

УДК 571.27 : 616.3

БАЛАНС TREG- И TH17-КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

Д. А. Аторин^{1*}, Г. А. Жулай¹, Л. В. Топчиева¹, И. В. Курбатова¹,
О. П. Дуданова²

¹ Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН»
(ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910),
*atorin98@mail.ru

² Петрозаводский государственный университет (пр. Ленина, 33, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910)

Т-хелперы 17 (Th17) и Т-регуляторные лимфоциты (Treg) играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза. Нарушение баланса этих клеток может привести к воспалительным заболеваниям кишечника, в том числе и к язвенному колиту (ЯК). Целью исследования являлась оценка баланса Th17/Treg-клеток в периферической крови у больных ЯК по их содержанию и по уровню транскриптов генов *FOXP3* и *RORC*. В исследование были включены условно здоровые люди и пациенты с диагнозом язвенный колит. Всего обследовано 40 человек, из которых 18 больны ЯК. Тотальную РНК выделяли из лейкоцитов периферической крови. Уровень транскриптов генов изучали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Относительное содержание Treg-клеток по фенотипу CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} и Th17-клеток по фенотипу CD4⁺CD161⁺ оценивали методом проточной цитометрии. Исследования показали, что в периферической крови больных ЯК содержание транскриптов генов *FOXP3* и *RORC* было выше, чем у доноров из контрольной группы ($p = 0,0093$ и $0,0008$ соответственно). Соотношение транскриптов генов *FOXP3* и *RORC* в лейкоцитах периферической крови здоровых людей было 2,57, у больных ЯК – 1,91. Значимых различий в количестве Treg-клеток и Th17-клеток не обнаружено. Таким образом, повышенный уровень транскриптов генов *FOXP3* и *RORC* в лейкоцитах периферической крови больных ЯК свидетельствует, на наш взгляд, об активации Т-клеточного звена адаптивного иммунитета. Различия в транскрипционной активности генов, характеризующих Treg- и Th17-клетки, и их отсутствие в количестве CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} и CD4⁺CD161⁺ клеток у индивидов из групп исследования связаны, вероятно, с разнообразием субпопуляций эффекторных и регуляторных Т-лимфоцитов, экспрессирующих указанные транскрипционные факторы.

Ключевые слова: Treg-клетки; Th17; *FOXP3*; *RORC*; иммунный баланс; язвенный колит

Для цитирования: Аторин Д. А., Жулай Г. А., Топчиева Л. В., Курбатова И. В., Дуданова О. П. Баланс Treg- и Th17-клеток в периферической крови больных язвенным колитом // Труды Карельского научного центра РАН. 2024. doi: 10.17076/eb1977

Финансирование. Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (FMEN- 2022-0009).

**D. A. Atorin^{1*}, G. A. Zhulai¹, L. V. Topchieva¹, I. V. Kurbatova¹,
O. P. Dudanova². BALANCE OF TREG AND TH17 CELLS IN PERIPHERAL
BLOOD OF PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS**

¹ Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences
(11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia), *atorin98@mail.ru

² Petrozavodsk State University (33 Lenin Ave., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia)

T-helper 17 cells (Th17) and T-regulatory lymphocytes (Tregs) play an important role in maintaining immune homeostasis. Disruption of the balance between these cells can lead to inflammatory bowel diseases, including ulcerative colitis (UC). To assess the Th17/Treg balance in the peripheral blood of patients with UC based on the content of the cells and on *FOXP3* and *RORC* gene transcription levels. The study included nominally healthy individuals and patients diagnosed with UC. A total of 40 persons were examined, of which 18 had UC. Whole RNA was isolated from peripheral blood leukocytes. The level of gene transcripts was studied using real-time polymerase chain reaction. The relative content of Treg cells of the CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} phenotype and Th17 cells of the CD4⁺CD161⁺ phenotype was measured by flow cytometry. It was shown that the content of *FOXP3* and *RORC* gene transcripts in the peripheral blood of UC patients was higher than in people from the control group ($p = 0.0093$, $p = 0.0008$, respectively). The ratio of *FOXP3* and *RORC* gene transcripts in peripheral blood leukocytes was 2.57 in healthy individuals and 1.91 in UC patients. No significant differences were found in the numbers of Tregs and Th17 cells. We suppose the over transcription of the *FOXP3* and *RORC* genes in peripheral blood leukocytes of UC patients indicates an activation of the T-cell component of adaptive immunity. The differences in the transcriptional activity of the genes that characterize Treg and Th17 cells and the lack of differences in the amount of CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} and CD4⁺CD161⁺ cells in individuals from the study groups are probably associated with the diversity of the effector- and regulatory T-cell subpopulations expressing these transcription factors.

Keywords: Treg; Th17; *FOXP3*; *RORC*; immune balance; ulcerative colitis

For citation: Atorin D. A., Zhulai G. A., Topchieva L. V., Kurbatova I. V., Dudanova O. P. Balance of Treg and Th17 cells in peripheral blood of patients with ulcerative colitis. *Trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra RAN = Transactions of the Karelian Research Centre RAS*. 2024. doi: 10.17076/eb1977

Funding. The research was supported from the federal budget for the implementation of state assignment to the Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences (FMEN-2022-0009).

