BY-NC-SA

https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-231-11-81-89

Содержание Т-лимфоцитов, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, при язвенном колите

Жулай Г.А.[1], Топчиева Л.В.[1], Аторин Д.А.[1], Дуданова О.П.[2], Курбатова И.В.[1]

[1] Институт биологии – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр "Карельский научный центр Российской академии наук"» (ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, Республика Карелия, 185910, Россия)

[2] ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», (пр. Ленина, 33, г. Петрозаводск, Республика Карелия, 185910, Россия)

Для цитирования: Жулай Г.А., Топчиева Л.В., Аторин Д.А., Дуданова О.П., Курбатова И.В. Содержание Т-лимфоцитов, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, при язвенном колите. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2024;(11): 81–89 doi: 10.31146/1682-8658-ecg-231-11-81-89

✉ *Для переписки:*
Жулай Галина Анатольевна
zhgali-111@yandex.ru

Жулай Галина Анатольевна, к.б.н., научный сотрудник лаб. генетики
Топчиева Людмила Владимировна, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаб. генетики
Аторин Даниил Алексеевич, аспирант лаб. генетики
Дуданова Ольга Петровна, профессор, д.м.н., зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней и гигиены
Курбатова Ирина Валерьевна, к.б.н., старший научный сотрудник лаб. генетики

Резюме

Цель исследования – оценить содержание Т-клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, а также их связь с уровнем мРНК гена *ADORA2A*, кодирующего аденозиновый рецептор A2A, в периферической крови больных язвенным колитом (ЯК) в сравнении со здоровыми донорами.

Материал и методы. Обследована группа больных ЯК (n=18) и здоровых доноров (n=22). Содержание лимфоцитов, несущих на своей поверхности эктонуклеотидазы, в периферической крови оценивали методом проточной цитометрии. Уровень мРНК гена *ADORA2A* анализировали методом ПЦР в режиме реального времени.

Результаты. У пациентов с ЯК регистрировали более высокое содержание активированных $CD8^+CD25^+$ Т-клеток, чем у здоровых людей (5,85% (3,02–27,17) против 2,36% (1,35–3,12) при p=0,0008). Экспрессия эктонуклеотидаз на поверхности Т-клеток зависела от их принадлежности к определенной субпопуляции. Отмечено, что у больных ЯК содержание $CD8^+CD73^+$ Т-клеток было выше, чем у здоровых лиц (29,29% (19,73–49,70) против 20,00% (8,01–27,41) при p=0,031). Повышение содержания $CD8^+CD73^+$ Т-клеток при ЯК сопровождалось повышением числа активированных $CD8^+CD25^+$ Т-клеток (r_s=0,66, p=0,031). У больных ЯК уровень мРНК *ADORA2A* выше, чем у здоровых доноров ($0{,}415\times10^3$ ($0{,}006\times10^3$–$1{,}540\times10^3$) против $0{,}014\times10^3$ ($0{,}005\times10^3$–$0{,}046\times10^3$) при p=0,000025). Уровень мРНК *ADORA2A* не коррелировал с количеством $CD39^+$ и $CD73^+$ Т-клеток, также как и с содержанием самих $CD8^+$-, $CD4^+$- и Treg-клеток.

Заключение. У больных ЯК значимую роль в аденозинэргичном пути могут играть активированные цитотоксические $CD8^+CD73^+$ Т-клетки.

EDN: WVTQBX

Ключевые слова: Т-клетки, CD39, CD73, язвенный колит, ген *ADORA2A*

Информация о финансировании. Исследования проведены в рамках государственного задания (тема FMEN-2022–0009).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

BY-NC-SA

https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-231-11-81-89

Content of T lymphocytes expressing ectonucleotidases CD39 and CD73 in ulcerative colitis

G.A. Zhulai[1], L.V. Topchieva[1], D.A. Atorin[1], O.P. Dudanova[2], I.V. Kurbatova[1]

[1] Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences (11, Pushkinskaya Str., Petrozavodsk, Republic of Karelia, 185910, Russia)

[2] Petrozavodsk State University (33, Lenin Str., Petrozavodsk, Republic of Karelia, 185910, Russia)

For citation: Zhulai G.A., Topchieva L.V., Atorin D.A., Dudanova O.P., Kurbatova I.V. Content of T lymphocytes expressing ectonucleotidases CD39 and CD73 in ulcerative colitis. *Experimental and Clinical Gastroenterology.* 2024;(11): 81–89. (In Russ.) doi: 10.31146/1682-8658-ecg-231-11-81-89

✉ *Corresponding author:*
Galina A. Zhulai
zhgali-111@yandex.ru

Galina A. Zhulai, PhD (Biology), researcher in the Laboratory of Genetics; *ORCiD: 0000–0001–6266–3289*, *Scopus Author ID: 56657446700*

Ludmila V. Topchieva, PhD (Biology), Leading Researcher at the Laboratory of Genetics; *ORCiD: 0000–0001–8697–2086*, *Scopus Author ID: 15137309400*

Daniil A. Atorin, PhD student in the Laboratory of Genetics; *ORCiD: 0009–0006–2738–3728*

Olga P. Dudanova, MD, professor, Head of Department of Propaedeutics of Internal Diseases and Hygiene; *ORCiD: 0000–0003–2613–5694*, *Scopus Author ID: 6603343207*

Irina V. Kurbatova, PhD (Biology), Senior Research Associate in the Laboratory of Genetics; *ORCiD: 0000–0001–7620–7065*; *Scopus Author ID: 6603406315*

Summary

The aim of the study was to evaluate the content of T-cells expressing ectonucleotidases CD39 and CD73, as well as their association with the mRNA level of *ADORA2A* gene encoding adenosine A2A receptor in the peripheral blood of ulcerative colitis (UC) patients in comparison with healthy donors.

Material and Methods. The group of UC patients (n=18) and healthy donors (n=22) was examined. The content of lymphocytes carrying ectonucleotidases on their surface in peripheral blood was estimated by flow cytometry. The mRNA level of *ADORA2A* gene was analyzed by real-time PCR.

