

СОДЕРЖАНИЕ CD4<sup>+</sup>-КЛЕТОК С ЭКСПРЕССИЕЙ ЭКТОНУКЛЕОТИДАЗ CD39/CD73 У ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКАТ. В. Радыгина<sup>1</sup>✉, С. В. Петричук<sup>1</sup>, Д. Г. Купцова<sup>1</sup>, А. С. Потапов<sup>1,2</sup>, А. С. Илларионов<sup>2</sup>, А. О. Анушенко<sup>1</sup>, О. В. Курбатова<sup>1</sup>, Е. Л. Семикина<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва, Россия<sup>2</sup> Первый московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Изучение регуляции иммунного ответа на фоне терапии блокаторами TNF при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК) у детей остается актуальной проблемой. Целью исследования было изучить экспрессию CD39/CD73 в субпопуляциях лимфоцитов (регуляторных Т-клеток (Treg) — CD4<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup>; активированных Т-клеток (Tact) — CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup>; Th17-лимфоцитов — CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) периферической крови у детей с ВЗК (с болезнью Крона (БК),  $n = 34$ ; с язвенным колитом —  $n = 33$ ), принимавших блокаторы TNF, и у 45 условно здоровых детей. Результаты представлены в виде медианы (Me) и квартилей ( $Q_{25}$ – $Q_{75}$ ). С помощью многоцветной цитометрии показано, что у детей с ВЗК наибольшее количество CD39<sup>+</sup> выявлено в популяции Treg — 31% (15–38), наименьшее — в Tact 4% (1–7), а наибольшее количество CD73<sup>+</sup> — в Tact 13% (8–21). Соотношение экспрессии CD39 и CD73 у пациентов с ВЗК, так же как и в группе сравнения, зависело от популяции клеток. Экспрессия CD39 в Treg, Tact и Th17 у пациентов с ВЗК не зависела от возраста ребенка. В группе детей с БК в обострении относительно группы сравнения получено снижение экспрессии CD39 в Treg (12% (9–23) против 35% (28–39),  $p = 0,000001$ ). У детей в ремиссии БК экспрессия CD39 в Treg достоверно выше, чем при обострении (31% (27–40) против 12% (9–23);  $p = 0,000094$ ). Между группой пациентов в ремиссии и группой сравнения достоверных различий выявлено не было, за исключением снижения экспрессии CD73 в Treg при БК. Полученные результаты показывают, что экспрессия CD39 и CD73 в популяциях CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов в значительной степени связана с течением заболевания, с обострением или ремиссией, и, соответственно, с эффективностью проводимой анти-TNF-терапии.

**Ключевые слова:** популяции лимфоцитов, CD4<sup>+</sup>-лимфоциты, Treg, Th17, Tact, CD39, CD73, ВЗК, дети**Финансирование:** исследование проведено в рамках государственного задания Минздрава России, № АААА-А19-119013090093-2.**Благодарности:** авторы выражают благодарность всем пациентам, участвовавшим в исследовании, а также признательность за сотрудничество коллегам из гастроэнтерологического отделения с гепатологической группой национального медицинского исследовательского центра здоровья детей.**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» МЗ РФ (протокол № 6 от 11 июня 2019 г.). Для всех участников исследования было получено информированное согласие родителей в соответствии с принципами Хельсинкской декларации.✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Вячеславовна Радыгина  
Ломоносовский проспект, д. 2/1, г. Москва, 119296, Россия; tvradigina@mail.ru**Статья получена:** 22.06.2022 **Статья принята к печати:** 16.07.2022 **Опубликована онлайн:** 30.07.2022**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.039CONTENT OF CD4<sup>+</sup> CELLS EXPRESSING CD39/CD73 ECTONUCLEOTIDASES IN CHILDREN WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASESRadygina TV<sup>1</sup>✉, Petrichuk SV<sup>1</sup>, Kuptsova DG<sup>1</sup>, Potapov AS<sup>1,2</sup>, Illarionov AS<sup>2</sup>, Anushenko AO<sup>1</sup>, Kurbatova OV<sup>1</sup>, Semikina EL<sup>1,2</sup><sup>1</sup> National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia<sup>2</sup> Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

The regulation of TNF inhibitor therapy-associated immune responses in inflammatory bowel diseases (IBD) in children remains an urgent problem. The study aimed at analyzing the expression of CD39/CD73 endonucleotidases by different subsets of peripheral blood T cells in children with IBD including Crohn's disease ( $n = 34$ ) and ulcerative colitis ( $n = 33$ ) having received TNF inhibitors in comparison with conditionally healthy children ( $n = 45$ ). Lymphocyte subsets including regulatory T cells (Treg, CD4<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup>), activated T cells (Tact, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup>) and Th17 cells (CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) were studied by flow cytometry. The results are presented as medians (Me) and quartiles ( $Q_{25}$ – $Q_{75}$ ). In children with IBD the highest and the lowest relative counts of CD39<sup>+</sup> cells were found in Treg and Tact subsets — 31% (15–38) and 4% (1–7), respectively. The highest relative counts of CD73<sup>+</sup> cells were found in Tact — 13% (8–21). The CD39 and CD73 expression ratio in patients with IBD, and in the control group as well, depended on particular subset. CD39 expression in Treg, Tact and Th17 of patients with IBD was not age-dependent. Patients with acute Crohn's disease revealed decreased expression of CD39 in Treg compared with the control group (12% (9–23) vs 35% (28–39), respectively;  $p = 10^{-6}$ ). Patients with Crohn's disease in remission revealed increased expression of CD39 in Treg compared with the acute of the disease (31% (27–40) vs 12% (9–23);  $p = 9.4 \times 10^{-6}$ ). Patients with Crohn's disease in remission revealed no significant differences with the control group apart from reduced expression of CD73 by Treg in Crohn's disease. The results indicate significant association of CD39 and CD73 expression levels in particular subsets of CD4<sup>+</sup> cells with the phase of the disease (acute vs remission) and, accordingly, with the anti-TNF regimen efficacy.