Введение

Поддержание иммунного гомеостаза (то есть баланса между иммунологической толерантностью и воспалительными иммунными реакциями) важно для предотвращения чрезмерных воспалительных реакций на патогены и обеспечения толерантности к микробиоте. Неконтролируемое воспаление может привести к дальнейшему повреждению тканей, хронизации процессов воспаления и развитию иммуновоспалительных и аутоиммунных заболеваний с последующей потерей функций органов [Chovatiya et al., 2014], в частности воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). CD4⁺ Т-лимфоциты играют ключевую роль в адаптивном иммунном ответе, способствуя иммунной защите, иммунному надзору и иммунному гомеостазу [Horwitz et al., 2019]. CD4⁺ наивные

Т-клетки при активации дифференцируются в различные субпопуляции Т-хелперных клеток с определенным профилем цитокинов и эффекторными функциями. Th17 характеризуются продукцией провоспалительных цитокинов IL-17A, IL-17F и IL-22, а также экспрессией транскрипционного фактора RAR-related orphan receptor gamma (*RORγ*), кодируемого геном *RORC* [Zhou et al., 2020]. В норме Th17 играют ключевую роль в защите слизистой оболочки кишечника, поддерживая баланс иммунного микроокружения [Omenetti, Pizarro, 2015].

CD4⁺ наивные Т-клетки при активации также могут дифференцироваться в регуляторные Т-клетки (Treg). По сравнению с клетками Th17 Т-регуляторные лимфоциты выполняют противовоспалительное действие. Эти клетки подавляют активацию иммунной системы и играют роль в защите от аутоиммунных реакций.

Treg-клетки секретируют противовоспалительные цитокины (IL-10 и TGF- β) и экспрессируют коингибирующие молекулы, например CTLA4 и LAG3. Treg также модулируют активность антигенпрезентирующих клеток [Grover et al., 2021]. Известно, что ключевым транскрипционным фактором для Treg-клеток является forkhead-box P3 (FOXP3), кодируемый геном *FOXP3*. FOXP3 играет важную роль в развитии и функционировании Treg-клеток [Tao et al., 2017].

Клетки Th17 и Treg связаны между собой общим сигнальным путем, опосредованным TGF- β . В присутствии TGF- β и IL-6 или TGF- β и IL-21 наивные CD4⁺ T-клетки дифференцируются в клетки Th17. В отсутствие провоспалительных цитокинов (IL-6 или IL-21) TGF- β способствует их дифференцировке в Treg-клетки [Bettelli et al., 2006]. В работе [Chu et al., 2016] отмечено, что дисбактериоз микробиоты кишечника является основной причиной иммунных нарушений и воспалительных заболеваний кишечника. На дифференцировку наивных T-клеток в Th17 или Treg-клетки могут влиять кишечная микробиота и ее метаболиты [Britton et al., 2019], а также сила сигнала T-клеточного рецептора (TCR) [Kim et al., 2017]. TCR распознает антигены, передает сигналы и определяет дифференцировку T-клеток [Smith-Garvin et al., 2009].

Известно, что при иммуновоспалительных заболеваниях наблюдается дисбаланс эффекторных клеток Th17 и супрессорных Treg в сторону снижения количества последних [Kulkarni et al., 2018]. Нарушение баланса этих клеток может приводить к воспалительным заболеваниям кишечника, в том числе к язвенному колиту (ЯК).

Язвенный колит – хроническое аутоиммунное заболевание толстой кишки неизвестной этиологии и патогенеза, характеризующееся воспалением ее слизистой оболочки. По тяжести течения, частоте осложнений и операций ЯК, который относится к ВЗК, занимает одно из ведущих мест в структуре заболеваний желудочно-кишечного тракта. Основной контингент заболевших – работоспособная возрастная группа от 20 до 40 лет, на ее долю приходится 80 % всех больных ЯК. Это заболевание ухудшает качество жизни и может быть причиной развития онкологии, поэтому так высока социальная значимость изучения этиологии и патогенеза ЯК [Padoan et al., 2023].

В организме больных ЯК по сравнению со здоровыми людьми клетки Th17 усиленно инфильтрируют слизистую оболочку кишечника, а количество провоспалительного цитокина IL-17 увеличивается [Veldhoen et al., 2006]. Однако сведения о количестве Treg-клеток в организме больных ЯК противоречивы.

В работах [Acharya et al., 2018; Yu et al., 2019] на мышинной модели ЯК, вызванного декстраном сульфата натрия (DSS), показано, что количество Treg-клеток уменьшилось, при этом введение Treg-ассоциированных цитокинов, IL-10 и TGF- β , способствовало снижению воспалительного процесса в кишечнике. Некоторые исследователи [Yu et al., 2007; Ma et al., 2016], напротив, отмечают увеличение Treg-клеток у мышей с ЯК, индуцированным DSS. В работе [Sznurkowska et al., 2020] также отмечается увеличение Treg-клеток у молодых пациентов, больных ЯК.

В последние десятилетия обсуждается возможность регулирования дифференцировки клеток Th17 и Treg для лечения или профилактики язвенного колита. Тем не менее роль дисбаланса Th17/Treg в этиологии и патогенезе ЯК все еще остается спорной [Di Sabatino et al., 2015].

В связи с этим цель исследования – оценить баланс Th17/Treg-клеток в периферической крови у больных ЯК по их содержанию и по уровню транскриптов генов *FOXP3* и *RORC*.

Материалы и методы

Исследование проведено на базе ЧУЗ «КБ «РЖД-Медицина» г. Петрозаводск» в 2022–2023 гг. В исследование включены условно здоровые люди и пациенты с диагнозом ЯК (табл. 1). Всего исследовано 40 человек, из которых 18 были больны ЯК. Средний возраст больных ЯК составлял 38 (33–44) лет. 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 [Клинические..., 2020]. 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. Больные ЯК получали только базисную терапию 5'-аминосалициловой кислотой (5'-АСК) – салофальк, сульфасалазин, в дозировке 3–4 г препарата в сутки в зависимости от степени активности ЯК, возраста и клинических показателей.