Results. A higher content of activated $CD8^+CD25^+$ T-cells was registered in UC patients than in healthy subjects (5.85% (3.02–27.17) vs. 2.36% (1.35–3.12) at p=0.0008). Expression of ectonucleotidases on the surface of T-cells depended on their belonging to a certain subpopulation. It was noted that in UC patients the content of $CD8^+CD73^+$ T-cells was higher than in healthy individuals (29.29% (19.73–49.70) vs. 20.00% (8.01–27.41) at p=0.031). The increase in $CD8^+CD73^+$ T-cells in UC was accompanied by an increase in the number of activated $CD8^+CD25^+$ T-cells (r_s=0.66, p=0.031). The level of *ADORA2A* mRNA was higher in UC patients than in healthy donors (0.415×10^3 (0.006×10^3–1.540×10^3) vs. 0.014×10^3 (0.005×10^3–0.046×10^3) at p=0.000025). *ADORA2A* mRNA levels did not correlate with the number of $CD39^+$ and $CD73^+$ T cells, nor did they correlate with the content of $CD8^+$, $CD4^+$ and Treg cells themselves.

Conclusion. In UC patients, activated cytotoxic $CD8^+CD73^+$ T cells may play a significant role in the adenosineergic pathway.

Keywords: T cells, CD39, CD73, ulcerative colitis, *ADORA2A* gene

Financial support. The studies were carried on the subject of research (FMEN-2022–0009).

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Введение

Язвенный колит (ЯК) – хроническое рецидивирующее воспалительное заболевание толстой кишки неизвестной этиологии, характеризующееся нарушением регуляции иммунного ответа на антигены кишечной микрофлоры. В основе заболевания лежат изменения врожденного иммунного ответа, аутофагия, нарушение механизмов распознавания микроорганизмов, нарушение эпителиального барьера и, как результат, искажение адаптивного иммунитета, приводящее к чрезмерной активации различных субпопуляций Т-лимфоцитов в слизистой оболочке кишечника и периферической крови больных ЯК [1].

В связи с этим, в последнее время большое внимание при изучении патогенеза язвенного колита уделяется иммуномодулирующим факторам, к которым относится внеклеточный аденозин. Аденозин влияет на многие физиологические функции, и, в частности, он является важнейшим регулятором врожденного и адаптивного иммунного ответа, который защищает ткани от воспалительного повреждения и аутоиммунитета [2]. Классически аденозин образуется из внеклеточного АТФ, высвобождающегося во время повреждения, гипоксии или ишемии ткани. АТФ быстро гидролизуется до аденозиндифосфата, аденозинмонофосфата (АМФ) и аденозина с помощью эктоферментного каскада с участием эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролазы-1 (ENTPD1, CD39) и экто-5'-нуклеотидазы (NT5E, CD73). Эктонуклеотидазы CD39 и CD73 экспрессируются на многих клетках, в том числе и на иммунных: Т-клетках, В-клетках, моноцитах/макрофагах, естественных киллерах (NK) и дендритных клетках. Свой противоспалительный эффект аденозин реализует посредством активации аденозиновых рецепторов [3]. Действие аденозина зависит от субпопуляции Т-клеток. Так, связывание аденозинового рецептора А2А на регуляторных Т-клетках (Treg) стимулирует их активацию и супрессорные функции [4], а у эффекторных иммунных клеток ограничивает пролиферацию, секрецию IL-4/IFN-γ и провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-17). Аденозин может подавлять адгезию нейтрофилов в местах воспаления [5].

Непосредственно в условиях хронического кишечного воспаления активация A2AR подавляла выработку IL-12, TNFα и IFN-γ [6]. Появляются данные о том, что содержание аденозина у пациентов с ЯК значительно снижается, а продукция провоспалительных факторов при колите эффективно уменьшается после применения агонистов аденозиновых рецепторов А2А [7]. В плазме крови больных ЯК отмечается повышенный уровень фермента аденозиндезаминазы, который переводит внеклеточный аденозин в инозин, тем самым ограничивая его действие [8].

За прошедшие годы было получено несколько доказательств ключевой роли аденозина в поддержании кишечного гомеостаза и в управлении взаимодействия между кишечными эпителиальными клетками и иммунными клетками кишечника [2]. Как уже отмечено, аденозин и его рецепторы участвуют в формировании противовоспалительных иммунных реакций [9, 10], в частности, модулируют супрессорные и эффекторные свойства Т-лимфоцитов. Однако доклинические исследования эффективности препаратов, воздействующих на аденозиновую систему, в лечении хронических воспалительных заболеваний кишечника осложняются недостатком сведений о функциональных свойствах клеточных популяций, неоднородностью используемых моделей *in vivo* и *in vitro*, что в некоторых случаях может привести к противоречивым результатам.

В связи с этим целью исследования было оценить содержание Т-клеток, экспрессирующих CD39 и CD73, а также их связь с уровнем мРНК гена *ADORA2A,* кодирующего A2AR, в периферической крови больных ЯК в сравнении со здоровыми донорами.

Материалы и методы

В исследование включены 18 пациентов с ЯК и соответствующие им по возрасту и полу 22 условно здоровых человека (*табл. 1*). Исследование проведено согласно требованиям Хельсинской декларации 2013 г. и одобрено Комитетом по медицинской этике при Министерстве здравоохранения и социального развития Республики Карелия и Петрозаводском государственном университете (протокол № 25 от 12.02.2013 г.). Все обследованные лица подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование выполнено с использованием приборной базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ФИЦ КарНЦ РАН.

