

РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ И Т-ХЕЛПЕРЫ 17-ГО ТИПА С ЭКСПРЕССИЕЙ ЭКТОНУКЛЕОТИДАЗ CD39 И CD73 ПРИ ТЯЖЕЛОЙ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ У ДЕТЕЙ

Р. Ш. Закиров^{1,2}✉, Д. Г. Купцова¹, Е. В. Фрейдлин¹, Е. Л. Семикина¹, С. В. Петричук¹, О. В. Карасева^{1,2}¹ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Минздрава России, Москва, Россия² Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии, Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

Исследование механизмов развития иммунного ответа при тяжелой механической травме (ТМТ) у детей — актуальная и социально значимая задача по причине высокой инвалидизации и летальности. Целью работы было определение информативных иммунологических критериев тяжести и прогноза исхода травматической болезни у детей ($n = 43$) на основе оценки экспрессии эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в популяциях регуляторных Т-клеток (T_{reg} , $CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$) и Т-хелперов 17-го типа ($Th17$, $CD4^+CD161^+CD3^+$) при ТМТ в группах с благоприятным (ТМТбл, $n = 24$), неблагоприятным (ТМТнебл, $n = 17$) и летальным исходом ($n = 2$). С помощью метода проточной цитофлуориметрии было выявлено выраженное снижение абсолютного количества T_{reg} и $Th17$, а также T_{reg} и $Th17$, экспрессирующих CD39 и CD73, в раннем посттравматическом периоде ТМТ. В группах ТМТбл и ТМТнебл относительное число T_{reg} и $Th17$, экспрессирующих CD39, значимо различалось ($p < 0,05$) и было существенно повышено с первых по третьи сутки после травмы для ТМТнебл. Уровень T_{reg} CD39 (44,4 %) является предпосылкой неблагоприятного исхода у выживших детей при ТМТ. Для больных с летальным исходом были получены крайне низкие показатели экспрессии эктонуклеотидаз: $CD39^+T_{reg}$ — 9,52% (9,52–13,75) и $CD39^+Th17$ — 0,92% (0,74–1,1). Для ТМТбл интенсивность флуоресценции (FL) CD39 на T_{reg} в раннем посттравматическом периоде была повышена в сравнении с ТМТбл. Для средней интенсивности флуоресценции (FL) CD39 на T_{reg} пороговое значение составило 8,25 у.е. Для пациентов с летальным исходом значения FL CD39 на T_{reg} выявлены крайне низкие: 3,95 у.е. (3,7–4,67). Полученные результаты показывают, что экспрессия CD39 и CD73 в популяциях T_{reg} и $Th17$ в значительной степени связана с тяжестью и исходом травматической болезни у детей.

Ключевые слова: дети, тяжелая травма, регуляторные Т-лимфоциты, Т-хелперы 17-го типа, CD39, CD73, иммуносупрессия**Финансирование:** исследование проведено в рамках государственного задания Минздрава России, № АААА–А19–119021190051–6, № 122040800163–9.**Благодарности:** авторы выражают благодарность всем пациентам, участвовавшим в исследовании, а также признательность за сотрудничество коллегам из отдела сочетанной травмы, анестезиологии и реанимации НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения города Москвы.**Вклад авторов:** Р. Ш. Закиров, О. В. Карасева, С. В. Петричук — планирование работы, анализ литературы, набор экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов, подготовка и редактирование рукописи; Е. Л. Семикина — планирование работы; Д. Г. Купцова, Е. В. Фрейдлин — набор экспериментальных данных.**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом Научно-исследовательского института неотложной детской хирургии и травматологии ДЗ г. Москвы (протокол № 2 от 26 мая 2020 г.). Для всех участников исследования было получено добровольное информированное согласие родителей в соответствии с принципами Хельсинкской декларации.✉ **Для корреспонденции:** Рустам Шакирович Закиров
Ломоносовский проспект, д. 2/1, г. Москва, 119296, Россия; zakirov.rsh@nczd.ru**Статья получена:** 21.11.2022 **Статья принята к печати:** 11.12.2022 **Опубликована онлайн:** 24.12.2022**DOI:** 10.47183/mes.2022.042

REGULATORY T CELLS AND T HELPER 17 CELLS EXPRESSING CD39 AND CD73 ECTONUCLEOTIDASE IN CHILDREN WITH SEVERE INJURY

Zakirov RSh^{1,2}✉, Kuptsova DG¹, Freidlin EV¹, Semikina EL¹, Petrichuk SV¹, Karaseva OV^{1,2}¹ National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia² Institute of Urgent Children Surgery and Traumatology, Moscow, Russia

