пирсона, Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Цитофлуориметрические результаты и количественные данные выражали в виде процента (%) позитивных клеток от искомой популяции. Все количественные данные приводили в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q25; Q75). Для оценки значимости различий использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Критическая величина уровня значимости (p) принималась равной 0,05. Для выявления корреляционных взаимосвязей между двумя количественными параметрами использовали непараметрический метод ранговой корреляции по Спирмену с вычислением коэффициента ранговой корреляции (r).

Результаты исследования и их обсуждение

**Анализ цитокинового профиля
больных язвенным колитом**

Методом мультиплексного ИФА-анализа был проведен анализ содержания цитокинов и хемокинов в периферической крови больных ЯК и здоровых добровольцев. Иммунный профиль группы больных ЯК был оценен согласно следующим критериям в зависимости от тяжести заболевания и времени дебюта.

Анализ цитокинового профиля группы больных ЯК и группы контроля (таблица) показал, что среди анализируемого спектра цитокинов значимые отличия (пациенты по сравнению с группой контроля) среди интерлейкинов и провоспалительных цитокинов продемонстрировали, IL-5, IL-7, IL-12 (p70), тогда как изменения концентрации для IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-13, IL-17A/CTLA8, IL-21, IL-23, IFN- γ и TNF α не были значимы. Значимо у больных также отличался противовоспалительный цитокин IL-10, СС-хемокин CCL3/MIP-1 α , СХС-хемокины CXCL8/IL-8 и CXCL11/I-TAC, а также СХ3С-хемокин CX3CL1/Fractalkine (таблица).

Обращает на себя внимание тот факт, что концентрация IL-2 в плазме у больных ЯК не отличалась от таковой у здоровых добровольцев, хотя сообщалось, что она может быть понижена в слизистой оболочке у пациентов с ЯК [13]. Кроме того, незначительное повышение у больных ЯК концентрации IFN- γ не было значимым.

Анализ изменения уровня цитокинов в зависимости от тяжести заболевания при условном разделении группы больных ЯК на 3 группы с легким (группа 1, n = 9), среднетя-

Таблица. Цитокиновый профиль группы пациентов с ЯК и условно здоровых добровольцев (группа контроля)
Table. Cytokine profile of UC patients ($n = 25$) and healthy individuals (control group) ($n = 26$)

Цитокины / Cytokines	Пациенты с ЯК ($n = 26$), концентрация цитокинов пг/мл / UC patients ($n=26$), level of cytokines, pg/mL Me (Q25; Q75)	Группа контроля ($n = 25$), концентрация цитокинов пг/мл / Healthy controls ($n=25$), level of cytokines, pg/mL Me (Q25; Q75)	p
Интерлейкины и провоспалительные цитокины / Interleukins and proinflammatory cytokines			
IL-1 β	1,40 (1,13; 1,64)	1,20 (1,11; 1,45)	0,220
IL-2	1,82 (1,54; 2,38)	1,73 (1,21; 2,16)	0,163
IL-4	22,22 (16,40; 36,28)	18,99 (15,51; 21,33)	0,141
IL-5	2,04 (1,51; 3,06)	1,54 (1,20; 2,35)	0,035
IL-6	1,18 (0,78; 3,78)	1,49 (0,65; 3,83)	0,915
IL-7	9,33 (8,64; 10,99)	8,91 (7,90; 9,57)	0,027
IL-12 (p70)	2,27 (1,75; 3,19)	1,71 (1,27; 2,47)	0,026
IL-13	3,12 (1,65; 5,17)	2,36 (1,30; 2,73)	0,154
IL-17A/CTLA8	6,85 (5,36; 8,11)	6,79 (4,72; 8,06)	0,699
IL-21	2,98 (2,23; 3,73)	2,48 (2,36; 2,99)	0,249
IL-23	118,70 (93,98; 153,50)	109,00 (85,15; 135,10)	0,300
IFN- γ	38,41 (33,68; 45,72)	33,94 (31,51; 42,11)	0,086
TNF α	3,70 (3,20; 4,60)	3,49 (2,81; 4,00)	0,101
Противовоспалительные цитокины / Anti-inflammatory cytokines			
IL-10	7,42 (5,29; 10,12)	5,54 (3,88; 6,74)	0,006
Ростовые факторы / Growth factors			
GM-CSF	7,86 (5,88; 9,94)	7,68 (6,52; 8,93)	0,685
СС-хемокины / CC chemokines			
CCL3/MIP-1 α	5,42 (3,96; 7,25)	3,14 (2,24; 5,36)	0,022
CCL4/MIP-1 β	5,69 (2,63; 9,02)	5,46 (3,90; 7,36)	0,699
CCL20/MIP-3 α	9,16 (7,81; 10,05)	8,25 (7,49; 9,07)	0,089
СХС-хемокины / CXC chemokines			
CXCL8/IL-8	4,37 (2,05; 8,11)	2,03 (1,26; 4,41)	0,025
CXCL11/I-TAC	14,20 (11,05; 22,42)	7,98 (6,72; 10,27)	<0,001
СХ3С-хемокины / CX3C chemokines			
CX3CL1/ Fractalkine	135,40 (119,10; 153,90)	125,30 (113,80; 131,90)	0,049

Результаты в таблице представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Me (Q25; Q75)). Значимость различий (p) указана согласно U-критерию Манна-Уитни.

Data are presented as medians and interquartile ranges (Me (Q25; Q75)). The significance of differences (p) was assessed using the Mann-Whitney U test.

желым (группа 2, $n = 10$) и тяжелым течением (группа 3, $n = 6$) заболевания обнаружил значимые отличия в содержании цитокинов IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-13, IL-17A/CTLA8 и IL-21. Между группами 1 и 2 значимой разницы обнаружено не было. Между группами 1 и 3 отмечалась значимая разница в концентрации цитокина IL-8 (2,28 (1,98; 5,19) vs 33,18 (5,91; 66,04), $p_{1-3} = 0,018$). Между группами 2 и 3 отмечалась значимая разница в концентрации цитокинов IL-4 (17,37 (12,73; 23,83) vs 67,26 (20,29; 150,40), $p_{2-3} = 0,011$); IL-5 (1,48 (0,96; 2,32) vs 2,96 (2,03; 8,20), $p_{2-3} = 0,023$); IL-6 (1,02 (0,63; 2,01) vs 9,48 (1,11; 56,50), $p_{2-3} = 0,031$); IL-7 (8,79 (7,94; 9,81) vs 10,99 (9,56; 16,85), $p_{2-3} = 0,026$); IL-8 (3,89 (1,57; 7,57) vs 33,18 (5,91; 66,04), $p_{2-3} = 0,042$); IL-13 (2,28 (1,51; 4,02) vs 9,99 (3,96; 30,49), $p_{2-3} = 0,017$); IL-17A (5,56 (3,78; 6,65) vs 7,18 (7,05; 8,70), $p_{2-3} = 0,026$); IL-21 (2,36 (1,93; 3,06) vs 3,88 (3,01; 6,02), $p_{2-3} = 0,026$).