Больные ЯК находились в фазе обострения (левостороннее поражение, легкая и среднетяжелая атаки). Диагноз ЯК устанавливали общепринятыми методами диагностики с учетом комплекса клинических данных и результатов лабораторных, эндоскопических и гистологических исследований. Активность иммуновоспалительного процесса в слизистой толстой кишки оценивалась по данным клинической картины по традиционной шкале Truelove and Witts с учетом частоты стула, примеси крови, температуры и частоты пульса, уровня гемоглобина и скорости оседания эритроцитов. Учитывались эндоскопические признаки согласно индексу Шредера – наличие эритемы, контактной кровоточивости, эрозий, язв, спонтанной кровоточивости. При гистологическом исследовании оценивалась степень воспалительной инфильтрации собственной пластинки, наличие нейтрофилов, эозинофилов, крипт-абсцессов, повреждение крипт, уменьшение числа бокаловидных клеток, наличие эрозий и язв. Критериями исключения являлись: тяжелые атаки и осложненные формы ЯК, требующие назначения кортикостероидов и/или иммуносупрессоров и/или препаратов биологической терапии. Были исключены пациенты с хроническими диффузными заболеваниями печени различной этиологии, пациенты с тяжелыми сопутствующими заболеваниями системного характера, в том числе пациенты с сердечно-сосудистой, дыхательной, печеночной и почечной недостаточностью, пациенты с эндокринной патологией, а также женщины в период беременности и лактации. Больные ЯК получали только базисную терапию – салофальк, сульфасалазин, в дозировке 3–4 гр. препарата в сутки в зависимости от степени активности ЯК, возраста и клинических показателей.

Таблица 1. Характеристика обследованных доноров

Характеристика	Контроль	ЯК
Обследовано человек	22	18
Мужчины	10 (45,5%)	10 (55,5%)
Женщины	12 (54,5%)	8 (44,5%)
Возраст, Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)	39 (35–47)	38 (33–44)
Терапия производными 5-АСК (Салофальк, Сульфасалазин)	–	18 (100%)
Активность:		
Высокая	–	2 (17%)
Умеренная	–	4 (22%)
Слабая	–	12 (61%)
Форма ЯК:		
Левосторонний	–	14 (78%)
Тотальный	–	4 (22%)

Выделение РНК и анализ экспрессии генов

Материалом для исследования служила венозная кровь, собранная из локтевой вены натощак в пробирки с антикоагулянтом К3ЭДТА. Тотальную РНК (тотРНК) из лейкоцитов периферической крови выделяли с помощью набора ExtractRNA (Евроген, Россия). Фракцию лейкоцитов периферической крови получали после лизиса клеток крови раствором, содержащим хлорид аммония. ТотРНК обрабатывали ДНКазой (1 е.а.). кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипции с обратной транскриптазой Magnus (Евроген, Россия). Качество тотРНК оценивали после электрофореза в 1% агарозном геле. Количество тотРНК определяли на спектрофотометре SmartSpecPlus (Bio-Rad, США).

Уровень мРНК гена *ADORA2A* изучали методом ПЦР в режиме реального времени на приборе LightCycler (Roshe, Германия), используя набор PCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Каждую ПЦР повторяли не менее 2-х раз. Смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала 1 нг кДНК, по 50 пкМ прямого и обратного праймеров, 4 мкл реакционной смеси и 13,4 мкл деонизованной воды, свободной от нуклеаз. Протокол ПЦР: денатурация кДНК 5 мин при 95 °С; 45 циклов: денатурация при 95 °С 30 с; отжиг при 64 °С 30 с; элонгация при 72 °С 30 с. Ген *18S rRNA* использовали в качестве референсного гена. Последовательность праймеров: ген *ADORA2A* прямой: CTTGGGTTCTGAGGAAGCAG, обратный: CAGCAGCTCCTGAACCCTAG; ген *18S rRNA* прямой*:* AGAAACGGCTACCACATCCA, обратный: CACCAGACTTGCCCTCCA. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов. Эффективность ПЦР оценивали по стандартной кривой. Относительный уровень транскриптов оценивали по ΔCt.

Проточная цитометрия

Образцы цельной крови обследуемых лиц были окрашены антителами и затем инкубированы 20 минут при комнатной температуре в темноте, в соответствии с протоколом производителя. Эритроциты были лизированы реагентом BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США). В работе использованы следующие моноклональные антитела: CD3-PC5 (клон UCHT1), CD4-FITC (клон OKT4), CD4-PC7 (клон OKT4), CD8-PC7 (клон RPA-T8), CD25-PC5 (клон BC96), CD127-PC7 (клон EBIORDR5), CD73-PE (клон AD2), CD39-PE (клон EBIOA1), CD39-FITC (клон EBIOA1), а также соответствующие изотипические контроли (eBioscience, США). Были проанализированы клетки с фенотипом $CD3^+CD8^+$ цитотоксические Т-клетки, $CD4^+CD25^{-/int}$ Т-хелперные клетки и $CD4^+CD25^{hi}$/$CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ Treg-клетки. Применение маркера CD25 в данном анализе обусловлено тем, что $CD4^+$ клетки ($CD4^+CD25^{hi}$) включают в себя Treg-клетки, характеризующиеся повышенной экспрессией CD39. Все события получены на цитометре Cytomics FC500 («Beckman Coulter», США). В каждом образце анализировали не менее 30000 событий в лимфоцитарном гейте, основанном на прямом и боковом светорассеянии.

Статистический анализ

Статистическая обработка материала и расчеты показателей проведены с использованием программы GraphPad Prism v.7. Значимость различий между показателями вычисляли по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Степень взаимосвязи параметров оценивали с помощью корреляционного анализа по Спирмену. Различия считались значимыми при $p<0,05$. Данные представлены в виде: медиана (нижние и верхние квартили) – Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$).

Результаты исследования

В первую очередь у больных ЯК и здоровых людей оценивали относительное содержание цитотоксических $CD8^+$ Т-клеток, $CD4^+$ Т-хелперов и $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ Treg-клеток. Кроме того, по присутствию на поверхности маркера ранней активации CD25, анализировали активированные $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клетки. Отмечено, что число этих клеток в группах исследования не различалось (*рис. 1*). Группа пациентов с ЯК характеризовалась более высоким содержанием активированных $CD8^+CD25^+$ Т-клеток.

