

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКТОНУКЛЕОТИДАЗЫ CD39 В РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТКАХ У ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

Радыгина Т.В.¹, Сорокина Е.Г.¹, Петричук С.В.¹, Купцова Д.Г.¹,
Курбатова О.В.¹, Потапов А.С.^{1, 2}, Афанасьева С.А.¹

¹ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. В связи с ростом заболеваемости и распространенности воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) поиск прогностических маркеров эффективности проводимой терапии является актуальной проблемой. Дисбаланс между Th17-лимфоцитами и регуляторными Т-клетками (Treg) является ключевым дефектом иммунной системы, приводящим к ВЗК. Внеклеточный АТФ, образующийся при повреждении тканей, обладает провоспалительным эффектом и способствует дифференцировке Th17-клеток. Эктонуклеотидаза CD39 катализирует дефосфорилирование АТФ до АМФ с последующим превращением в аденозин под действием CD73. CD39 экспрессируется в разных типах клеток, в том числе в Treg. Цель — оценить функциональную активность CD39⁺ в Treg у детей с ВЗК с помощью люциферин-люциферазного метода.

Обследовано 68 детей с ВЗК. Из них 28 детей были в состоянии ремиссии, 40 — в обострении. Оценку количества Treg (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}), экспрессирующих CD39, проводили методом проточной цитометрии. Концентрацию АТФ в супернатантах и клетках определяли с помощью люциферин-люциферазного теста. Результаты представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Достоверность различий между группами оценивали с использованием непараметрического U-критерия Манна—Уитни.

Относительное количество CD39⁺Treg у пациентов в ремиссии ВЗК было достоверно выше, чем у пациентов в состоянии обострения. Снижение концентрации АТФ под действием CD39⁺Treg у пациентов с ВЗК происходило сразу при добавлении экзогенного АТФ. АТФ у пациентов в ремиссии снижалось на 44,5% (Me 54,5 (41,5-65,9)), у пациентов в обострении — на 32,5% (Me 67,5 (59,7-71,3)).

Адрес для переписки:

Радыгина Татьяна Вячеславовна
ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ
119991, Россия, Москва, Ломоносовский пр., 2, стр. 1.
Тел: 8 (499) 134-13-98.
Факс: 8 (499) 134-70-01.
E-mail: radigina.tv@nczd.ru

Address for correspondence:

Tatiana V. Radygina
National Medical Research Center of Children's Health
2 bldg 1 Lomonosovsky Ave
Moscow
119991 Russian Federation
Phone: +7 (499) 134-13-98.
Fax: +7 (499) 134-70-01.
E-mail: radigina.tv@nczd.ru

Образец цитирования:

Т.В. Радыгина, Е.Г. Сорокина, С.В. Петричук, Д.Г. Купцова, О.В. Курбатова, А.С. Потапов, С.А. Афанасьева «Оценка функциональной активности эктонуклеотидазы CD39 в регуляторных Т-клетках у детей с воспалительными заболеваниями кишечника» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 2. С. 415-422. doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2616

© Радыгина Т.В. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T.V. Radygina, E.G. Sorokina, S.V. Petrichuk, D.G. Kuptsova, O.V. Kurbatova, A.S. Potapov, S.A. Afanasyeva "Evaluation of the functional activity of CD39 ectonucleotidase in regulatory T cells in children with inflammatory bowel diseases", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 2, pp. 415-422.

doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2616

© Radygina T.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2616

При этом у пациентов в состоянии ремиссии снижение содержания АТФ через 5 минут реакции было достоверно выше, чем у пациентов в состоянии обострения ($p = 0,01$), через 35 минут реакции достоверной разницы не выявлено. Показано, что образцы с меньшим количеством клеток и меньшей интенсивностью экспрессии CD39 в Treg имели большую активность эктонуклеотидазы CD39.

Для эффективного гидролиза АТФ, помимо количества CD39 в Treg, важна их функциональная активность. Оценка каталитической активности CD39 в Treg у пациентов с ВЗК наиболее информативна в первые минуты после добавления экзогенной АТФ. У пациентов в состоянии ремиссии каталитическая активность CD39 в Treg была выше, чем у пациентов в состоянии обострения.