Однако когда мы попытались оценить уровень цитокинов в зависимости от активности текущей атаки при условном разделении группы больных ЯК на две подгруппы – пациенты с активностью от легкой до умеренной (подгруппа 1,

$n = 14$) и пациенты с высокой активностью воспалительного процесса (подгруппа 2, $n = 11$), значимые отличия в содержании цитокинов были обнаружены только для двух цитокинов. Между подгруппами 1 и 2 отмечалась разница в концентрации IL-13 (2,02 (1,30; 4,64) vs 4,66 (2,28; 14,52), $p_{1-2} = 0,048$) и CCL4/MIP-1 β (3,67 (2,49; 7,86) vs (8,69 (4,07; 11,53), $p_{1-2} = 0,040$). IL-13 связан с Th2-ответом, а CCL4/MIP-1 β рассматривается как потенциальный маркер терапевтического ответа.

Сравнение цитокинового профиля больных в зависимости от клинической картины заболевания, дебюта, стажа ЯК показало, что положительную корреляционную взаимосвязь между возрастом дебюта заболевания и концентрацией демонстрируют цитокины IL-6 ($r = 0,402$, $p = 0,047$) и IL-8 ($r = 0,431$, $p = 0,031$).

Сравнение содержания цитокинов и лабораторных показателей показало, что среди цитокинов и различных типов иммунных клеток была положительная корреляция только между содержанием нейтрофилов и CX3CL1/Fractalkine ($r = 0,441$, $p = 0,035$).

Анализ иммунологического статуса больных язвенным колитом

Анализ относительного содержания основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови больных методом многоцветной проточной цитометрии позволил выявить основные популяции В-клеток с фенотипом CD19 $^{+}$ и цитотоксические Т-лимфоциты с фенотипом CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$, а также популяции «регуляторных» лимфоцитов, включая Т-хелперы (Th) и регуляторные Т-клетки (Treg).

Хотя относительное содержание В-лимфоцитов в периферической крови в группе больных не отличалось от значений в группе условно здоровых мужчин (10,94% (6,95; 13,79) vs 12,07% (10,31; 13,86), $p = 0,337$), субпопуляционный состав циркулирующих В-клеток, выделяемых на основании нескольких подходов – коэкспрессия IgD и CD38 (так называемая Bm1-Bm5-классификация), коэкспрессия IgD и CD27, CD27 и CD38, а также CD27 и CD5 имели ряд различий. В рамках общего пула лимфоцитов у больных по сравнению с группой условно здоровых мужчин снижалась не только доля «наивных» В-клеток (с 1,65% (1,48; 2,29) до 1,13% (0,58; 2,01) при $p = 0,018$), но и уровни В-клеток памяти с фенотипами IgD-CD38 $^{+}$ (с 1,14% (0,87; 1,76) до 0,89% (0,60; 1,14), $p = 0,013$) и IgD-CD38 $^{-}$ (с 0,78% (0,38; 1,06) до 0,91% (0,77; 1,66) при $p = 0,032$). Также были снижены IgD-CD27 $^{+}$ -В-клетки памяти с переключенным классом синтезируемых антител – с 1,51% (1,28; 2,17) до 1,31% (0,91; 1,86) ($p = 0,009$), эти клетки, в отличие от других В-клеток, отрицательно коррелировали с тяжестью течения ЯК ($r = -0,465$, $p = 0,029$).

Исследование Т-лимфоцитов на основании экспрессии CD3, а также коэкспрессии CD4, или CD8, или CD25, позволяет выявить основные субпопуляции Т-лимфоцитов, Т-хелперы (Th), цитотоксические Т-клетки (Tcyt) и регуляторные Т-лимфоциты (Treg) соответственно. Содержание CD3 $^{+}$ -лимфоцитов было повышено у больных ЯК по сравнению с группой контроля (79,45% (74,58; 84,18) vs 74,65% (71,02; 77,52), $p = 0,024$), однако по содержанию остальных субпопуляций Т-клеток (CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ -Th (47,04% (41,17; 56,53) vs 46,40% (39,63;

52,5) при $p = 0,451$); CD3⁺CD8⁺-T_{cyt} (25,78% (21,93; 31,95) vs 24,66% (19,81; 26,84) при $p = 0,197$); CD3⁺CD4⁺CD25^{bright} (3,03% (2,47; 4,11) vs 3,36% (2,70; 3,55) при $p = 0,910$)) значимых различий выявлено не было. Различия выявлялись только при дальнейшем субпопуляционном анализе.

Анализ основных субпопуляций Т-лимфоцитов и регуляторных Т-лимфоцитов периферической крови

Анализ относительного содержания основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов на разных стадиях дифференцировки показал, что в периферической крови больных ЯК уровень «наивных» Т_{cyt} ниже почти в два раза (22,05% (12,21; 34,29) vs 45,47% (41,74; 56,32), $p < 0,001$), а уровень зрелых высокодифференцированных Т_{cyt} популяции TEMRA, наоборот, выше (47,44% (33,71; 65,32) vs 25,00% (19,36; 35,12), $p < 0,001$), чем в группе условно здоровых добровольцев. Кроме этого, у них снижалась доля CM Т_{cyt}, отвечающих за долговременную иммунологическую память (3,41% (1,78; 5,47) vs 5,73% (3,91; 9,97) в группе контроля, $p = 0,001$) (рисунок). Значимые изменения в уровне субпопуляции EM Т_{cyt}-клеток обнаруживались только тогда, когда оценивалась активность атаки у больных ЯК относительно здорового контроля и в случае оценки тяжести течения заболевания в группе больных с легким течением ЯК относительно группы здоровых добровольцев. Таким образом, у мужчин с ЯК наблюдается снижение доли «наивных» и CM-клеток, которые отвечают за распознавание антигенов в рамках лимфоидной ткани и развитие специфического иммунного ответа, тогда как содержание популяций CD3⁺CD8⁺ зрелых эффекторов TEMRA, способных мигрировать в периферические ткани и проявлять свои эффекторные свойства, связанные с элиминацией патогенов, значимо увеличивается.