**Keywords:** lymphocyte subsets, CD4<sup>+</sup> subsets, Treg, Th17, Tact, CD39, CD73, children, inflammatory bowel diseases**Funding:** the study was carried out on state assignment of the Ministry of Health of Russia, number АААА-А19-119013090093-2.**Acknowledgement:** the authors thank all patients for participation and acknowledge the Gastroenterology Department with Hepatology Group of the National Medical Research Center for Children's Health and its collaboration.**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the National Medical Research Center for Children's Health, Moscow (protocol № 6 dated June 11, 2019). The informed consent was submitted by all study participants.✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana V. Radygina  
Lomonosovsky prospekt, 2/1, Moscow, 119296, Russia; tvradigina@mail.ru**Received:** 22.06.2022 **Accepted:** 16.07.2022 **Published online:** 30.07.2022**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.039

Изучение процессов патогенеза воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), а также поиск новых подходов для прогноза ответа пациентов на терапию является актуальной проблемой в современной

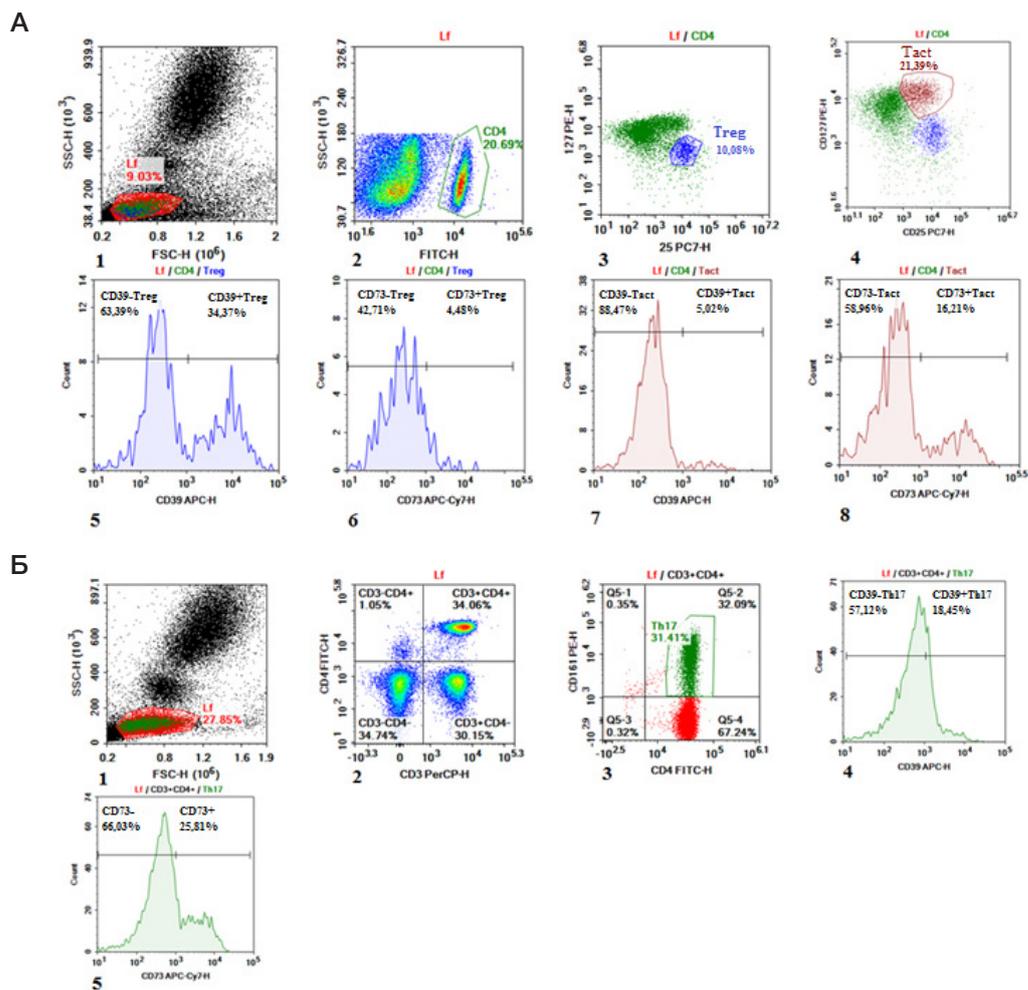
педиатрии. В Российской Федерации распространенность ВЗК составляет 5,1 случай на 100 тысяч населения [1]. Особую обеспокоенность у педиатров вызывает прирост заболеваемости ВЗК среди детей за последнее десятилетие

на 30% и выявление тяжелых форм заболевания в раннем детском возрасте [2, 3]. Известно, что к возникновению ВЗК приводит сочетание нескольких неблагоприятных факторов: генетическая предрасположенность, дисфункция иммунной системы, нарушение кишечной микрофлоры, воздействие вредных факторов окружающей среды [4]. Однако наиболее значимыми факторами развития ВЗК считают нарушения в иммунной системе. Показана значимость определения Th17-лимфоцитов (Th17) и регуляторных Т-клеток (Treg) для оценки тяжести патологического процесса и эффективности применяемой терапии при ВЗК [5, 6]. Наивные Т-клетки могут дифференцироваться в Th1, Th2, Th17 и Treg под действием цитокинов, продуцируемых антигенпрезентирующими клетками. Th17 и Treg имеют общий сигнальный путь, опосредованный TGF $\beta$ . В присутствии IL6, IL21, TGF $\beta$  наивные CD4<sup>+</sup>-Т-клетки дифференцируются в Th17 в отсутствие же провоспалительных цитокинов — в Treg-клетки. Нарушение баланса между Th17 и Treg приводит к возникновению различных аутоиммунных заболеваний, включая ВЗК [7, 8].

В последнее десятилетие идет интенсивное изучение пуринаргической системы регуляции, оказывающей непосредственное влияние на иммунную систему. Гипотеза о пуринаргической передаче сигнала была предложена

Джеффри Бернстокком еще в 1972 г. [9]. В современном понимании внеклеточная аденозинтрифосфорная кислота (eATP) играет роль провоспалительного медиатора, участвующего в регуляции клеточного метаболизма, миграции, пролиферации и апоптозе клеток через сигнальные пути, запускаемые рецепторами P2Y и P2X [10, 11]. Ферменты эктонуклеотидазы (CD39, или ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, E-NTPDase1; CD73, или ecto-5'-nucleotidase, Ecto5'NTase) участвуют в последовательном дефосфорилировании ATP до аденозина, обладающего противовоспалительными свойствами [11]. Дисбаланс между количеством eATP и аденозина может приводить к активации воспалительного процесса [12]. Эктонуклеотидаза CD39 играет важную роль в регуляции воспаления кишечника: высокая экспрессия CD39 в циркулирующих Treg коррелирует с клинической и эндоскопической ремиссией у пациентов с ВЗК [13, 14]. Показано также, что однонуклеотидные полиморфизмы, связанные со снижением экспрессии CD39, повышают риск возникновения болезни Крона [15].