Ключевые слова: Treg, CD39, гидролиз, АТФ, ВЗК, дети

EVALUATION OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF CD39 ECTONUCLEOTIDASE IN REGULATORY T CELLS IN CHILDREN WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

Radygina T.V.^a, Sorokina E.G.^a, Petrichuk S.V.^a, Kuptsova D.G.^a,
Kurbatova O.V.^a, Potapov A.S.^{a, b}, Afanasyeva S.A.^a

^a National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

^b I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. In connection with the increasing incidence and prevalence of inflammatory bowel disease (IBD), the search for prognostic markers of the effectiveness of therapy is an urgent problem. An imbalance between Th17 lymphocytes and regulatory T cells (Treg) is a major defect in the immune system leading to IBD. Extracellular ATP produced during tissue damage, rebound pro-inflammatory effects, and activates Th17 cell differentiation. Ectonucleotidase CD39 catalyzes the dephosphorylation of ATP to AMP, followed by conversion to adenosine by CD73. CD39 is expressed in various cell types, including Treg. Aim – evaluate the functional activity of CD39⁺ in Treg in children with IBD using the luciferin-luciferase method.

68 children with IBD were examined. Of these, 28 children were in remission, 40 were in exacerbation. The number of Tregs (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}) expressing CD39 was estimated by flow cytometry. The ATP concentration in supernatants and cells was determined using the luciferin-luciferase test. Results are presented as median (Me) and quartiles (Q_{0.25}-Q_{0.75}). The significance of differences between groups was assessed using the nonparametric Mann–Whitney U test.

The relative number of CD39⁺Treg in patients in remission of IBD was significantly higher than in patients in a state of exacerbation. A decrease in ATP concentration under the influence of CD39⁺Treg in patients with IBD occurred immediately upon the addition of exogenous ATP. ATP in patients in remission decreased by 44.5% (Me 54.5 (41.5-65.9)), in patients in exacerbation – by 32.5% (Me 67.5 (59.7-71.3)). At the same time, in patients in remission, the decrease in the ATP content after 5 minutes of the reaction was significantly higher than in patients in the state of exacerbation ($p = 0.01$), after 30 minutes of the reaction, no significant difference was found. It was shown that samples with a smaller number of cells and a lower intensity of CD39 expression in Treg had a higher activity of CD39 ectonucleotidase.

For efficient ATP hydrolysis, in addition to the amount of CD39 in Treg, their functional activity is important. The assessment of the catalytic activity of CD39 in Treg in patients with IBD is most informative in the first minutes after the addition of exogenous ATP. In patients in remission, the catalytic activity of CD39 in Treg was higher than in patients in a state of exacerbation.

Keywords: Treg, CD39, ATP, hydrolysis, IBD, children

Введение

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) относятся к иммунопатологическим заболеваниям, характеризующимся прогрессиру-

ющим хроническим воспалительно-деструктивным поражением желудочно-кишечного тракта [1]. Основными формами ВЗК являются болезнь Крона (БК) и язвенный колит [11]. В современном понимании ВЗК возникают у

генетически предрасположенных людей при нарушении регуляции иммунного ответа, направленного против компонентов кишечной микрофлоры [11]. Поиск прогностических маркеров для оценки эффективности лечения ВЗК остается актуальной проблемой. Отмечено увеличение распространенности и заболеваемости ВЗК в России [2]. Точных данных о заболеваемости и распространенности ВЗК у детей в России нет, за исключением отдельных регионов [1].