В то же время мы не обнаружили значимых различий в уровне субпопуляций Th-клеток с разной степенью дифференцировки (рисунок).

Уровень регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD25^{bright} в общем пуле Th-клеток в группе больных ЯК значимо не отличался от такового в группе контроля (7,02% (5,68; 7,86) vs 6,44% (5,73; 8,23), $p = 0,861$). Кроме того, анализ субпопуляционного состава Treg, в том числе Treg, несущих на своей поверхности нуклеотидазы CD39 и/или CD73, участвующие в катаболизме провоспалительного АТФ в противовоспалительный аденозин, не выявил значимых различий между сравниваемыми группами. В то же время субпопуляции CM Treg демонстрировали отрицательную корреляцию с тяжестью течения ЯК ($r = -0,431$, $p = 0,045$), воспроизводимую в субпопуляциях CD73⁺CD39⁺-Treg ($r = -0,507$, $p = 0,016$) и CD73⁺CD39⁺-Treg ($r = -0,551$, $p = 0,008$). Субпопуляция «наивных» CD73⁺CD39⁺-Treg положительно коррелировала с тяжестью течения ЯК ($r = 0,455$, $p = 0,032$) только у больных с легким течением либо относительно здоровых или относительно больных с тяжелым течением.

Анализ содержания основных субпопуляций «поляризованных» Т-хелперов в периферической крови: Th1 (фенотип CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁻), Th2 (фенотип CXCR5⁺CXCR3⁺CCR6⁺CCR4⁺), Th17 (фенотип CXCR5⁺CCR6⁺) и фолликуляр-

ных Т-хелперов (Tfh), несущих на своей поверхности CXCR5 в рамках Т-лимфоцитов периферической крови у больных ЯК (рисунок) не показал значимых отличий от значений в группе контроля для Th1-клеток (9,94% (7,55; 14,94) vs 11,04% (8,04; 14,21), $p = 0,991$, соответственно), Th2-клеток (4,74% (4,14; 7,08) vs 4,84% (3,63; 5,79), $p = 0,385$) и Tfh-клеток (10,01% (6,61; 14,80) vs 11,81% (9,29; 13,32), $p = 0,337$). То, что содержание Th2-клеток все же может значимо меняться в ходе заболевания, можно обнаружить только при анализе тяжести течения заболевания либо при анализе активности атаки в субпопуляции EM Th2-клеток (данные не показаны). Вместе с тем относительное содержание Th17-клеток у больных ЯК было значимо ниже значений, полученных для группы сравнения (20,25% (14,87; 27,20) vs 29,44% (22,05; 31,23), $p = 0,007$).

Дальнейший анализ популяции Th17-лимфоцитов, проведенный в рамках общего пула CCR6⁺ CM и EM Th-клеток как на основании экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR4, так и по спектру функциональных активностей, позволил выявить субпопуляции «классических» Th17 с фенотипом CCR4⁺CXCR3⁻, «дважды позитивных» или DP-Th17 с фенотипом CCR4⁺CXCR3⁺, «неклассических» CCR4⁻CXCR3⁺ или Th17.1-клеток и «дважды негативных» CCR4⁻CXCR3⁻ или DN-Th17-клеток. Было показано (рисунок), что у больных ЯК по сравнению с группой контроля в циркуляции повышался уровень DN-Th17 (8,57% (7,20; 13,04) vs 7,18% (5,36; 8,57), $p = 0,008$), тогда как относительное содержание Th17.1-клеток снижалось (28,25% (20,96; 35,57) vs 36,36% (31,60; 43,84), $p = 0,003$).

На основании экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR6 весь компартмент циркулирующих CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺-Tfh-клеток можно дополнительно разделить на четыре отдельные популяции: CXCR3⁺CCR6⁻-Tfh1, CXCR3⁺CCR6⁻-Tfh2, CXCR3⁺CCR6⁺-Tfh17 и CXCR3⁺CCR6⁺-DP-Tfh. Мы обнаружили, что, хотя общий пул Tfh-клеток у больных значимо не отличался от такового у условно здоровых мужчин, в субпопуляционном составе у больных ЯК имеются отличия. У них относительно группы контроля была снижена доля DP-Tfh-клеток (10,75% (9,07; 13,81) vs 12,41% (11,39; 17,24), $p = 0,011$), тогда как содержание Tfh2 было значимо повышено (28,70% (25,67; 34,22) vs 23,74% (23,24; 26,39) в контроле, $p = 0,003$).

Иммунный ответ при ВЗК на уровне как очага воспаления, так и периферической крови широко исследуется уже много лет. Однако проводимые ранее исследования проводились, как правило, на группах больных, включавших как мужчин, так и женщин. При этом многие исследования включали пациентов как с ЯК, так и с БК. Исходя из того, что пол влияет на особенности иммунного ответа, мы включили в исследование только мужчин [6, 7]. Кроме того, в исследование были включены только пациенты с ЯК.

Нарушение регуляции ответа Т-лимфоцитов часто рассматривается как ключевой фактор хронического воспаления при ВЗК [14]. Полученные нами результаты также указывают на существенные изменения в составе Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов с ЯК. В первую очередь, следует отметить накопление в циркуляции эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов (TEMRA), способных поки-

