



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.14.3.018>
УДК 616.344-002:616.34-008.87:612.017.1



Нижегородова Д.Б.✉, Назаренко Е.М., Иванчик Г.И., Шулейко А.Ч., Кулинич С.С.,
Величко А.В., Зафранская М.М.

Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины
Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь

Клеточный и гуморальный иммунный ответ к компонентам микробиоты у пациентов с болезнью Крона

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Нижегородова Д.Б. – концепция и дизайн исследования, проведение иммунологических исследований и статистическая обработка данных, написание исходного варианта и окончательное редактирование текста рукописи; Назаренко Е.М. – постановка культуральных и иммунологических исследований; Иванчик Г.И. – проведение диссоциации ткани, гематологические исследования; Шулейко А.Ч. – сбор и статистическая обработка клинических и морфологических данных, забор биологического материала; Кулинич С.С. – постановка культуральных исследований и криоконсервация клеток; Величко А.В. – проведение иммунохимического анализа; Зафранская М.М. – концепция и дизайн исследования, окончательное редактирование текста рукописи.

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ «Биотехнологии-2», подпрограмма 3.1 «Молекулярные и клеточные биотехнологии-2», № госрегистрации 20230295.

Подана: 21.05.2025

Принята: 01.09.2025

Контакты: nzh@tut.by

Резюме

Введение. Иммунопатогенез болезни Крона ассоциируется не только с изменением состава микробиоты, но и с нарушением ее взаимодействия с мукозальной иммунной системой в результате срыва механизмов иммунологической толерантности. Существующие классические методы не позволяют напрямую определять исходную частоту микробиота-реактивных лимфоцитов. В данной статье представлен методологический подход идентификации Т-клеток, реагирующих на флагеллин, олигоманнан или бактериальный липопроtein, которая включает определение поверхностной экспрессии активационного маркера CD154 в сочетании с внутриклеточной продукцией цитокинов CD3⁺-лимфоцитами и позволяет выделять субпопуляции антиген-специфических клеток у пациентов с болезнью Крона.

Цель. Охарактеризовать субпопуляции Т-лимфоцитов, реактивных к компонентам микробиоты, в периферической крови и слизистой оболочке подвздошной кишки и установить их взаимосвязь с продукцией аутоантител у пациентов с болезнью Крона.

Материалы и методы. Материалом исследования явились биопсийный материал подвздошной кишки и периферическая кровь 16 пациентов (10 мужчин, 6 женщин) с болезнью Крона в возрасте от 22,5 до 30,5 года (X 25,0 года). Мукозальные лимфоидные клетки получали путем программной диссоциации тканей кишки. Лимфоидные клетки культивировали в присутствии компонентов микробиоты в течение 12 ч., после чего оценивали количество антиген-специфических Т-клеток методом проточной цитометрии. Статистическую обработку проводили в GraphPad Prism.

Результаты. У пациентов с болезнью Крона установлено статистически значимое увеличение количества Т1- и Т17-клеток в культурах PBLs, стимулированных флагеллином и липопротеином, которые коррелировали с локализацией ($R=0,54$, $p<0,05$) и фенотипом ($R=0,86$, $p<0,05$) болезни. В культурах IELs пациентов с болезнью Крона регистрировались изменения только среди клеток Т-хелперов 17-го типа в ответ на флагеллин ($p<0,05$) и олигоманнан ($p<0,01$) относительно ГС, коррелирующих с циркулирующими флагеллин-специфическими Т1 PBLs ($R=0,80$, $p<0,01$). В культурах LPLs наблюдалась противоположная картина, характеризующаяся повышением как спонтанного ($p<0,01$), так и маннан-специфического ($p<0,05$) уровня Т1-клеток у пациентов с болезнью Крона относительно ГС, зависящего от тяжести фенотипа болезни ($R=0,85$, $p<0,01$). Маннан-специфические мукозальные Т17 IELs и Т1 LPLs обратно пропорционально коррелировали с концентрацией ASCA IgG ($R=-0,64$ и $R=-0,86$, $p<0,05$ соответственно) в сыворотке пациентов и не зависели от продукции ASCA IgA.

Заключение. В данном исследовании продемонстрирована идентификация циркулирующих и мукозальных микробиота-специфических Т-клеток, эффекторных реакции которых приводят к основному повреждению ткани, что необходимо учитывать при комплексной диагностике болезни Крона.

Ключевые слова: болезнь Крона, мукозальные иммунные клетки, антиген-специфический иммунный ответ, микробиота, Т-лимфоциты, аутоантитела, проточная цитометрия

Nizheharodava D.✉, Nazaranka E., Ivanchyk G., Shuleika A., Kulinich S., Vialichka A., Zafranskaya M.

Scientific Research Institute of Experimental and Clinical Medicine of the Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Cellular and Humoral Immune Response to Microbiota Components in Patients with Crohn's Disease

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Nizheharodava D. – study concept and design, immunological tests and statistical processing of data, writing the original version and final editing of the manuscript; Nazaranka E. – cultural and immunological tests; Ivanchyk G. – tissue dissociation, hematological tests; Shuleika A. – clinical and morphological data processing, biological material sampling; Kulinich S. – cultural tests and cells cryopreservation; Vialichka A. – enzyme-linked immunosorbent assay; Zafranskaya M. – study concept and design, final editing of manuscript.

Funding: the work was financially supported by the state research program "Biotechnologies-2", subprogram 3.1 "Molecular and cellular biotechnologies-2", registration number 20230295.

Submitted: 21.05.2025

Accepted: 01.09.2025

Contacts: nzh@tut.by

Abstract

Introduction. Crohn's disease immunopathogenesis is associated not only with changes in microbiota composition, but also with disrupted interaction with the mucosal immune system as a result of the immunological tolerance breakdown. Existing classical methods do not allow a direct determination of microbiota-reactive lymphocytes baseline frequency.



The article presents a methodology to identify T cells reacting to flagellin, oligomannan, or bacterial lipoprotein, based on surface expression of the activating marker CD154 in combination with intracellular production of cytokines by CD3⁺lymphocytes and allows determining antigen-specific cell subsets in patients with Crohn's disease.

