

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ Т-ЛИМФОЦИТОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ СВИЩЕЙ ПРЯМОЙ КИШКИ ПРИ БОЛЕЗНИ КРОНА: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Образцов И.В.^{1,2}, Широких К.Е.¹,
Шапина М.А.¹, Сухина М.А.¹, Халиф И.Л.¹

¹ ФГБУ ГНЦ колопроктологии им. А.Н. Рыжих МЗ РФ, г. Москва
(директор – чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор Ю.А.Шелыгин)

² ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Д.Рогачёва МЗ РФ, г. Москва
(директор – академик РАН, д.м.н., профессор А.Г.Румянцев)

Целью работы стал поиск показателей, позволяющих провести дифференциальную диагностику между банальными свищами и свищами, ассоциированными с болезнью Крона (БК) без активности в кишке. В исследование включено 28 здоровых индивидов в качестве контрольной группы, 9 пациентов с банальными свищами и 12 больных с БК-ассоциированными свищами. Методом проточной цитометрии в периферической крови определяли содержание различных субпопуляций Т-лимфоцитов. По сравнению с контрольной группой, в группе банальных свищей определено значимое повышение CD62L^{low}CD45RA⁺ эффекторных Т-хелперов ($p < 0,05$), у больных с БК-ассоциированными свищами этот показатель снижен ($p < 0,01$). Содержание CD62L^{high}CD45RA⁺ наивных Т-хелперов, напротив, повышено при банальных свищах и снижено при БК-ассоциированных ($p < 0,01$). Содержание CD4+CD69⁺, CD4+CD161^{high} и CD4+CD161^{low} Т-лимфоцитов в контрольной группе и в группе БК-ассоциированных свищей не различается; при этом в группе банальных свищей доля CD4+CD161^{high} и CD4+CD161^{low} Т-лимфоцитов снижена ($p < 0,01$ и $p < 0,05$, соответственно), а содержание CD4+CD69⁺ Т-клеток – повышено ($p < 0,01$). Кроме того, в группе БК-ассоциированных свищей снижена доля CD8+CD25⁺ ($p < 0,01$) и повышено абсолютное содержание CD8+CD161^{high} Т-клеток ($p < 0,05$) по сравнению с группой банальных свищей. Таким образом, иммунофенотипирование Т-лимфоцитов периферической крови представляется перспективным для раннего выявления БК при манифестации в форме изолированного аноректального свища.

[Ключевые слова: аноректальный свищ, болезнь Крона, биомаркеры, МАИТ-клетки, Th17-клетки, iNKT-клетки, наивные Т-лимфоциты, эффекторные Т-лимфоциты, CD25+ Т-лимфоциты, CD69+ Т-лимфоциты]

T-CELL IMMUNE PHENOTYPING FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF CROHN'S DISEASE ASSOCIATED ANORECTAL FISTULA: A PILOT STUDY

Obrazcov I.V., Shirokikh K.E., Shapina M.A., Sukhina M.A., Khalif I.L.
State Scientific Centre of Coloproctology, Moscow, Russia

Our aim was to develop a system of parameters that could enable differentiation between idiopathic and Crohn's disease (CD) associated fistula without intestinal lesions. 28 healthy individuals, 9 patients with idiopathic fistula and 12 patients with Crohn's fistula participated in our study. We evaluated different peripheral blood T-cell populations by means of flow cytometry. CD62L^{low}CD45RA⁺ effector T-cells were increased in the idiopathic fistula cases ($p < 0,05$) and decreased in Crohn's fistula cases ($p < 0,01$) compared with the control group. On the contrary, naïve CD62L^{high}CD45RA⁺ T-cells were higher in the idiopathic fistula group and lower in Crohn's fistula cases ($p < 0,01$). No difference between CD4+CD69⁺, CD4+CD161^{high} and CD4+CD161^{low} T-cell levels was shown between healthy controls and Crohn's fistula cases, however, CD4+CD161^{high} and CD4+CD161^{low} T-cell levels were lower ($p < 0,01$ and $p < 0,05$, respectively) and CD4+CD69⁺ T-cell levels were higher ($p < 0,01$) in the group of idiopathic fistulas compared with the control. Moreover, Crohn's fistulas showed the decrease of CD8+CD25⁺ T-cell level ($p < 0,01$) and the increase of CD8+CD161^{high} T-cell absolute count ($p < 0,05$) compared with idiopathic fistula cases. Thus peripheral T-cell immune phenotyping seems to be promising for early identification of CD that manifests as an isolated anorectal fistula.

[Key words: anorectal fistula, Crohn's disease, biomarkers, MAIT-cells, Th17, iNKT, naïve T-cells, effector T-cells, CD25+ T-cells, CD69+ T-cells]

Адрес для переписки: Образцов Игорь Владимирович, ФГБУ «ГНЦК им. А.Н.Рыжих» Минздрава России,
ул. Саляма Адила, д. 2, Москва, 123423, тел.: +7 (499) 199-00-68, e-mail: igor_obraztsov@bk.ru

ВВЕДЕНИЕ

Свищи прямой кишки (СПК) представляют собой одну из наиболее часто встречающихся болез-

ней в практике колопроктологического стационара. Обычно формируются в результате блокады анальных крипт, приводящей к инфицированию анальных желёз и нагноению. В 40-60% случаев

свищи сопровождаются абсцедированием, причём формирование абсцесса характеризует острую стадию заболевания, а рецидивирование свища – хроническую. СПК подлежат хирургическому лечению с высокой вероятностью достижения стойкой ремиссии. Принципиально иного подхода требуют свищи, ассоциированные с болезнью Крона (СБК). Болезнь Крона (БК) представляет собой одну из форм воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) и характеризуется персистирующим воспалением слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. Этиопатогенез БК основан на сочетанном воздействии генетической предрасположенности, иммунной дисрегуляции на уровне ЖКТ и кишечного микробиома [2], однако патогенетический механизм БК до сих пор не расшифрован окончательно. БК обычно сопровождается осложнениями системного и местного характера; к числу наиболее важных местных осложнений можно отнести формирование СБК [3,4]. Около 10% случаев БК манифестируют с формирования свищей, которые опережает кишечные проявления на несколько лет [5]. Наличие свища не только значительно ухудшает качество жизни пациента, но и увеличивает риск развития вторичных осложнений: абсцедирования, формирования стриктур и развития анарктального рака (при персистировании свища более 20 лет) [6]. Свищи, ассоциированные с БК, часто оказываются рефрактерными к хирургической коррекции: вероятность достижения ремиссии с полным закрытием свища составляет около 34% [7]. Кроме того, манифестация БК в виде изолированного анарктального свища затрудняет своевременную постановку диагноза и начало специфического лечения основного заболевания [8]. Поэтому до сегодняшнего дня не теряет актуальность анализ перспективных диагностических индикаторов – биомаркеров, направленных на селективную оценку различных звеньев патогенеза локального воспаления, приводящего к формированию, персистированию или рецидиву свища. Так, ценную диагностическую информацию может дать фенотипирование Т-лимфоцитов периферической крови.