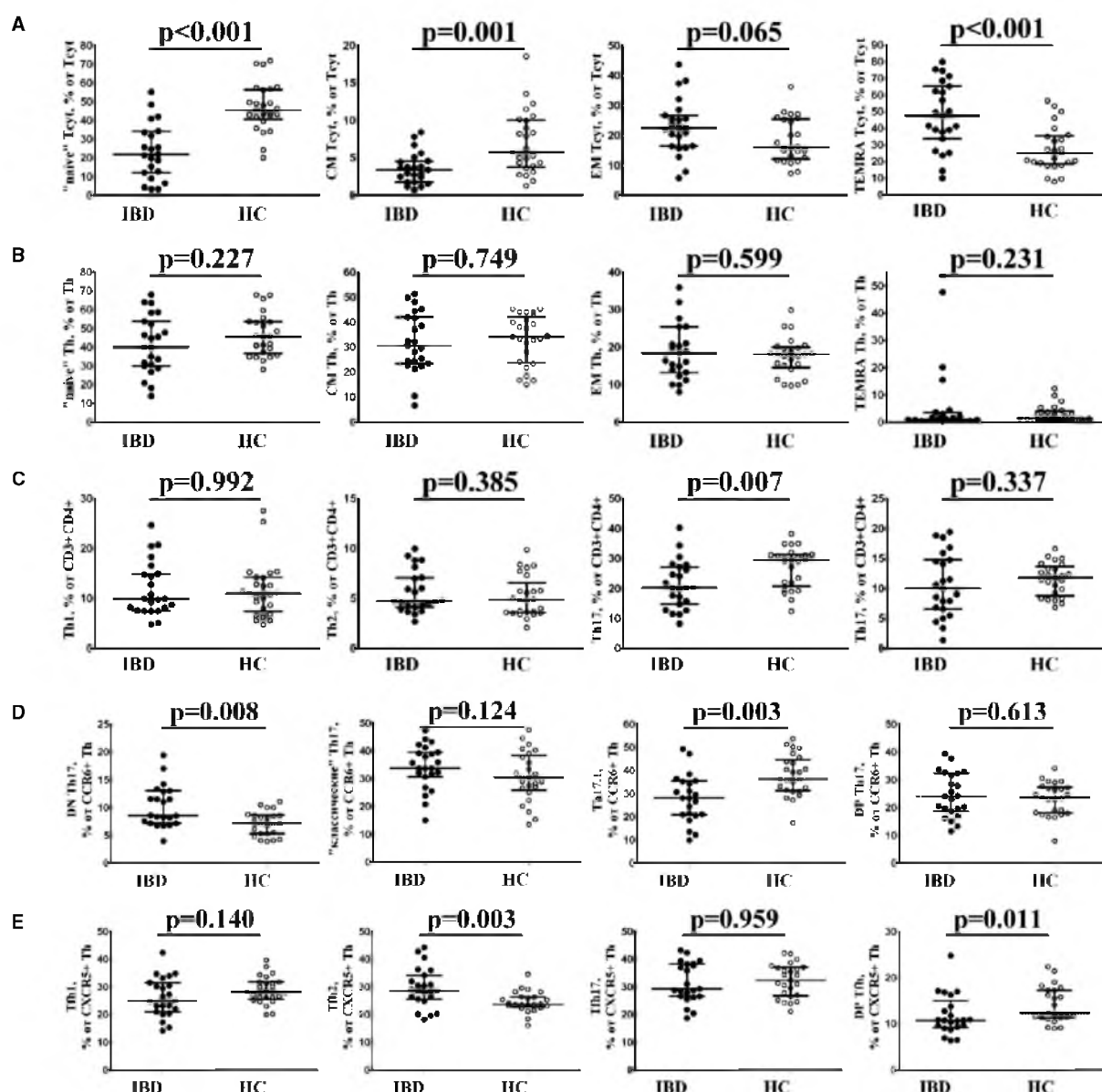


Рисунок. Относительное содержание основных субпопуляций Т-клеток в периферической крови больных ЯК и группы контроля.
А – относительное содержание основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов, находящихся на различных стадиях дифференцировки. Слева направо – «наивные» Тcyl (Naive), Тcyl центральной памяти (CM); Тcyl эффекторной памяти (EM), «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные Тcyl (TEMRA). В – относительное содержание основных субпопуляций Т-хелперов, находящихся на различных стадиях дифференцировки. Слева направо – «наивные» Th (Naive), Th центральной памяти (CM); содержание Th эффекторной памяти (EM), «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные Th (TEMRA). С – изменения в субпопуляционном составе «поляризованных» Th клеток периферической крови. Слева направо – Th1, Th2, Th17 и Tfh. Результаты приведены в виде процента от общего пула Th с фенотипом CD3+CD4+. D – изменения в субпопуляционном составе Th17-клеток периферической крови. Слева направо – «дважды негативные» DN-Th17; «классические» Th17, Th17.1, DP-Th17. Результаты приведены в виде процента от общего пула Th17 с фенотипом CCR6+CD3+CD4+. E – изменения в субпопуляционном составе Tfh клеток периферической крови. Слева направо – Tfh1, Tfh2, Tfh17 и DP-Tfh. Результаты приведены в виде процента от общего пула Tfh-клеток с фенотипом CXCR5+CD3+CD4+. Обозначения: черные круги (IBD, inflammatory bowel disease/IBD, ВЗК) – пациенты с ЯК; белые круги (healthy controls/HC) – условно здоровые. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Me (Q25; Q75)). Значимость различий указана согласно U-критерию Манна–Уитни.

Figure. Relative proportion of T cell subpopulations in the peripheral blood of UC patients and healthy controls.

A – Relative proportion of the main subpopulations of cytotoxic T-lymphocytes at various stages of their differentiation. From left to right: naive Tcyl cells (Naive), central memory Tcyl cells (CM); effector memory Tcyl cells (EM), terminally differentiated CD45RA-positive effector Tcyl cells (TEMRA). B – Relative proportion of the main subpopulations of helper T-lymphocytes at various stages of their differentiation. From left to right: naive Th cells (Naive), central memory Th cells (CM); effector memory Th cells (EM), terminally differentiated CD45RA-positive effector Th cells (TEMRA). C – Changes in the subpopulations of polarized Th cells of peripheral blood. From left to right: Th1, Th2, Th17, and Tfh. Proportions from the entire population of CD3+CD4+ cells. D – Changes in the subpopulations of Th17 cells of peripheral blood. From left to right: double-negative Th17 cells (DN-Th17); classic Th17, Th17.1, DP-Th17. Proportions from the entire population of CCR6+CD3+CD4+ Th17 cells. E – Changes in the subpopulations of Tfh cells of peripheral blood. From left to right: Tfh1, Tfh2, Tfh17, and DP-Tfh. Proportions from the entire population of CXCR5+CD3+CD4+ Tfh cells. Note: black circles (IBD, inflammatory bowel disease)–UC patients; white circles (HC, healthy controls)–healthy individuals. Data are presented as medians and interquartile ranges (Me (Q25; Q75)). The significance of differences (p) was assessed using the Mann-Whitney U test.