Эктонуклеотидазы экспрессируются в различных популяциях лимфоцитов, в том числе в Treg и Th17 клетках. Показано, что 90% TregFoxp3<sup>+</sup> несут на своей поверхности CD39 [16]. Популяция Treg неоднородна по экспрессии CD39. Т-клетки CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD39<sup>+</sup> и



**Рис. 1.** Стратегия последовательного гейтирования Treg, Tact, Th17, экспрессирующих CD39, CD73. **А.** Стратегия последовательного гейтирования для Treg / Tact. 1 — выделение «лимфоидного» региона по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; 2 — выделение CD4 позитивных лимфоцитов; 3 — выделение Treg по маркерам (CD4<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup>); 4 — выделение Tact по маркерам (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup>); 5 — определение CD39Treg; 6 — определение CD73Treg; 7 — определение CD39Tact; 8 — определение CD73Tact. **Б.** Стратегия последовательного гейтирования для Th17. 1 — выделение «лимфоидного» региона по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; 2 — выделение двойной позитивной популяции по маркерам CD3 и CD4; 3 — выделение Th17-популяции; 4 — определение CD39Th17; 5 — определение CD73Th17

**Таблица 1.** Число клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, в популяциях Т-лимфоцитов у пациентов с ВЗК и в группе сравнения

Фермент	Пациенты с ВЗК (n = 67)				Группа сравнения (n = 45)				p
	CD39		CD73		CD39		CD73		
	Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	Min-Max							
Treg, %	31,2 (14,8-37,8)	6-58	5,0 (3,0-8,3)	0-15	35 (27,8-39,4)	19-49	8,1 (6,9-12,2)	2-39	p39 = 0,023 p73 = 0,000
Tact, %	3,9 (1,1-6,7)	0-14	12,9 (8,0-21,1)	2-30	5 (4,4-7,4)	3-11	17,6 (11,9-21,5)	8-35	p39 = 0,001 p73 = 0,021
Th17, %	10,4 (5,2-16,8)	0-29	7,7 (4,7-11,4)	1-26	9,6 (8,6-12,1)	6-24	10,2 (7,3-14,4)	3-33	p39 = 0,771 p73 = 0,007

**Примечание:** p39 — уровень достоверности между группой пациентов с ВЗК и группой сравнения, экспрессирующих CD39 в разных популяциях Т-клеток; p73 — уровень достоверности между группой пациентов с ВЗК и группой сравнения, экспрессирующих CD73 в разных популяциях Т-клеток.

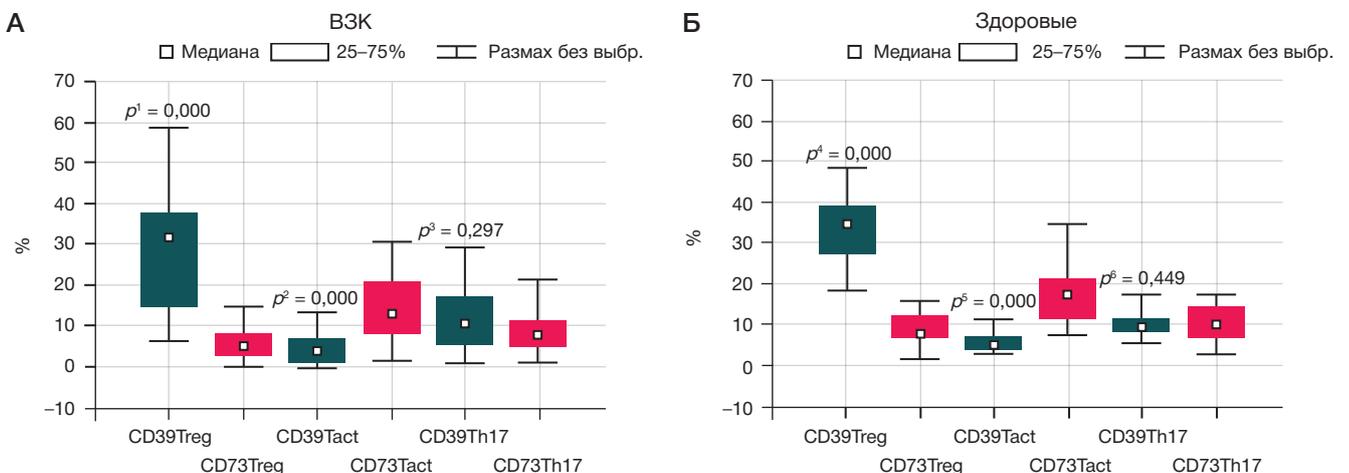
CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD39<sup>-</sup>, как было показано при множественном склерозе, подавляли пролиферацию и продукцию Т-эффektорами IFN $\gamma$  [17]. Но только клетки с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> подавляли продукцию IL17, в то время как CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD39-Treg продуцировали IL17 [17]. Необходимо отметить, что популяция Th17-клеток также неоднородна по экспрессии CD39 и, помимо популяции, оказывающей провоспалительное воздействие на окружающие клетки, есть еще популяция супрессорных Th17-лимфоцитов (supTh17), экспрессирующая высокие уровни CD39 и способствующая продукции аденозина. SupTh17 определяются в периферической крови и в ткани собственной пластинки кишечника у здоровых людей, тогда как их количество снижено у пациентов с БК, что подчеркивает их важность для контроля воспаления в кишечнике [18, 19]. Большинство исследований, посвященных изучению пуринергической передачи сигнала, ранее было проведено у взрослых пациентов с ВЗК [12-14].

В связи с этим, целью настоящего исследования было оценить количество клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы (CD39/CD73) в субпопуляциях CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов у детей с ВЗК.

**ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ**

Было обследовано 67 пациентов с ВЗК (с болезнью Крона (БК) — 34 пациента, язвенным колитом (ЯК) — 33 пациента) в возрасте 3,4-18 лет, прошедших терапию блокаторами

TNF. По течению заболевания дети были разделены на группы: группа 1 — обострение БК (n = 18), группа 2 — ремиссия БК (n = 16), группа 3 — обострение ЯК (n = 22), группа 4 — ремиссия ЯК (n = 11). Разделение пациентов на группы проводили с использованием педиатрических индексов активности болезни PCDAI для БК ( $\leq 10$  — ремиссия,  $> 10$  — обострение) и PUCAI для ЯК ( $\leq 10$  — ремиссия,  $> 10$  — обострение). Группу сравнения (группа 5, n = 45) составили условно здоровые дети в возрасте 3,7-17,5 лет. Критерии включения пациентов в группу 5: отсутствие в стандартном клиническом и биохимическом лабораторном исследовании результатов, выходящих за диапазон референсных значений; отсутствие каких-либо острых или обострения хронических состояний; отсутствие травм; отсутствие в анамнезе аутоиммунных, онкологических и психических заболеваний. Образцы венозной крови для иммунологических тестов получали путем забора из локтевой вены натощак в пробирки BDVacutainer® с антикоагулянтом K2ЭДТА. Иммунофенотипирование лимфоцитов и оценку экспрессии рецепторов пуринергической передачи сигнала (CD39 и CD73) в Th17-лимфоцитах, в Treg и Т-активированных лимфоцитах (Tact) проводили методом проточной лазерной цитофлуориметрии (Novocyte, ACEA Biosciences; США). Использовали моноклональные антитела, конъюгированные с различными флуорохромами: CD4-FITC (cat. A07750, Beckman Coulter; США), CD127-PE (cat. IM 10980U, Beckman Coulter; США), CD25-PC7 (cat. A52882, Beckman Coulter; США), CD161-PE (cat. IM