Т-лимфоциты являются ключевыми клетками адаптивного иммунного ответа. В процессе развития созревающие Т-лимфоциты превращаются в Т-хелперы (Th) или Т-цитотоксические (Tc) клетки. Tc характеризуются экспрессией корцептора CD8 на клеточной мембране, они взаимодействуют с клеткой-мишенью через молекулу главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, MHC) I типа; при активации CD8+ клетка выделяет перфорины и гранзимы, запускающие процесс апоптоза клетки-мишени.

Th экспрессируют корцептор CD4 и связываются с молекулой MHC II типа на поверхности антигенпрезентирующих клеток [9]. Это взаимодействие способствует дифференцировке CD4+ клетки из наивной формы, характеризующейся экспрессией антигена CD45RA, в клетку памяти, несущую CD45RO [10]. Наивные Т-лимфоциты и Т-клетки памяти подразделяют также на субпопуляции центральных и эффекторных клеток, обладающие, соответственно, тропизмом к вторичным лимфоидным структурам и периферическим слизистым (в частности, к слизистой оболочке кишечника). Центральные Т-клетки характеризуются повышенной экспрессией L-селектина CD62L, эффекторные Т-клетки экспрессируют эту молекулу слабо [11]. Активация Т-клеток при взаимодействии с антигеном способствует началу экскреции цитокинов, ответственных за реализацию наиболее подходящего типа иммунного ответа. Сегодня принято выделять Th1-, Th2- и Th17- типы ответа, различающиеся по своим иммунологическим эффектам, реализующимся в процессе клеточной активации [12]. Одним из способов оценки активации Т-лимфоцитов является исследование экспрессии молекул CD25, CD69 и HLA-DR [13]. Кроме того, CD69 активно экспрессируется резидентными лимфоцитами, подвергающимися непрерывной стимуляции антигенами кишечной микробиоты [14].

Th1-ответ направлен на активацию Tc-звена, он реализуется за счёт секреции интерферона (ИФН)- γ и фактора некроза опухоли (ФНО)- α . Th2-ответ через интерлейкины (ИЛ) 10 и 4 способствует синтезу иммуноглобулинов и подавлению клеточного ответа. Th17-ответ направлен на развитие гранулоцитарного воспаления за счёт синтеза ИЛ-17 и гранулоцитарных колониестимулирующих факторов. Избыточная активация Th17-клеток сопряжена с формированием хронического персистирующего воспаления; для БК характерна сочетанная активация Th1- и Th17-системы [15].

Одной из характеристических черт Th17-клеток считается экспрессия лектина С-типа CD161, однако эта мембранная молекула специфична не только для них. Наличие CD161 было впервые показано на NK-клетках; кроме того, некоторые CD4+ и CD8+ клетки также экспрессируют этот маркер. CD161+ клетки можно подразделить на субпопуляции со средним и высоким (CD161^{high}) уровнем экспрессии, причём CD161^{high} клетки выделяют в отдельную категорию так называемых инвариантных Т-клеток, ассоциированных со слизистой (mucosal-associated invariant T-cells, MAIT) [16]. Эти клетки тропны к кишечному эпителию и играют важную роль в поддержании местного

Таблица 1. Иммунофенотипирование МАИТ-, iNKT- и Th17-клеток

Фенотип	Популяция
CD3+CD4+CD25+	CD25+ Т-хелперы
CD3+CD8+CD69+	CD69+ Т-цитотоксические клетки
CD3+CD4+CD69+	CD69+ Т-хелперы
CD3+CD8+CD25+	CD25+ Т-цитотоксические клетки
CD3+CD4+CD62L ^{low} CD45RA+	Эффекторные CD45RA+ Т-клетки
CD3+CD4+ CD62L ^{high} CD45RA+	Наивные Т-лимфоциты
CD3+CD4+CD62L ^{low} CD45RO+	Эффекторные Т-клетки памяти
CD3+CD4+ CD62L ^{high} CD45RO+	Т-клетки центральной памяти
CD3+CD4+CD161 ^{high}	CD4+ МАИТ-клетки
CD3+CD8+CD161 ^{high}	CD8+ МАИТ-клетки
CD3+CD4+CD161 ^{low}	Th17-клетки
CD3+CD8+CD161 ^{low}	iNKT-клетки
CD3+CD4+CD161 ^{low} HLA-DR+	HLA-DR+ активированные Th17-клетки
CD3+CD8+CD161 ^{low} HLA-DR+	HLA-DR+ активированные iNKT-клетки

иммунологического гомеостаза слизистой кишечника. МАИТ-клетки экспрессируют частично инвариантный ТКР, взаимодействующий с антиген-презентирующей молекулой MR1 (вместо МНС), на которой представляются антигены-предшественники рибофлавина, вырабатываемые многими бактериями (*E.coli*, *E.faecalis*, *S.typhimurium* и др.) и некоторыми дрожжевыми грибами (*C.glabrata*, *S.albicans*). Примечательно, что мутантные штаммы лактококков и сальмонелл, неспособные вырабатывать рибофлавин, не вызывают активации МАИТ-клеток [17]. Кроме того, МАИТ-клетки способны активироваться ТКР-независимым образом в присутствии ИЛ-12 и ИЛ-18. Активированные МАИТ-клетки выделяют ИЛ-17, ИФН- γ и ФНО- α , запуская тем самым Th17- и Th1- пути развития воспаления. Большая часть МАИТ-клеток представлена CD8+ Т-лимфоцитами, значительно меньшая – CD4+ [18].

МАИТ-клетки имеют много общих черт с другой популяцией Т-лимфоцитов, относящихся к системе врождённого ответа, так называемых инвариантных NKT (iNKT) клеток, частично сходных с NK-клетками [19]. Эти клетки экспрессируют CD161 в умеренных количествах, обладают частично инвариантным ТКР и активируются при взаимодействии с гликолипидами микробного происхождения, представленными на молекуле CD1d. Как и в случае с МАИТ-клетками, ИЛ-12 и ИЛ-18 способствуют активации iNKT-клеток. iNKT-клетки активируются антигенами многих бактерий, включая *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *S. typhimurium* и др., и выделяют ИЛ-12, ФНО- α и макрофагальный воспалительный белок 2 (macrophage inflammatory protein, MIP-2), способствуя, тем самым, запуску Th1-пути и привлечению нейтрофилов в очаг воспаления [20,21]. Существуют данные о том, что пул CD161^{low} Т-лимфоцитов, несущих рецептор цитотоксичности CD8, представля-

ет собой популяцию резидентных клеток, тропных к слизистой кишечника и играющих серьёзную роль в локальной регуляции воспаления [22].