В контрольную группу были включены 22 условно здоровых человека (группа контроля), средний возраст которых составил 39 (35–47) лет. Возраст индивидов из групп исследования значимо не различался ($p < 0,05$). Критерии исключения из исследования для группы здоровых людей: наличие хронических иммуновоспалительных заболеваний, в том числе сахарного диабета второго типа, злоупотребление алкоголем, курение табака, перенесенные в последние два месяца инфекционные заболевания.

Использовали периферическую кровь, взятую натощак. Тотальную РНК (тотРНК) из лейкоцитов периферической крови выделяли с помощью набора Extract RNA («Евроген», Россия). Фракцию лейкоцитов периферической крови (ЛПК) 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 SmartSpec Plus (Bio-Rad, США).

Уровень транскриптов генов изучали методом ПЦР в режиме реального времени на приборе

LightCycler (Roshe, Германия), используя набор PCRMix-HS SYBR («Евроген», Россия). Каждую ПЦР повторяли не менее двух раз. Смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала 1 нгк ДНК, по 50 пкМ прямого и обратного праймеров, 4 мкл реакционной смеси и 13,4 мкл деионизованной воды, свободной от нуклеаз. Протокол ПЦР: денатурация кДНК 5 мин при 95 °С; 45 циклов: денатурация при 95 °С 30 с; отжиг при 58 °С 20 с (для генов *FOXP3* и *RORC*). Ген *18S rRNA* использовали в качестве референсного. Последовательность праймеров дана в таблице 2. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР-фрагментов. Эффективность ПЦР оценивали по стандартной кривой. Относительный уровень транскриптов определяли по ΔCt ($\Delta Ct = 2^{(Ct \text{ референсного гена} - Ct \text{ гена интереса})}$, где Ct – значение порогового цикла) [Livak et al., 2001]. Данные представлены в относительных единицах.

Образцы цельной крови обследуемых лиц также были окрашены антителами для проточной цитометрии, затем инкубированы 20 минут при комнатной температуре в темноте, в соответствии с протоколом производителя. Эритроциты лизировали реагентом BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США).

Таблица 1. Характеристика групп исследования
Table 1. Description of the studied groups of people

Характеристика Description	Контроль Control	ЯК UC
Число обследованных Number of the examined people	22	18
Мужчины Men	10 (45,5 %)	10 (55,5 %)
Женщины Women	12 (54,5 %)	8 (44,5 %)
Возраст, Ме ($Q_{0,25} - Q_{0,75}$), лет Age, Me ($Q_{0,25} - Q_{0,75}$), years	39 (35–47)	38 (33–44)
Терапия производными 5'-аминосалициловой кислоты (салофальк, сульфасалазин) Therapy with 5'-aminosalicylic acid derivatives (Salofalk, Sulfasalazine)	-	18 (100 %)
Активность ЯК UC activity		
Высокая High	-	2 (17 %)
Умеренная Moderate	-	4 (22 %)
Слабая Weak	-	12 (61 %)
Форма ЯК UC forms		
Левосторонний Left-side	-	14 (78 %)
Панколит Pancolitis	-	4 (22 %)

Примечание. Данные представлены как доля от общего количества обследованных в группе (%).
Note. Data are presented as the share in the group total (%).

Таблица 2. Последовательности праймеров для определения уровня транскриптов генов
Table 2. Primer sequences for determining gene transcript levels

Ген Gene	Последовательность праймеров 5' - 3' Primers equence 5' - 3'		Размер ПЦР продукта, пар оснований PCR product size, base pairs	Источник Source
	Прямой Foward	Обратный Reverse		
<i>18SrRNA</i>	AGAAACGGCTACCACATCCA	CACCAGACTTGCCCTCCA	119	Собственный дизайн Authors' design
<i>FOXP3</i>	GCCACAACCTGAGTCTGC	GTTCGTCCATCCTCCTTTCC	172	Huang et al., 2013
<i>RORC</i>	CCAAGGCAGGGCTCAATG	GAAGTCCACATCGGTCAGG	123	Huang et al., 2013

В работе использованы следующие моноклональные антитела: CD4-FITC, CD25-PC5, CD127-PC7, CD161-PerCP, а также соответствующие изотипические контроли (eBioscience, США). Результаты получены на цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). В каждом образце анализировали не менее 30 000 событий в лимфоцитарном гейте, основанном на прямом и боковом светорассеянии. Данные представлены как доля (в %) от популяции CD4⁺ Т-клеток.

Статистическая обработка данных выполнена в пакете программ GraphPad Prism (version 7.0). Нормальность распределения данных проверяли критерием Шапиро – Уилка. Поскольку выборка не соответствовала нормальному распределению, для оценки значимости различий между группами применяли непараметрический критерий Манна – Уитни. Значимыми считались различия при $p < 0,05$. Также проведен однофакторный ANOVA. Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей ($Q_{0,25} - Q_{0,75}$).

Исследование выполнено на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Результаты и обсуждение

Проанализирован уровень мРНК генов *FOXP3* и *RORC* в ЛПК больных ЯК в сравнении

с условно здоровыми людьми (табл. 3). В ЛПК больных ЯК уровень транскриптов гена *FOXP3* был выше, чем у контрольной группы ($p = 0,0093$), уровень транскриптов гена *RORC* также был значимо выше, чем у контрольной группы ($p = 0,0008$). Соотношение уровня транскриптов генов *FOXP3* и *RORC* в группе здоровых людей было 2,57, в группе больных ЯК – 1,91.