**Рис. 2.** Число клеток, экспрессирующих CD39 и CD73, в популяциях CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов у пациентов с ВЗК и в группе сравнения. **А.** p<sup>1</sup> — уровень достоверности между CD39Treg и CD73Treg, p<sup>2</sup> — уровень достоверности между CD39Tact и CD73Tact, p<sup>3</sup> — уровень достоверности между CD39Th17 и CD73Th17. **Б.** p<sup>4</sup> — уровень достоверности между CD39Treg и CD73Treg, p<sup>5</sup> — уровень достоверности между CD39Tact и CD73Tact, p<sup>6</sup> — уровень достоверности между CD39Th17 и CD73Th17

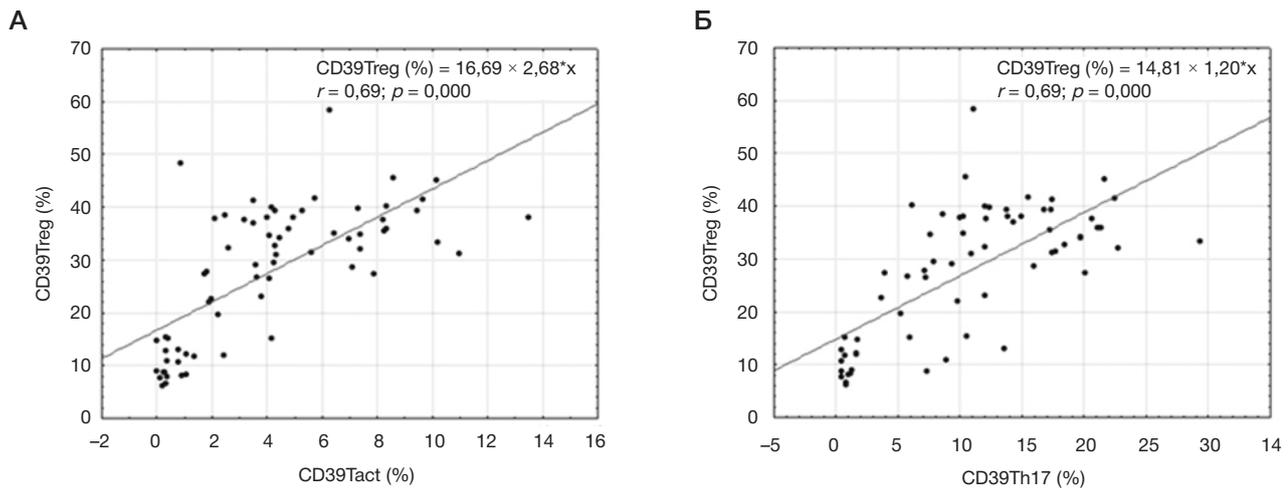


Рис. 3. Зависимость экспрессии CD39 в Treg от Tact (А) и Th17 (Б) у пациентов с ВЗК

3450, Beckman Coulter; США), CD3-PC5 (cat. A07749, Beckman Coulter; США), CD39-APC-Cy7 (Clone A1, cat. RT2241130 Sony Biotechnology; США), CD73-APC-Cy7 (Clone AD2, cat. RT2320110; Sony Biotechnology, США). Для лизирования эритроцитов использовали лизирующий раствор BD FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences; США), длительность инкубации с которым в темноте при комнатной температуре не превышала 10–12 мин. Выделение популяций клеток, экспрессирующих CD39 и CD73 в регуляторных Т-клетках (CD4<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>CD25<sup>high</sup>), Tact-лимфоцитах (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup>), Th17-лимфоцитах (CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) проводили с помощью пошагового гейтирования (рис. 1).

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft; США). Описательная статистика количественных

признаков представлена в формате: медиана (нижние и верхние квартили) — Me (Q<sub>0,25</sub>–Q<sub>0,75</sub>), минимум/максимум (Min/Max). Достоверность различий между группами оценивали с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия в распределениях оценивали с помощью критерия χ<sup>2</sup>. Статистически значимыми считали различия при p < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**CD39 и CD73 в популяциях Т-лимфоцитов у детей с ВЗК в сравнении с группой условно здоровых детей**

Анализ числа клеток с экспрессией CD39 и CD73 у детей с ВЗК показал, что наибольшее число клеток CD39<sup>+</sup>

Таблица 2. Число клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, в популяциях Т-лимфоцитов в группах пациентов с БК, ЯК и в группе сравнения

	БК обострение	БК ремиссия	ЯК обострение	ЯК ремиссия	Здоровые дети	БК	ЯК
Показатель	Группа 1 (n = 18) Me (Q <sub>0,25</sub> –Q <sub>0,75</sub> )	Группа 2 (n = 16) Me (Q <sub>0,25</sub> –Q <sub>0,75</sub> )	Группа 3 (n = 22) Me (Q <sub>0,25</sub> –Q <sub>0,75</sub> )	Группа 4 (n = 11) Me (Q <sub>0,25</sub> –Q <sub>0,75</sub> )	Группа 5 (n = 45) Me (Q <sub>0,25</sub> –Q <sub>0,75</sub> )	p <sub>12</sub>	p <sub>34</sub>
CD39Treg, %	12,48 (8,64–22,53)	30,71 (26,62–39,56)	32,77 (14,60–39,19)	35,51 (33,91–37,70)	35 (27,8–39,4)	0	0,355
p	0	0,556	0,198	0,627			
CD73Treg, %	3,90 (3,25–5,91)	5,87 (2,50–8,86)	4,80 (3,20–7,00)	5,45 (1,97–12,68)	8,1 (6,9–12,2)	0,606	0,836
p	0	0,022	0,001	0,072			
CD39Tact, %	0,59 (0,30–3,20)	4,18 (2,92–7,35)	4,08 (1,36–6,05)	7,00 (2,50–8,28)	5 (4,4–7,4)	0,001	0,204
p	0	0,158	0,025	0,76			
CD73Tact, %	11,50 (8,04–15,18)	13,07 (8,26–23,47)	13,10 (8,00–18,23)	16,28 (8,78–21,60)	17,6 (11,9–21,5)	0,423	0,585
p	0,014	0,325	0,066	0,427			
CD39Th17, %	3,71 (0,71–12,10)	9,60 (8,54–10,3)	14,08 (1,72–17,31)	17,26 (8,60–20,64)	9,6 (8,6–12,1)	0,092	0,462
p	0,014	0,486	0,062	0,059			
CD73Th17, %	6,30 (4,32–10,20)	8,22 (3,50–16,54)	6,50 (5,40–9,05)	8,30 (3,00–18,70)	10,2 (7,3–14,4)	0,224	0,418
p	0,008	0,489	0,002	0,569			

Примечание: p<sub>12</sub> — уровень достоверности между группами 1 и 2 по экспрессии CD39 / CD73 в популяциях CD4<sup>+</sup>; p<sub>34</sub> — уровень достоверности между группами 3 и 4 по экспрессии CD39 / CD73 в популяциях CD4<sup>+</sup>; p — уровень достоверности между группами пациентов с БК и ЯК и группой сравнения, экспрессирующих CD39 / CD73 в разных популяциях Т-клеток.