Таким образом, локальный гомеостаз слизистой кишечника реализуется благодаря системе резидентных Т-лимфоцитов, включающей МАИТ-, iNKT-клетки и Th17-клетки, а также эффекторные Т-клетки. Количественная и функциональная оценка этих популяций в периферической крови позволит охарактеризовать патогенез перианальных поражений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены пациенты с СПК (n=9), пациенты с СБК (n=12), и контрольная группа (КГ) здоровых индивидов (n=28). Методом проточной цитометрии оценивали относительное и абсолютное содержание популяций CD3+ Т-лимфоцитов (фенотипическая характеристика представлена в таблице 1).

Кроме того, оценивали уровень спонтанной активации указанных клеточных популяций по экспрессии HLA-DR и рассчитывали коэффициент активации ($K_{акт}$) как долю HLA-DR+ клеток в общем содержании.

Периферическую кровь в объёме 50 мкл (содержание лейкоцитов не менее 2×10^6 /мл) окрашивали антителами, мечеными флуорохромами (IOtest Beckman Coulter, USA), согласно инструкции производителя по следующей схеме:

Пробирка 1: CD25-FITC, CD8-PE, CD3-ECD, CD69-PC5, CD4-PC7

Пробирка 2: CD45RA-FITC, CD45RO-PE, CD3-ECD, CD62L-PC5, CD4-PC7

Пробирка 3: HLA-DR-FITC, CD161-PE, CD8-ECD, CD3-PC5, CD4-PC7

Лизис эритроцитов выполнен на станции прободготовки TQ-Prep Workstation (Beckman Coulter, USA). Для оценки абсолютного содержания клеток использовали калибровочные частицы CaliBright (Beckman Coulter, USA); цитометрия выполнена на приборе FC-500 (Beckman Coulter, USA); средний объем сбора составил 70000 событий. Стратегия гейтирования показана на рисунке 1.

Статистическая обработка результатов выполнена в пакете IBM SPSS 19. Построены ящичковые диаграммы; вычислены средние и медианные значения; доверительный интервал представлен в виде $x_{cp} \pm Z\alpha_{/2} \sigma / \sqrt{n}$ ($\alpha = 95\%$, $p=0,05$). Различия средних оценивались на основании t-критерия

с поправкой Бонферрони на ненормальность распределения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании активации Т-клеток определено статистически значимое ($p<0,001$) снижение относительного содержания активированных CD25+ Т-хелперов как в группе СПК, так и в группе СБК по сравнению с КГ. При этом абсолютное содержание этих клеток также было достоверно снижено в указанных группах ($p<0,001$ и $p<0,01$, соответственно), однако значимых различий в уровнях

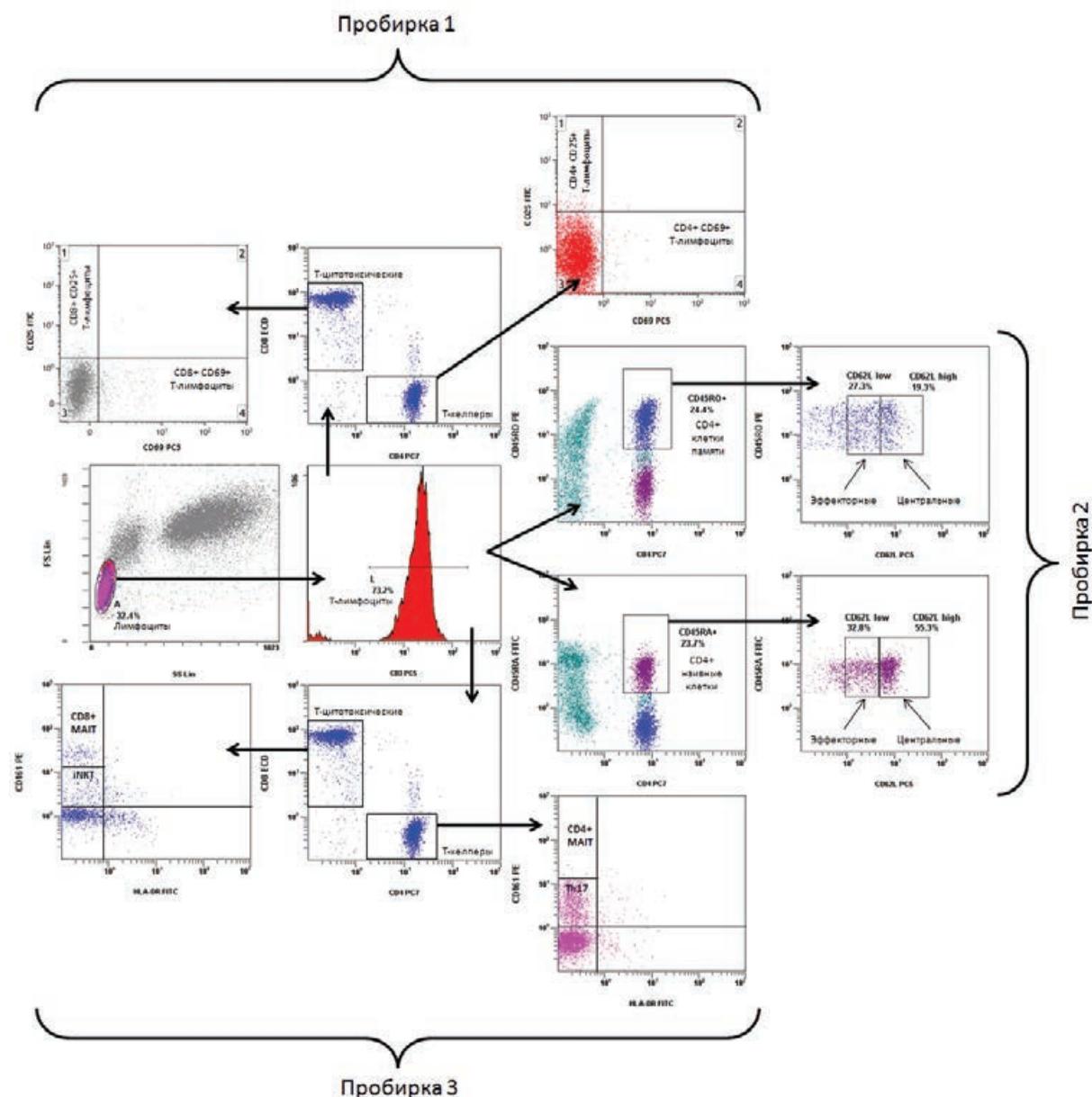


Рисунок 1. Стратегия гейтирования

показателей между группами СБК и СПК выявлено не было. Уровень активированных CD69+ Т-цитотоксических клеток значимо не различался во всех трёх обследованных группах (не показано); при этом доля активированных CD69+ Т-хелперов оказалась достоверно выше в группе СПК как по