Frequent resulting disability and case mortality support the urgency of investigation of the immune response mechanisms triggered by severe injury (SI) in children. This study aimed to determine the informative immunological criteria of traumatic injury severity and prognosis in children ($n = 43$) based on the assessment of expression of CD39 and CD73 ectonucleotidase in populations of regulatory T cells (T_{reg} , $CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$) and T-helper 17 cells ($Th17$, $CD4^+CD161^+CD3^+$) in SI cases grouped by the outcome (favorable (Slfav, $n = 24$), unfavorable (Slunfav, $n = 17$) and lethal ($n = 2$)). With the help of flow cytometry, we identified a pronounced decrease in the absolute number of T_{reg} and $Th17$, as well as T_{reg} and $Th17$ expressing CD39 and CD73, in the early post-traumatic period. In the Slfav and Slunfav groups the relative number of T_{reg} and $Th17$ cells expressing CD39 differed significantly ($p < 0,05$); it was substantially higher from the first to the third day post injury in the Slunfav group. The level of T_{reg} CD39 (44.4%) is a premise for an unfavorable outcome in children surviving an SI. In fatality cases, we registered extremely low ectonucleotidase expression rates: $CD39^+T_{reg}$ — 9.52% (9.52–13.75) and $CD39^+Th17$ — 0.92% (0.74–1.1). In the Slunfav group, the intensity of fluorescence (FL) of CD39 on T_{reg} cells in the early post-traumatic period was higher than seen in the Slfav group. The threshold value for the average fluorescence intensity (FL) of CD39 on T_{reg} was 8.25 c.u. In fatality cases, the T_{reg} CD39 FL values were extremely low: 3.95 c.u. (3.7–4.67). The results of the study indicate that in children, the expression of CD39 and CD73 in T_{reg} and $Th17$ populations is significantly associated with the severity of injury and outcome of the traumatic disease.

Keywords: children, severe injury, T_{reg} , $Th17$, CD39, CD73, immune suppression**Funding:** the study was supported under the State Assignment by the Ministry of Health of Russia, #AAAA–A19–119021190051–6, #122040800163–9**Acknowledgments:** the authors express their gratitude to all patients who participated in the study, as well as to colleagues from the department of concomitant injury, anesthesiology and resuscitation of the Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology of the Moscow Department of Health for their cooperation.**Author contribution:** Zakirov RSh, Karaseva OV, Petrichuk SV — study planning, analysis of literature, collection of experimental data, analysis and interpretation of the results, manuscript authoring and editing; Semikina EL — study planning; Kuptsova DG, Freidlin EV — collection of experimental data.**Compliance with the ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Urgent Children Surgery and Traumatology of the Department of Health of Moscow (Minutes #2 of May 26, 2020). Parents of all participants of the study have signed the informed consent form in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.✉ **Correspondence should be addressed:** Rustam Shakirovich Zakirov
Lomonosovsky prospect, 2/1, Moscow, 119296, Russia; zakirov.rsh@nczd.ru**Received:** 21.11.2022 **Accepted:** 11.12.2022 **Published online:** 24.12.2022**DOI:** 10.47183/mes.2022.042