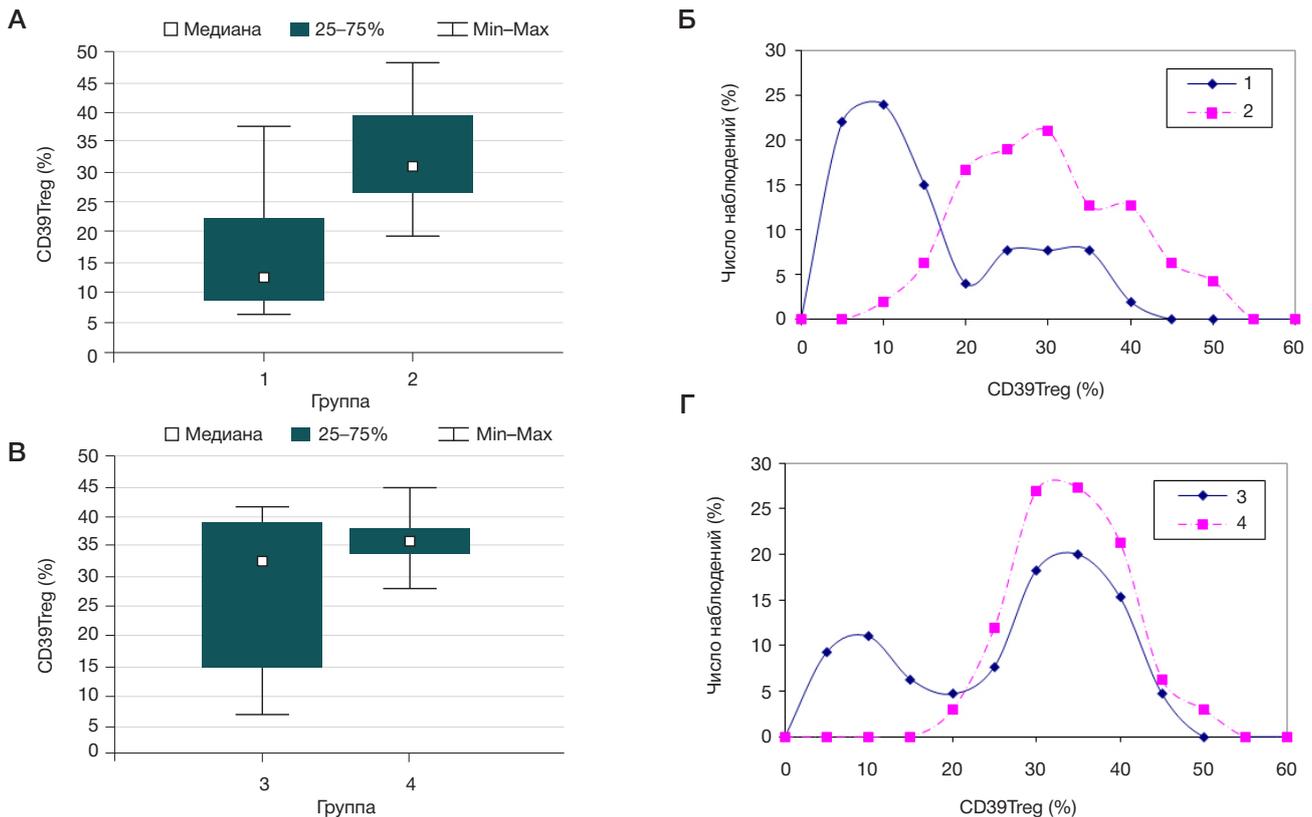


Рис. 4. Относительное число клеток, экспрессирующих CD39 в Treg, в группах 1 и 2 пациентов с БК (А, Б) и в группах 3 и 4 пациентов с ЯК (В, Г)

выявлено в популяции Treg и составило 6–58% от Treg, наименьшее значение — в популяции Tact и составляет 0–14% от Tact. Экспрессия CD73 наиболее выражена в Tact — 2–30% от Tact (табл.1). В группе сравнения наблюдали аналогичные соотношения по экспрессии CD39 и CD73 в популяциях Т-лимфоцитов (табл.1).

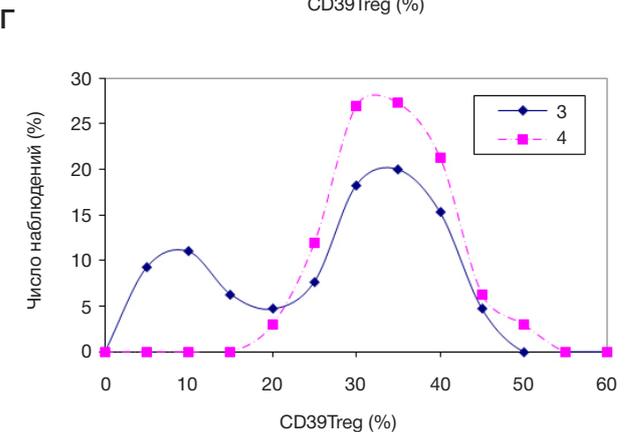
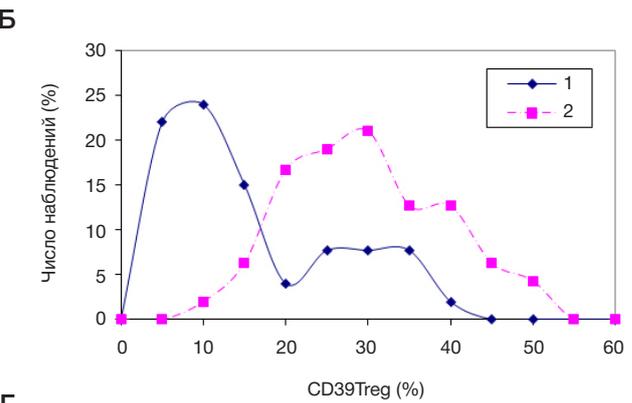
Соотношение экспрессии CD39 и CD73 у пациентов с ВЗК, так же как и в группе сравнения, зависело от популяции клеток: в популяции Treg экспрессия CD39 (CD39Treg) была достоверно выше, чем CD73 (CD73Treg) ( $p = 0,000$ ), а в популяции Tact экспрессия CD39 соответственно достоверно ниже CD73 ( $p = 0,000$ ) (рис. 2А). Число клеток с экспрессией ферментов CD39 и CD73 в Th17-лимфоцитах достоверно не отличалось (табл. 1; рис. 2Б).