сравнению с КГ ($p < 0,001$), так и по сравнению с СБК ($p < 0,01$). Абсолютное содержание активированных CD69+ Т-хелперов также оказалось значимо выше по сравнению с КГ ($p < 0,001$), однако достоверных различий в уровнях показателя между группами СПК и СБК найдено не было. Доля активирован-

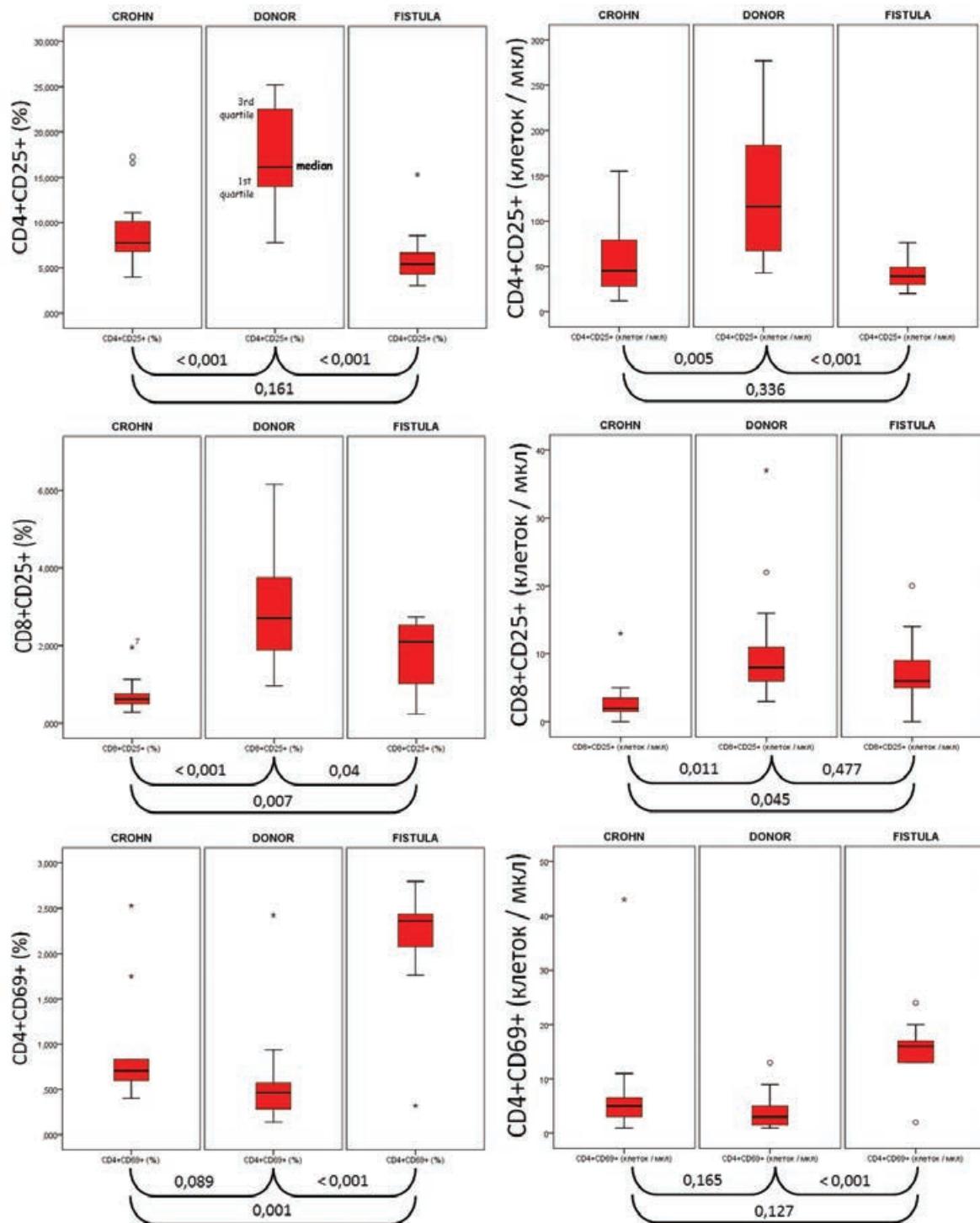


Рисунок 2. Содержание CD25+ и CD69+ Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов

Таблица 2. CD4+CD69+ и CD8+CD25+, наивные и эффекторные CD45RA+ T-клетки

		CD4+CD69+, %	CD4+CD69+, клеток/мкл	CD8+CD25+, %	CD8+CD25+, клеток/мкл	Наивные, %	Наивные, клеток/мкл	Эффекторные, %	Эффекторные, клеток/мкл
СБК	Среднее (p<0,05)	0,85±0,37	7,50±6,55	1,41±1,33	6,08±5,83	68,48±17,38	195,25±140,87	27,03±17,68	63,92±47,42
	Медиана	0,70	4,50	0,64	2,50	79,08	95,00	14,38	31,50
КГ	Среднее (p<0,05)	0,45±0,12	3,18±1,47	2,80±0,75	6,67±1,55	36,53±10,72	107,79±36,10	53,02±9,09	162,14±44,59
	Медиана	0,46	3,00	2,70	6,00	25,71	61,00	64,19	140,50
СПК	Среднее (p<0,05)	2,12±0,48	15,11±3,95	1,72±0,63	7,89±3,9	13,03±9,82	32,44±20,30	71,17±9,88	178,22±52,11
	Медиана	2,36	16,00	2,10	6,00	6,20	16,00	75,13	147,00

ных CD25+ T-цитотоксических клеток оказалась значимо ниже в группе СБК как по сравнению с КГ (p<0,001), так и с БС (p<0,01); при этом абсолютное содержание этих клеток также оказалось снижено в группе СБК, однако с меньшей статистической достоверностью (p < 0,05). Показатели активации T-клеток представлены на рисунке 2.