В этиологической структуре детской инвалидизации и смертности одно из первых мест принадлежит тяжелой механической травме (ТМТ) [1, 2]. ТМТ сопровождается развитием декомпенсации систем жизнеобеспечения организма в результате комплексного воздействия таких факторов повреждения, как травматическое механическое повреждение, кровопотеря и гипоксия. Иницирующим фактором является механическое повреждение. Оно ведет к выбросу ассоциированных с повреждением молекулярных паттернов DAMP (от англ. damage-associated molecular pattern), которые в свою очередь способны нарушать клеточный иммунный ответ на экзогенные антигены и патоген-ассоциированные молекулярные паттерны PAMP (от англ. pathogen-associated molecular pattern), что вносит свой вклад в развитие дисфункции иммунной системы. Одним из таких эндогенных тканевых сигналов DAMP, запускающих и регулирующих иммунный ответ на повреждение, является внеклеточный АТФ (еАТФ) [3]. При травматическом воздействии наблюдается стойкое повышение уровня еАТФ в очаге повреждения [4, 5]. Являясь одним из основных компонентов пуринергической системы и сильным провоспалительным сигналом, еАТФ важен при регуляции функционирования Т-клеток. Как мощный молекулярный паттерн, связанный с повреждениями, еАТФ играет ключевую роль в иницировании воспалительной реакции через пуринергические рецепторы P2R. В то же время конечный продукт расщепления еАТФ — внеклеточный аденозин, являясь иммуносупрессором, играет важную роль в ограничении воспалительного ответа. Он осуществляет свои функции через аденозиновые рецепторы A2A, блокируя сигнал Т-клеточного рецептора (TCR) путем ингибирования фосфорилирования зета-ассоциированного белка 70 (ZAP-70) и активации активирующего белка 1 (AP-1), что приводит к снижению продукции IL2, экспрессии CD25 и ингибированию пролиферации Т-клеток. Уровни еАТФ и внеклеточного аденозина, а также их биологические эффекты жестко регулируются каталитическими эффектами эктоферментов, экспрессируемых на плазматической мембране иммунных клеток, — CD39 (E-NTPDase1) и CD73 (Ecto5'NTase). CD39 метаболизирует АТФ до АДФ, пирогосфата и АМФ. АМФ расщепляется с помощью эктонуклеотидазы CD73 до аденозина и фосфата. Таким образом, активность экзонуклеотидаз CD39 и CD73 обеспечивает баланс провоспалительного действия АТФ и противовоспалительного аденозина в очаге воспаления [6–9]. Тяжелая травма обычно сопровождается периодом выраженной иммуносупрессии, в патогенезе которой ключевую роль занимает снижение уровня Т-лимфоцитов. Оценка абсолютного и относительного количества субпопуляций Т-хелперов — значимый маркер для определения тяжести и прогноза исхода патологического процесса [10–13]. По причине высокой клинической значимости определения уровней экспрессии экзонуклеотидаз CD39 и CD73 на различных популяциях циркулирующих лимфоцитов в диагностике и прогнозе широкого круга заболеваний [14] целью настоящего исследования было выявить информативные иммунологические критерии тяжести и прогноза исхода травматической болезни у детей на основе оценки абсолютного и относительного количества субпопуляций Т-лимфоцитов, а также уровня экспрессии эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в популяциях T_{reg} и Th17 при тяжелой механической травме у детей.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В ходе исследования было обследовано 43 пациента (28 мальчиков (65,1%), 15 девочек (34,9%); 116 наблюдений) с ТМТ, проходивших лечение в отделении анестезиологии-реанимации НИИ НДХИТ ДЗ г. Москвы в период с 2020–2021 гг. Лабораторное обследование выполняли на базе лабораторного отдела ФГАУ НМИЦ здоровья детей Минздрава РФ в динамике травматической болезни от 1 до 5 раз в зависимости от длительности пребывания ребенка в отделении анестезиологии-реанимации (ОАР) НИИ НДХИТ ДЗ г. Москвы. Средний возраст детей составлял 13,0 (6,0–15,0) лет (Me (Q_{25} – Q_{75})). В качестве декретированных сроков лабораторного обследования были выбраны первые, третьи, пятые, седьмые, 14-е сутки с момента получения травмы.

Контрольную группу в исследовании составил 41 условно здоровый ребенок. Все дети, вошедшие в контрольную группу, проходили диспансеризацию на базе ФГАУ НМИЦ здоровья детей Минздрава России и были сопоставимы по возрасту и полу: возраст — 12,41 (7,4–16,2) лет; 26 мальчиков (63,4%), 15 девочек (36,6%).

Для объективной оценки тяжести повреждения в работе использовали шкалу тяжести повреждения (Injury severity score, ISS), шкалу комы Глазго — Glasgow Coma Scale (ШКГ, GCS) и ее модификацию для пациентов младше двух лет педиатрическую ШКГ — Pediatric GCS (pGCS) [15].

Для оценки исхода ТМТ использовали шкалу исходов комы Глазго — Glasgow Outcome Scale (ШИГ, GOS) и шкалу исходов тяжелой травмы — Severe Injury Outcomes Scale (ШИИТ, OISS) [16]: категория 1 — полное восстановление (способность вести прежний уровень жизни с прежним уровнем активности); категория 2 — хорошее восстановление (имеются последствия, не ограничивающие уровень социальной адаптации, но ограничивающие прежний уровень функциональной активности, требующие продолжения этапного или восстановительного лечения); категория 3 — умеренная инвалидизация (имеются последствия, не позволяющие восстановить прежний функциональный уровень, не нуждается в уходе посторонних); категория 4 — тяжелая инвалидизация (нуждается в постороннем уходе); категория 5 — смерть. Оценку по ШИИТ и ШИГ проводили при выписке пациента.

Критерии включения пациентов в исследование: пациенты с ТМТ (ISS ≥ 16), проходившие лечение в отделении ОПИТ. Критерии исключения: наличие сопутствующих острых воспалительных и хронических заболеваний.

На первом этапе проводили анализ полученных результатов для контрольной группы и группы детей с ТМТ. На втором этапе — для двух групп больных, разделенных по ШИГ и ШИИТ: ТМТ с благоприятным исходом (ТМТбл, $n = 24$), ТМТ с неблагоприятным исходом (ТМТнебл, $n = 17$) (табл. 1). Благоприятным исходом при ТМТ считали по ШИГ 4–5 балла или ШИИТ 1–2 балла, неблагоприятным исходом по ШИГ 2–3 балла или по ШИИТ 3–4 балла. Отдельно была описана группа ТМТ с летальным исходом (ТМТли, $n = 2$) (табл. 1).