Известно, что уровень мРНК гена *FOXP3* увеличивается в CD4⁺ Т-клетках после их активации. Вероятно, повышение уровня мРНК *FOXP3* у обследованных нами больных ЯК связано с активацией эффекторных Т-клеток, что характерно для данной аутоиммунной патологии. Тем не менее в ЛПК больных ЯК соотношение уровня транскриптов *FOXP3/RORC* было в 1,3 раза ниже, чем у индивидов из контрольной группы. Это, вероятно, может свидетельствовать о преобладании пула провоспалительных эффекторных Т-хелперов 17 в периферической крови больных ЯК.

В связи с этим у больных ЯК и здоровых доноров мы также оценивали относительное содержание Treg-клеток по фенотипу CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} и Th17-клеток по фенотипу CD4⁺CD161⁺ (табл. 4). В результате анализа нами не обнаружено различий в содержании Th17-клеток и Treg- у больных ЯК и здоровых доноров.

Таблица 3. Уровень транскриптов генов *FOXP3* и *RORC* в периферической крови у больных язвенным колитом и здоровых доноров

Table 3. Level of *FOXP3* and *RORC* gene transcripts in peripheral blood of patients with ulcerative colitis and healthy donors

Ген Gene	Контроль Control	ЯК UC
Уровень транскриптов <i>FOXP3</i> , отн. ед. <i>FOXP3</i> transcript level, relative units	0,018 (0,008–0,056)	0,165* (0,026–0,56)
Уровень транскриптов <i>RORC</i> , отн. ед. <i>RORC</i> transcript level, relative units	0,007 (0,001–1,05)	0,162* (0,004–1,052)

Примечание. Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей ($Q_{0,25} - Q_{0,75}$). *Различия значимы при $p < 0,05$.
Note. Data are presented as median (Me) and quartiles ($Q_{0,25} - Q_{0,75}$). *Differences are significant at $p < 0.05$

Таблица 4. Содержание Т-клеток в периферической крови здоровых людей и больных язвенным колитом
Table 4. T cell content in peripheral blood of healthy people and patients with ulcerative colitis

Фенотип Т-клеток T cell phenotype	Контроль Control	ЯК UC
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-} Treg-клетки, % от CD4 ⁺ Т-клеток CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-} Treg cells, % of CD4 ⁺ T cells	3,76 (3,23–5,43)	4,79 (3,43–5,77)
CD4 ⁺ CD161 ⁺ Th17-клетки, % от CD4 ⁺ Т-клеток CD4 ⁺ CD161 ⁺ Th17 cells, % of CD4 ⁺ T cells	14,9 (12,33–16,41)	11,42 (8,64–16,23)

Примечание. Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей ($Q_{0,25} - Q_{0,75}$).
Note. Data are presented as median (Me) and quartiles ($Q_{0,25} - Q_{0,75}$).

Поскольку ген *FOXP3* расположен на Х-хромосоме, мы проанализировали уровень транскриптов генов и количество клеток в разных группах исследования у мужчин и женщин (табл. 5).
Уровень транскриптов генов *FOXP3* и *RORC* в ЛПК мужчин, больных ЯК, значимо различался при сравнении с контрольной группой ($p = 0,026$ и $0,00058$ соответственно). У женщин при аналогичном сравнении также обнаружены значимые различия ($p = 0,03$ и $0,008$ соответственно).
Проведен однофакторный ANOVA анализ. Показано, что уровень транскриптов генов *FOXP3* и *RORC* в ЛПК обследованных лиц из контрольной группы и группы больных ЯК не зависел от гендерной принадлежности ($F = 0,12$, $p = 0,73$, $\eta = 0,71$; $F = 0,65$, $p = 0,43$, $\eta = 2,82$ соответственно для контрольной группы и $F = 0,04$, $p = 0,83$, $\eta = 0,24$; $F = 0,97$, $p = 0,34$, $\eta = 3,59$ для

группы больных ЯК). Количество Трег-клеток было связано с половой принадлежностью в группе условно здоровых людей ($F = 7,44$ при $p = 0,016$, $\eta = 43,76$), но не в группе больных ЯК ($F = 0,02$ при $p = 0,88$, $\eta = 0,15$). Количество Трег-клеток в периферической крови здоровых мужчин оказалось больше, чем у здоровых женщин ($p = 0,015$). Количество Th17-клеток не зависело от гендерной принадлежности ни в группе контроля, ни в группе ЯК ($F = 1,07$, $p = 0,32$, $\eta = 6,29$; $F = 0,1$, $p = 0,99$, $\eta = 0,77$).
Таким образом, мы выявили различия в уровне транскриптов генов *FOXP3* и *RORC* в ЛПК условно здоровых людей (контрольная группа) и больных ЯК. Причем эти различия не зависели от гендерной принадлежности обследованных лиц. Количество провоспалительных Th17-клеток и иммуносупрессорных Трег-клеток в периферической крови условно здоровых людей и больных ЯК не различалось.