дать кровотока и мигрировать на периферии, где они способны индуцировать апоптоз в клетках-мишенях, вызывая нарушения архитектоники воспаленных тканей. Хотя сообщения об обнаружении активированных циркулирующих CD8⁺-Т-клеток при ВЗК появились еще в 2013 г. [15], их роль в патогенезе ВЗК мало изучена [16]. Также мы наблюдали снижение доли «наивных» CD3⁺CD8⁺-клеток, обладающих разнообразными высокоспецифичными Т-клеточными рецепторами и способных к распознаванию широчайшего спектра патогенов. Этот факт может рассматриваться в качестве неблагоприятного прогностического фактора для пациентов ЯК, так как снижает способности иммунной системы к ответу на новые внутриклеточные патогены при их первичной инвазии в организм хозяина. В случае Т-хелперов нами было отмечено снижение в периферической крови доли Th17, которые играют ведущую роль в индукции воспаления в тканях, ассоциированных с кишечником. Более того, в рамках общего пула Th17-клеток нами показано снижение доли «провоспалительных» Th17.1, что может быть связано с высоким уровнем миграции этих клеток в воспаленные ткани кишечника, где они могут играть главную роль в формировании нейтрофильного инфильтрата. И, наконец, нами были выявлены нарушения в субпопуляционном составе циркулирующих фолликулярных Т-хелперов памяти, связанные с увеличением в крови доли Tfh2, способных переключать класс синтезируемых В-клетками антител с IgM на IgG и IgA. Известно, что именно Tfh2 и Tfh17 – за счет высокого уровня секреции IL-21 – вызывали пролиферацию «наивных» В-клеток и их дальнейшую дифференцировку в плазматические клетки с фенотипом CD19^{low}CD38⁺ [17]. Что же касается CXCR3-экспрессирующих Tfh (Tfh1), то они не обладали способностью к синтезу IL-21, а в условиях *in vitro* не способствовали созреванию и дифференцировке В-клеток. Более того, при анализе субпопуляционного состава В-лимфоцитов в периферической крови больных нами было выявлено увеличение содержания циркулирующих предшественников плазматических клеток, что прямо указывает на активацию гуморального звена приобретенного иммунитета, связанную с клональной экспансией антиген-специфических В-клеток в лимфоидной ткани. Таким образом, полученные нами результаты говорят о нарушении баланса между различными популяциями Tfh, связанные, в первую очередь, с увеличением уровня клеток, способных стимулировать В-клетки (популяция Tfh2), что повышает вероятность развития аутоиммунных реакций. Что же касается циркулирующих регуляторных Т-клеток, то, помимо снижения их общего уровня в циркуляции, нами было отмечено нарушение экспрессии на их поверхности молекулы CD73, что может быть тесно связано с дефектами в каскаде реакций, приводящих к формированию противовоспалительного аденозина как в лимфоидной ткани, так и в очагах воспаления на периферии. Генерация аденозина, обладающего широким спектром противовоспалительных активностей, из молекул провоспалительного АТФ реализуется за счет двух основных нуклеотидаз Трег-клеток – CD39 и CD73, осуществляющих расщепление АТФ до АДФ, пирофосфата и АМФ, а также аденозина и фосфата соответственно [18]. Он также угнетает активность и других популяций Т-клеток

(например, проявление цитолитических свойств или синтез цитокинов), в частности, Th17, играющих важную роль в патогенезе ВЗК [19].

В то же время сравнение цитокиновых профилей здоровых добровольцев и больных ЯК выявило у последних значимую гиперпродукцию цитокинов IL-12, IL-5, IL-10, но не IL-1 β , IL-2, IFN- γ и TNF- α , что делает такой ответ менее соответствующим Th1-ответу и более характерным для Th2-ответа (IL-4, IL-5, IL-10 и/или IL-13) [4]. Интересно, что концентрации IL-4 и IL-13 были повышены у пациентов с ЯК, однако разница не была значимой ($p = 0,141$ и $p = 0,154$ соответственно). Тем не менее уровень IL-13 у пациентов с высокой активностью воспалительного процесса (подгруппа 2) был значимо выше, чем у больных с активностью от легкой до умеренной (подгруппа 1). Разница в содержании самих Th1- и Th2-клеток у больных ЯК по сравнению с таковыми в группе здоровых добровольцев также не была значимой. Тем не менее содержание Th2-клеток могло значимо меняться в зависимости от тяжести течения заболевания или активности атаки, чего нельзя сказать об изменении Th1-клеток.

Прямых признаков активации Th17-типа и продукции цитокинов IL-17A/CTLA8 и IL-23 в плазме крови больных не было. Однако отмечалось значимое увеличение уровня хемокина CXCL11/I-TAC. Хемокин CXCL11/I-TAC является IFN- γ -зависимым цитокином и лигандом для клеток, экспрессирующих на своей мембране рецептор CXCR3. К таким клеткам относятся, помимо Th1-типа, «пластичные» Th17-типа (в том числе IFN- γ -продуцирующие субпопуляции Th17.1 и DP-Th17), цитотоксические Т-лимфоциты, ряд субпопуляций регуляторных Т-клеток, В-лимфоциты, натуральные киллеры, дендритные клетки, клетки эпителия и эндотелия. Соответственно, повышенные уровни данного хемокина могут свидетельствовать о вовлечении в патогенез ВЗК разных типов CXCR3-позитивных клеток и развитии иммунного ответа при ВЗК. У пациентов с минимальной и умеренной активностью ЯК отмечается значимое увеличение содержания цитокина CXCL11/I-TAC по сравнению с пациентами в ремиссии. Полученные данные свидетельствуют не только о патогенетической роли данного хемокина при активном течении ЯК, но и о возможной его роли в привлечении и направленной миграции иммунных клеток, экспрессирующих рецептор CXCR3.

Мы наблюдали снижение уровня субпопуляции Th17.1, что может говорить об активной миграции этих клеток в место воспаления. В то же время у больных наблюдалось увеличение уровня DN-Th17-клеток в периферической крови. Ранее было показано *in vitro*, что CCR6+DN-Th17 в зависимости от цитокинового окружения могут менять свой фенотип: в случае Th17-микроокружения CCR6+DN начинали экспрессировать CCR4, приобретая фенотип «классических» Th17 (CCR6⁺CCR4⁺), тогда как в Th1-микроокружении на их поверхности появлялся CXCR3, свойственный Th17.1 и Th1 [20]. Это позволяет предположить, что в данном случае эти клетки являются пулом, благодаря которому может пополняться субпопуляция Th17.1-клеток, которые в рамках пулов центральной и эффекторной памяти мигрируют в очаг воспаления.