Рисунок 1. Относительное содержание Т-клеток в периферической крови больных язвенным колитом и здоровых доноров

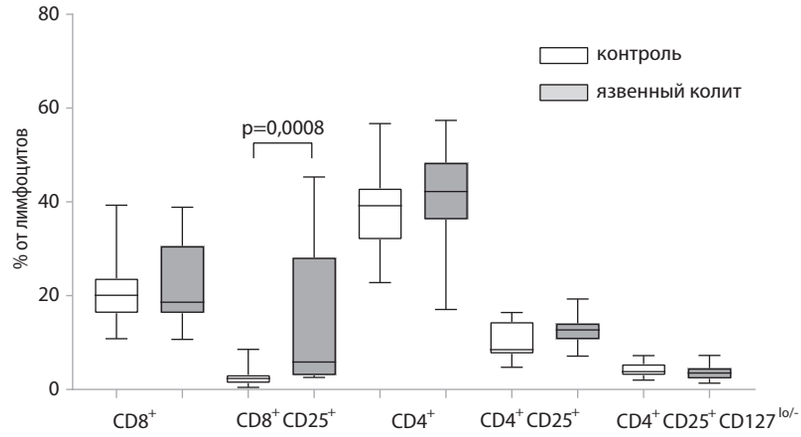

Рисунок 2. Экспрессия эктонуклеотидаз CD39 и CD73 на лимфоцитах здорового донора.

Примечание: А) содержание $CD39^+$, $CD73^+$ и $CD39^+CD73^+$ клеток среди $CD8^+$, $CD4^+CD25^{-/int}$ и $CD4^+CD25^{hi}$ Т-клеток. Б) содержание $CD39^+$, $CD73^+$ и $CD39^+CD73^+$ клеток среди общего пула лимфоцитов и отдельно среди $CD3^+$ Т-клеток.

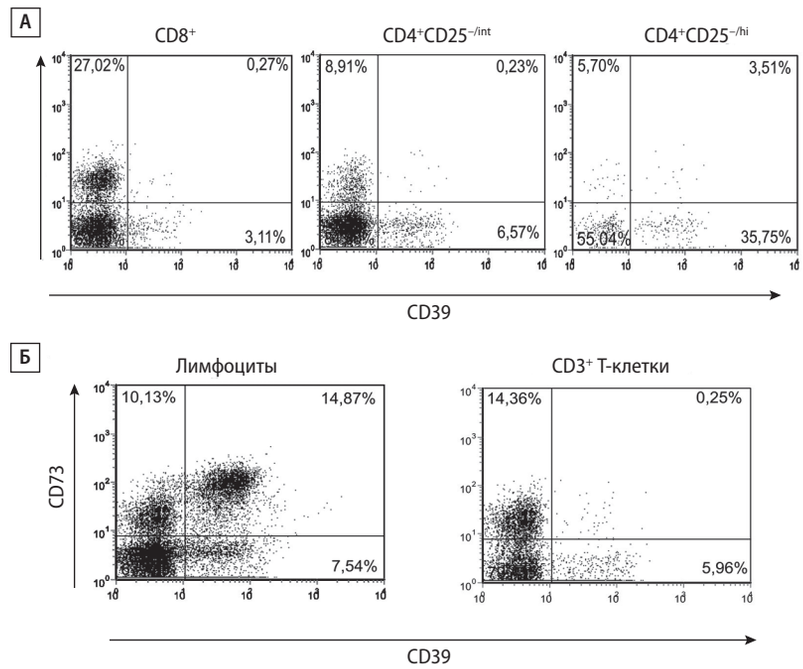

Таблица 2. Относительное содержание Т-клеток, экспрессирующих CD39 и CD73, в периферической крови больных ЯК и здоровых доноров

Примечание: * достоверные отличия (p<0,05) от контрольной группы

	Контроль			Больные ЯК		
	$CD8^+$ Т-клетки,% от $CD8^+$	**$CD4^+CD25^{-/int}$ Т-клетки,% от $CD4^+$**	**$CD4^+CD25^{hi}$ Treg-клетки,% от $CD4^+$**	**$CD8^+$ Т-клетки,% от $CD8^+$**	**$CD4^+CD25^{-/int}$ Т-клетки,% от $CD4^+$**	**$CD4^+CD25^{hi}$ Treg-клетки,% от $CD4^+$**
$CD39^+$	2,20 (0,58–3,66)	4,91 (2,23–6,85)	47,17 (23,93–55,91)	2,38 (1,28–3,82)	4,30 (1,58–6,35)	38,74 (13,67–54,96)
$CD73^+$	20,00 (8,01–27,41)	6,75 (4,02–8,84)	4,0 (3,35–5,78)	29,29 (19,73–49,70)*	8,16 (4,08–13,59)	6,37 (3,78–11,23)
$CD39^+CD73^+$	0,25 (0,05–0,56)	0,13 (0,08–0,25)	1,98 (0,89–3,97)	0,37 (0,20–0,78)	0,16 (0,07–0,5)	1,24 (0,39–3,45)

Уровень внеклеточного аденозина может зависеть от количества клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы. Чтобы оценить роль иммунных клеток в активации аденозинергического пути, у больных ЯК было рассмотрено количество $CD3^+$ Т-клеток, несущих на своей поверхности эктонуклеотидазы CD39 и CD73, а именно $CD8^+$ цитотоксических Т-клеток, $CD4^+$ Т-хелперных клеток и Treg-клеток. Кроме того, были рассмотрены клетки, ко-экспрессирующие CD39 и CD73. Такие клетки имеют преимущество в генерации внеклеточного аденозина.