Таблица 5. Содержание транскриптов генов *FOXP3* и *RORC*, Трег- и Th17-клеток в периферической крови у мужчин и женщин в контрольной группе и в группе больных язвенным колитом
Table 5. The content of *FOXP3* and *RORC* gene transcripts, Treg and Th17 cells in the peripheral blood of men and women in the control group and in the group of patients with ulcerative colitis

Показатель Index	Контроль Control		ЯК UC	
	Мужчины Men	Женщины Women	Мужчины Men	Женщины Women
Уровень транскриптов <i>FOXP3</i> , отн. ед. <i>FOXP3</i> transcript level, relative units	0,024 (0,0061–0,056)	0,016 (0,009–0,044)	0,43 ^a (0,078–0,97)	0,17 ^b (0,040–2,57)
Уровень транскриптов <i>RORC</i> , отн. ед. <i>RORC</i> transcript level, relative units	0,012 (0,0076–0,026)	0,022 (0,0038–0,028)	0,91 ^a (0,056–1,6)	0,062 ^b (0,0014–0,89)
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-} Treg-клетки, % от CD4 ⁺ Т-клеток CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-} Treg cells, % of CD4 ⁺ T cells	5,24 (4,62–6,86)	3,42 ^c (2,49–3,63)	4,79 (4,52–5,89)	5,36 (2,71–5,48)
CD4 ⁺ CD161 ⁺ Th17-клетки, % от CD4 ⁺ Т-клеток CD4 ⁺ CD161 ⁺ Th17 cells, % of CD4 ⁺ T cells	14,7 (12,37–15,09)	15,71 (13,03–16,36)	8,64 (6,22–17,29)	11,19 (10,42–14,25)

Примечание. Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей ($Q_{0,25} - Q_{0,75}$). ^a – различия значимы при сравнении группы мужчин, больных ЯК, по сравнению с контрольной группой; ^b – различия значимы при сравнении группы женщин, больных ЯК, по сравнению с контрольной группой; ^c – различия значимы при сравнении женщин и мужчин из контрольной группы.
Note. Data are presented as median (Me) and quartiles ($Q_{0,25} - Q_{0,75}$). ^a – the differences are significant when comparing the group of men with UC compared to the control group; ^b – the differences are significant when comparing the group of women with UC compared to the control group; ^c – the differences are significant when comparing women and men from the control group.

Поскольку предрасположенность мужчин и женщин к иммуновоспалительным заболеваниям может быть связана с особенностями их иммунной системы и гормональным статусом [Klein, Flanagan, 2016; Singh, Bischoff, 2021], мы проанализировали связь количества указанных клеток с гендерной принадлежностью. Нами не выявлено влияния пола на количество Th17- и Treg-клеток в периферической крови больных ЯК. Однако в контрольной группе количество Treg-клеток в периферической крови мужчин было значимо выше, чем у женщин.

Сведения об экспрессии гена *FOXP3* и количестве Treg-клеток в периферической крови при ЯК противоречивы. В работе [Sznurkowska et al., 2020] отмечено, что у молодых пациентов с ЯК количество циркулирующих Treg-клеток, а также Treg-клеток кишечника было значительно выше, чем у группы здоровых людей. Другие авторы, напротив, отмечают снижение пула Treg-клеток в периферической крови при ЯК [Kulkarni et al., 2018]. Эти противоречия можно объяснить значительной гетерогенностью этой популяции. Так, на экспериментальной модели ЯК [Ma et al., 2016] показано, что повышенное содержание Treg-клеток связано с увеличением количества несупрессорных клеток в пуле Treg, фенотип которых $CD4^+CD45RA^+FoxP3^{low}$, а количество самих Treg-клеток с фенотипом $CD4^+CD45RA^+FoxP3^{high}$ было снижено. Кроме того, авторы показали, что $CD4^+CD45RA^+FoxP3^{low}$ -клетки представляют собой потенциальный источник лимфоцитов Th17. Это может способствовать дисбалансу между Treg и Th17 и снижению количества функциональных Treg-клеток [Acharya et al., 2018; Yu et al., 2019]. Тем не менее по результатам нашего исследования количество Treg-лимфоцитов в периферической крови здоровых людей и больных ЯК было практически одинаковым.

Данные литературы относительно уровня экспрессии *RORC* и содержания Th17 не носят такого противоречивого характера. Практически все авторы отмечают увеличение уровня транскриптов *RORC* и Th17 у больных ЯК. В нашем исследовании мы не выявили различий в количестве клеток Th17, но при этом обнаружили повышение уровня транскрипта гена *RORC* в ЛПК больных ЯК по сравнению со здоровыми людьми. Полученные в нашем исследовании данные по экспрессии указанного гена соответствуют данным других авторов. Так, в исследовании [Long et al., 2020] количество Th17-клеток и продукция IL-17 были выше у больных ЯК, чем у здоровых доноров. В работе [Longhi et al., 2014] также показано, что у пациентов с ВЗК количество клеток Th17 как в ЛПК,

так и в собственной пластинке кишечника было значительно выше, чем у здоровых людей.

Заключение

В основе патогенеза многих иммуновоспалительных заболеваний лежит нарушение баланса провоспалительных Th17- и супрессорных Treg-клеток. В представленной работе выявлено, что в ЛПК больных ЯК уровень транскриптов генов транскрипционных факторов Treg-клеток (*FOXP3*) и Th17-клеток (*RORC*) выше по сравнению со здоровыми людьми. На первый взгляд, это могло бы отражать изменения в количестве данного типа клеток у больных. Однако цитометрический анализ не позволил выявить различия в пуле как $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$, так и $CD4^+CD161^+$ -клеток в группе здоровых индивидов и больных ЯК. Вероятно, это связано с разнообразием субпопуляций эффекторных и регуляторных Т-лимфоцитов, экспрессирующих указанные транскрипционные факторы, функциональные свойства которых могут значительно варьировать в зависимости от активности воспалительного процесса при ЯК. В связи с этим при изучении патогенеза ЯК необходимо анализировать субпопуляции клеток, которые, несмотря на экспрессию транскрипционных факторов *FOXP3* и *RORC*, могут проявлять как супрессорные, так и эффекторные свойства Th17 и Treg.