У пациентов с ВЗК относительно группы сравнения выявлено достоверное снижение числа клеток с экспрессией CD39 и CD73 в Treg клетках и Tact (табл. 1). Что касается Th17-лимфоцитов, то по экспрессии CD39 группы не различались, а экспрессия CD73 была достоверно ниже в группе детей с ВЗК.

Выявлена прямая корреляционная зависимость между относительным количеством CD39Treg и CD39Tact ( $r = 0,69$ ;  $p = 0,000$ ; рис. 3А), CD39Treg и CD39Th17 ( $r = 0,69$ ;  $p = 0,000$ ; рис. 3Б) у пациентов с ВЗК. Аналогичные зависимости были выявлены для CD73: число CD73Treg коррелирует с CD73Tact ( $r = 0,45$ ;  $p = 0,000$ ); CD73Treg с CD73Th17 ( $r = 0,46$ ;  $p = 0,000$ ).

Анализ показал, что экспрессия CD39 в Treg, Tact и Th17 у пациентов с ВЗК не зависела от возраста ребенка. В то же время в группе сравнения выявлена обратная зависимость экспрессии CD39 от возраста для Th17-лимфоцитов ( $r = -0,39$ ;  $p = 0,009$ ). Группы пациентов с ВЗК и условно здоровых детей не различались по возрасту ( $p = 0,435$ ).

Экспрессия CD73 в Th17-лимфоцитах у пациентов с ВЗК, так же как и в группе сравнения, повышалась с



возрастом ( $r = 0,43$ ;  $p = 0,000$ ).

Длительность заболевания у пациентов в группах составляла от 5 месяцев до 7,7 лет, а длительность проводимой терапии — 2–288 недели. Зависимости количества клеток с экспрессией CD39/CD73 от длительности заболевания и длительности терапии выявлено не было.

#### Экспрессия CD39/CD73 в популяциях CD4<sup>+</sup>-клеток в группах детей при обострении ВЗК и ремиссии заболевания

Был проведен сравнительный анализ экспрессии CD39 и CD73 в популяциях CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов у пациентов с БК и ЯК при обострении (группа 1, группа 3) и при ремиссии заболевания (группа 2, группа 4) между собой и по сравнению с группой условно здоровых детей (группа 5) (табл. 2). Для пациентов с БК выявлено достоверное снижение относительного числа клеток с экспрессией CD39 в группе 1 по сравнению с группой 2 в популяциях Treg и Tact. В группе детей с БК при обострении (группа 1) было получено достоверное снижение экспрессии CD39 и CD73 в популяциях Treg, Tact, Th17 относительно группы 5 (табл. 2). Между группой пациентов с БК в ремиссии и группой сравнения достоверных различий выявлено не было, за исключением снижения экспрессии CD73 в Treg (табл. 2).

Для пациентов с ЯК выявлено достоверное снижение процента Tact, экспрессирующих CD39, в группе пациентов с обострением заболевания относительно группы 5. Кроме того, в группе пациентов с обострением ЯК было выявлено достоверное снижение экспрессии CD73 в Treg и Th17 по сравнению с группой условно здоровых детей (табл. 2). В то же время между группой пациентов с ЯК при ремиссии и группой сравнения достоверных различий получено не было.

Выявлены достоверные различия в экспрессии CD39 в Treg у пациентов с БК в состоянии обострения и ремиссии (рис. 4А). Из-за большого разброса показателей у детей с ЯК достоверных различий между группами 3 и 4 по экспрессии CD39 в Treg получено не было (рис. 4В). Графики на рис. 4Б и 4Г отражают распределение пациентов с БК (группы 1 и 2) и ЯК (группы 3 и 4) по экспрессии CD39 в Treg: в каждой группе выявляются пациенты с низкой и высокой частотой экспрессии. На графиках видно, что точка разделения пациентов в обострении с высокой и низкой экспрессией CD39 в Treg приходится на 20% клеток. При проведении анализа распределения пациентов с БК по количеству клеток с экспрессией CD39 в Treg было отмечено, что у 78% пациентов в обострении субпопуляция CD39Treg составляла менее 20% клеток (рис. 4В). Напротив, в состоянии ремиссии у 82% пациентов субпопуляция CD39Treg составляла более 20% клеток (рис. 4В). В группе 3 у трети пациентов маркер CD39 в Treg экспрессировался менее чем в 20% клеток, у 67% — более 20% Treg (рис. 4Г). У 100% пациентов группы 4 CD39 экспрессировали более 20% Treg (рис. 4Г).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При изучении взрослых здоровых доноров показано, что уровень экспрессии CD39 в Treg может варьировать в диапазоне 2–60%, что отражается на способности этих клеток к гидролизу АТФ [20]. Клетки доноров с большим числом CD39 в Treg осуществляют гидролиз АТФ более эффективно. Нами было показано, что у здоровых детей экспрессия CD39 в Treg колеблется от 19–49%. Оценка содержания клеток с экспрессией эктонуклеотидаз в CD4<sup>+</sup>-лимфоцитах у детей с ВЗК, принимавших блокаторы TNF, показала, что экспрессия CD39 превалирует у пациентов в стадии ремиссии заболевания, что согласуется с данными других авторов [13].

Известно также, что лечение анти-TNF-препаратами у взрослых вызывало увеличение экспрессии CD39 в Treg [21]. В нашем исследовании группа пациентов в стадии обострения БК имела достоверно более низкие количества Treg с экспрессией CD39 по сравнению с группой пациентов в стадии ремиссии БК. При сравнении пациентов с БК и ЯК при обострении заболевания оказалось, что число пациентов, имеющих низкую экспрессию CD39 в Treg, больше при БК, чем при ЯК.

В одной из работ, посвященных оценке функциональной активности CD39 в Treg у пациентов с аутоиммунными гепатитами, показано снижение гидролиза АТФ и образования аденозина [22]. Можно предположить, что у пациентов с ВЗК тоже снижена эффективность гидролиза АТФ за счет снижения активности CD39. Этим можно объяснить

факт наличия пациентов с БК с высокой экспрессией CD39 в Treg при недостаточном эффекте от анти-TNF-терапии и обострении заболевания. Вероятнее всего, увеличение количества Treg, несущих на своей поверхности эктонуклеотидазу CD39, имеет компенсаторный характер и происходит в ответ на недостаточную активность фермента.