Экспрессия эктонуклеотидаз на поверхности Т-клеток зависела от их принадлежности к определенной субпопуляции (*рис. 2А, табл. 2*). Так, у здоровых лиц и у больных ЯК для $CD8^+$ Т-клеток более характерно наличие CD73, чем CD39 (p<0,0001 и p<0,0001, соответственно), а Treg-клетки отличаются повышенным уровнем $CD39^+$-клеток в своей популяции (p<0,0001 и p<0,0001, соответственно). Отмечено, что клетки, ко-экспрессирующие обе эктонуклеотидазы, представляют собой небольшую часть Т-клеток. В основном $CD39^+CD73^+$-клеток

Рисунок 3. Относительное содержание $CD39^+$ и $CD73^+$ клеток в лимфоцитарном гейте и гейте $CD3^+$ Т-клеток в периферической крови больных язвенным колитом и здоровых доноров

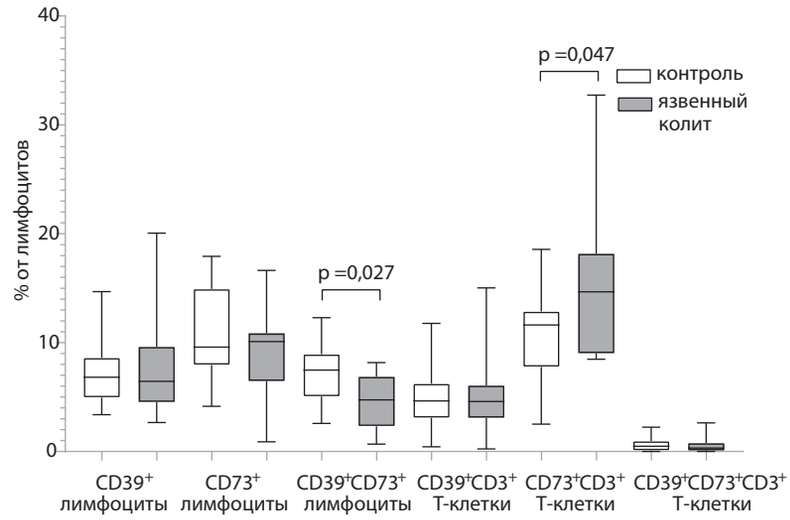

Таблица 3. Коэффициенты корреляции Спирмена (r_s) между уровнем мРНК *ADORA2A* и относительным содержанием Т-клеток, экспрессирующих CD39 и CD73, у больных ЯК

Т-клетки	r_s	p	Т-клетки	r_s	p
$CD8^+CD39^+$ /$CD8^+$	–0,524	0,196	$CD4^+CD25^{-/int}$ $CD39^+$ /$CD4^+$	0,112	0,704
$CD8^+CD73^+$/$CD8^+$	0,214	0,619	$CD4^+CD25^{-/int}$ $CD73^+$/$CD4^+$	–0,545	0,087
$CD8^+CD39^+CD73^+$/$CD8^+$	–0,720	0,077	$CD4^+CD25^{-/int}CD39^+CD73^+$ /$CD4^+$	–0,035	0,963
$CD39^+$ Treg/$CD4^+$	–0,213	0,463	$CD39^+$ $CD73^+$ Treg/$CD4^+$	–0,142	0,782
$CD73^+$ Treg/$CD4^+$	–0,500	0,177	Treg/$CD4^+$	–0,002	>0,99
$CD8^+$/лимфоциты	0,454	0,140	$CD4^+$/лимфоциты	–0,236	0,437

было больше среди популяции $CD4^+CD25^{hi}$ Treg-клеток (*табл. 2*), кроме $CD8^+$, полученных от больных ЯК (здоровые: Treg-клетки против $CD4^+CD25^{-/int}$: $p < 0,0001$, Treg-клетки против $CD8^+$: $p < 0,0001$; больные ЯК: Treg-клетки против $CD4^+CD25^{-/int}$: $p = 0,0101$, Treg-клетки против $CD8^+$: $p = 0,085$).

В целом по содержанию $CD39^+$ и $CD73^+$ Т-клеток больные ЯК не отличались от людей из контрольной группы. Отмечено, что у больных ЯК содержание $CD8^+CD73^+$ Т-клеток было выше, чем у здоровых лиц (p=0,031). Повышение содержания $CD8^+CD73^+$ Т-клеток при ЯК сопровождалось повышением числа активированных $CD8^+CD25^+$ Т-клеток ($r_s = 0,66$, $p = 0,031$).

У больных ЯК и здоровых доноров оценивали уровень мРНК гена *ADORA2A*, кодирующего аденозиновый рецептор А2А. Показано, что у больных ЯК относительное содержание мРНК *ADORA2A* в лейкоцитах периферической крови выше, чем у здоровых доноров (ЯК: $0,415\times10^3$ ($0,006\times10^3$–$1,540\times10^3$), контроль: $0,014\times10^3$ ($0,005\times10^3$–$0,046\times10^3$), p=0,000025).

Следующим шагом была оценка у больных ЯК корреляционной связи между уровнем мРНК *ADORA2A* в лейкоцитах крови и содержанием Т-клеток, несущих на своей поверхности CD39 и CD73 (*табл. 3*). Как оказалось, уровень мРНК *ADORA2A* не коррелировал с количеством $CD39^+$ и $CD73^+$ Т-клеток, также как и с содержанием самих $CD8^+$, $CD4^+$ и Treg-клеток.

Выделение мРНК для анализа экспрессии гена *ADORA2A* осуществляли из лейкоцитов периферической крови, которые включают в себя помимо Т-клеток другие клеточные популяции, участвующие в реализации CD39/CD73/A2AR сигнального пути. В связи с этим мы оценили содержание $CD39^+$ и $CD73^+$ клеток в целом среди лимфоцитов, которые помимо Т-клеток включают В-клетки и NK-клетки, и отдельно среди $CD3^+$ Т-клеток (*рис. 2Б*). У больных ЯК и здоровых доноров отмечены схожие различия в содержании $CD39^+$ и $CD73^+$ клеток среди лимфоцитов и отдельно среди $CD3^+$ Т-клеток. Так, в целом для популяции $CD3^+$ Т-клеток более характерно повышенное число $CD73^+$ клеток в отличие от общего пула лимфоцитов (контроль: p=0,016, ЯК: p=0,042) (*рис. 3*). Тогда как среди общего пула лимфоцитов преобладало число $CD39^+$-клеток (контроль: p=0,001, ЯК: p=0,035) и клеток ко-экспрессирующих CD39 и CD73 (контроль: p=0,0002, ЯК: p=0,004). У больных ЯК относительное содержание $CD73^+CD3^+$ Т-клеток в крови было выше, чем у здоровых доноров, что, скорее всего, связано с повышением числа $CD8^+CD73^+$ Т-клеток. Кроме того, больные ЯК и здоровые доноры отличались между собой относительным содержанием $CD39^+CD73^+$-клеток среди общего пула лимфоцитов, которых у больных ЯК было меньше. Из этого следует, что у больных ЯК изменения в относительном содержании клеток, экспрессирующих на своей поверхности эктонуклеотидазы, касаются не только $CD3^+$ Т-клеток, но и других популяций лимфоцитов.