Purpose. To characterize T-lymphocytes subsets reactive to microbiota components in peripheral blood and ileum mucosa and to establish their correlation with autoantibodies production in patients with Crohn's disease.

Materials and methods. The study material was intestinal biopsy material from the ileum and peripheral blood of 16 patients (10 men, 6 women) with Crohn's disease aged from 22.5 to 30.5 years (with average age of 25.0 years). Mucosal lymphoid cells were obtained by programmatic dissociation of intestinal tissues. Lymphoid cells were cultured in the presence of microbiota components for 12 h, after which the number of antigen-specific T cells was estimated by flow cytometry. Statistical processing was performed in GraphPad Prism.

Results. A statistically significant increased T1 and T17 cells numbers were detected in PBLs cultures stimulated with flagellin and lipoprotein in patients with Crohn's disease, which correlated with disease localization ($R=0.54$, $p<0.05$) and phenotype ($R=0.86$, $p<0.05$). Changes only among T-helper 17 cells in response to flagellin ($p<0.05$) and oligomannan ($p<0.01$) were established in IELs cultures of Crohn's disease patients as compared to CG, correlating with circulating flagellin-specific T1 PBLs ($R=0.80$, $p<0.01$). The opposite pattern was observed in LPLs cultures, characterized by increased level in both spontaneous ($p<0.01$) and mannan-specific ($p<0.05$) T1 cells in patients with Crohn's disease relative to CG, depending on disease phenotype ($R=0.85$, $p<0.01$). Mannan-specific mucosal T17 IELs and T1 LPLs were inversely correlated with serum level of ASCA IgG ($R=-0.64$ and $R=-0.86$, $p<0.05$, respectively) in Crohn's disease patients and did not depend on ASCA IgA level.

Conclusion. The study demonstrates the identification of circulating and mucosal microbiota-specific T cells, effector responses of which result in the tissue damage, what should be considered in the comprehensive diagnosis of Crohn's disease.

Keywords: Crohn's disease, mucosal immune cells, antigen-specific immune response, microbiota, T-lymphocytes, autoantibodies, flow cytometry

■ ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Крона представляет собой хроническое аутоиммунное воспалительное заболевание кишечника, характеризующееся мультифакториальной этиологией и генетически обусловленной абберантной иммунной реакцией на компоненты микробиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [1]. Развитие аутоиммунного воспаления при болезни Крона ассоциируется не только с изменением количественного и качественного состава микробиоты, сопровождающимся снижением разнообразия и перераспределением в представителях Firmicutes и Bacteroides с превалированием условно-патогенных и патогенных бактерий, но и с нарушением взаимодействия микробиоты с мукозальной иммунной системой ЖКТ в результате срыва механизмов иммунологической толерантности [2]. Однако до сих пор не выяснено, являются

ли эти эффекты причиной или следствием развития заболевания, что требует детального изучения формирования антиген-индуцированного иммунного ответа на компоненты микробиоты при болезни Крона.

Среди основных предполагаемых эффекторных механизмов повреждения ткани отмечают иммунологические реакции, опосредованные Т-хелперами 1-го и 17-го типов [3]. Однако большинство выполненных в данном аспекте исследований касается характеристики данных популяций в периферической крови, и только единичные исследования рассматривают их реакцию на компоненты микробиоты [4, 5]. Кроме того, особое внимание уделяется продукции аутоантител к компонентам микробиоты, несмотря на то, что их роль считается вторичной в патогенезе болезни Крона [6]. К настоящему времени к потенциальным аутоантигенам, представляющим собой компоненты микробиоты и играющим основную роль в патогенезе болезни Крона, относят бактериальный флагеллин, олигоманнан дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и бактериальный липопротеин [6–8]. В связи с этим высокоактуальными являются исследования мукозальных эффекторных клеток, способных реагировать на потенциальные аутоантигены, и определение их взаимосвязи с циркулирующими в периферической крови микробиота-специфическими Т-лимфоцитами.

Система мукозального иммунитета желудочно-кишечного тракта представлена несколькими клеточными компартментами, классифицируемыми как интраэпителиальные лимфоидные клетки (IELs – англ. Intraepithelial Lymphoid Cells), лимфоциты собственной пластинки слизистых оболочек (LPLs – англ. Lamina Propria Cells), неорганизованные лимфоидные скопления и Пейеровы бляшки. К наиболее перспективным в плане поиска мишеней для таргетной клеточной терапии относят IELs и LPLs, так как данные клетки активно вовлекаются в эффекторную фазу развития мукозального иммунного ответа, в то время как неорганизованные лимфоидные скопления и Пейеровы бляшки отвечают за индуктивную фазу иммунного ответа. Все эти компартменты выполняют протективную и иммунорегуляторную роль, вместе с тем они могут вовлекаться в патологические процессы ЖКТ аутоиммунной природы, что до сих пор является предметом активных дискуссий [9, 10].

Существующие классические методы определения антиген-специфических Т-клеток, праймированных аутоантигеном, включают методы оценки пролиферации Т-клеток (по включению [³H] тимидина, CFSE-метод), секреции цитокинов (ELISA, ELISPOT) и анализ маркеров, индуцированных активацией. Каждый из этих методов имеет свои индивидуальные ограничения в установлении конкретных показателей, а их использование по отдельности не позволяет напрямую определять исходную частоту антиген-реактивных Т-клеток, как и цитокиновый профиль, синтезируемый конкретным лимфоцитом. Предыдущие исследования показали, что CD40L (CD154) сверхэкспрессируется на циркулирующих Т-клетках при болезни Крона, а индукция CD40L участвует в патогенной продукции цитокинов [7]. Используя преимущество данного временно экспрессируемого лиганда, представляется возможным напрямую подсчитать и охарактеризовать антиген-специфические клетки после коротковременной стимуляции, что снижает риск потенциальных фенотипических и функциональных изменений из-за эффектов *in vitro* во время длительного культивирования *ex vivo*. Экспрессию CD154 можно эффективно обнаружить после 7-часовой стимуляции лимфоидных клеток поликлональными стимуляторами или микробными антигенами [11].