Повышенная продукция IL-5 в очаге воспаления также может служить фактором привлечения эозинофилов при ВЗК, что уже сообщалось ранее как в случае больных ЯК, так и на животных моделях заболевания [4, 21]. В свою очередь, снижение уровня IL-5 в экспериментальном исследовании было значимо связано с невоспалительным статусом и бутират-продуцирующей *Faecalibacterium prausnitzii*, обладающей противовоспалительным действием [22].

Цитокин IL-7 играет важную роль в регуляции роста и выживания лимфоцитов. Поэтому его увеличение в плазме крови больных ЯК может отражать процессы активации, пролиферации и роста лимфоцитов разных субпопуляций при ВЗК. С другой стороны, не исключены и провоспалительные эффекты IL-7, который был связан с развитием хронического колита в экспериментальных исследованиях у грызунов. Кроме того, повышенная экспрессия гена сигнального пути IL-7 в CD8⁺-Т-клетках крови на момент постановки диагноза была значимо связана с рецидивом и более агрессивным течением ВЗК [23].

Следует отметить, что продукция цитокина IFN- γ у мужчин с ЯК оказалась сопоставимой с группой контроля. Полученные данные могут свидетельствовать об особенностях изменений состава клеточных популяций, ответственных за продукцию данного цитокина (Th1 и, в том числе, «пластичных» субпопуляций Th17-типа).

Цитокин IL-10 выполняет множество противовоспалительных и иммунорегуляторных функций и может продуцироваться разными клетками, в том числе регуляторными Т-лимфоцитами, В-лимфоцитами, дендритными клетками, клетками паренхимы. При ВЗК, возможно, важным является определение источника продукции данного цитокина в тканях кишечника для определения его механизмов действия. Значимое повышение уровня IL-10 у пациентов с ЯК может иметь саногенетическое значение благодаря его способности подавлять пролиферацию Т-клеток. Ранее было высказано предположение о двойной роли IL-10 при ЯК: с одной стороны, IL-10 может быть необходим для индукции ремиссии, с другой – для поддержания стойкой ремиссии может потребоваться подавление внутриклеточного пути IL-10 в связи с его способностью повышать выживаемость Т-клеток и способствовать развитию рецидивов [24].

Хемокин CCL3/MIP-1 α участвует в процессах миграции полиморфноядерных лейкоцитов, соответственно, увеличение его содержания может свидетельствовать о привлечении и активации макрофагов в очаге воспаления при ЯК. Ранее была показана роль CCL3/MIP-1 α в стимулировании накопления нейтрофилов в толстой кишке в раннюю фазу экспериментального колита [25].

Повышение содержания хемокина CXCL8/IL-8 у больных ЯК может свидетельствовать о дополнительной миграции нейтрофилов в очаги воспаления и оказывать дополнительное влияние на иммунопатогенез заболевания, возможно, характер его течения, тяжести и исходов. Ранее было показано, что уровень CXCL8/IL-8 в слизистой оболочке пациентов с БК и ЯК был значимо выше, чем в контрольной группе условно здоровых лиц, и, кроме того, коррелировал с тяжестью воспаления при ВЗК [4].

Хемокин CX3CL1/Fractalkine является лигандом для клеток, экспрессирующих рецептор CX3CR1 [4]. К таким клеткам в первую очередь относятся дендритные антигенпрезентирующие клетки, моноциты, а также лимфоциты, эпителиальные и эндотелиальные клетки. Поэтому повышение уровня этого хемокина может свидетельствовать об активности воспаления с участием разных типов клеток, возможно, повышенной активации антигенпрезентирующих клеток при хроническом течении заболевания и персистенции антигена (аутоантигена).

Заключение

В заключение можно отметить, что нами были получены новые данные о значимых изменениях в составе Т-лимфоцитов периферической крови и цитокиновом профиле у мужчин с ЯК, которые оказались более характерными для Th2-ответа, роль которого при этом заболевании до конца не выяснена. Важным результатом исследования явились выявленные нарушения в субпопуляционном составе циркулирующих фолликулярных Т-хелперов памяти, связанные со значимым увеличением в крови доли Tfh2, способных переключать класс синтезируемых В-клетками антител с IgM на IgG и IgA. Кроме того, впервые было показано значимое увеличение концентраций цитокина IL-7 и хемокина CXCL11/I-TAC при ЯК, значение которых в патогенезе и саногенезе ВЗК предстоит уточнить в последующих исследованиях.

Информация о финансировании

Работа была выполнена при поддержке РФФИ (проект №20-65-47026).

Financial support

This work was supported by the Russian Science Foundation (Project No 20-65-47026).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declared no conflicts of interest.

Информированное согласие

При проведении исследования было получено информированное согласие пациентов или их родителей либо законных представителей.

Informed consent

In carrying out the study, written informed consent was obtained from all patients or their parents or legal representatives.

Литература / References

1. Du L, Ha C. Epidemiology and Pathogenesis of Ulcerative Colitis. *Gastroenterol Clin North Am.* 2020 Dec;49(4):643-654. DOI: 10.1016/j.gtc.2020.07.005
2. Zou J, Liu C, Jiang S, Qian D, Duan J. Cross Talk between Gut Microbiota and Intestinal Mucosal Immunity in the Development of Ulcerative Colitis. *Infect Immun.* 2021 Aug 16;89(9):e0001421. DOI: 10.1128/IAI.00014-21
3. Вахитов ТЯ, Кудрявцев ИВ, Салль ТС, Лазарева НМ, Кононова СВ, и др. Субпопуляции Т-хелперов, ключевые цитокины и хемокины в патогенезе