У пациентов оценивали количество Th17-лимфоцитов (Th17 — $CD3^+CD4^+CD161^+$), количество регуляторных Т-лимфоцитов (T_{reg} — $CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$), а также определяли уровень экспрессии рецепторов пуринергического сигналинга на T_{reg} ($CD39^+T_{reg}$ — $CD4^+CD127^{low}CD25^{high}CD39^+$ и $CD73^+T_{reg}$ —

Таблица 1. Клиническая характеристика больных

Фактор		Исход ТМТ		
		ТМТбл	ТМТнебл	ТМТли
n		24	17	2
Пол, %	д	9 (37,5)	6 (35,3)	–
	м	15 (62,5)	11 (64,7)	2 (100,0)
Возраст (Ме [IQR]), лет		12,5 [6,0–15,0]	13,0 [8,0–14,0]	7,5 [4,7–10,2]
Койко-дни ОАР (Ме [IQR]), дни		9,00 [7,00–13,25]	16,00 [10,00–25,00]	6,00 [6,00–6,00]
Койко-дни общее кол-во (Ме [IQR]), дни		23,00 [16,00–29,25]	53,00 [23,00–58,00]	6,00 [6,00–6,00]
ISS (Ме [IQR])		26 (19–29)	27 (26–34)	25 и 35
ЧМТ, %		21 (87,5)	16 (94,1)	100
ШКГ (Ме [IQR]), баллы		12 (8–12)	7 (4–13)	7 и 3
Кома, %		5 (20,8)	8 (47,0)	2 (100)
Сочетанная травма, %		21 (87,5)	16 (94,1)	2 (100)
Множественная травма, %		11 (45,8)	7 (41,1)	1 (50)
Кровопотеря, %		16 (66,6)	13 (76,4)	1 (50)
Нестабильная гемодинамика, %		8 (33,3)	12 (70,5)	2 (100)
Респираторная поддержка (ИВЛ), %		16 (66,6)	16 (94,1)	2 (100)
Полиорганная недостаточность, %		1 (4,1)	2 (11,7)	2 (100)

CD4⁺CD127^{low}CD25^{high}CD73⁺) и Th17-лимфоцитах (CD39⁺Th17 — CD3⁺CD4⁺CD161⁺CD39⁺ и CD39⁺Th17 — CD3⁺CD4⁺CD161⁺CD73⁺). Оценку количественных показателей субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови выполняли с использованием двухплатформенной технологии. Для подсчета абсолютного числа лимфоцитов в работе использовали гематологический анализатор Sysmex XT-2000i (Sysmex Corporation; Япония). Пробоподготовка цитофлуориметрического анализа включала в себя инкубирование в течение 20 мин в темном месте 100 мкл цельной крови с 10 мкл моноклональных антител, меченных флуорохромами. Для лизирования эритроцитов

использовали лизирующий раствор BD FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences; США), длительность инкубации с которым в темноте при комнатной температуре не превышала 10–12 мин. Запись полученного образца и анализ результатов выполняли на проточном цитофлуориметре Novocyte (ACEA Biosciences; США). Для определения субпопуляций лимфоцитов использовали следующие поверхностные маркеры: CD45, IgG1, IgG2a, CD3, CD4, CD25, CD127, CD161, CD39, CD73 (Beckman Coulter, США; BD Biosciences, США; SONY corp., Япония).

Обработку полученных данных проводили с помощью компьютерных программ MS Excel 2016 (Microsoft corp.; США), Statistica 10 (StatSoft, Inc.; США), IBM SPSS Statistics 25

Таблица 2. Субпопуляции CD4⁺-лимфоцитов, T_{reg} и Th17, экспрессирующие CD39 и CD73, а также интенсивность флуоресценции эктонуклеотидаз на T_{reg} и Th17 для контрольной группы и детей с ТМТ вне зависимости от исхода травматической болезни