Принимая во внимание высокую актуальность изучения состояния специфических мукозальных иммунных клеток в локальном микроокружении аутоиммунного воспаления, в данной статье представлен методологический подход идентификации антиген-специфических Т-лимфоцитов к компонентам микробиоты у пациентов с болезнью Крона на основе экспрессии CD154, индуцированной флагеллином, олигоманнаном или бактериальным липопротеином на циркулирующих и тканерезидентных лимфоцитах в сочетании с внутриклеточной продукцией цитокинов для идентификации субпопуляций Т-хелперов 1-го и 17-го типов, которые принимались за подлинные антиген-специфические Т-клетки у пациентов с болезнью Крона. Кроме того, рассмотрена их взаимосвязь не только между компартментами IELs и LPLs, но и с гуморальным компонентом аутоиммунного воспаления.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Охарактеризовать субпопуляции Т-лимфоцитов, реактивных к компонентам микробиоты, в периферической крови и слизистой оболочке подвздошной кишки и установить их взаимосвязь с продукцией аутоантител у пациентов с болезнью Крона.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования явились биопсийный материал подвздошной кишки и периферическая кровь 16 пациентов (10 мужчин, 6 женщин) с болезнью Крона в возрасте от 22,5 до 30,5 года (X 25,0 года), находившихся на лечении в хирургическом отделении УЗ «Минская областная клиническая больница». Диагноз подтверждался морфологическим исследованием биопсийного материала. Тяжесть болезни Крона устанавливалась в соответствии с Монреальской классификацией воспалительных заболеваний кишечника (ALBP система). Пациенты имели следующие особенности локализации патологического процесса: толстокишечное поражение – 4 пациента, тонкокишечное – 7 пациентов, тонко-толстокишечное – 5 пациентов. Из них у 3 пациентов определялся воспалительный фенотип заболевания, у 5 пациентов – стенозирующий/стриктурирующий и у 6 пациентов – пенетрирующий/свищевой фенотип; у 2 пациентов диагностировалось также перианальное повреждение.

Группу сравнения (ГС) составили 7 пациентов (4 мужчин и 3 женщины) со спаечной болезнью ЖКТ или дивертикулезом в возрасте от 36,0 до 55,0 года (X 46,0), находившихся на лечении в хирургическом отделении УЗ «Минская областная клиническая больница». Все исследуемые пациенты предоставили информированное согласие.

Выделение лимфоидных клеток

Мононуклеары периферической крови (PBLs – англ. peripheral blood lymphocytes) выделяли путем наслаивания разведенной в физиологическом растворе периферической крови на градиент плотности Roti-Sep (CarlRoth, Германия) с последующим центрифугированием в течение 30 мин. при 1500 об/мин (366 g) при 4 °C. Осадок 2-кратно отмывали в физиологическом растворе с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки в течение 10 мин. при 1500 об/мин (366 g). Концентрацию подсчитывали с помощью гематологического анализатора Micros-60 (ABX, Франция).

IELs и LPLs получали из биопсийного материала путем комбинированной диссоциации ткани с использованием автоматизированного диссоциатора gentleMACS (Miltenyi Biotec, Германия) и набора ферментов Lamina Propria Dissociation Kit

(Miltenyi Biotec, Германия). Образец ткани кишки механически измельчали на небольшие фрагменты размером 0,5 см², после чего инкубировали в растворе для первичной диссоциации, представляющем собой раствор Хенкса без Ca²⁺ и Mg²⁺ (LT Biotech, Литва) с добавлением 5 мМ ЭДТА (AppliChem, Германия), 5% фетальной бычьей сыворотки (Carpicorn, Германия), 1 мМ ДТТ (AppliChem, Германия), в течение 20 мин. при 37 °С при непрерывном помешивании. Полученную смесь фильтровали через сетчатый фильтр с порами 100 мкм и повторяли инкубирование в растворе для первичной диссоциации. Объединяли клеточные суспензии IELs и отмывали центрифугированием при 1500 об/мин (366 g) в течение 10 мин. После механической дезагрегации выполняли ферментативную диссоциацию ткани с использованием набора Lamina Propria Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Германия). Ткань кишки помещали в пробирку для клеточной диссоциации, содержащую RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) и ферменты R, A и H в концентрациях согласно инструкции производителя, инкубировали в течение 30 мин. при 37 °С при непрерывном перемешивании. После инкубации пробирки с образцами помещали в программный диссоциатор gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec, Германия) и выполняли дезагрегацию ткани. Полученную клеточную суспензию LPLs отмывали центрифугированием при 1500 об/мин (366 g) в течение 10 мин. Жизнеспособность выделенных клеток IELs и LPLs определяли по окрашиванию трипановым синим.

Культуральный метод

Для оценки антиген-специфического ответа исследуемые иммунные клетки (PBLs, IELs, LPLs) культивировали в концентрации 2×10^5 /лунку в культуральной среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 5% сыворотки АВ (РНПЦ ТиМБ, Беларусь), 1% антибиотика-антимикотика (Elabscience, Китай) и 1% L-глутамина (Elabscience, Китай) в присутствии стимуляторов (см. таблицу) в течение 12 ч. в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 37 °С. За 4 ч. до конца инкубации культуры клеток добавляли 10 мкг/мл брефельдина А (Cayman Chemicals, США).

Метод проточной цитометрии

Количество антиген-реактивных Т-лимфоцитов 1-го и 17-го профиля в клеточных культурах PBLs, IELs и LPLs после *in vitro* стимуляции антигенами микробиоты определяли методом проточной цитометрии. Культуры фиксировали с помощью реагента Inside Fix (Miltenyi Biotec, Германия) в течение 20 мин., отмывали в реагенте Inside Perm (Miltenyi Biotec, Германия) и окрашивали моноклональными антителами

Характеристика антигенных компонентов микробиоты для оценки специфического ответа Т-лимфоцитов

Microbiota antigens used for estimation of T-lymphocytes specific response

Стимулятор	Концентрация стимулятора	Производитель	
Смесь рекомбинатных флагеллинов (Fla)	Рекомбинантный флагеллин (full length, 503 a.a.)	100 нг/мл	Abcam, Великобритания
	Рекомбинантный флагеллин FliA(H) Lys150~Ile448	100 нг/мл	Prospec, США
Олигоманнан (OM) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10 мкг/мл	Sigma-Aldrich, США	
Рекомбинантный бактериальный липопротеин (Lp) Asp1719~Arg2038	100 нг/мл	Cloud-Clone, США	



CD3-APC, CD4-VioBright-B515, CD8-VioGreenTM, IFN- γ -PE, CD14-VioBlue, CD20-VioBlue, CD154-APC-Vio770 в течение 20 мин. при температуре 18–25 °C в темноте в соответствии с инструкцией производителя набора T Cell Analysis Kit (REAffinity™, Miltenyi Biotec, Германия).