- воспалительных заболеваний кишечника (часть 1). Вопросы практической педиатрии. 2020;15(6):67-78. / Vakhitov TYa, Kudryavtsev IV, Sall TS, Lazareva NM, Kononova SV, et al. T helper cell subsets, key cytokines and chemokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (Part 1). *Vopr. prakt. pediatri. (Clinical Practice in Pediatrics)*. 2020;15(6):67-78. DOI: 10.20953/1817-7646-2020-6-67-78 (In Russian).
4. Вахитов ТЯ, Кудрявцев ИВ, Салль ТС, Лазарева НМ, Кононова СВ, и др. Субпопуляции Т-хелперов, ключевые цитокины и хемокины в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника (часть 2). Вопросы практической педиатрии. 2021;16(1):41-51. / Vakhitov TYa, Kudryavtsev IV, Sall TS, Lazareva NM, Kononova SV, et al. T-helper cell subsets, key cytokines and chemokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (Part 2). *Vopr. prakt. pediatri. (Clinical Practice in Pediatrics)*. 2021;16(1):41-51. DOI: 10.20953/1817-7646-2021-41-51 (In Russian).
5. Popov J, Caputi V, Nandeesh N, Rodriguez DA, Pai N. Microbiota-Immune Interactions in Ulcerative Colitis and Colitis Associated Cancer and Emerging Microbiota-Based Therapies. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 21;22(21):11365. DOI: 10.3390/ijms222111365
6. Cargiolli M, Miranda A, Bottiglieri ME. Inflammatory bowel disease: gender difference. *Ital J Gender-Specific Med* 2017;3(1):23-28. DOI: 10.1723/2751.28029
7. Goodman WA, Erkkila IP, Pizarro TT. Sex matters: impact on pathogenesis, presentation and treatment of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020 Dec;17(12):740-754. DOI: 10.1038/s41575-020-0354-0
8. Park HJ, Choi JM. Sex-specific regulation of immune responses by PPARs. *Exp Mol Med*. 2017 Aug 4;49(8):e364. DOI: 10.1038/emm.2017.102
9. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med*. 1987 Dec 24;317(26):1625-9. DOI: 10.1056/NEJM198712243172603
10. Ивашкин ВТ, Шелыгин ЮА, Белоусова ЕА, Абдулганиева ДИ, Алексеева ОА, и др. Проект клинических рекомендаций по диагностике и лечению язвенного колита. Колопроктология. 2019;18(4):7-36. / Ivashkin VT, Shelygin YuA, Belousova EA, Abdulganieva DI, Alekseeva OA, et al. Project: Clinical guidelines for the diagnostics and treatment of ulcerative colitis. *Koloproktologia*. 2019;18(4):7-36. DOI: 10.33878/2073-7556-2019-18-4-7-36 (In Russian).
11. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006 Jun;55(6):749-53. DOI: 10.1136/gut.2005.082909
12. Хайдуков СВ, Байдун ЛА, Зурочка АВ, Тотолян АА. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект). Медицинская иммунология. 2012;14(3):255-268. / Khaydukov SV, Baidun LA, Zurochka AV, Totolyan AA. Standartizovannaya tekhnologiya «Issledovanie subpopulyatsionnogo sostava limfotsitov perifericheskoy krvi s primeneniem protochnykh tsitofluorimetrov-analizatorov» (proekt). *Medical Immunology (Russia)*. 2012;14(3):255-268. DOI: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268 (In Russian).
13. Murata Y, Ishiguro Y, Itoh J, Munakata A, Yoshida Y. The role of proinflammatory and immunoregulatory cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis. *J Gastroenterol*. 1995 Nov;30 Suppl 8:56-60.
14. Smids C, Horjus Talabur Horje CS, Drylewicz J, Roosenboom B, Groenen MJM, et al. Intestinal T Cell Profiling in Inflammatory Bowel Disease: Linking T Cell Subsets to Disease Activity and Disease Course. *J Crohns Colitis*. 2018 Mar 28;12(4):465-475. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjx160
15. Funderburg NT, Stubblefield Park SR, Sung HC, Hardy G, Clagett B, et al. Circulating CD4(+) and CD8(+) T cells are activated in inflammatory bowel disease and are associated with plasma markers of inflammation. *Immunology*. 2013 Sep;140(1):87-97. DOI: 10.1111/imm.12114
16. Casalegno Garduño R, Dabritz J. New Insights on CD8+ T Cells in Inflammatory Bowel Disease and Therapeutic Approaches. *Front Immunol*. 2021;12:738762. DOI: 10.3389/fimmu.2021.738762
17. Morita R, Schmitt N, Benteibibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*. 2011 Jan 28;34(1):108-21. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.12.012
18. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta*. 2008 May;1783(5):673-94. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.024
19. Faas MM, Saez T, de Vos P. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses? *Mol Aspects Med*. 2017 Jun;55:9-19. DOI: 10.1016/j.mam.2017.01.002
20. Vartanian S, Deeks SG, Chomont N, Routy JP, Ancuta P. New insights into the heterogeneity of Th17 subsets contributing to HIV-1 persistence during antiretroviral therapy. *Retrovirology*. 2016 Aug 24;13(1):59. DOI: 10.1186/s12977-016-0293-6
21. Rodrigo-Muñoz JM, Gil-Martínez M, Sastre B, Del Pozo V. Emerging Evidence for Pleiotropism of Eosinophils. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):7075. DOI: 10.3390/ijms22137075
22. Miquel S, Leclerc M, Martin R, Chain F, Lenoir M, et al. Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. *mBio*. 2015 Apr 21;6(2):e00300-15. DOI: 10.1128/mBio.00300-15
23. Belarif L, Danger R, Kermarrec L, Nerrière-Daguin V, Pengam S, et al. IL-7 receptor influences anti-TNF responsiveness and T cell gut homing in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2019 Apr 2;129(5):1910-1925. DOI: 10.1172/JCI121668
24. Wang S, Wang J, Ma R, Yang S, Fan T, et al. IL-10 enhances T cell survival and is associated with faster relapse in patients with inactive ulcerative colitis. *Mol Immunol*. 2020 May;121:92-98. DOI: 10.1016/j.molimm.2020.03.001
25. Ajuebor MN, Kunkel SL, Hogaboam CM. The role of CCL3/macrophage inflammatory protein-1α in experimental colitis. *Eur J Pharmacol*. 2004 Aug 30;497(3):343-9. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.07.005

Информация о соавторах:

Кононова Светлана Витальевна, кандидат биологических наук, ответственный исполнитель проекта РНФ №20-65-47026, Институт экспериментальной медицины; ведущий инженер группы регуляции биосинтеза белка Института белка РАН
Адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12
Телефон: (812) 234-6868
E-mail: skonon23@gmail.com
ORCID: 0000-0002-7373-7797

Кудрявцев Игорь Владимирович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией иммунорегуляции отдела иммунологии Института экспериментальной медицины
Адрес: 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12
Телефон: (812) 234-1669
E-mail: igorek1981@yandex.ru
ORCID: 0000-0001-7204-7850

Лазарева Наталья Михайловна, старший лаборант кафедры иммунологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П.Павлова
Адрес: 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8
Телефон: (921) 394-8420
E-mail: nmlazareva@gmail.com