Ключевым дефектом иммунной системы, приводящим к ВЗК, считается дисбаланс между Th17-лимфоцитами и T-регуляторными клетками (Treg) [3, 9, 14]. Известно, что для дифференцировки Th17-лимфоцитов необходима внеклеточная аденозинтрифосфорная кислота (АТФ), которая образуется из поврежденных клеток и относится к DAMPs сигналам (damage associated molecular patterns) [13]. При адекватном иммунном ответе внеклеточная АТФ может быть дефосфорилирована до аденозина, обладающего противовоспалительными свойствами. Эктонуклеотидаза CD39 (CD39 – ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, E-NTPDase1) катализирует превращение АТФ в аденозинмонофосфат с последующим гидролизом с помощью эктонуклеотидазы CD73 (CD73 – ecto-5'-nucleotidase, Ecto5'NTase) до аденозина [6]. Эктонуклеотидазы экспрессируются в различных популяциях лимфоцитов, в том числе в Treg и Th17-клетках [15]. Показано, что высокая экспрессия CD39 в циркулирующих Treg коррелирует с клинической и эндоскопической ремиссией у пациентов с ВЗК [7].

Работ по оценке ферментативной активности эктонуклеотидазы CD39 крайне мало, и они противоречивы. Например, у пациентов с аутоиммунным гепатитом было показано снижение активности эктонуклеотидазы CD39 в Treg [8]. В другой работе у пациентов с рассеянным склерозом наоборот было продемонстрировано увеличение активности CD39 вне зависимости от проводимой терапии [4].

Для определения ферментативной активности эктонуклеотидазы CD39 используют различные методы. Косвенная оценка активности CD39 после добавления к клеткам АТФ возможна по изменению концентрации свободного фосфата с использованием набора для колориметрического анализа Sensolyte® (AnaSpec, Seraing, Бельгия) [10]. Другой метод измерения каталитической активности эктонуклеотидазы CD39 возможен по изменению концентрации не гидролизованного АТФ путем измерения частоты люминесцентных событий в системе обнаружения на основе люциферазы (ATP Lite Luminescence System, Perkin-Elmer) [8].

Целью настоящей работы было оценить функциональную активность CD39⁺ в Treg у детей с ВЗК с помощью люциферин-люциферазного метода.

Материалы и методы

Было проведено обследование 68 детей с ВЗК. На основании педиатрических индексов активности болезни PCDAI/PUCAI (значение индекса < 10 соответствовало состоянию ремиссии, > 10 – обострению) дети были разделены на группы: в состоянии обострения было 40 пациентов, в состоянии ремиссии – 28 пациентов.

Для определения активности CD39⁺ в Treg из цельной венозной крови выделяли мононуклеарные лимфоциты (PBMC) после центрифугирования в градиенте плотности Histopaque – 1,077 г/см³ (Sigma-Aldrich, США). Клетки PBMC окрашивали с помощью моноклональных антител: CD4-FITC (cat. A07750, Beckman Coulter, США), CD127-PE (cat. IM 10980U, Beckman Coulter, США), CD25-PC7 (cat. A52882, Beckman Coulter, США), CD39-APC-Cy7 (Clone A1, cat. RT2241130 Sony Biotechnology, США). Количество CD39⁺Treg клеток оценивали с помощью проточной цитометрии (Novocyte, ACEA Biosciences, США). Использовали тактику последовательного гейтирования для выделения Treg (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}), экспрессирующих CD39. Сортировку PBMC для получения популяции Treg проводили с помощью Cell Sorter SH800S (Sony, Япония). Из каждого образца PBMC собирали по 100 тысяч клеток Treg в среде TechMACS GMP Medium (США), оптимальную для поддержания жизнеспособности Treg. После сортировки жизнеспособность клеток оценивали с помощью красителя 7-ADD, и она составляла не менее 98%. Далее клетки помещали в CO₂ инкубатор при 37 °C на сутки.

После 24 часов инкубации в суспензии клеток оценивали количество Treg, экспрессирующих CD39⁺ и интенсивность его флуоресценции (FI) с помощью проточной цитометрии.

Для оценки гидролиза АТФ клетки центрифугировали при 300 G в течение 5 минут. Готовили 3 пробы суспензии клеток по 200 мкл каждая. Супернатант пробы 1 использовали для измерения фонового значения собственной АТФ клеток. К пробе 2 и 3 добавляли по 10 мкл 500 мкМ АТФ (Sigma-Aldrich, США) до конечной концентрации 25 мкМ. Пробу 2 сразу после добавления АТФ центрифугировали при 300 G, при 4 °C, в течение 5 минут. Пробу 3 инкубировали в темноте на водяной бане при 37 °C, в течение 30 минут. Далее суспензию центрифугировали при 300 G, при 4 °C, в течение 5 минут. Супернатанты пробы 2 и 3 использовали в реакции.