Результаты измерения регистрировали на 30 000 Т-лимфоцитов, используя 10-канальный проточный цитометр CytoFlex (Beckman Coulter, США). Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения CytExpert software (version 2.3.0.84, Beckman Coulter, США). Дублеты, клеточный дебрис и CD14⁺ или CD20⁺ клетки исключали из анализа. Среди антиген-специфических лимфоцитов выделяли следующие субпопуляции клеток: CD3⁺CD154⁺ γ IFN⁺ клетки (T1), CD3⁺CD154⁺IL-17⁺ клетки (T17), CD3⁺CD4⁺CD154⁺ γ IFN⁺ клетки (Th1), CD3⁺CD4⁺CD154⁺IL-17⁺(Th17), CD3⁺CD8⁺CD154⁺ γ IFN⁺ клетки (CTL1), CD3⁺CD8⁺CD154⁺IL-17⁺ клетки (CTL17).

Иммуноферментный анализ

Концентрацию аутоантител ASCA IgG и ASCA IgA в сыворотках пациентов исследуемых групп определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием следующих коммерческих наборов: Anti-Saccharomyces cerevisiae ELISA (IgG) (Euroimmun, Германия, аналитическая чувствительность – 1,0 RU/мл) и Anti-Saccharomyces cerevisiae ELISA (IgA) (Euroimmun, Германия, аналитическая чувствительность – 1,0 RU/мл). Все этапы исследований осуществляли в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя. Оптическую плотность исследуемых образцов измеряли на спектрофотометре Sunrise (Tecan, Австрия) при длине волны $\lambda=450$ нм. Пороговым значением (cut-off) считали 20 RU/мл.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных выполняли в программе GraphPad Prism. Нормальность распределения определяли по критерию Шапиро – Уилка. Статистически значимые различия определяли при уровне $p<0,05$. Для характеристики исследуемых групп использовались показатели медианы, нижнего и верхнего процентилей (25-й процентиль ÷ 75-й процентиль). Сравнение групп и определение статистической значимости различий осуществлялось с помощью теста Краскела – Уоллиса с поправкой Данна. Корреляционный анализ выполняли по Спирмену с определением коэффициентов корреляции (R).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика субпопуляций Т-лимфоцитов 1-го и 17-го профиля, специфических к компонентам микробиоты, в периферической крови пациентов с болезнью Крона

Для характеристики циркулирующих и мукозальных Т-лимфоцитов, реактивных к компонентам микробиоты, в исследуемых группах оценивали количество цитокин-синтезирующих активированных клеток с фенотипом CD3⁺CD154⁺ γ IFN⁺ (Т-клетки 1-го цитокинового профиля, T1) и с фенотипом CD3⁺CD154⁺IL-17⁺ клетки (Т-клетки 17-го цитокинового профиля, T17), реагирующих на смесь рекомбинатных флагеллинов (Fla), олигоманнан (OM) Saccharomyces cerevisiae и бактериальный липопротейн (Lp). Кроме того, идентифицировали хелперные субпопуляции Th1 и Th17 (CD3⁺CD4⁺CD154⁺ γ IFN⁺ клетки и CD3⁺CD4⁺CD154⁺IL-17⁺ клетки, соответственно)

и цитотоксические субпопуляции CTL1 и CTL17 ($CD3^+CD8^+CD154^+\gamma IFN^+$ клетки и $CD3^+CD8^+CD154^+IL-17^+$ клетки соответственно), представляющие собой процент от общего числа Т-лимфоцитов.

У пациентов с болезнью Крона установлено статистически значимое увеличение количества Т1-клеток (рис. 1А) и Т17-клеток (рис. 1В) в культурах PBLs, стимулированных компонентами микробиоты: в присутствии флагеллинов – в 1,6 раза (Т1, $p < 0,05$) и 2,6 раза (Т17, $p < 0,01$), липопроотеина А – в 2,0 раза (Т1, $p < 0,05$) и 3,1 раза (Т17, $p < 0,05$) относительно ГС. Соотношение микробиота-реактивных популяций Т1/Т17 определялось как больше 1,0 у пациентов с болезнью Крона ($k_{Fla} = 1,38$; $k_{OM} = 1,16$ и $k_{Lp} = 2,13$), однако за счет выраженной стимуляции Т17-клеток уровень показателей снижался относительно аналогичных в ГС ($k_{Fla} = 2,26$; $k_{OM} = 4,10$ и $k_{Lp} = 3,35$, $p < 0,05$).

При этом количество циркулирующих Fla-специфических Т1-клеток коррелировало с уровнем Fla-специфических Т17-клеток ($R = 0,90$, $p < 0,001$) у пациентов с болезнью Крона. Кроме того, наибольший процент Fla-специфических Т17-лимфоцитов отмечался при тонко-толстокишечной локализации аутоиммунного воспаления ($R = 0,54$, $p < 0,05$), в то время как количество Lp-реактивных Т1-клеток повышалось с увеличением фенотипической тяжести патологического процесса ($R = 0,86$, $p < 0,05$) у пациентов с болезнью Крона согласно Монреальской классификации болезни.

Характеристика субпопуляционного состава показала, что среди Fla-специфических Т1-клеток преимущественно реагировали цитотоксические CTL1-лимфоциты ($p < 0,01$), в то время как среди Fla-реактивных Т17-клеток отвечали как хелперные Th17 ($p < 0,05$), так и цитотоксические CTL17-лимфоциты ($p < 0,05$) в культурах PBLs пациентов с болезнью Крона относительно ГС. В то же время статистически значимых различий в общем количестве маннан-специфических Т1- и Т17-клеток в периферической крови исследуемых групп не было выявлено, однако установлено повышение содержания OM-реактивных CTL17-лимфоцитов ($p < 0,01$) в культурах PBLs у пациентов с болезнью Крона относительно уровня их содержания у пациентов ГС. Полученные результаты свидетельствуют о преимущественно реагирующей на компоненты микробиоты субпопуляции циркулирующих цитотоксических Т-лимфоцитов.