Салль Татьяна Сергеевна, ведущий инженер отдела биохимии Института экспериментальной медицины
Адрес: 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12
Телефон: (812) 234-6868
E-mail: miss_taty@mail.ru
ORCID: 0000-0002-5890-5641

Скалинская Мария Игоревна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и диетологии им. С.М.Рысса Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И.Мечникова
Адрес: 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41
Телефон: (812) 303-5000
E-mail: mskalinskaya@yahoo.com
ORCID: 0000-0003-0769-8176

Бакулин Игорь Геннадьевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и диетологии им. С.М.Рысса Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И.Мечникова
Адрес: 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41
Телефон: (812) 543-9538
E-mail: igbakulin@yandex.ru
ORCID: 0000-0002-6151-2021

Хавкин Анатолий Ильич, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник Научно-исследовательского клинического института педиатрии имени академика Ю.Е.Вельтищева Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова; профессор кафедры педиатрии с курсом детских хирургических болезней Медицинского института Белгородского государственного национального исследовательского университета
Адрес: 125412, Москва, ул. Талдомская, 2
Телефон: (495) 483-4192
E-mail: gastropedclin@gmail.com
ORCID: 0000-0001-7308-7280

Ситкин Станислав Игоревич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник научной группы «Метаболизма неинфекционных заболеваний» Института экспериментальной медицины; доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и диетологии им. С.М.Рысса Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И.Мечникова; зав. НИГ эпигенетики и метагеномики Института перинатологии и педиатрии Национального медицинского исследовательского центра им. В.А.Алмазова
Адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12
Телефон: (812) 234-6868
E-mail: drsitkin@gmail.com
ORCID: 0000-0003-0331-0963

Information about co-authors:

Svetlana V. Kononova, PhD in Biological Sciences, Principal Investigator for the RSF Project No 20-65-47026, Institute of Experimental Medicine; Leading Engineer of the Group of Protein Synthesis Regulation, Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences
Address: 12 Akademichan Pavlov str., Saint Petersburg, 197376, Russian Federation
Phone: (812) 234-6868
E-mail: skonon23@gmail.com
ORCID: 0000-0002-7373-7797

Igor V. Kudryavtsev, PhD in Biological Sciences, Head of Laboratory of Immunoregulation, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine
Address: 12 Akademichan Pavlov str., Saint Petersburg, 197376, Russian Federation
Phone: (812) 234-1669
E-mail: igorek1981@yandex.ru
ORCID: 0000-0001-7204-7850

Natalia M. Lazareva, Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University
Address: 6-8 Lev Tolstoy str., Saint Petersburg, 197022, Russian Federation
Phone: (921) 394-8420
E-mail: nmlazareva@gmail.com

Tatyana S. Sall, Leading Engineer, Department of Biochemistry, Institute of Experimental Medicine
Address: 12 Akademichan Pavlov str., Saint Petersburg, 197376, Russian Federation
Phone: (812) 234-6868
E-mail: miss_taty@mail.ru
ORCID: 0000-0002-5890-5641

Maria I. Skalinskaya, MD, PhD, Associated Professor of the S.M.Ryss Department of Propedeutics of Internal Diseases, Gastroenterology and Dietetics, I.I.Mechnikov North-Western State Medical University
Address: 41 Kirochnaya str., Saint Petersburg, 191015, Russian Federation
Phone: (812) 303-5000
E-mail: mskalinskaya@yahoo.com
ORCID: 0000-0003-0769-8176

Igor G. Bakulin, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the S.M.Ryss Department of Propedeutics of Internal Diseases, Gastroenterology and Dietetics, I.I.Mechnikov North-Western State Medical University
Address: 41 Kirochnaya str., Saint Petersburg, 191015, Russian Federation
Phone: (812) 543-9538
E-mail: igbakulin@yandex.ru
ORCID: 0000-0002-6151-2021

Anatoly I. Khavkin, MD, PhD, DSc, Professor, Chief Researcher, Yu.E.Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics of the Pirogov Russian National Research Medical University; Professor of the Institute of Medicine, Belgorod National Research University
Address: 2 Taldomskaya str., Moscow, 125412, Russian Federation
Phone: (495) 483-4192
E-mail: gastropedclin@gmail.com
ORCID: 0000-0001-7308-7280

Stanislav I. Sitkin, MD, PhD, Leading Researcher, Non-Infectious Disease Metabolomics Group, Institute of Experimental Medicine; Associated Professor of the S.M.Ryss Department of Propedeutics of Internal Diseases, Gastroenterology and Dietetics, I.I.Mechnikov North-Western State Medical University; Head of the Epigenetics & Metagenomics Research Group of the Institute of Perinatology and Pediatrics, V.A.Almazov National Medical Research Centre
Address: 12 Akademichan Pavlov str., Saint Petersburg, 197376, Russian Federation
Phone: +7 (812) 234-6868
E-mail: drsitkin@gmail.com
ORCID: 0000-0003-0331-0963

НОВОСТИ МЕДИЦИНЫ

Гепатит с высокой активностью как редкая форма манифестации бруцеллеза у ребенка 9 лет

Бруцеллез является системной зоонозной инфекцией с многообразными механизмами передачи возбудителя, острым или хроническим течением, для которой характерны лихорадка, поражение опорно-двигательного аппарата, сердечно-сосудистой, нервной и половой систем. В Российской Федерации эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу остается неблагоприятной: за период с января 2019 г. по декабрь 2020 г. было зарегистрировано 513 человек с впервые выявленным бруцеллезом, среди них 15 детей в возрасте до 14 лет. Прогноз при данном заболевании в целом благоприятный при адекватной комбинации антибактериальных препаратов и длительности их приема. При нарушении схем терапии возможно рецидивирующее и, в дальнейшем, хроническое течение данной инфекции. Смертность при бруцеллезе составляет менее 5%. В данной статье представлено нетипичное течение бруцеллеза у ребенка 9 лет. На основании представленных данных литературы, а также описанного клинического случая следует отметить, что, несмотря на отсутствие эпидемиологического анамнеза, в случаях острого гепатита наряду с другими возможными причинами требуется исключение бруцеллеза.

Чеботарева Т.А., Гусева Г.Д., Строкова Т.В., Полунина Д.А., Багаева М.Э.
Гепатит с высокой активностью как редкая форма манифестации бруцеллеза у ребенка 9 лет.
Вопросы детской диетологии. 2021; 19(5): 78–84
DOI: 10.20953/1727-5784-2021-5-78-84
Источник: www.phdynasty.ru