Относительное содержание эффекторных CD62L^{low}CD45RA+CD4+ T-клеток оказалось повышено в группе СПК (p<0,05) и снижено в группе СБК (p<0,01) по сравнению с КГ. Абсолютное

содержание указанных клеток также снижено в группе СБК по сравнению с КГ (p<0,05) и СПК (p<0,01), однако уровень показателя в группах СПК и КГ достоверно не различается. Доля наивных CD62L^{high}CD45RA+CD4+ T-клеток, напротив, значимо повышена в группе СБК (p<0,01) и снижена в группе СПК (p<0,01) по сравнению с КГ. Достоверно снижено и абсолютное содержание этих клеток в группе СПК по сравнению с КГ (p<0,01) и СБК (p<0,05). Эффекторные CD62L^{low}CD45RO+CD4+ T-клетки памяти снижены в группе СБК как в

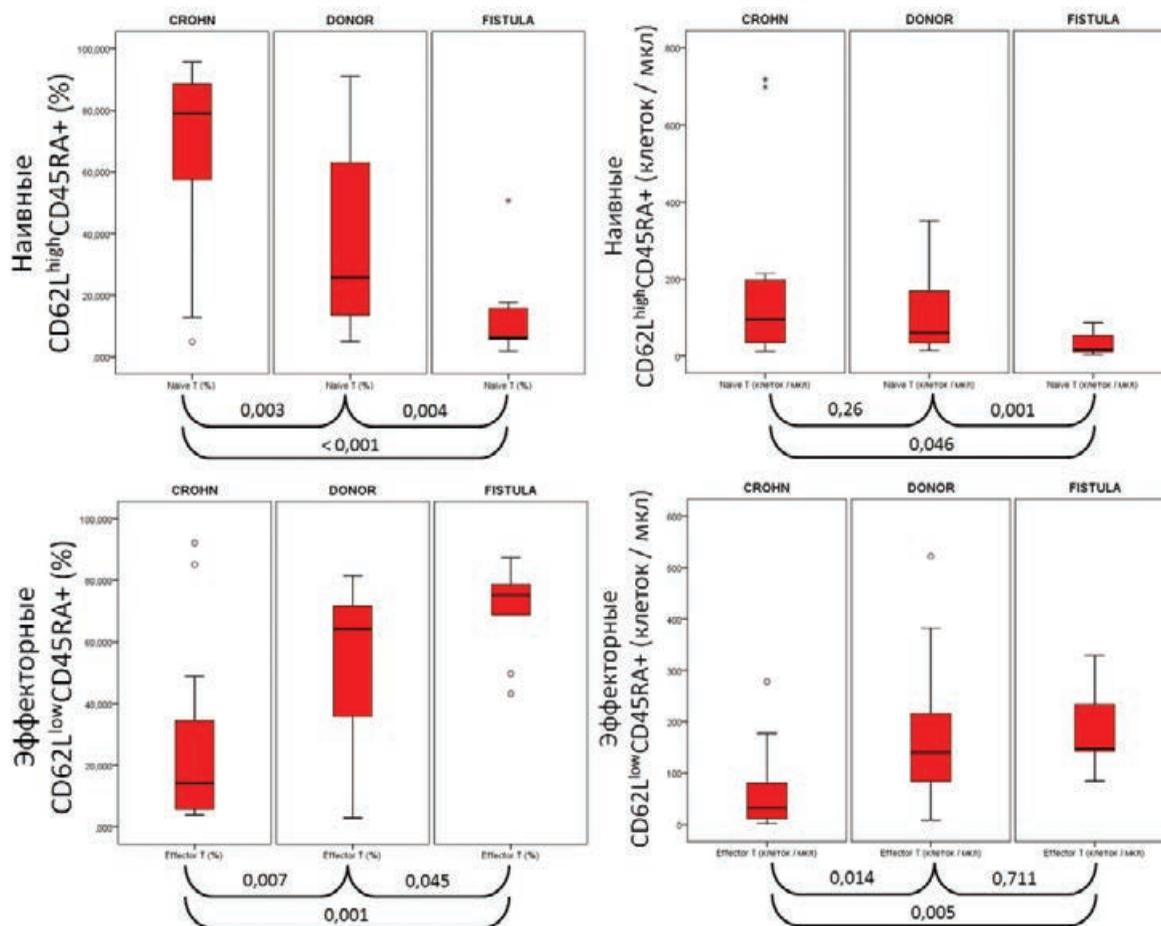


Рисунок 3. Содержание наивных и эффекторных CD45RA+ T-клеток

Таблица 3. CD4+ и CD8+ МАИТ-клетки, Th17-клетки и iNKT клетки

		CD4+МАИТ, %	CD4+ МАИТ, клеток/мкл	CD8+МАИТ, %	CD8+ МАИТ, клеток/ мкл	Th17, %	Th17, клеток/ мкл	iNKT, %	iNKT, клеток/ мкл
СБК	Среднее ($p < 0,05$)	0,85±0,36	4,5±2,2	4,5±3,0	9,7±4,2	29,7±6,2	158,3±37,7	17,2±4,2	53,3±15,6
	Медиана	0,50	3,0	2,0	8,2	32,1	188,9	15,2	51,2
КГ	Среднее ($p < 0,05$)	0,92±0,23	6,9±2,6	6,9±3,1	34,8±23,0	26,7±2,7	197,0±46,8	14,3±3,4	73,8±34,6
	Медиана	0,91	7,0	6,6	27,7	26,7	195,6	12,8	60,1
СПК	Среднее ($p < 0,05$)	0,24±0,23	1,3±1,1	2,5±1,9	6,9±5,5	21,0±3,8	138,4±36,3	13,5±4,6	59,2±45,8
	Медиана	0,10	0,7	1,35	4,02	20,6	119,5	12,0	35,5

относительном, так и в абсолютном содержании ($p < 0,05$) по сравнению с КГ; значимые различия в содержании CD62L^{high}CD45RO+CD4+ Т-клеток центральной памяти не выявлены (не показано).

Содержание наивных и эффекторных Т-клеток представлено на рисунке 3.