Согласно данным литературы, флагеллин является основным структурным белком жгутиков и обеспечивает подвижность преимущественно грамнегативных комменсальных и патогенных бактерий. Взаимодействуя с паттерн-распознающими рецепторами (TLR5, NLR, CARD) на врожденных иммунных клетках, флагеллин инициирует синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов, участвуя в развитии воспалительной реакции [12]. В отношении клеток приобретенного иммунитета показан двойственный эффект флагеллина: прямая активация через TLR5 [13] и опосредованная через процессинг эпитопов флагеллина дендритными клетками и презентацию $CD3^+CD4^+$ -Т-хелперам с последующей их активацией и дифференцировкой в эффекторные или регуляторные флагеллин-специфические клетки [14]. У пациентов с болезнью Крона флагеллин-специфические $CD3^+CD4^+$ -Т-клетки обнаруживаются как в циркуляции, так и ткани кишки, при этом их профиль характеризуется преимущественно как Т-хелперы 17-го типа [5], что согласуется с нашими данными.

Бактериальный липопротеин, наряду с флагеллином, рядом авторов идентифицирован как потенциальный аутоантиген в иммунопатогенезе воспалительных заболеваний кишечника. В частности, $CD4^+$ -Т-клетки пациентов с болезнью Крона

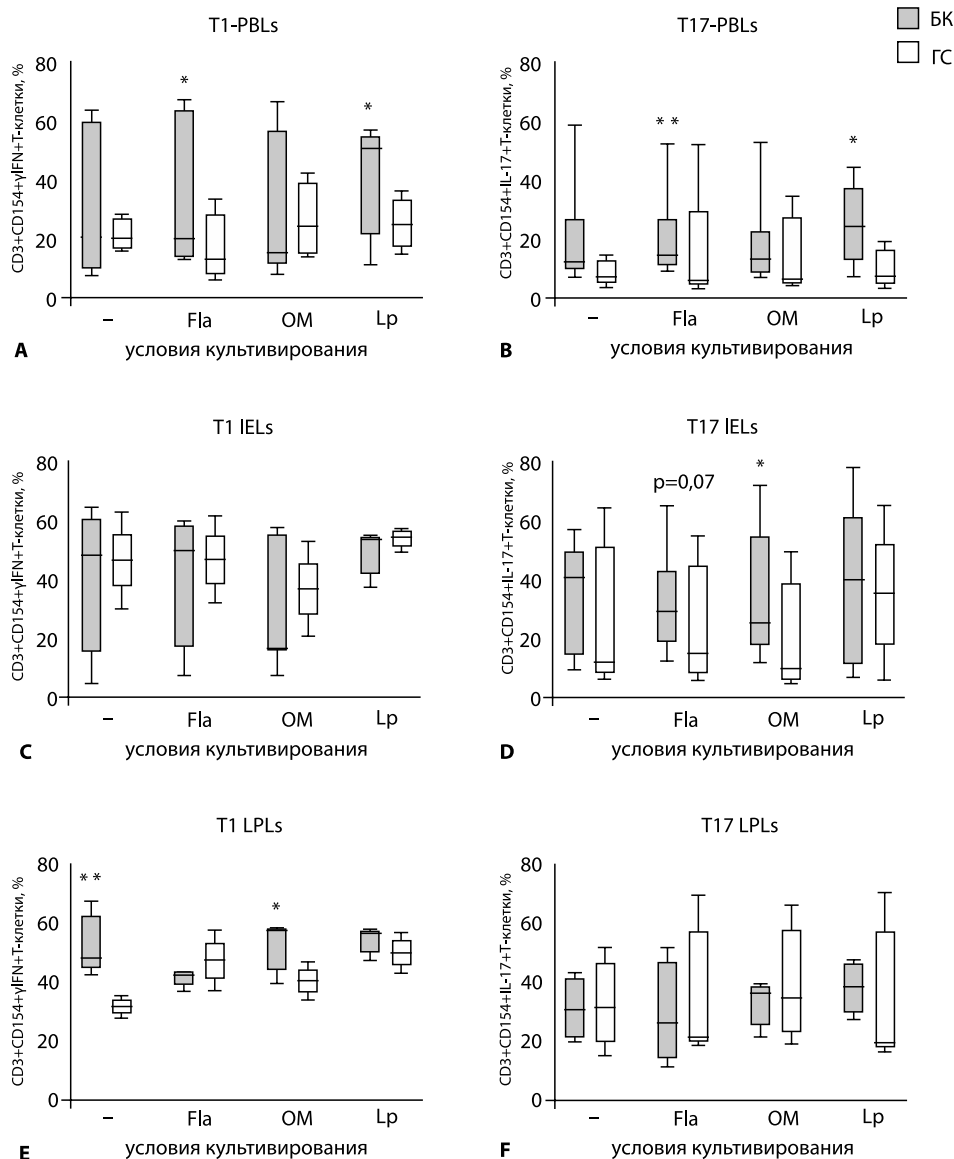


Рис. 1. Количество Т-лимфоцитов 1-го и 17-го профиля, реактивных к компонентам микробиоты, у пациентов с болезнью Крона и группы сравнения, Ме (25; 75)%о: А – Т1-клетки периферической крови, В – Т17-клетки периферической крови, С – интерэпителиальные Т1-клетки, D – интерэпителиальные Т17-клетки, Е – Т1-клетки lamina propria, F – Т17-клетки lamina propria
Fig. 1. Number of profile 1 and 17 T-lymphocytes reactive to microbiota components in Crohn's disease patients and comparison group, Me (25; 75)%о: А – Т1-cells of peripheral blood, В – Т17-cells of peripheral blood, С – intraepithelial Т1-cells, D – intraepithelial Т17-cells, Е – Т1-cells of lamina propria, F – Т17-cells of lamina propria

Примечания: PBLs – лимфоциты периферической крови, IELs – интерэпителиальные лимфоциты, LPLs – лимфоциты lamina propria, Fla – флагеллин, OM – олигоманнан, Lp – липопроtein, БК – пациенты с болезнью Крона, ГС – группа сравнения, Ме (25; 75)%о – медиана, 25-й и 75-й процентиля; * p<0,05; ** p<0,01.