Таким образом, у больных ЯК при сравнении со здоровыми людьми установлен повышенный уровень транскриптов генов *FOXP3* и *RORC* при отсутствии достоверных изменений в содержании $CD4^+CD25^+CD127^{lo/-}$ Treg-клеток и $CD4^+CD161^+$ Th17-клеток. Полученные результаты могут быть использованы для прогнозирования течения и оценки эффективности терапии ЯК.

Литература

Клинические рекомендации. Язвенный колит. 2020 (22.07.2020). Утверждены Минздравом РФ. 56 с. URL: http://disuria.ru/_ld/9/988_kr20K51mz.pdf?ysclid=m4v0xq7z68486751805 (дата обращения: 10.10.2024).

Acharya S., Timilshina M., Jiang L., Neupane S., Choi D. Y., Park S. W., Lee S. Y., Jeong B. S., Kim J. A., Nam T. G., Chang J. H. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis and DSS induced colitis by NTG-A-009 through the inhibition of Th1 and Th17 cells differentiation // Sci. Rep. 2018. Vol. 8, no. 1. Art. 7799. doi: 10.1038/s41598-018-26088-y

Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T. B., Oukka M., Weiner H. L., Kuchroo V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic

- effector Th17 and regulatory T cells // *Nature*. 2006. Vol. 441, no. 7090. P. 235–238. doi: 10.1038/nature04753
- Britton G. J., Contijoch E. J., Mogno I., Vennaro O. H., Llewellyn S. R., Ng R., Li Z., Mortha A., Merad M., Das A., Gevers D., McGovern D. P. B., Singh N., Braun J., Jacobs J. P., Clemente J. C., Grinspan A., Sands B. E., Colombel J. F., Dubinsky M. C., Faith J. J. Microbiotas from humans with inflammatory bowel disease alter the balance of gut Th17 and ROR γ t⁺ regulatory T cells and exacerbate colitis in mice // *Immunity*. 2019. Vol. 50, no. 1. P. 212–224. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.015
- Chovatiya R., Medzhitov R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis // *Mol. Cell*. 2014. Vol. 54, no. 2. P. 281–290. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.030
- Chu H., Khosravi A., Kusumawardhani I. P., Kwon A. H. K., Vasconcelos A. C., Cunha L. D., Mayer A. E., Shen Y., Wu W. L., Kambal A., Targan S. R., Xavier R. J., Ernst P. B., Green D. R., McGovern D. P. B., Virgin H. W., Mazmanian S. K. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease // *Science*. 2016. Vol. 352, no. 6289. P. 1116–1120. doi: 10.1126/science.aad9948
- Di Sabatino A., Lenti M. V., Giuffrida P., Vanoli A., Corazza G. R. New insights into immune mechanisms underlying autoimmune diseases of the gastrointestinal tract // *Autoimmun. Rev.* 2015. Vol. 14, no. 12. P. 1161–1169. doi: 10.1016/j.autrev.2015.08.004
- Grover P., Goel P. N., Greene M. I. Regulatory T cells: regulation of identity and function // *Front. Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 750542. doi: 10.3389/fimmu.2021.750542
- Horwitz D. A., Fahmy T. M., Piccirillo C. A., La Cava A. Rebalancing immune homeostasis to treat autoimmune diseases // *Trends Immunol.* 2019. Vol. 40, no. 10. P. 888–908. doi: 10.1016/j.it.2019.08.003
- Huang H., Lu Z., Jiang C., Liu J., Wang Y., Xu Z. Imbalance between Th17 and regulatory T-cells in sarcoidosis // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14. P. 21463–21473. doi: 10.3390/ijms141121463
- Kim H. S., Jang S. W., Lee W., Kim K., Sohn H., Hwang S. S., Lee G. R. PTEN drives Th17 cell differentiation by preventing IL-2 production // *J. Exp. Med.* 2017. Vol. 214, no. 11. P. 3381–3398. doi: 10.1084/jem.20170523
- Klein S. L., Flanagan K. L. Sex differences in immune responses // *Nat. Rev. Immunol.* 2016. Vol. 16, no. 10. P. 626–638. doi: 10.1038/nri.2016.90