Содержание АТФ определяли в супернатантах с помощью люциферин-люциферазы (Promega, США) в 0,1 М Tris acetate буфере при pH 7,75 [5]. Содержание АТФ в клетках определяли с помощью модифицированного люциферин-люциферазного теста [12]. Для этого к ним добавляли 2% трихлоруксусную кислоту / 2мМ ЭДТА с последующей нейтрализацией 3М КОН / 1,5М Tris acetate буфером [5].

Люминесценцию определяли с использованием многофункционального мультипланшетного считывателя Clariostar (BMG, Германия). Измерение проводили в пробах (110 мкл Tris acetate буфера + 50 мкл образца) сразу после добавления люциферин-люциферазы (40 мкл). Величину люминесценции соотносили с калибровочной кривой, сохраняющей линейность в диапазоне от 0,5 (500 нМ) до 50 мкМ АТФ. Активность CD39 АТФ-азы (%АТФ) определяли по разнице между пробой 1 и пробой 2, между пробой 1 и 3 и выражали в % к 1 точке, принимаемой за 100%.

Для анализа данных пациенты с ВЗК были разделены на группы по количеству CD39⁺Treg (1-я и 2-я группы) и интенсивности флуоресценции (3-я и 4-я группы) CD39 в Treg: 1-я группа – < 300 кл/мкл; 2 группа – > 800 кл/мкл; 3-я группа – флуоресценция (F1 в MFI – средняя интенсивность флуоресценции) в диапазоне от 2,3 до 4,6 MFI; 4-я группа – F1 в диапазоне от 6,85 до 7 MFI.

Исследование получило одобрение локального этического комитета ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» МЗ РФ (протокол № 6, 11.06.19 г). Перед исследованием было получено информированное согласие родителей в соответствии с Хельсинкской декларацией.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica 7.0 (StatSoft, США). Описательная статистика количественных признаков представлена в формате: медиана (нижние и верхние квартили) – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Достоверность различий между группами оценивали с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при p < 0,05.

Результаты и обсуждение

Экспрессия CD39⁺ в Treg при обострении и ремиссии ВЗК

Анализ количества Treg, экспрессирующих CD39, у пациентов с ВЗК в состоянии ремиссии и обострения показал достоверное снижение относительного количества CD39⁺Treg при обострении: Me 18,9 (10,9-36,5) при обострении против Me 34,8 (24,7-38,4) в ремиссии, p = 0,002. Полученные данные согласуются с данными Gibson D (2015) о корреляции экспрессии CD39 в циркулирующих Treg с клинической и эндоскопической ремиссией у пациентов с ВЗК [7]. Распределение пациентов по относительному количеству CD39⁺Treg в состоянии обострения и ремиссии показано на рисунке 1. Оказалось, что у большинства пациентов в ремиссии заболевания (87,5%) относительное количество CD39⁺ в Treg было больше 20%. Распределение пациентов в обострении описывается кривой с двумя пиками. У 52% пациентов в состоянии обострения ВЗК содержание CD39⁺ в Treg было более 20%, у 48% пациентов – менее 20% (рис. 1).

Можно предположить, что у пациентов в обострении с высоким количеством CD39⁺Treg сни-