В нашем исследовании показано, что количество лимфоцитов субпопуляции supTh17, обладающих супрессорной активностью, у детей в обострении БК было достоверно ниже, чем в группе условно здоровых детей. Представляется перспективным определение supTh17-популяции в качестве дополнительного маркера состояний обострения/ремиссии. Кроме того, как у здоровых детей, так и у детей с ВЗК, количество данной популяции снижается с возрастом. Можно предположить, что снижение популяции supTh17 увеличивает вероятность развития воспалительного процесса с возрастом.

CD73 играет важную роль в поддержании гомеостаза кишечника [23–25]. На нокаут-мышцах было продемонстрировано, что отсутствие CD73 приводит к выраженному воспалению толстой кишки и повреждению тканей у мышей [26]. В нашем исследовании у детей с ВЗК относительно группы сравнения выявлено снижение экспрессии CD73 в Treg, Tact, Th17. CD73 оказывает свою ферментативную активность, расщепляя АМФ до аденозина, не только в виде заякоренного белка на мембране, но и в растворимой форме [27]. Возможно, что для оценки состояния пациента необходимо определять не только экспрессию CD73 в CD4<sup>+</sup>-клетках, но и исследовать активность его растворимой формы, которая, как показано, коррелирует с тяжестью воспалительного процесса [28].

## ВЫВОДЫ

Результаты нашего исследования показывают, что число клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазу CD39 и CD73 в популяциях CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, зависит от популяции клеток и в значительной степени связано с состоянием обострения или ремиссии, и, соответственно, с эффективностью проводимой анти-TNF-терапии. Большинство детей в стадии ремиссии ВЗК имеют высокий уровень CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов с экспрессией эктонуклеотидаз, что способствует снижению активности воспаления за счет преобразования АТФ в аденозин. Однако случаи высокой экспрессии CD39 встречаются и в стадии обострения заболевания, что может быть связано с различной активностью экспрессируемого фермента. Мы полагаем, что дальнейшие исследования по оценке функциональной активности эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в совокупности с количественными показателями могут быть информативны для прогноза и оценки эффективности анти-TNF-терапии при ВЗК.

## Литература

- Burisch J, Pedersen N, Cukovic-Cavka S, et al. East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCOEpiCom inception cohort. *Gut*. 2014; 63 (4): 588–97.
- Benchimol EI, Guttman A, Griffiths AM, et al. Increasing incidence of paediatric inflammatory bowel disease in Ontario, Canada: evidence from health administrative data. *Gut*. 2009; 58: 1490–7.
- Papamichael K, Gils A, Rutgeerts P, Levesque BG, Vermeire S, Sandborn WJ, et al. Role for therapeutic drug monitoring during induction therapy with TNF antagonists in IBD: evolution in the definition and management of primary nonresponse. *Inflamm. Bowel Dis*. 2015; 21: 182–97.
- Князев О. В., Шкурко Т. В., Каграманова А. В., Веселов А. В., Никонов Е. Л. Эпидемиология воспалительных заболеваний кишечника. Современное состояние проблемы. Доказательная гастроэнтерология. 2020; 9 (2): 66–73. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.17116/dokgastro2020902166>.
- Yan JB, Luo MM, Chen ZY, He BH. The function and role of the Th17/Treg cell balance in Inflammatory bowel disease. *J Immunol Res*. 2020; 2020: 8813558. DOI: 10.1155/2020/8813558.

6. Петричук С. В., Мирошкина Л. В., Семикина Е. Л., Топтыгина А. П., Потапов А. С., Цимбалова Е. Г. и др. Показатели популяционного состава лимфоцитов как предикторы эффективности терапии ингибитором TNF $\alpha$  у детей с воспалительными заболеваниями кишечника. *Медицинская иммунология*. 2018; 20 (5): 721–30. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2018-5-721-730>.
7. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom T. B, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006; 441 (7090): 235–8.
8. Lee GR. The balance of Th17 versus Treg cells in autoimmunity. *Int J Mol Sci*. 2018. 19: 730. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms19030730>.
9. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews*. 1972; 24 (3): 509–81.
10. Kukulski F, et al. Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling. *Adv Pharmacol*. 2011; 61: 263–99. PubMed: 21586362.
11. Virgilio FD, Sarti AC, Silva RC. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2020; 318 (5): 832–5. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00053.2020>.
12. Faas MM, Sáez T, de Vos P. Extracellular ATP and adenosine: the yin and yang in immune responses? *Mol Aspects Med*. 2017; 55: 9–19. DOI: 10.1016/j.mam.2017.01.002.
13. Vuerich M, Mukherjee S, Robson SC, Longhi MS. Control of gut inflammation by modulation of purinergic signaling. *Front Immunol*. 2020; 11: 1882. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01882.
14. Gibson DJ, Elliott L, McDermott E, Tosetto M, Keegan D, Byrne K, et al. Heightened expression of CD39 by regulatory T lymphocytes is associated with therapeutic remission in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015; 21: 2806–14. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000566.
15. Friedman DJ, Kunzli BM, A-Rahim YI, Sevigny J, Berberat PO, Enyoji K, et al. From the cover: CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 16788–93.
16. Zeng J, Ning Z, Wang Y, Xiong H. Implications of CD39 in immune-related diseases. *Int Immunopharmacol*. 2020; 89 (Pt A): 107055. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107055.
17. Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, et al. CD39Foxp3 regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *The Journal of Immunology*. 2009; 183: 7602–10.
18. Longhi MS, Moss A, Bai A, Wu Y, Huang H, Cheifetz A, et al. Characterization of human CD39+ Th17 cells with suppressor activity and modulation in inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*. 2014; 9: e87956. DOI: 10.1371/journal.pone.0087956.
19. Fernández D, Flores-Santibáñez F, Neira J, Osorio-Barrios F, Tejón G, Nuñez S, et al. Purinergic signaling as a regulator of Th17 cell plasticity. *PLoS ONE*. 2016; 11: e0157889. DOI: 10.1371/journal.pone.0157889.
20. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Stenjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007; 110 (4): 1225–32.
21. Gibson DJ, Elliott L, McDermott E, Tosetto M, Keegan D, Byrne K, et al. Heightened expression of CD39 by regulatory T lymphocytes is associated with therapeutic remission in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015; 21: 2806–14. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000566.
22. Grant Ch R, Liberal R, Holder BS, Cardone J, Ma Y, Robson SC, et al. Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2014; 59 (3): 1007–15. DOI: 10.1002/hep.26583.
23. Louis NA, Robinson AM, MacManus CF, Karhausen J, Scully M, Colgan SP. Control of IFN- $\alpha$ A by CD73: implications for mucosal inflammation. *J Immunol*. 2000; 180: 4246–55. DOI: 10.4049/jimmunol.180.6.4246.
24. Sotnikov I, Louis NA. CD73-dependent regulation of interferon alpha and interleukin-10 in the inflamed mucosa. *Sci World J*. 2010; 10: 2167–80. DOI: 10.1100/tsw.2010.203
25. Colgan SP, Eitzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal*. 2006; 351–60. DOI: 10.1007/s11302-005-5302-5.
26. Bynoe MS, Waickman AT, Mahamed DA, Mueller C, Mills JH, Czopik A. CD73 is critical for the resolution of murine colonic inflammation. *BioMed Research International*. 2012, Article ID 260983, 13 pages, 2012. Available from: <https://doi.org/10.1155/2012/260983>.
27. Schneider E, Rissiek A, Winzer R, Puig B, Rissiek B, Haag F, et al. Expression and function of non-cell-bound CD73 in inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10, article 1729. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01729.
28. Maksimow M, Lea K, Nieminen A, Kylänpää L, Aalto K, et al. Early prediction of persistent organ failure by soluble CD73 in patients with acute pancreatitis. *Critical Care Medicine*. 2014; 42 (12): 2556–64. DOI: 10.1097/CCM.0000000000000550.