- Kulkarni N., Meitei H. T., Sonar S. A., Sharma P. K., Mujeeb V. R., Srivastava S., Lal G. CCR6 signaling inhibits suppressor function of induced-Treg during gut inflammation // *J. Autoimmun.* 2018. Vol. 88. P. 121–130. doi: 10.1016/j.jaut.2017.10.013
- Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method // *Methods*. 2001. Vol. 25, no. 4. P. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Longhi M. S., Moss A., Bai A., Wu Y., Huang H., Cheifetz A., Quintana F. S., Robson S. C. Characterization of human CD39⁺ Th17 cells with suppressor activity and modulation in inflammatory bowel disease // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, no. 2. e87956. doi: 10.1371/journal.pone.0087956
- Long Y., Zhao X., Xia C., Li X., Fan C., Liu C., Wang C. Upregulated IL-17A secretion and CCR6 coexpression in Treg subsets are related to the imbalance of Treg/Th17 cells in active UC patients // *Scand. J. Immunol.* 2020. Vol. 9, no. 2. e12842. doi: 10.1111/sji.12842
- Ma Y. H., Zhang J., Chen X., Xie Y. F., Pang Y. H., Liu X. J. Increased CD4⁺ CD45RA⁺ FoxP3^{low} cells alter the balance between Treg and Th17 cells in colitis mice // *World J. Gastroenterol.* 2016. Vol. 22, no. 42. P. 9356–9367. doi: 10.3748/wjg.v22.i42.9356
- Omenetti S., Pizarro T. T. The Treg/Th17 axis: a dynamic balance regulated by the gut microbiome // *Front. Immunol.* 2015. Vol. 6. P. 639. doi: 10.3389/fimmu.2015.00639
- Padoan A., Musso G., Contran N., Basso D. Inflammation, autoinflammation and autoimmunity in inflammatory bowel diseases // *CIMB*. 2023. Vol. 45, no. 7. P. 5534–5557. doi: 10.3390/cimb45070350
- Singh R. P., Bischoff D. S. Sex hormones and gender influence the expression of markers of regulatory T cells in SLE patients // *Front. Immunol.* 2021. Vol. 12. P. 619268. doi: 10.3389/fimmu.2021.619268
- Smith-Garvin J. E., Koretzky G. A., Jordan M. S. T cell activation // *Annu. Rev. Immunol.* 2009. Vol. 27, no. 1. P. 591–619. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706
- Sznurkowska K., Luty J., Bryl E., Witkowski J. M., Hermann-Okoniewska B., Landowski P., Szlagatyś-Sidorkiewicz A. Enhancement of circulating and intestinal T regulatory cells and their expression of helios and neuropilin-1 in children with inflammatory bowel disease // *J. Inflamm. Res.* 2020. Vol. 13. P. 995–1005. doi: 10.2147/jir.s268484
- Tao J. H., Cheng M., Tang J. P., Liu Q., Pan F., Li X. P. Foxp3, regulatory T cell, and autoimmune diseases // *Inflammation*. 2017. Vol. 40. P. 328–339. doi: 10.1007/s10753-016-0470-8
- Veldhoen M., Hocking R. J., Atkins C. J., Locksley R. M., Stockinger B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells // *Immunity*. 2006. Vol. 24, no. 2. P. 179–189. doi: 10.1016/j.immuni.2006.01.001
- Yu Q. T., Saruta M., Avanesyan A., Fleshner P. R., Banham A. H., Papadakis K. A. Expression and functional characterization of FOXP3⁺CD4⁺ regulatory T cells in ulcerative colitis // *Inflamm. Bowel Dis.* 2007. Vol. 13, no. 2. P. 191–199. doi: 10.1002/ibd.20053
- Yu R., Zuo F., Ma H., Chen S. Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium adolescentis* strains with similar adhesion property induce differential regulation of inflammatory immune response in Treg/Th17 axis of DSS-colitis mice // *Nutrients*. 2019. Vol. 11, no. 4. Art. 782. doi: 10.3390/nu11040782
- Zhou C., Wu X. R., Liu H. S., Liu X. H., Liu G. H., Zheng X. B., Lan P. Immunomodulatory effect of urine-derived stem cells on inflammatory bowel diseases via downregulating Th1/Th17 immune responses in a PGE2-dependent manner // *J. Crohn's Colitis*. 2020. Vol. 14, no. 5. P. 654–668. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjz200