Абсолютные и относительные показатели содержания CD25+, CD69+, наивных и эффекторных

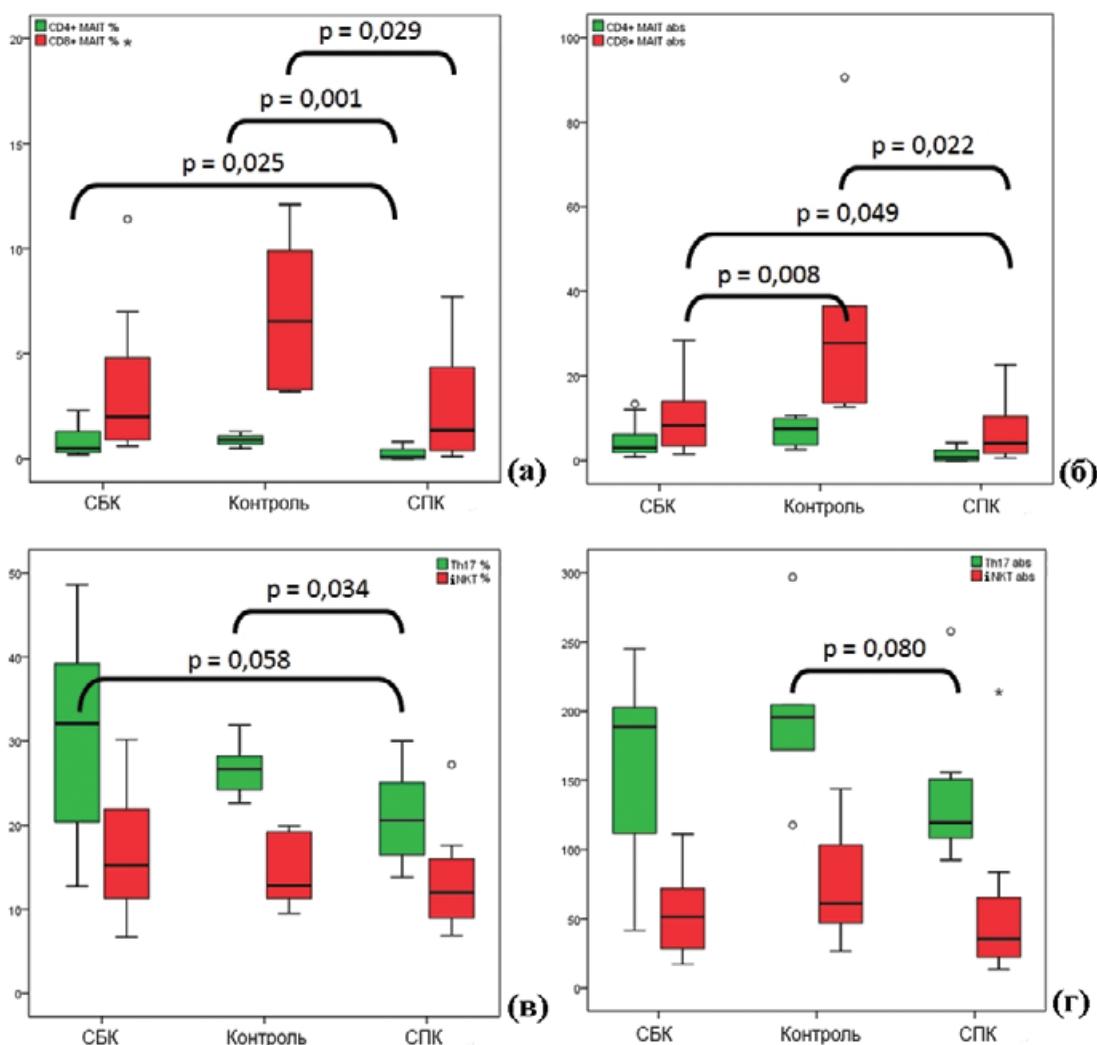


Рисунок 4. Содержание CD4+ и CD8+ МАИТ-клеток, Th17- и iNKT-клеток (а) – относительное содержание МАИТ клеток, %; (б) – абсолютное содержание МАИТ клеток, клеток/мкл; (в) – относительное содержание Th17- и iNKT-клеток, %; (г) – абсолютное содержание Th17- и iNKT-клеток, клеток/мкл;

CD62L^{low}CD45RA+CD4+ Т-лимфоцитов охарактеризованы в таблице 2.

Определено значимое снижение относительного содержания CD4+ МАИТ-клеток в группе СПК по сравнению с КГ ($p < 0,01$) и СБК ($p < 0,05$). Также в группе СПК оказалось значимо снижено относительное содержание CD8+ МАИТ-клеток по сравнению с КГ ($p < 0,05$). Абсолютное содержание CD8+ МАИТ клеток в группе СПК ниже, чем в СБК ($p < 0,05$), причём у пациентов с СБК, по сравнению с КГ, указанный индикатор ещё более снижен ($p < 0,01$). Кроме того, установлено снижение относительного содержания Th17-подобных клеток в группе СПК по сравнению с КГ ($p < 0,05$) и БК ($p < 0,1$), снижено и абсолютное содержание этих клеток в группе СПК по сравнению с КГ ($p < 0,1$). Различия в содержании iNKT-подобных клеток в обследуемых совокупностях выявлены не были. Показатели относительного и абсолютного содержания CD4+ и CD8+ МАИТ-, Th17- и iNKT-подобных клеток в обследованных совокупностях показано в таблице 3 и на рисунок 4. Оценка спонтанной активации популяций CD161+ клеток выполнена на основе коэффициента активации ($K_{акт}$), построенного как доля клеток, экспрессирующих HLA-DR в общем количестве клеток соответствующей популяции. Так, в CD4+ и CD8+ МАИТ-клетках экспрессия HLA-DR была минимальна, и $K_{акт}$ составил, соответственно, $0,029 \pm 0,036$ и $0,062 \pm 0,036$ в КГ, $0,092 \pm 0,065$ и $0,037 \pm 0,026$ в группе СБК, и 0 и $0,025 \pm 0,036$ в группе СПК. При этом экспрессия HLA-DR Th17-подобными и iNKT клетками была выражена значительно больше. Так, в КГ $K_{акт}$ Th17-подобных клеток оказался равен $0,985 \pm 0,019$, что значимо ($p < 0,1$) выше значения показателя в группе СПК, составляющего