Показатели	Контрольная группа	ТМТ (сутки, прошедшие с момента травмы)				
		1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки	7-е сутки	14-е сутки
	n = 41	n = 18	n = 33	n = 16	n = 21	n = 24
T _{reg} , abs	72,2 [57,3–86,2]	34,9 [22–48]*	38,3 [24,2–54,4]*	36,5 [24–67,2] *	36,5 [24–67,2]*	61 [49,1–78,9]
Th17, abs	144,6 [97,7–150,6]	78,1 [54,7–97,2]*	87,2 [64,4–136,3]*	93,2 [75,3–145,9]	93,2 [75,3–145,9]	163,3 [118,4–232,9]
T _{reg} /Th17	0,6 [0,5–0,8]	0,4 [0,3–0,7]	0,4 [0,3–0,5]*	0,4 [0,3–0,5]*	0,4 [0,3–0,5]	0,4 [0,3–0,5]*
CD39 ⁺ , % T _{reg}	35,2 [29,1–39,4]	27,6 [17,3–43,1]	33,3 [15,4–53,2]*	36,4 [15,8–49,6]	36,4 [15,8–49,6]	43,4 [28–52]
CD39 ⁺ , abs T _{regs}	27 [18,3–31,7]	9,3 [5,9–13,1]*	10 [7–14,2]*	12,4 [6,7–18,8]*	12,4 [6,7–18,8] *	23,2 [10,9–38,7]
CD39 ⁺ , % Th17	9,6 [8,6–12,1]	9,8 [6,5–12,4]	7,7 [3,4–10,6]*	6,8 [5,3–10,7]*	6,8 [5,3–10,7]	7,3 [4–8,9] *
CD39 ⁺ , abs Th17	12,5 [10,9–14,7]	7,9 [3,5–9,2]*	6,0 [2,2–9,6]*	7,1 [4–10,5]*	7,1 [4–10,5]	11,3 [4,3–18,5]
CD73 ⁺ , % T _{reg}	8,9 [7,3–11,1]	6,5 [4,1–13,1]	6,9 [4,9–11,8]	11,2 [5,1–22,3]	11,2 [5,1–22,3]	6,7 [4,6–16,9]
CD73 ⁺ , abs T _{regs}	8 [3–10]	2,7 [1,3–3,3]*	2,2 [1,6–4,7]*	5,2 [2,7–6,5]	5,2 [2,7–6,5]	4,3 [2,5–8]
CD73 ⁺ , % Th17	10,2 [7,3–14,4]	8,1 [6,1–13,7]	10,8 [7,4–19]	13,8 [10,6–16,5]	13,8 [10,6–16,5]	15* [9,2–19,8]
CD73 ⁺ , abs Th17	13,6 [8,4–17]	6,5 [3,3–9,2]*	10,3 [4,3–22,4]	14,7 [11,9–28,2]	14,7 [11,9–28,2]	26,7 [12,3–34,9]*
CD39/CD73 T _{reg}	3,4 [2,6–5,1]	3,9 [1,9–6,9]	4,5 [1,9–7,8]	2,8 [1,6–5,4]	2,8 [1,6–5,4]	4,6 [2,5–9,1]
CD39/CD73 Th17	1,1 [0,7–1,7]	1,4 [0,5–2,2]	0,7 [0,2–1,3]	0,5 [0,2–1,3]	0,5 [0,2–1,3]	0,5 [0,1–0,7]*
FL CD39 T _{reg}	7,9 [7–9,2]	8 [6,7–13]	8,4 [6,2–11,3]	8,1 [5,6–10]	8,1 [5,6–10]	9,4 [7,1–12]
FL CD39 Th17	7,2 [5,8–8,9]	6,6 [5,4–7,7]	7,8 [6,2–9,3]	7,2 [6,6–9,1]	7,2 [6,6–9,1]	7,8 [6,8–8,8]
FL CD73 T _{reg}	3,3 [2,7–3,7]	3,2 [2,7–4,1]	4,2 [3,2–6,2]*	3,3 [2,8–4,7]	3,3 [2,8–4,7]	4,4 [3,6–5,7]*
FL CD73 Th17	3,6 [3,3–4,7]	4 [3,2–6,1]	4,6 [3,2–5,7]	4,1 [3,9–6,8]	4,1 [3,9–6,8]	4 [3,3–6,4]

Примечание: Ме [Q₂₅–Q₇₅%]; * — p < 0,05, U-критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони, группы сравнения (здоровые дети, ТМТ).

Таблица 3. Скорректированный уровень достоверности анализируемых параметров с учетом поправки Бонферрони для контрольной группы и детей с ТМТ вне зависимости от исхода травматической болезни

Параметр	U-критерий Манна-Уитни (контрольная группа/ТМТ)				
Сутки с момента травмы	1	3	5	7	14
Число наблюдений	18	33	16	21	24
T_{reg}^{+} , abs	0,0000*	0,0000*	0,006*	0,03 *	0,605
Th17, abs	0,0000*	0,003*	0,215	1,407	0,232
$T_{reg}^{+}/Th17$	0,1035	0,005*	0,015*	0,3665	0,011*
CD39 ⁺ , % T_{reg}^{+}	0,509	4,1445	3,206	4,2395	0,3365
CD39 ⁺ , abs T_{reg}^{+}	0,0000*	0,0000*	0,002*	0,017*	1,9045
CD39 ⁺ , % Th17	4,13	0,0335*	0,0125*	1,9935	0,0015*
CD39 ⁺ , abs Th17	0,0005*	0,0000*	0,0165*	0,2125	1,091
CD73 ⁺ , % T_{reg}^{+}	2,2375	1,0035	2,6035	1,836	3,6035
CD73 ⁺ , abs T_{reg}^{+}	0,0015*	0,0000*	0,206	0,98	0,926
CD73 ⁺ , % Th17	1,6255	1,418	0,758	2,152	0,063
CD73 ⁺ , abs Th17	0,006*	2,032	1,1885	4,7335	0,0065*
CD39/CD73 T_{reg}^{+}	4,3845	4,1865	1,2375	1,4005	1,9915
CD39/CD73 Th17	4,462	0,1255	0,0885	1,2715	0,007*
FL CD39 T_{reg}^{+}	4,8375	4,8275	3,333	3,079	1,4725
FL CD39 Th17	1,936	1,105	2,7475	2,547	2,438
FL CD73 T_{reg}^{+}	2,5445	0,0245 *	3,462	0,1695	0,0005*
FL CD73 Th17	1,584	0,5755	0,223	2,6665	0,993

Примечание: Ме [Q_{25} – Q_{75}]; * — $p < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни, группы сравнения (контрольная группа, ТМТ).