References

- Acharya S., Timilshina M., Jiang L., Neupane S., Choi D. Y., Park S. W., Lee S. Y., Jeong B. S., Kim J. A., Nam T. G., Chang J. H. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis and DSS induced colitis by NTG-A-009 through the inhibition of Th1 and Th17 cells differentiation. *Sci. Rep.* 2018;8(1):7799. doi: 10.1038/s41598-018-26088-y

- Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T. B., Oukka M., Weiner H. L., Kuchroo V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441(7090):235–238. doi: 10.1038/nature04753
- Britton G. J., Contijoch E. J., Mogno I., Vennaro O. H., Llewellyn S. R., Ng R., Li Z., Mortha A., Merad M., Das A., Gevers D., McGovern D. P. B., Singh N., Braun J., Jacobs J. P., Clemente J. C., Grinspan A., Sands B. E., Colombel J. F., Dubinsky M. C., Faith J. J. Microbiotas from humans with inflammatory bowel disease alter the balance of gut Th17 and ROR γ t⁺ regulatory T cells and exacerbate colitis in mice. *Immunity*. 2019;50(1):212–224. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.015
- Chovatiya R., Medzhitov R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol. Cell*. 2014;54(2):281–290. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.030
- Chu H., Khosravi A., Kusumawardhani I. P., Kwon A. H. K., Vasconcelos A. C., Cunha L. D., Mayer A. E., Shen Y., Wu W. L., Kambal A., Targan S. R., Xavier R. J., Ernst P. B., Green D. R., McGovern D. P. B., Virgin H. W., Mazmanian S. K. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science*. 2016;352(6289):1116–1120. doi: 10.1126/science.aad9948
- Clinical guidelines. Ulcerative colitis. 2020 (22.07.2020). Approved by the Ministry of Health of the Russian Federation. 56 p. (In Russ.). URL: http://disuria.ru/_Id/9/988_kr20K51mz.pdf?ysclid=m4v0xq7z68486751805 (accessed: 10.10.2024).
- Di Sabatino A., Lenti M. V., Giuffrida P., Vanoli A., Corazza G. R. New insights into immune mechanisms underlying autoimmune diseases of the gastrointestinal tract. *Autoimmun. Rev.* 2015;14(12):1161–1169. doi: 10.1016/j.autrev.2015.08.004
- Grover P., Goel P. N., Greene M. I. Regulatory T cells: regulation of identity and function. *Front. Immunol.* 2021;12:750542. doi: 10.3389/fimmu.2021.750542
- Horwitz D. A., Fahmy T. M., Piccirillo C. A., La Cava A. Rebalancing immune homeostasis to treat autoimmune diseases. *Trends Immunol.* 2019;40(10):888–908. doi: 10.1016/j.it.2019.08.003
- Huang H., Lu Z., Jiang C., Liu J., Wang Y., Xu Z. Imbalance between Th17 and regulatory T-cells in sarcoidosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:21463–21473. doi: 10.3390/ijms141121463
- Kim H. S., Jang S. W., Lee W., Kim K., Sohn H., Hwang S. S., Lee G. R. PTEN drives Th17 cell differentiation by preventing IL-2 production. *J. Exp. Med.* 2017;214(11):3381–3398. doi: 10.1084/jem.20170523
- Klein S. L., Flanagan K. L. Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2016;16(10):626–638. doi: 10.1038/nri.2016.90
- Kulkarni N., Meitei H. T., Sonar S. A., Sharma P. K., Mujeeb V. R., Srivastava S., Lal G. CCR6 signaling inhibits suppressor function of induced-Treg during gut inflammation. *J. Autoimmun.* 2018;88:121–130. doi: 10.1016/j.jaut.2017.10.013
- Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method. *Methods*. 2001;25(4):402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Longhi M. S., Moss A., Bai A., Wu Y., Huang H., Cheifetz A., Quintana F. S., Robson S. C. Characterization of human CD39⁺ Th17 cells with suppressor activity and modulation in inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e87956. doi: 10.1371/journal.pone.0087956
- Long Y., Zhao X., Xia C., Li X., Fan C., Liu C., Wang C. Upregulated IL-17A secretion and CCR6 coexpression in Treg subsets are related to the imbalance of Treg/Th17 cells in active UC patients. *Scand. J. Immunol.* 2020;9(2):e12842. doi: 10.1111/sji.12842
- Ma Y. H., Zhang J., Chen X., Xie Y. F., Pang Y. H., Liu X. J. Increased CD4⁺ CD45RA⁺ FoxP3^{low} cells alter the balance between Treg and Th17 cells in colitis mice. *World J. Gastroenterol.* 2016;22(42):9356–9367. doi: 10.3748/wjg.v22.i42.9356
- Omenetti S., Pizarro T. T. The Treg/Th17 axis: a dynamic balance regulated by the gut microbiome. *Front. Immunol.* 2015;6:639. doi: 10.3389/fimmu.2015.00639
- Padoan A., Musso G., Contran N., Basso D. Inflammation, autoinflammation and autoimmunity in inflammatory bowel diseases. *CIMB*. 2023;45(7):5534–5557. doi: 10.3390/cimb45070350
- Singh R. P., Bischoff D. S. Sex hormones and gender influence the expression of markers of regulatory T cells in SLE patients. *Front. Immunol.* 2021;12:619268. doi: 10.3389/fimmu.2021.619268
- Smith-Garvin J. E., Koretzky G. A., Jordan M. S. T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 2009;27(1):591–619. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706
- Sznurkowska K., Luty J., Bryl E., Witkowski J. M., Hermann-Okoniewska B., Landowski P., Szlagatys-Sidorkiewicz A. Enhancement of circulating and intestinal T regulatory cells and their expression of helios and neuropilin-1 in children with inflammatory bowel disease. *J. Inflamm. Res.* 2020;13:995–1005. doi: 10.2147/jir.s268484
- Tao J. H., Cheng M., Tang J. P., Liu Q., Pan F., Li X. P. Foxp3, regulatory T cell, and autoimmune diseases. *Inflammation*. 2017;40:328–339. doi: 10.1007/s10753-016-0470-8
- Veldhoen M., Hocking R. J., Atkins C. J., Locksley R. M., Stockinger B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24(2):179–189. doi: 10.1016/j.immuni.2006.01.001
- Yu Q. T., Saruta M., Avanesyan A., Fleshner P. R., Banham A. H., Papadakis K. A. Expression and functional characterization of FOXP3⁺CD4⁺ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2007;13(2):191–199. doi: 10.1002/ibd.20053
- Yu R., Zuo F., Ma H., Chen S. Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium adolescentis* strains with similar adhesion property induce differential regulation of inflammatory immune response in Treg/Th17 axis of DSS-colitis mice. *Nutrients*. 2019;11(4):782. doi: 10.3390/nu11040782
- Zhou C., Wu X. R., Liu H. S., Liu X. H., Liu G. H., Zheng X. B., Lan P. Immunomodulatory effect of urine-derived stem cells on inflammatory bowel diseases via downregulating Th1/Th17 immune responses in a PGE2-dependent manner. *J. Crohn's Colitis*. 2020;14(5):654–668. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjz200

Поступила в редакцию / received: 24.10.2024; принята к публикации / accepted: 03.12.2024.
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflict of interest.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Аторин Даниил Алексеевич

аспирант лаборатории генетики

e-mail: atorin98@mail.ru

Жулай Галина Анатольевна

канд. биол. наук, научный сотрудник
лаборатории генетики

e-mail: zhgali-111@yandex.ru

Топчиева Людмила Владимировна

канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории генетики

e-mail: topchieva67@mail.ru

Курбатова Ирина Валерьевна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник
лаборатории генетики

e-mail: irina7m@yandex.ru

Дуданова Ольга Петровна

д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой
пропедевтики внутренних болезней и гигиены

e-mail: odudanova@gmail.com

CONTRIBUTORS:

Atorin, Daniil

PhD Student, Researcher Assistant

Zhulai, Galina

Cand. Sci. (Biol.), Researcher

Topchieva, Lyudmila

Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher

Kurbatova, Irina

Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher

Dudanova, Olga

Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Department