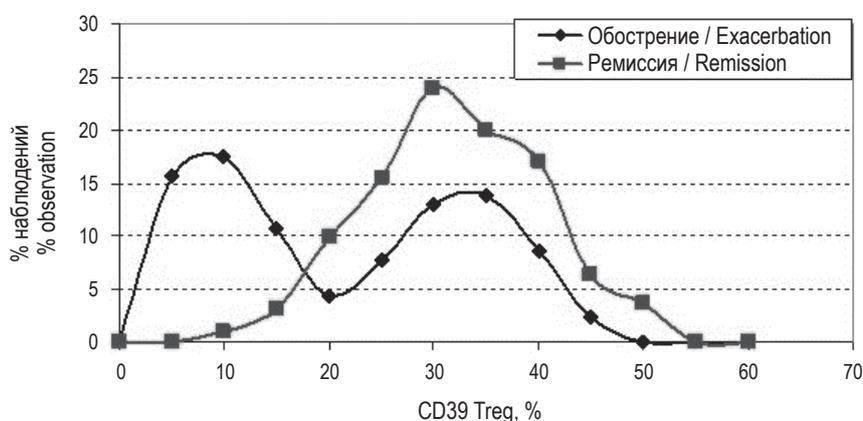


Рисунок 1. Относительное число клеток, экспрессирующих CD39 в Treg у пациентов в состоянии обострения и ремиссии ВЗК

Figure 1. Relative number of cells expressing CD39 in Treg in patients in IBD exacerbation and remission

жена активность эктонуклеотидазы CD39, как это было описано при аутоиммунном гепатите [4]. Таким образом, помимо количества CD39⁺ в Treg важна и оценка их функциональной активности.

Измерение ферментативной активности CD39⁺ в Treg у пациентов с ВЗК

Для оценки каталитической активности эктонуклеотидазы CD39 было проведено исследование динамики снижения экзогенно добавленного АТФ к CD39⁺Treg. В клеточном осадке всех исследованных образцов АТФ определялась в следовых количествах – Me 0,029 (0,021-0,031) мкМ.

Анализ динамики снижения концентрации экзогенно добавленной АТФ у пациентов с ВЗК показал, что в первые 5 минут реакции (2 точка на графике) АТФ падает с 25 мкМ до 15,3 (13,6-17,5) мкМ – на 39% от исходного уровня. Через 30 минут инкубации при 37 °С (3 точка) уровень АТФ продолжает снижаться и составляет 11,4 (9,2-12,6) мкМ, 54,4% от исходного уровня (рис. 2). Наши данные согласуются с исследованием Moncigieff Н о наличии АТФ-азной активности CD39⁺ клеток из РВМС, детектируемой при комнатной температуре [10].

Оценка гидролиза АТФ у пациентов с ВЗК

Учитывая большой разброс показателей концентрации АТФ во 2 и 3 точке, был проведен анализ динамики снижения АТФ у пациентов в состоянии обострения и ремиссии.

Реакция гидролиза АТФ начинается сразу после добавления экзогенного АТФ. В состоянии ремиссии концентрация АТФ через 5 минут реакции падает на 44,5% (Me 54,5 (41,5-65,9)), в то

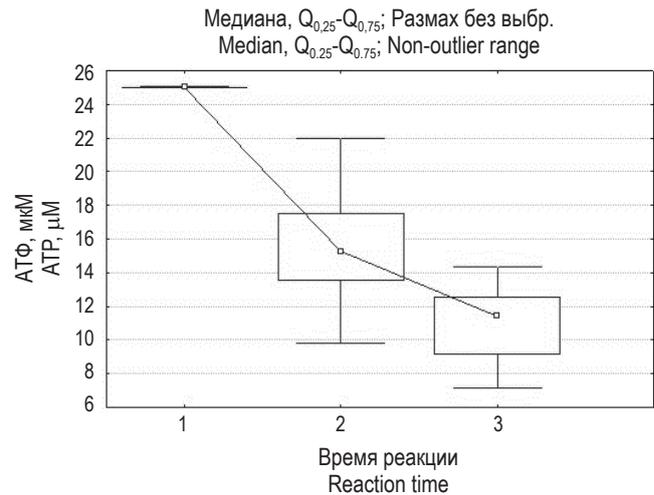


Рисунок 2. Динамика снижения АТФ у пациентов с ВЗК

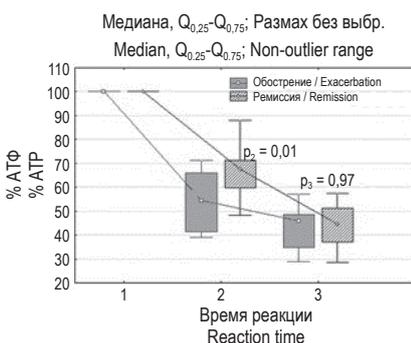
Примечание. По оси абсцисс: 1 – 0 минут (25 мкМ АТФ), 2 – 5 минут после добавления АТФ, 3 – 35 минут после добавления АТФ.