демонстрировали повышенный ответ на него с преобладанием Th17-клеточного фенотипа, по сравнению с характером аналогичной реакции клеток у пациентов здоровой группы. Однако патогенетическая значимость бактериального липопротеина практически не изучена, что дает основание не рассматривать его в качестве иммунодоминантного аутоантигена [5].

Характеристика субпопуляций Т-лимфоцитов 1-го и 17-го профиля, специфических к компонентам микробиоты, в ткани кишки пациентов с болезнью Крона

Для оценки мукозального специфического иммунного ответа проведены аналогичные исследования в слизистой оболочке подвздошной кишки с характеристикой субпопуляционного состава среди микробиота-реактивных цитокин-синтезирующих субпопуляций в культурах IELs и LPLs исследуемых групп. Несмотря на то, что оба компартмента отвечают за формирование эффекторной фазы иммунного ответа в слизистых оболочках ЖКТ, их субпопуляционный состав различается: среди IELs доминируют преимущественно киллерные клетки с выраженным цитолитическим потенциалом (CTL), который помогает регулировать взаимодействие IELs с эпителиальными клетками, микробиотой и люминальными антигенами ЖКТ, в то время как среди LPLs преобладают хелперные лимфоциты (Th) [10]. Это, в свою очередь, определяет необходимость сравнительной характеристики антиген-специфических IELs и LPLs в условиях аутоиммунного воспаления.

Показано, что в культурах IELs пациентов с болезнью Крона регистрировались изменения только среди клеток профиля T17 (рис. 1D), характеризующиеся повышением (в частности, за счет субпопуляции IL-17-синтезирующих Th17) в ответ на флагеллины ($p < 0,05$) и олигоманнан ($p < 0,01$), в то время как среди клеток профиля T1 статистически значимых изменений не выявлено относительно ГС (рис. 1C). При этом установлена корреляция количества мукозальных Fla-реактивных T17 IELs с циркулирующими Fla-специфическими T1 PBLs ($R = 0,80$, $p < 0,01$) у пациентов с болезнью Крона, что позволяет выделять данную популяцию антиген-специфических клеток в качестве кандидата на потенциальный биомаркер эффекторного повреждения ткани кишки. Тем не менее данная популяция мукозальных клеток не зависела от локализации или фенотипа патологического процесса. Известно, что наряду с Th17 источником IL-17 может являться субпопуляция неклассических $\gamma\delta$ T-лимфоцитов, составляющая 15–30% от всех IELs и способная намного быстрее синтезировать данный цитокин на больших уровнях относительно классических T-клеток [15].

В культурах LPLs наблюдалась противоположная культурам IELs картина: у пациентов с болезнью Крона регистрировалось статистически значимое повышение как спонтанного ($p < 0,01$), так и OM-специфического ($p < 0,05$) уровня T1-клеток (рис. 1E) при отсутствии различий среди T17-лимфоцитов (рис. 1F) в сочетании с установленной тенденцией к снижению субпопуляции Fla-специфических Th17 ($p = 0,07$) относительно ГС. При этом на олигоманнан преимущественно реагировала субпопуляция цитотоксических CTL1 клеток ($p < 0,05$), обратно пропорционально коррелирующая с локализацией аутоиммунного процесса ($R = -0,86$, $p < 0,05$), что обуславливает преимущественную реализацию эффекторных механизмов в тонкой кишке, и прямо пропорционально зависящая от тяжести фенотипа болезни ($R = 0,85$, $p < 0,01$). Однако



в данном исследовании не выявлено взаимосвязи LPLs с циркулирующими или мукозальными клетками других компартментов, что, возможно, определяет их отличную от других функциональную роль в поддержании и развитии специфического аутоиммунного воспаления в ЖКТ.

Согласно данным литературы, маннан не только представляет собой компонент пекарских дрожжей *S. cerevisiae*, но и входит в состав клеточной стенки *Candida albicans*, *Mycobacterium bovis*, *Micobacterium chelonae*. В норме маннан ингибирует пролиферацию лимфоцитов, но при болезни Крона имеет обратный эффект, усиливая пролиферацию Т-клеток, что объясняется потерей толерантности к кишечным антигенам [6]. Маннан, будучи нетипичным Т-клеточным антигеном, способен влиять на врожденный и приобретенный иммунный ответ разными путями. Антигенная роль маннана *S. cerevisiae* до сих пор не установлена, при этом известно, что он является сильным активатором макрофагов, распознающих его с помощью маннозного рецептора или CD1b-рецептора, и В-лимфоцитов, а ASCA продукция может быть и Т-зависимой природы. При болезни Крона показано, что маннан способен активировать лимфоциты и усиливать ими продукцию провоспалительных цитокинов, в частности TNF α , вне зависимости от активности болезни, что указывает на его иницирующую роль в поддержании воспаления и гиперответа на компоненты микробиоты [6, 16]. Обнаружение ASCA косвенно указывает на роль маннана в качестве аутоантигена, однако это до сих пор остается дискуссионным вопросом. Проведенное в 2023 г. Martinini и соавторами исследование определило, что воздействие пищевых дрожжей приводит к повышению реактивности Т-хелперных клеток 1-го типа как в крови, так и в биопсийной слизистой ткани, что было специфично для пациентов с болезнью Крона. Установлено, что повторное воздействие комменсальных дрожжевых антигенов инициирует каскад нисходящих реакций, способствующих повышенной цитотоксичности, хронической активации Т-клеток, повреждению слизистого барьера и усилению воспаления [4].

Характеристика продукции аутоантител к олигоманнану *Saccharomyces cerevisiae* у пациентов с болезнью Крона

Серологические, как и клеточные, маркеры также характеризуются высокой специфичностью и могут играть важную роль как в первичной диагностике болезни Крона, так и в ее прогрессировании или при уточнении диагноза неклассифицированных воспалительных заболеваний кишечника до оперативного вмешательства, что было нами показано в предыдущих исследованиях [17]. В связи с выявленными маннан-реактивными популяциями Т-лимфоцитов (профиля Т17 среди IELs и профиля Т1 среди LPLs) у пациентов с болезнью Крона охарактеризован специфический гуморальный иммунный ответ по продукции сывороточных аутоантител к олигоманнану *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) класса IgA и IgG. Результаты исследования частоты встречаемости и концентрации ASCA в сыворотке пациентов с болезнью Крона представлены на рис. 2.