$0,966 \pm 0,024$; в группе СБК $K_{акт}$ Th17-подобных клеток равен $0,966 \pm 0,024$ (Рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, наше исследование выявило несколько показателей иммунного статуса характерных для СПК и СБК. Так, обе формы поражений сопровождаются снижением абсолютного и относительного содержания активированных CD25+CD4+ Т-клеток. При этом группа СПК характеризуется достоверным повышением содержания CD69+CD4+ Т-клеток, а группа СБК – снижением содержания CD25+CD8+ Т-клеток. Примечательно, что фенотип CD25+CD8+ свойственен не только активированным Т-цитотоксическим клеткам, но также и CD8+ Т-супрессорам, обладающим многими общими чертами с конвенциональными CD4+ Т-регуляторным клеткам, такими как экспрессия фактора транскрипции *FoxP3* и отсутствие экспрессии CD127. Эти клетки обладают повышенной по сравнению с CD8+ Т-цитотоксическими клетками чувствительностью к ИЛ-2, проявляя при этом значительный иммуносупрессивный потенциал [23]. Снижение содержания CD25+CD8+ Т-супрессоров доказано при бронхиальной астме [24], вспышках рассеянного склероза [25], а также при ВЗК [26,27]. Выявленное нами пониженное содержание CD25+CD8+ Т-клеток у больных с СБК согласуется с данными означенных источников и позволяет предположить, что это снижение реализуется благодаря дефициту CD8+ Т-супрессоров, сопровождающему течение БК. Как и CD25+CD8+, фенотип CD69+CD4+ характерен для неконвенциональных Т-регуляторных клеток, несущих также CD122 и не экспрессирующих CD25 и *FoxP3*. Эти клетки реализуют свою супрессорную активность за счёт секреции ИЛ-10 и ТФР-β1 (в форме, связанной с мембраной); кроме того, они способны выделять ИЛ-2 и ИФН-γ [28]. Повышение содержания CD69+CD4+ Т-регуляторных клеток выявлено при гепатоцеллюлярной карциноме, причём их содержание оказалось ассоциировано с опухолевой прогрессией [29,30]. Кроме того, доказано, что CD69+CD4+ Т-регуляторные клетки инфильтрируют опухоль, создавая протективное цитокиновое микроокружение, способствующее опухолевой инвазии и уходу из-под иммунного контроля [31]. Эти данные позволяют выдвинуть гипотезу о роли обсуждаемых клеток и в процессе формирования свища, поскольку ТФР-β, ИФН-γ, а также ИЛ-2 и ИЛ-10 являются ключевыми цитокинами, ответственными за эпителиально-мезенхимальный переход и развитие инвазивности клеток кишечного эпителия [32, 33, 34].

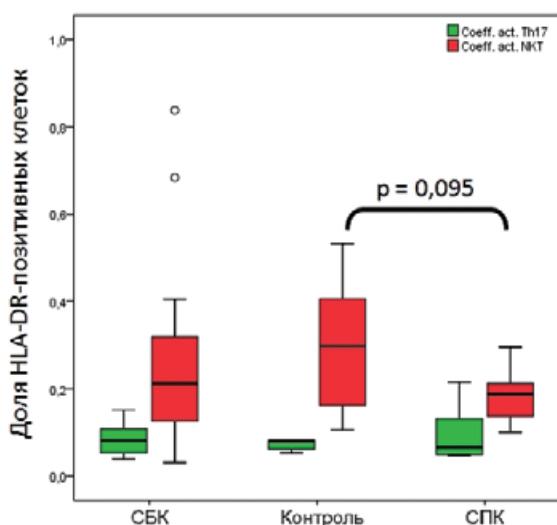


Рисунок 5. Активация Th17- и iNKT-клеток на основании экспрессии HLA-DR

Таблица 4. Содержание дифференциально-диагностически значимых популяций

Фенотип	Болезнь Крона	Идиопатические свищи прямой кишки
CD3+CD4+CD69+ (%)	не изменено	повышено
CD3+CD8+CD25+ (%)	снижено значительно	снижено незначительно
CD3+CD4+CD62L ^{low} CD45RA+ (%)	снижено	повышено
CD3+CD4+ CD62L ^{high} CD45RA+ (%)	повышено	снижено
CD3+CD4+CD161 ^{high} (%)	не изменено	снижено
CD3+CD4+CD161 ^{low} (%)	не изменено	снижено
CD3+CD8+CD161 ^{high} (абс.)	снижено незначительно	снижено значительно

Наши данные свидетельствуют также о различном соотношении эффекторных CD62L^{low}CD45RA+ и наивных CD62L^{high}CD45RA+ Т-хелперов: больные с СБК характеризуются снижением содержания первых и повышением вторых, в случае СПК соотношение эффекторных и наивных CD4+ Т-клеток зеркально. При этом показано, что эффекторные Т-клетки играют важную роль в патогенезе ВЗК, накапливаясь в собственной пластинке слизистой и осуществляя провоспалительное действие [35,36]. Таким образом, дефицит эффекторных CD4+ Т-клеток в периферической крови у пациентов со свищами, ассоциированными с БК, может быть вызван экстравазацией и накоплением этих клеток в очаге поражения. Отсутствие различий в содержании CD4+CD161^{high} МАИТ-клеток между пациентами с СБК и КГ согласуется с данными [37] о накоплении этих клеток в очаге воспаления и их малой численности в периферической крови. При этом пул CD4+ МАИТ-клеток периферической крови восполняется, вероятно, за счёт системного воздействия провоспалительных цитокинов, продуцирующихся при БК [38]. Накопление CD4+ МАИТ-клеток в поражённой области на фоне отсутствия системного воздействия при СПК обуславливает достоверное снижение относительного содержания этих клеток в периферической крови как по сравнению с КГ, так и с СБК. Кроме того, обнаруженное значимое снижение абсолютного содержания CD8+ МАИТ и Th17-подобных CD161^{low} клеток у пациентов с СПК, по сравнению с КГ и СБК, позволяет предположить, что регуляция этих клеток осуществляется аналогичным механизмом [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные позволяют выделить показатели иммунофенотипа периферической крови, позволяющие провести дифференциальную диагностику банальных свищей и свищей, ассоциированных с болезнью Крона. К этим показателям относится относительное содержание CD4+CD69+ и CD8+CD25+ Т-клеток, CD62L^{low}CD45RA+ эффек-

торных и CD62L^{high}CD45RA+ наивных Т-клеток, CD4+CD161^{high} МАИТ и CD4+CD161^{low} Th17-подобных клеток, а также абсолютное содержание CD8+CD161^{high} МАИТ-клеток (Табл. 4). Комплексная оценка данных показателей может быть перспективна для определения патогенеза перианальных поражений пациентов со свищами с целью раннего выявления манифестации БК с перианальных проявлений при неизменной слизистой оболочке кишечника.

Указано относительное изменение содержания популяций по отношению к контрольной группе здоровых индивидов.

ЛИТЕРАТУРА

- Blumetti J., Cintron J.R. Anorectal Abscess and Fistula. In: Current Surgical Therapy., Saunders, an imprint of Elsevier Inc. – 265-274.
- Головенко А.О., Халиф И.Л., Головенко О.В. Профилактика послеоперационных рецидивов болезни Крона (обзор литературы). Колопроктология. – 2012. – 4 (42). – с. 40-48.
- Конович Е.А., Халиф И.Л., Шапина М.В. Иммунопатогенез воспалительных заболеваний кишечника. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2013. – т. 23. – №4. – с. 69-78.
- Juncadella A.C., Alame A.M., Sands L.R. et al. Perianal Crohn's disease: A review. Postgraduate Medicine. – 2015; 127 (3), 266-272.
- Scharl M., Rogler G. Pathophysiology of fistula formation in Crohn's disease. World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology. – 2014; 5 (3), 205-212.
- Atienza P., Ksiao M. Particular aspects of proctology for anoperineal lesions in Crohn's disease. Journal of Visceral Surgery. – 2015; 152 (2 Suppl), S45-53.
- Nielsen O.H., Rogler G., Hahnloser D. Diagnosis and management of fistulizing Crohn's disease. Nature Clinical Practice. Gastroenterology & Hepatology. – 2009; 6 (2), 92-106.
- Халиф И.Л., Шапина М.В. Биологическая (антицитокиновая) терапия при болезни Крона: эффективность и потеря ответа. Доказательная гастроэнтерология. – 2013. – №3. – с. 17-23.