Figure 2. Dynamics of decrease ATP concentration in patients with IBD

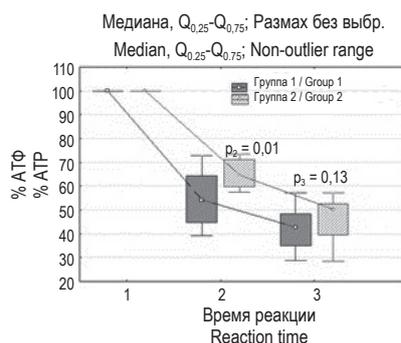
Note. Along abscissa axis: 1, 0 minutes; 2, 5 minutes after ATP addition; 3, 35 minutes after ATP addition.

время как у пациентов в обострении – на 32,5% (Me 67,5 (59,7-71,3)). У пациентов в состоянии ремиссии снижение содержания АТФ во 2 точке было достоверно больше, чем у пациентов в состоянии обострения ($p = 0,01$, рис. 3А). Таким образом, можно предположить, что АТФ-азная активность CD39⁺ в Treg выше у пациентов в ремиссии, чем у пациентов в обострении.

А (А)



Б (В)



В (С)

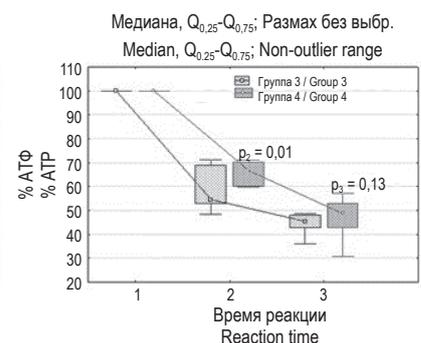


Рисунок 3. Динамика относительного уровня АТФ

Примечание. А – изменение уровня АТФ у пациентов в состоянии обострения и ремиссии. Б – изменение уровня АТФ в зависимости от количества CD39⁺Treg (1-я группа – < 300 кл/мкл; 2-я группа – > 800 кл/мкл). С – изменение уровня АТФ в зависимости от FI CD39⁺Treg. p_2 – достоверность между группами пациентов во 2 точке, p_3 – достоверность между группами пациентов в 3 точке.

Figure 3. Dynamics of the relative level of ATP

Note. (A) Change in the level of ATP in patients in a state of exacerbation and remission. (B) ATP level change depending on the amount of CD39⁺Treg (group 1 – < 300 cells/ μ l; group 2 – > 800 cells/ μ l). (C) ATP level change depending on FI CD39⁺Treg. p_2 , significance between groups of patients at point 2; p_3 , significance between groups of patients at point 3.

В 3 точке (после 30 мин инкубации при 37 °С) достоверной разницы между группами пациентов в состоянии обострения и ремиссии получено не было ($p = 0,97$). Вероятно, активность фермента CD39 необходимо оценивать в первые минуты реакции.

Для оценки гидролиза АТФ в зависимости от количества клеток были проанализированы группы с низким и высоким содержанием CD39⁺ в Treg: группа 1 < 300 кл/мкл (Me – 108 (73-247)), группа 2 > 800 кл/мкл (Me – 1228,65 (895-1738)) (рис. 2Б). Было получено, что в группе 1 через 5 минут после добавления АТФ (2 точка) наблюдалось достоверное увеличение ферментативной активности TregCD39⁺ по сравнению с группой 2 (рис. 3Б). В 3-й точке через 30 минут после добавления АТФ достоверной разницы между группами обнаружено не было. Таким образом, образцы с меньшим количеством клеток имели большую активность эктонуклеотидазы CD39. Возможно, что увеличение количества клеток CD39⁺Treg при обострении заболевания является компенсаторной реакцией на дисфункцию CD39, что согласуется с данными о снижении функциональной активности CD39 при аутоиммунном гепатите [8].