В сыворотке пациентов с болезнью Крона ASCA IgA и IgG определялись соответственно в 56% (рис. 2A) и 22% (рис. 2B) случаев, их уровень превышал аналогичные показатели в ГС ($p < 0,001$). При этом у пациентов с болезнью Крона во всех серопозитивных образцах выявлялись антитела класса IgA (100%) и реже – антитела класса IgG (40%). Отличительной особенностью антител ASCA класса IgG являлся

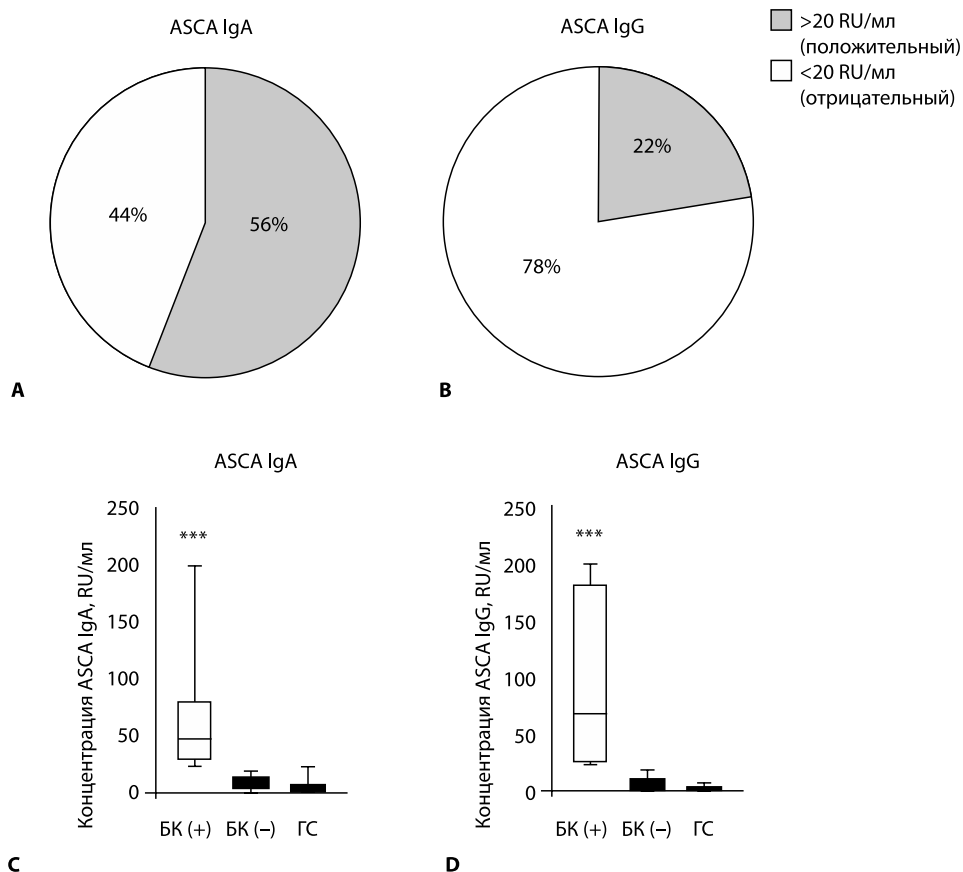


Рис. 2. Уровень аутоантител ASCA IgA и IgG в сыворотке пациентов с болезнью Крона и группы сравнения, Me (25; 75)%: А – соотношение пациентов с БК с положительным и отрицательным уровнем аутоантител ASCA IgA, В – соотношение пациентов с БК с положительным и отрицательным уровнем аутоантител ASCA IgG, С – концентрация аутоантител ASCA IgA в исследуемых группах, D – концентрация аутоантител ASCA IgG в исследуемых группах
Fig. 2. Serum levels of ASCA IgA and IgG in Crohn's disease patients and comparison group, Me (25; 75)%: А – ratio of Crohn's disease patients with positive and negative ASCA IgA level, В – ratio of Crohn's disease patients with positive and negative ASCA IgG level, С – ASCA IgA concentration in investigated groups, D – ASCA IgG concentration in investigated groups

Примечания: БК (+) – пациенты с БК с положительным уровнем аутоантител, БК (-) – пациенты с БК с отрицательным уровнем аутоантител, ГС – группа сравнения, Me (25; 75)% – медиана, 25-й и 75-й процентиля; *** $p < 0,001$.

их высокий сывороточный уровень в образцах серопозитивных пациентов с болезнью Крона: ASCA IgG – 81,1 (27,3 ÷ 150,3) RU/мл (рис. 2C) vs ASCA IgA – 47,9 (30,2 ÷ 64,4) RU/мл (рис. 2D). При этом концентрация ASCA IgA коррелировала с уровнем ASCA IgG в сыворотке пациентов с болезнью Крона ($R=0,72$, $p < 0,001$). В ГС количественные показатели ASCA IgA и IgG составили <20 RU/мл, что соответствовало серонегативному результату.



Для установления взаимосвязи маннан-специфического клеточного и гуморального иммунного ответа у пациентов с болезнью Крона проведен корреляционный анализ маннан-реактивных мукозальных Т-клеток 1-го и 17-го профиля с сывороточной концентрацией аутоантител ASCA IgA и ASCA IgG. Установлено, что выявленные повышенные уровни маннан-специфических T17 IELs и T1 LPLs в ткани кишки обратно пропорционально коррелировали с концентрацией ASCA IgG ($R=-0,64$, $p<0,05$ и $R=-0,86$, $p<0,05$ соответственно) в сыворотке пациентов и не зависели от продукции ASCA IgA. Полученные результаты предполагают автономный механизм действия эффекторных реакций клеточной и гуморальной природы, что еще раз подчеркивает мультинаправленность развития аутоиммунного воспаления при болезни Крона.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный методологический подход позволяет определять Т-лимфоциты, реактивные к компонентам микробиоты, демонстрируя превалирование различных циркулирующих и мукозальных Т-клеточных субпопуляций в зависимости от компартмента иммунной системы. У пациентов с болезнью Крона среди мукозальных IELs преимущественно реагируют Т-клетки 17-го профиля в ответ на флагеллин и маннан, в то время как в lamina propria идентифицируется ответ маннан-специфических Т-лимфоцитов 1-го профиля. В то же время в периферической крови определяются флагеллин- и липопротеин-специфические Т-клетки обоих профилей. Несмотря на отсутствие циркулирующих маннан-специфических Т-лимфоцитов, в сыворотке периферической крови у большинства пациентов с болезнью Крона идентифицируются маннан-специфические антитела.