(IBM corp.; США). Результаты представлены в виде медианы (Ме) и квартилей (Q_{25} – Q_{75}). Анализ различия признаков проводили при помощи U-критерия Манна-Уитни с коррекцией уровня достоверности с учетом поправки Бонферрони для множественных сравнений. Для оценки связи между признаками использовали корреляционный анализ с вычислением матрицы коэффициентов ранговых корреляций Спирмена R. Оценку значимости количественных показателей и выбор пороговых значений (cut-off point) выполняли по рабочей характеристической

кривой (ROC-кривой). Пороговые значения определяли исходя из требований максимальной чувствительности и специфичности. Критерием статистической достоверности получаемых выводов считали величину $p < 0,05$ (*).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ, проведенный в контрольной группе и у детей с ТМТ, выявил выраженное снижение абсолютного количества T_{reg}^{+} и Th17 в раннем посттравматическом периоде.

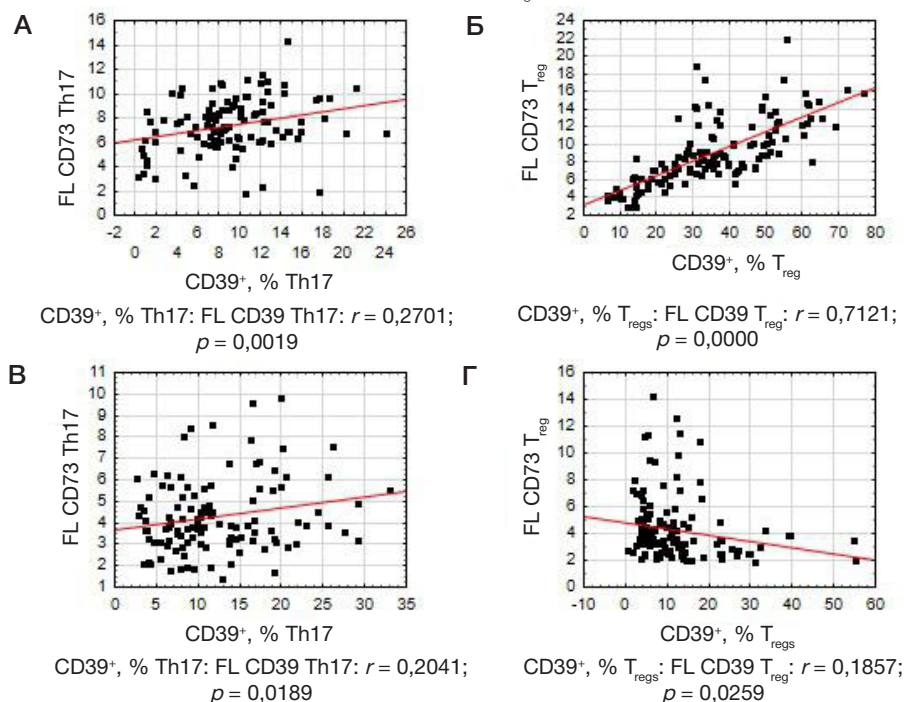


Рис. 1. Зависимость процентного содержания T_{reg}^{+} и Th17, экспрессирующих ферменты CD39 и CD73, от уровня флуоресценции (FL) CD39 и CD73. **А.** FL CD39 Th17: $CD39^{+}$, Th17%. **Б.** FL CD39 T_{reg}^{+} : $CD39^{+}$, T_{reg}^{+} %. **В.** FL CD73 Th17: $CD73^{+}$, Th17%. **Г.** FL CD73 T_{reg}^{+} : $CD73^{+}$, T_{reg}^{+} %.