На следующем этапе работы была проанализирована зависимость снижения концентрации АТФ от интенсивности экспрессии CD39⁺ в Treg (F1). В зависимости от интенсивности флуоресценции CD39⁺ в Treg образцы были поделены на группы: группу 3 составили образцы с F1 в диапазоне 2,3-4,6 MFI (Me – 3,9 (3,87-4,25)), группу 4 – образцы с F1 в диапазоне 6,85-7 MFI (Me – 6,76 (6,41-6,9)).

Через 5 минут после добавления АТФ снижение концентрации АТФ в группе 3 было достоверно выше чем в группе 4 ($p = 0,01$, рис. 3С). При этом снижение концентрации в группе 3 было на 45,5%, а в группе 4 – на 33,3%. Таким образом, Treg с меньшей плотностью CD39 имели большую ферментативную активность во 2 точке. В 3

точке не было выявлено достоверных различий в ферментативной активности CD39 между группами. Вероятно, что для оценки эффективности гидролиза эктонуклеотидазы CD39 важно учитывать как количество клеток с экспрессией CD39, так и плотность экспрессии рецептора CD39⁺.

Заключение

Использование люциферин-люциферазного метода на ограниченной выборке пациентов показало возможность оценки каталитической активности CD39⁺ в Treg по снижению концентрации экзогенной АТФ в образцах РВМС.

Показано, что реакция гидролиза начиналась в первые минуты после добавления экзогенной АТФ. Инкубация при 37 °С в течение 30 минут приводила к менее существенному снижению концентрации АТФ в образцах. Вероятно, для обеспечения эффективного противовоспалительного ответа важна скорость гидролиза АТФ и своевременная его утилизация. Таким образом, оценка каталитической активности CD39 в Treg у пациентов с ВЗК наиболее информативна в первые минуты после добавления экзогенной АТФ.

Пациенты в состоянии ремиссии ВЗК имели большую активность CD39⁺ в Treg по сравнению с пациентами в обострении заболевания. Увеличение количества клеток с экспрессией эктонуклеотидазы CD39⁺ в Treg у части пациентов в состоянии обострения ВЗК может быть связано с их функциональной недостаточностью, что подтверждается нашими результатами: в образцах с большим количеством CD39⁺ в Treg наблюдалась меньшая активность эктонуклеотидазы CD39. Таким образом, повышение количества CD39⁺ в Treg может являться компенсаторным механизмом.

Целесообразны дальнейшие исследования по оценке кинетики гидролиза АТФ в большей выборке пациентов.

Список литературы / References

1. Горелов А.В., Каннер Е.В. Воспалительные заболевания кишечника у детей: особенности течения и терапии // Медицинский совет, 2018. № 2. С. 140-145. [Gorelov A.V., Kanner E.V. Inflammatory bowel diseases in children: peculiarities of the disease Course and therapy. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2018, no. 2, pp. 140-145. (In Russ.)]
2. Организация медицинской помощи пациентам с воспалительными заболеваниями кишечника в РФ в 2015-2021 гг.: информационный материал рабочей группы Экспертного совета по здравоохранению Комитета Совета Федерации по социальной политике // Медицинские технологии. Оценка и выбор, 2021 № 4. С. 9-15. [Healthcare for patients with inflammatory bowel disease in Russian Federation in 2015-2021: information from the Healthcare Expert Advisory Board of the Social Policy Committee of the Federation Council. *Meditsinskii tekhnologii. Otsenka i vybor = Medical Technologies. Assessment and Choice*, 2021, no. 4, pp. 9-15. (In Russ.)]
3. Петричук С.В., Мирошкина Л.В., Семикина Е.Л., Топтыгина А.П., Потапов А.С., Цимбалова Е.Г., Радыгина Т.В. Показатели популяционного состава лимфоцитов как предикторы эффективности терапии ингибитором TNF α у детей с воспалительными заболеваниями кишечника // Медицинская иммуноло-