Уровень мРНК *ADORA2A* и содержание $CD39^+$- и $CD73^+$-клеток среди общего пула лимфоцитов и отдельно среди $CD3^+$ Т-клеток у больных ЯК не коррелировали между собой (*табл. 4*).

Таблица 4. Коэффициенты корреляции Спирмена (r_s) между уровнем мРНК *ADORA2A* и относительным содержанием $CD39^+$ и $CD73^+$ клеток в общем пуле лимфоцитов и отдельно среди $CD3^+$ у больных ЯК

	r_s	p		r_s	p
$CD39^+$ лимфоциты	0,340	0,233	$CD39^+CD3^+$	–0,189	0,558
$CD73^+$ лимфоциты	0,333	0,385	$CD73^+$ $CD3^+$	0,0667	0,880
$CD39^+CD73^+$ лимфоциты	–0,464	0,302	$CD39^+CD73^+$ $CD3^+$	–0,464	0,302

Обсуждение

Внеклеточный аденозин оказывает иммуносупрессорное действие, что может способствовать ограничению воспаления при воспалительных заболеваниях кишечника. Непосредственно противовоспалительное действие на иммунные клетки аденозин оказывает, связываясь с рецептором A2A. A2AR соединен с Gs белком и активирует аденилатциклазу, катализирующую образование циклического АМФ [2]. В настоящей работе показано, что уровень мРНК гена *ADORA2A* в лейкоцитах периферической крови обследованных нами больных ЯК выше, чем у здоровых доноров (p=0,000025). Данные литературы относительно уровня экспрессии этого гена и содержания рецептора на поверхности иммунных клеток при иммунновоспалительных заболеваниях противоречивы. Одни авторы не отмечают изменений в экспрессии гена *ADORA2A* в клетках крови больных ЯК [11], другие наблюдают повышенную экспрессию этого гена при таких аутоиммунных заболеваниях как болезнь Крона, системная красная волчанка, анкилозирующий спондилоартрит, ревматоидный артрит [12]. Увеличение уровня мРНК гена *ADORA2A* часто сопровождалось подавлением секреции цитокинов IFN-α, TNF, IL-2, IL-6, IL-1β и ингибированием NF-κB сигнального пути, опосредующего воспаление в разных типах клеток [12].

Внеклеточный АТФ быстро переходит в аденозин под действием ферментов CD39 и CD73. У животных с делецией генов, кодирующих эти ферменты, наблюдается повышенная восприимчивость к воспалительным состояниям или более тяжелое прогрессирование воспаления в экспериментальных моделях ВЗК [13, 14, 15]. У людей наличие в генотипе полиморфных вариантов гена *CD39*, ассоциированых с более низким уровнем его экспрессии, наблюдается повышенная восприимчивость к ВЗК [14]. Напротив, блокада нуклеозидных транспортеров, осуществляющих транспорт аденозина внутрь клетки, вызывает повышение внеклеточного уровня аденозина с последующим улучшением течения воспаления в моделях ВЗК [12].

В настоящее время показано, что CD39 и CD73 находятся на поверхности различных иммунных клеток и играют важную роль в их функционировании при развитии ВЗК. Так, известно, что наличие CD39 на Treg-клетках связано с их иммуносупрессорным действием [17]. У больных ВЗК в исследовании Gibson с соавт. количество $CD39^+$ Treg-клеток в крови было ниже при активном воспалительном процессе, чем у здоровых людей, и значительно увеличивалось после лечения пациентов препаратами анти-ФНО (фактор некроза опухоли) [18]. Схожие данные относительно $CD39^+$ Treg были получены для детей с болезнью Крона [19]. Для другой популяции иммуносупрессорных клеток, supTh17, также отмечены изменения в экспрессии CD39. Участие supTh17 в генерации внеклеточного АМФ, аденозина и других пуриновых производных показано *in vitro* [20]. Пациенты с ВЗК имели низкий уровень $CD39^+$ supTh17 как в периферической крови, так и в собственной пластинке кишечника по сравнению со здоровыми лицами [21]. У больных ВЗК показано увеличение других $CD39^+$ клеток, не являющихся иммуносупрессорами. Так, в собственной пластинке кишечника пациентов с ВЗК количество $CD39^+$ клеток в популяции $FOXP3^-$ Т-лимфоцитов оказалось выше, чем у здоровых людей [20]. В нашем исследовании достоверных различий в содержании CD39-положительных $CD8^+$-, $CD4^+$- и Treg-клеток у больных ЯК и здоровых доноров не выявлено.