Выявлена различная локализация микробиота-специфических Т-клеток, эффекторные реакции которых приводят к основному повреждению ткани, что необходимо учитывать как при комплексной иммунологической диагностике болезни Крона (включая корректный выбор биологического материала пациентов – периферическая кровь против биопсийного материала и лабораторного метода исследования – проточная цитометрия против иммуно(cito)гистохимии), так и при поиске новых терапевтических мишеней.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ahluwalia B, Moraes L, Magnusson M.K., Öhman L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2018;53(4):379–389. doi: 10.1080/00365521.2018.1447597
2. Calvez V, Puca P, Di Vincenzo F, Del Gaudio A, Bartocci B, Murgiano M, Iaccarino J, Parand E, Napolitano D, Pugliese D, Gasbarrini A, Scaldaferrri F. Novel Insights into the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Biomedicines*. 2025;13(2):305. doi: 10.3390/biomedicines13020305
3. Cao H, Diao J, Liu H, Liu S, Liu J, Yuan J, Lin J. The Pathogenicity and Synergistic Action of Th1 and Th17 Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2023;29(5):818–829. doi: 10.1093/ibd/izac199
4. Martini G.R., Tikhonova E., Rosati E. et al. Selection of cross-reactive T cells by commensal and food-derived yeasts drives cytotoxic T_H1 cell responses in Crohn's disease. *Nat Med*. 2023;29:2602–2614. doi: 10.1038/s41591-023-02556-5
5. Calderón-Gómez E, Bassolas-Molina H, Mora-Buch R, Dotti I, Planell N, Esteller M, Gallego M, Martí M, Garcia-Martin C, Martínez-Torró C, Ordás I, Singh S, Panés J, Benítez-Ribas D, Salas A. Commensal-Specific CD4(+) Cells From Patients With Crohn's Disease Have a T-Helper 17 Inflammatory Profile. *Gastroenterology*. 2016;151(3):489–500.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2016.05.050
6. Sendid B, Cornu M, Cordier C, Bouckaert J, Colombel J.F., Poulain D. From ASCA breakthrough in Crohn's disease and *Candida albicans* research to thirty years of investigations about their meaning in human health. *Autoimmunity Reviews*. 2024;23(2):103486. doi: 10.1016/j.autrev.2023.103486
7. Morgan N.N., Duck L.W., Wu J, Rujani M, Thomes P.G., Elson C.O., Mannon P.J. Crohn's Disease Patients Uniquely Contain Inflammatory Responses to Flagellin in a CD4 Effector Memory Subset. *Inflamm Bowel Dis*. 2022;28(12):1893–1903. doi: 10.1093/ibd/izac146
8. Van Bodegraven A.A., Meuwissen S.G. Lipoprotein (a), thrombophilia and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001;13(12):1407–9. doi: 10.1097/00042737-200112000-00002

9. Velikova T, Kaouri I.E., Bakopoulou K., Gulina M., Naydenova K., Dimitrov M., Peruhova M., Lazova S. Mucosal Immunity and Trained Innate Immunity of the Gut. *Gastroenterology Insights*. 2024;15(3):661–675. doi: 10.3390/gastroent15030048
10. White Z., Cabrera I., Kapustka I., Sano T. Microbiota as key factors in inflammatory bowel disease. *Front Microbiol*. 2023;14:1155388. doi: 10.3389/fmicb.2023.1155388
11. Hegazy A.N., West N.R., Stubbington M.J.T., Wendt E., Suijker K.I.M., Datsi A., et al. Circulating and Tissue-Resident CD4⁺ T Cells With Reactivity to Intestinal Microbiota Are Abundant in Healthy Individuals and Function Is Altered During Inflammation. *Gastroenterology*. 2017;153(5):1320–1337.e16. doi: 10.1053/j.gastro.2017.07.047
12. Cook L., Lisko D.J., Wong M.Q., Garcia R.V., Himmel M.E., Seidman E.G., Bressler B., Levings M.K., Steiner T.S. Analysis of Flagellin-Specific Adaptive Immunity Reveals Links to Dysbiosis in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2020;9(3):485–506. doi: 10.1016/j.jcmgh.2019.11.012
13. Hajam I.A., Dar P.A., Shahnawaz I., Jaume J.C., Lee J.H. Bacterial flagellin-a potent immunomodulatory agent. *Exp Mol Med*. 2017;49(9):e373. doi: 10.1038/emm.2017.172
14. Alexander K.L., Zhao Q., Reif M., Rosenberg A.F., Mannon P.J., Duck L.W., Elson C.O. Human Microbiota Flagellins Drive Adaptive Immune Responses in Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2021;161(2):522–535. doi: 10.1053/j.gastro.2021.03.064
15. Schmitt H., Neurath M.F., Atreya R. Role of the IL23/IL17 Pathway in Crohn's Disease. *Front. Immunol*. 2021;12:622934. doi: 10.3389/fimmu.2021.622934
16. Zonna X., Banta C., Hossein-Javaheeri N. The Association Between Crohn's Disease and Patient Response to Yeast: A Review of the Literature. *Gastroenterology Insights*. 2024;15(4):1064–1074. doi: 10.3390/gastroent15040073
17. Nizhegorodova D., Adamovich A., Ivanchyk G., Dybov O., Kulnich S., Shadrina V., Vorobei A., Zafranskaya M. Antibody profile in patients with inflammatory bowel diseases. *Immunopathology, allergology, infectology*. 2020;3:30–38. doi: 10.14427/jipai.2020.3.30 (in Russian)