- гия, 2018. Т. 20, № 5. С. 721-730. [Petrichuk S.V., Miroshkina L.V., Semikina E.L., Toptygina A.P., Potapov A.S., Tsimbalova E.G., Radygina T.V. Indicators of the lymphocyte subsets as efficiency predictors of therapy with inhibitors of TNF α in children with inflammatory bowel diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 721-730. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-721-730.
4. Álvarez-Sánchez N., Cruz-Chamorro I., Díaz-Sánchez M., Lardone P.J., Guerrero J.M., Carrillo-Vico A. Peripheral CD39-expressing T regulatory cells are increased and associated with relapsing-remitting multiple sclerosis in relapsing patients. *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9, 2302. doi: 10.1038/s41598-019-38897-w.
 5. Budd S.L., Nicholls D.G. Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.*, 1996, Vol. 67, no. 6, pp. 2282-2291.
 6. Di Virgilio F., Sarti A.C., Silva R.C. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2020, Vol. 318, no. 5, pp. 832-835.
 7. Gibson D.J., Elliott L., McDermott E., Tosetto M., Keegan D., Byrne K., Martin S.T., Rispens T., Cullen G., Mulcahy H.E., Cheifetz A.S., Moss A.C., Robson S.C., Dohert G.A., Ryan E.J. Heightened expression of CD39 by regulatory T lymphocytes is associated with therapeutic remission in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2015, Vol. 21, pp. 2806-2814.
 8. Grant C.R., Liberal R., Holder B.S., Cardone J., Ma Y., Robso S.C., Mieli-Vergani G., Vergani D., Longhi M.S. Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2014, Vol. 59, no. 3, pp. 1007-1015.
 9. Guo J., Wang L.-Y., Wu J., Xu L.F., Sun M. The JAK2 inhibitor AG490 regulates the Treg/Th17 balance and alleviates DSS-induced intestinal damage in IBD rats. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.*, 2020, Vol. 47, no. 8, pp. 1374-1381.
 10. Moncrieffe H., Nistala K., Kamhieh Y., Evans J., Eddaoudi A., Eaton S., Wedderburn L.R. High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 1, pp. 134-143.
 11. Negi S., Saini S., Tandel N., Sahu K., Mishr R., Tyagi R.K. Translating Treg therapy for inflammatory bowel disease in humanized mice. *Cells*. 2021, Vol. 10, no. 8, 1847. doi: 10.3390/cells10081847.
 12. Sorokina E.G., Reutov V.P., Senilova Y.E., Khodorov B.I., Pinelis V.G. Changes in ATP content in cerebellar granule cells during hyperstimulation of glutamate receptors: possible role of NO and nitrite ions. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2007, Vol. 143, no. 4, pp. 442-445.
 13. Vuerich M., Harshe R.P., Robson S.C., Longhi M.S. Dysregulation of adenosinergic signaling in systemic and organ-specific autoimmunity. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 3, 528. doi: 10.3390/ijms20030528.
 14. Yan J.B., Luo M.M., Chen Z.Y., He B.H. The function and role of the Th17/Treg cell balance in Inflammatory bowel disease. *J. Immunol. Res.*, 2020, 8813558. doi: 10.1155/2020/8813558.
 15. Zeng J., Ning Z., Wang Y., Xiong H. Implications of CD39 in immune-related diseases. *Int. Immunopharmacol.*, 2020, Vol. 89, Pt A, 107055. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107055.

Авторы:

Радыгина Т.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Сорокина Е.Г. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Петричук С.В. — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии лабораторного отдела НИИ педиатрии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Купцова Д.Г. — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Radygina T.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Sorokina E.G., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Neurobiology and States of Brain Development, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Petrichuk S.V., PhD, MD (Biology), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Kuptsova D.G., Junior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Курбатова О.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Kurbatova O.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Потапов А.С. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории научных основ детской гастроэнтерологии и гепатологии, заведующий гастроэнтерологическим отделением с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Potapov A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Scientific Foundations of Pediatric Gastroenterology and Hepatology, Head of Gastroenterology Department with Hepatology Group, National Medical Research Center of Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Афанасьева С.А. — лаборант-исследователь лаборатории нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Afanasyeva S.A., Laboratory Assistant, Laboratory of Neurobiology and States of Brain Development, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Поступила 24.11.2022
Принята к печати 20.02.2023

Received 24.11.2022
Accepted 20.02.2023