Libera и соавторы [22] проанализировали у больных ВЗК паттерны экспрессии CD39 и CD73 вместе с маркерами активации (HLA-DR, CD38), дифференцировки (CCR7, CD45RA) и тканевой резидентности (CD69, CD103, CD49a) на $CD4^+$, $CD8^+$, $\gamma\delta^+$ Т-клетках и инвариантных Т-клетках слизистой оболочки. Оказалось, что при ВЗК количество $CD39^+$ $\gamma\delta^+$ Т-клеток и $CD8^+$-Т-клеток в собственной пластинке кишечника было намного выше, чем в крови. Содержание $CD39^+CD4^+$ и $CD39^+CD8^+$ положительно коррелировало с активацией Т-клеток. Связь с активацией (содержание $CD8^+CD25^+$) наблюдалась нами для $CD73^+CD8^+$ Т-клеток (r = 0,66, p = 0,031) у больных ЯК. Кроме того, Libera и соавторы показали, что у пациентов с ВЗК число $CD39^+\gamma\delta^+$ Т-клеток, поддерживающих иммунологическую толерантность в слизистых оболочках, снижено по сравнению со здоровыми людьми.

Экспрессия эктонуклеотидазы CD73 имеет ключевое значение для генерации внеклеточного аденозина как по классическому пути через CD39, так и по альтернативному пути (через CD38/CD157/CD203a/CD73) [23]. В то же время, блокада CD73 ингибирует экспрессию провоспалительных цитокинов и при этом способствует выработке противовоспалительных цитокинов в макрофагах [24]. Блокада CD73 заметно облегчает колит, вызванный декстраном сульфата натрия (DSS) у мышей, что характеризуется снижением потери веса, снижением частоты диареи и уменьшением количества кровавого стула [24]. В работе Doherty с соавт. [25] показано, что в периферической крови и собственной пластинке кишечника пациентов с активным ЯК количество $CD73^+CD4^+$ Т-клеток было значительно выше, чем у здоровых людей и возвращалось к исходному уровню после терапии анти-ФНО. В этом же исследовании отмечено,

что периферические $CD73^+CD4^+$ Т-клетки преимущественно экспрессируют CD45RO и обогащены клетками $IL\text{-}17A^+$. Однако нами не найдено различий в количестве $CD73^+CD4^+$ Т-клеток у больных ЯК и здоровых лиц. При этом, показано, что в крови пациентов с ЯК повышен уровень $CD73^+CD8^+$ Т-клеток по сравнению с контролем ($p=0,031$). Возможно, это связано с усилением активации цитотоксических $CD8^+$ Т-клеток, что является неблагоприятным фактором. Следствием активации аутореактивных клонов $CD8^+$ Т-клеток может быть повреждение (лизис) собственных тканей. Роль эктонуклеотидазы CD73 при ЯК в функционировании иммунных клеток еще предстоит выяснить. Кроме того, ограничением в данном исследовании может служить небольшая выборка группы больных ЯК.

У больных ЯК среди лимфоцитов наблюдаются изменения в экспрессии эктонуклеотидаз CD39 и CD73 не только на $CD3^+$ Т-клетках, но и на $CD3^-$ лимфоцитах (В-клетки, NK-клетки). Больные ЯК отличались сниженным содержанием клеток, коэкспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, в лимфоцитарном гейте ($p=0,027$), но не среди $CD3^+$ Т-клеток. Этот вопрос требует отдельного исследования.

Заключение

В результате исследования показано, что уровень мРНК гена *ADORA2A* в лейкоцитах периферической крови больных ЯК выше, чем у здоровых доноров ($p=0,000025$). Данные, полученные в нашем исследовании, согласуются с данными литературы. Активация Т-клеток при аутоиммунных и иммуновоспалительных заболеваниях сопровождается усилением экспрессия гена *ADORA2A* и повышением содержания на поверхности иммунных клеток рецептора A2AR [26]. Это может быть связано с тканевым повреждением и высвобождением АТФ как источника аденозина. Как известно, иммуномодулирующая роль A2AR при воспалении зависит от его воздействия на Т-клетки, уровень экспрессии которого специфичен для субпопуляций. В связи с этим, в представленной нами работе было проведено исследование связи уровня экспрессии гена *ADORA2A* с количеством Т-клеток, которые имеют на своей поверхности эктонуклеотидазы CD39 и CD73. Как правило, экспрессия рецептора A2AR выше в $CD4^+$-, чем в $CD8^+$ Т-клетках; однако при активации Т-клеток уровни рецепторов в основном повышаются в $CD8^+$ Т-клетках [27]. В настоящей работе показано, что уровень мРНК гена *ADORA2A* не коррелирует с содержанием в крови больных ЯК CD39- и/или CD73-экспрессирующих $CD8^+$-, $CD4^+$- и Treg-клеток, а также с содержанием самих $CD8^+$-, $CD4^+$- и Treg-клеток. Вероятно, вклад в генерацию аденозина и усиление экспрессии гена *ADORA2A* у больных ЯК стоит рассматривать в совокупности с другими популяциями лейкоцитов, экспрессирующими эктонуклеотидазы. Выявленная у больных ЯК связь активированных цитотоксических $CD8^+$ Т-клеток с содержанием $CD8^+CD73^+$ Т-клеток дополняет уже имеющиеся представления о патогенезе ЯК и может быть использована в терапевтических или диагностических целях.