## References

1. Burisch J, Pedersen N, Cukovic-Cavka S, et al. East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCOEpiCom inception cohort. *Gut*. 2014; 63 (4): 588–97.
2. Benchimol EI, Guttman A, Griffiths AM, et al. Increasing incidence of paediatric inflammatory bowel disease in Ontario, Canada: evidence from health administrative data. *Gut*. 2009; 58: 1490–7.
3. Papamichael K, Gils A, Rutgeerts P, Levesque BG, Vermeire S, Sandborn WJ, et al. Role for therapeutic drug monitoring during induction therapy with TNF antagonists in IBD: evolution in the definition and management of primary nonresponse. *Inflamm. Bowel Dis*. 2015; 21: 182–97.
4. Kniazev OV, Shkurko TV, Kagramanova AV, Veselov AV, Nikonov EL. Epidemiology of inflammatory bowel disease. State of the problem (review). *Russian Journal of Evidence-Based Gastroenterology*. 2020; 9 (2): 66–73. Russian.
5. Yan JB, Luo MM, Chen ZY, He BH. The function and role of the Th17/Treg cell balance in Inflammatory bowel disease. *J Immunol Res*. 2020; 2020: 8813558. DOI: 10.1155/2020/8813558.
6. Petrichuk SV, Miroshkina LV, Semikina EL, Topotygina AP, Potapov AS, Tsimbalova EG, et al. Indicators of the lymphocyte subsets as efficiency predictors of therapy with inhibitors of TNF $\alpha$  in children with inflammatory bowel disease. *Medical Immunology*. 2018; 20 (5): 721–30. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2018-5-721-730>. Russian.
7. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom T. B, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006; 441 (7090): 235–8.
8. Lee GR. The balance of Th17 versus Treg cells in autoimmunity. *Int J Mol Sci*. 2018. 19: 730. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms19030730>.
9. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews*. 1972; 24 (3): 509–81.
10. Kukulski F, et al. Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling. *Adv Pharmacol*. 2011; 61: 263–99. PubMed: 21586362.
11. Virgilio FD, Sarti AC, Silva RC. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2020; 318 (5): 832–5. Available from: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00053.2020>.
12. Faas MM, Sáez T, de Vos P. Extracellular ATP and adenosine: the yin and yang in immune responses? *Mol Aspects Med*. 2017; 55: 9–19. DOI: 10.1016/j.mam.2017.01.002.
13. Vuerich M, Mukherjee S, Robson SC, Longhi MS. Control of gut inflammation by modulation of purinergic signaling. *Front Immunol*. 2020; 11: 1882. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01882.
14. Gibson DJ, Elliott L, McDermott E, Tosetto M, Keegan D, Byrne K, et al. Heightened expression of CD39 by regulatory T lymphocytes

- is associated with therapeutic remission in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2015; 21: 2806–14.
15. Friedman DJ, Kunzli BM, A-Rahim YI, Sevigny J, Berberat PO, Enjoji K, et al. From the cover: CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 16788–93.
  16. Zeng J, Ning Z, Wang Y, Xiong H. Implications of CD39 in immune-related diseases. *Int Immunopharmacol.* 2020; 89 (Pt A): 107055. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107055.
  17. Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, et al. CD39Foxp3 regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *The Journal of Immunology.* 2009; 183: 7602–10.
  18. Longhi MS, Moss A, Bai A, Wu Y, Huang H, Cheifetz A, et al. Characterization of human CD39+ Th17 cells with suppressor activity and modulation in inflammatory bowel disease. *PLoS ONE.* 2014; 9: e87956. DOI: 10.1371/journal.pone.0087956.
  19. Fernández D, Flores-Santibáñez F, Neira J, Osorio-Barrios F, Tejón G, Nuñez S, et al. Purinergic signaling as a regulator of Th17 cell plasticity. *PLoS ONE.* 2016; 11: e0157889. DOI: 10.1371/journal.pone.0157889.
  20. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 2007; 110 (4): 1225–32.
  21. Gibson DJ, Elliott L, McDermott E, Tosetto M, Keegan D, Byrne K, et al. Heightened expression of CD39 by regulatory T lymphocytes is associated with therapeutic remission in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2015; 21: 2806–14. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000566.
  22. Grant Ch R, Liberal R, Holder BS, Cardone J, Ma Y, Robson SC, et al. Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 2014; 59 (3): 1007–15. DOI: 10.1002/hep.26583.
  23. Louis NA, Robinson AM, MacManus CF, Karhausen J, Scully M, Colgan SP. Control of IFN-alphaA by CD73: implications for mucosal inflammation. *JImmunol.* 2000; 180: 4246–55. DOI: 10.4049/jimmunol.180.6.4246.
  24. Sotnikov I, Louis NA. CD73-dependent regulation of interferon alpha and interleukin-10 in the inflamed mucosa. *Sci World J.* 2010; 10: 2167–80. DOI: 10.1100/tsw.2010.203
  25. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal.* 2006; 351–60. DOI: 10.1007/s11302-005-5302-5.
  26. Bynoe MS, Waickman AT, Mahamed DA, Mueller C, Mills JH, Czopik A. CD73 is critical for the resolution of murine colonic inflammation. *BioMed Research International.* 2012, Article ID 260983, 13 pages, 2012. Available from: <https://doi.org/10.1155/2012/260983>.
  27. Schneider E, Rissiek A, Winzer R, Puig B, Rissiek B, Haag F, et al. Generation and function of non-cell-bound CD73 in inflammation. *Frontiers in Immunology.* 2019; 10, article 1729. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01729.
  28. Maksimow M, Lea K, Nieminen A, Kylänpää L, Aalto K, et al. Early prediction of persistent organ failure by soluble CD73 in patients with acute pancreatitis. *Critical Care Medicine.* 2014; 42 (12): 2556–64. DOI: 10.1097/CCM.0000000000000550.