Таблица 4. Относительное количество T_{reg} и Th17, экспрессирующих ферменты CD39 и CD73, в периоде с первых по третьи сутки у детей с ТМТ

Показатель	ТМТнебл	ТМТбл	ТМТли	Уровень статистической значимости p , ТМТнебл и ТМТбл
Число наблюдений	19	28	3	
T_{reg} , % CD4	9,24 [8,12–10,84]	8,9 [8,48–11,4]	9,9 [8,84–10,5]	0,968
CD39, % T_{reg}	52,33 [43,7–62,2]*	21,7 [14,9–25,2]	9,52 [9,52–13,75]	0,000026
CD73, % T_{reg}	6,24 [3,2–8,8]	6,54 [4,0–9,2]	4,9 [3,53–7,2]	0,84
Th17, % CD4	30,76 [25,2–35,2]*	15,5 [12,2–17,8]	19,5 [17,91–28,5]	0,0008
CD39, % Th17	14,55 [8,9–19,1]*	6,72 [3,14–9,0]	0,92 [0,74–1,1]	0,012
CD73, % Th17	12,38 [7,7–19,21]	10,38 [4,15–15,77]	5,7 [4,7–6,7]	0,599

Примечание: Ме [Q_{25} – Q_{75} %]; U -критерий Манна–Уитни, группы сравнения: ТМТнебл, ТМТбл.

Значения данных показателей для больных с ТМТ значимо отличались от показателей контрольной группы (табл. 2, 3). При этом соотношение T_{reg} /Th17 с третьих по пятые сутки с момента травмы было снижено в сравнении с контрольной группой, за счет постепенного повышения уровня Th17 начиная с третьих суток (табл. 2, 3).

Динамика абсолютного количества T_{reg} и Th17, экспрессирующих ферменты CD39 и CD73, повторяла динамику малых субпопуляций CD4⁺-лимфоцитов в остром посттравматическом периоде, однако для T_{reg} изменения были более выражены (табл. 2, 3). Относительное количество CD39⁺ T_{reg} у детей с ТМТ изменялось от 6,3 до 76,6% и существенно превышало значение CD39⁺Th17 (диапазон изменчивости: 0,3–24,1%) (табл. 2). Для CD73 относительное количество было существенно выше на Th17 (диапазон изменчивости — 2,6–99,9%), чем на T_{reg} (диапазон изменчивости — 0,5–55,2%). Достоверных отличий от контрольной группы выявлено не было. Однако для части наблюдений значения существенно превышали максимальные уровни контрольной группы (табл. 2).

Анализ средней интенсивности флуоресценции (FL) эктонуклеотидаз на T_{reg} и Th17 выявил различия для CD73 на T_{reg} . Значения FL для CD73 для 3-х суток после травмы было повышенным по сравнению с контрольной группой (табл. 2, 3).

Корреляционный анализ позволил выявить зависимость процентного содержания T_{reg} и Th17, экспрессирующих CD39 и CD73, и уровня флуоресценции маркеров. Для Th17 процентное содержание клеток, экспрессирующих ферменты, незначительно увеличивается с повышением уровня флуоресценции CD39 ($r = 0,27$; $p = 0,002$) и CD73 ($r = 0,20$; $p = 0,018$) (рис. 1 А, В). Процентное содержание T_{reg} , экспрессирующих ферменты, увеличивается с повышением уровня флуоресценции: CD39 ($r = 0,71$; $p < 0,001$), а для CD73 незначительно снижается ($r = -0,18$; $p < 0,025$; рис. 1). Для CD39⁺ T_{reg} выявлена наиболее сильная прямая зависимость (рис. 1 Б).

При сравнительном анализе посттравматического периода в группах с ТМТбл и ТМТнебл показано существенное повышение относительного количества Th17 с первых по третьи сутки в группе с неблагоприятным течением, при этом по количеству T_{reg} группы не различались (табл. 4). Показатели экспрессии CD39 на T_{reg} и Th17-лимфоцитах значимо различались в группах ТМТбл и ТМТнебл и были существенно повышены у пациентов с неблагоприятным течением посттравматического периода (табл. 4, рис. 2). Для двух пациентов с летальным исходом сравнительный анализ не проводили по причине недостаточного числа наблюдений (число наблюдений — три), но для данной категории больных при сопоставимых

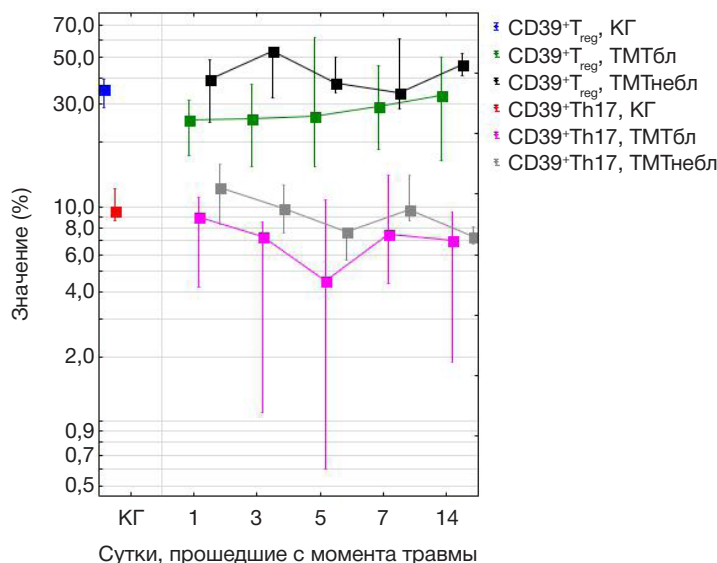


Рис. 2. Относительное количество Th17 и T_{reg} , экспрессирующих CD39 в группах ТМТбл, ТМТнебл и контрольной группе. Ме [Q_{25} – Q_{75} %]; группы сравнения: ТМТнебл, ТМТбл и контрольная группа (КГ)