Литература | References

1. Shelygin Yu.A., Ivashkin V.T., Belousova E.A. et al. Ulcerative colitis (K51), adults. *Koloproktologiâ*. 2023;22(1):10–44. (In Russ) doi: 10.33878/2073–7556–2023–22–1–10–44.
2. Antonioli L., Fornai M., Pellegrini C., Bertani L., Nemeth Z.H., Blandizzi C. Inflammatory Bowel Diseases: It's Time for the Adenosine System. *Front Immunol*. 2020;11:1310. doi: 10.3389/fimmu.2020.01310.
3. Pasquini S., Contri C., Borea P.A., Vincenzi F., Varani K. Adenosine and Inflammation: Here, There and Everywhere. *IJMS*. 2021;22(14):7685. doi: 10.3390/ijms22147685.
4. Ohta A., Sitkovsky M. Extracellular Adenosine-Mediated Modulation of Regulatory T Cells. *Front Immunol*. 2014;5. doi: 10.3389/fimmu.2014.00304.
5. Zhu Y., Zhuang Z., Wu Q. et al. CD39/CD73/A2a Adenosine Metabolic Pathway: Targets for Moxibustion in Treating DSS-Induced Ulcerative Colitis. *Am J Chin Med*. 2021;49(03):661–676. doi: 10.1142/S0192415X21500300.
6. Kim S.E., Ko I.G., Jin J.J. et al. Polydeoxyribonucleotide Exerts Therapeutic Effect by Increasing VEGF and Inhibiting Inflammatory Cytokines in Ischemic Colitis Rats. *BioMed Research International*. 2020;2020:1–11. doi: 10.1155/2020/2169083.
7. Bahreyni A., Samani S.S., Khazaei M., Ryzhikov M., Avan A., Hassanian S.M. Therapeutic potentials of adenosine receptors agonists and antagonists in colitis; Current status and perspectives. *Journal Cellular Physiology*. 2018;233(4):2733–2740. doi: 10.1002/jcp.26073.
8. Beyazit Y., Koklu S., Tas A. et al. Serum adenosine deaminase activity as a predictor of disease severity in ulcerative colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2012;6(1):102–107. doi: 10.1016/j.crohns.2011.07.010.
9. Dal Ben D., Antonioli L., Lambertucci C., Fornai M., Blandizzi C., Volpini R. Purinergic Ligands as Potential Therapeutic Tools for the Treatment of Inflammation-Related Intestinal Diseases. *Front Pharmacol*. 2018;9:212. doi: 10.3389/fphar.2018.00212.
10. Ercan G., Yigitturk G., Erbas O. Therapeutic effect of adenosine on experimentally induced acute ulcerative colitis model in rats. *Acta Cir Bras*. 2019;34(12): e201901204. doi: 10.1590/s0102–865020190120000004.
11. Rybaczyk L., Rozmiarek A., Circle K. et al. New bioinformatics approach to analyze gene expressions and signaling pathways reveals unique purine gene dysregulation profiles that distinguish between CD and UC: *Inflammatory Bowel Diseases*. 2009;15(7):971–984. doi: 10.1002/ibd.20893.
12. Ye J.H., Rajendran V.M. Adenosine: An immune modulator of inflammatory bowel diseases. *WJG*. 2009;15(36):4491. doi: 10.3748/wjg.15.4491.

13. Künzli B.M., Berberat P.O., Dwyer K. et al. Variable impact of CD39 in experimental murine colitis. *Dig Dis Sci*. 2011; 56: 1393–1403. doi: 10.1007/s10620–010–1425–9.

14. Friedman D.J., Künzli B.M., A-Rahim Y.I., Sevigny J., Berberat P.O., Enjyoji K. et al. CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(39):16788–16793. doi: 10.1073/pnas.0902869106.

15. Longhi M.S., Moss A., Jiang Z.G., Robson S.C. Purinergic signaling during intestinal inflammation. *J Mol Med*. 2017;95(9):915–925. doi: 10.1007/s00109–017–1545–1.

16. Ye H., Zhao J., Xu X., Zhang D., Shen H., Wang S. Role of adenosine A2a receptor in cancers and autoimmune diseases. *Immunity Inflam & Disease*. 2023;11(4): e826. doi: 10.1002/iid3.826.

17. Borsellino G., Kleinewietfeld M., Di Mitri D. et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007;110(4):1225–1232. doi: 10.1182/blood-2006–12–064527.

18. Gibson D.J., Elliott L., McDermott E. et al. Heightened Expression of CD39 by Regulatory T Lymphocytes Is Associated with Therapeutic Remission in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2015;21(12):2806–2814. doi: 10.1097/MIB.0000000000000566.

19. Radygina T.V., Petrichuk S.V., Kuptsova D.G. et al. Content of CD4+ cells expressing CD39/CD73 ectonucleotidases in children with inflammatory bowel diseases. *Bulletin of RSMU*. 2022; (4): 17–23. doi: 10.24075/brsmu.2022.039.

20. Lord J.D., Shows D.M., Chen J., Thirlby R.C. Human Blood and Mucosal Regulatory T Cells Express Activation Markers and Inhibitory Receptors in Inflammatory Bowel Disease. Unutmaz D, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(8): e0136485. doi: 10.1371/journal.pone.0136485.

21. Longhi M.S., Moss A., Bai A. et al. Characterization of Human CD39+ Th17 Cells with Suppressor Activity and Modulation in Inflammatory Bowel Disease. Hogan SP, ed. *PLoS ONE*. 2014;9(2): e87956. doi: 10.1371/journal.pone.0087956.

22. Libera J., Wittner M., Kantowski M. et al. Decreased Frequency of Intestinal $CD39^{+}\gamma\delta^{+}$ T Cells With Tissue-Resident Memory Phenotype in Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol*. 2020;11:567472. doi: 10.3389/fimmu.2020.567472.

23. Ferretti E., Horenstein A.L., Canzonetta C., Costa F., Morandi F. Canonical and non-canonical adenosinergic pathways. *Immunology Letters*. 2019;205:25–30. doi: 10.1016/j.imlet.2018.03.007.

24. Wang R., Wang Y., Wu C. et al. CD73 blockade alleviates intestinal inflammatory responses by regulating macrophage differentiation in ulcerative colitis. *Exp Ther Med*. 2023;25(6):272. doi: 10.3892/etm.2023.11972.

25. Doherty G.A., Bai A., Hanidziar D. et al. CD 73 is a phenotypic marker of effector memory T h17 cells in inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol*. 2012;42(11):3062–3072. doi: 10.1002/eji.201242623.

26. Ohta A., Ohta A., Madasu M. et al. A2A Adenosine Receptor May Allow Expansion of T Cells Lacking Effector Functions in Extracellular Adenosine-Rich Microenvironments. *The Journal of Immunology*. 2009;183(9):5487–5493. doi: 10.4049/jimmunol.0901247.

27. Vuerich M., Nguyen D.H., Ferrari D., Longhi M.S. Adenosine-mediated immune responses in inflammatory bowel disease. *Front Cell Dev Biol*. 2024;12:1429736. doi: 10.3389/fcell.2024.1429736.