9. Chighnen J., Fleisher T.A., Shearer W.T. Adaptive Immunity. In: Middleton's Allergy: Principles and Practice, 2, 20-29, Saunders, an imprint of Elsevier Inc.
10. Golubovskaya V., Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. – 2016 Mar.; 15; 8 (3).
11. Busch D.H., Fräßle S.P., Sommermeyer D. et al. Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy. *Semin. Immunol.* – 2016; Feb; 28 (1): 28-34.
12. Fonseca-Camarillo G., Yamamoto-Furusho J.K. Immunoregulatory Pathways Involved in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* – 2015 Sep; 21 (9): 2188-93.
13. Хайдуков С.В., Байдун Л.В. Современные подходы к оценке клеточной составляющей иммунного статуса. *Медицинский алфавит*. – 2015. – т. 2. – №8. – с. 44-51.
14. Radulovic K., Niess J.H. CD69 is the crucial regulator of intestinal inflammation: a new target molecule for IBD treatment? *J. Immunol. Res.* – 2015; 2015: 497-506.
15. Highrahara K., Nakayama T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int. Immunol.* – 2016 Apr; 28 (4): 163-71.
16. Fergusson J.R., Smith K.E., Fleming V.M. et al. CD161 defines a transcriptional and functional phenotype across distinct human T cell lineages. *Cell Rep.* – 2014 Nov; 9 (3): 1075-88.
17. Cowley S.C. MAIT cells and pathogen defense. *Cell Mol Life Sci.* – 2014 Dec; 71 (24): 4831-40.
18. Ussher J.E., Bilton M., Attwod E. et al. CD161+ CD8+ T cells, including the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12+IL-18 in a TCR-independent manner. *Eur. J. Immunol.* – 2014 Jan; 44 (1): 195-203.
19. Birkholz A.M., Kronenberg M. Antigen specificity of invariant natural killer T-cells. *Biomed. J.* – 2015 Dec; 38 (6): 470-83.
20. Zajonc D.M., Girardi E. Recognition of Microbial Glycolipids by Natural Killer T Cells. *Front. Immunol.* – 2015 Aug; 6:400.
21. Kinjo Y., Kitano N., Kronenberg M. The role of invariant natural killer T cells in microbial immunity. *J. Infect. Chemother.* – 2013 Aug; 19 (4): 560-70.
22. Fergusson J.R., Hühn M.H., Swadling L. et al. CD161(int)CD8+ T cells: a novel population of highly functional, memory CD8+ T cells enriched within the gut. *Mucosal Immunol.* – 2016 Mar; 9 (2): 401-13.
23. Churlaud G., Pitoiset F., Jebbawi F. et al. Human and Mouse CD8(+)/CD25(+)/FOXP3(+) Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. *Front. Immunol.* – 2015 Apr 15; 6: 171.
24. Eusebio M., Kuna P., Kraszula L. et al. The relative values of CD8+CD25+Foxp3bright Treg cells correlate with selected lung function parameters in asthma. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* – 2015 Jun; 28 (2): 218-26.
25. Correale J., Villa A. Role of CD8+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* – 2010 May; 67 (5): 625-38.
26. Brimnes J., Allez M., Dotan I. et al. Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J. Immunol.* – 2005 May 1; 174 (9): 5814-22.
27. Yao Y., Han W., Liang J. et al. Glatiramer acetate ameliorates inflammatory bowel disease in mice through the induction of Qa-1-restricted CD8+ regulatory cells. *Eur. J. Immunol.* – 2013 Jan; 43 (1): 125-36.
28. Han Y., Guo Q., Zhang M. et al. CD69+ CD4+ CD25- T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. *J. Immunol.* – 2009 Jan 1; 182 (1): 111-20.
29. Zhu J., Feng A., Sun J. et al. Increased CD4(+) CD69(+) CD25(-) T cells in patients with hepatocellular carcinoma are associated with tumor progression. *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2011 Oct; 26 (10): 1519-26.
30. Xu D., Wang F.S. Are non-traditional CD4(+) CD69(+) CD25(-) regulatory T cells involved in disease progression of human hepatocellular carcinoma? *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2011 Oct; 26 (10): 1469-70.
31. Han Y., Yang Y., Chen Z. et al. Human hepatocellular carcinoma-infiltrating CD4+CD69+ Foxp3-regulatory T cell suppresses T cell response via membrane-bound TGF-β1. *J. Mol. Med. (Berl)*. – 2014 May; 92 (5): 539-50.
32. Yu H., Shen Y., Hong J. et al. The contribution of TGF-β in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): Down-regulation of E-cadherin via snail. *Neoplasma*. – 2015; 62 (1): 1-15.
33. Lv N., Gao Y., Guan H. et al. Inflammatory mediators, tumor necrosis factor-α and interferon-γ, induce EMT in human PTC cell lines. *Oncol. Lett.* – 2015 Oct; 10 (4): 2591-97.
34. Liu C.Y., Xu J.Y., Shigh X.Y. et al. M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. *Lab. Invest.* – 2013 Jul; 93 (7): 844-54.
35. Wendt E., Keshav S. CCR9 antagonism: potential in the treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Clin Exp. Gastroenterol.* – 2015; Apr 7; 8: 119-30.
36. Shale M., Schighering C., Powrie F. CD4(+) T-cell subsets in intestinal inflammation. *Immunol. Rev.* – 2013 Mar; 252 (1): 164-82.
37. Giudici F., Maggi L., Santi R. et al. Perianal Crohn's disease and hidradenitis suppurativa: a possible common immunological scenario. *Clin. Mol. Allergy*. – 2015 Jul 22; 13 (1): 12.
38. Siegmund B., Feakins R.M., Barmias G. et al. Results of the Fifth Scientific Workshop of the ECCO (II): Pathophysiology of Perianal Fistulizing Disease. *J Crohns Colitis*. – 2016 Apr; 10 (4): 377-86.
39. Maggi L., Capone M., Giudici F. et al. CD4+CD161+ T lymphocytes infiltrate Crohn's disease-associated perianal fistulas and are reduced by anti-TNF-α local therapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2013; 161 (1): 81-6.