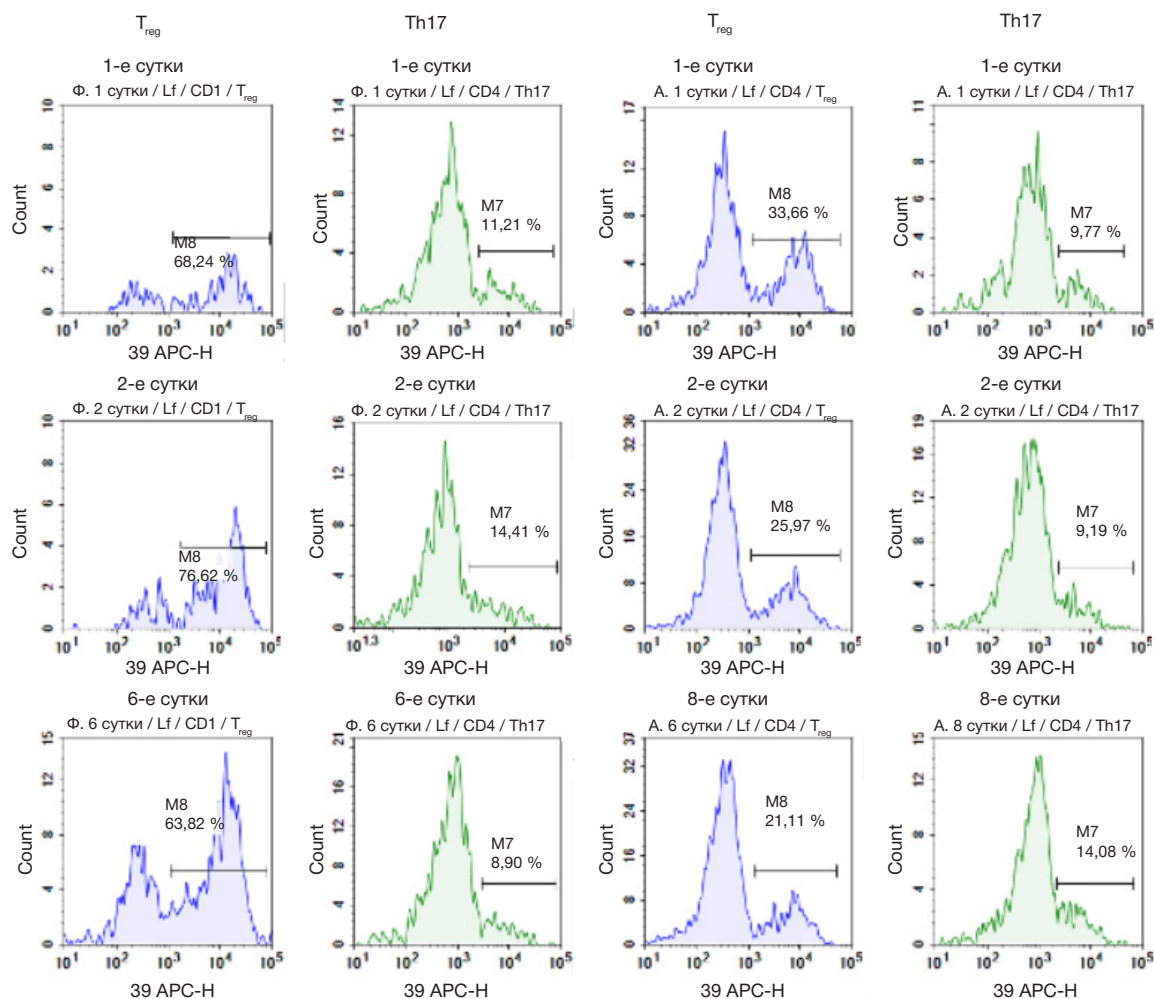


Рис. 3. Динамика относительного количества Th17 и T_{reg}, экспрессирующих CD39, в критическом периоде тяжелой травмы у детей с неблагоприятным (клинический пример 1) и благоприятным исходом травмы (клинический пример 2)

значениях относительного количества T_{reg} и Th17 были получены крайне низкие показатели экспрессии эктонуклеотидаз на T_{reg} и Th17 (табл. 4).

Приведенные ниже клинические примеры показывают динамику экспрессии CD39 на T_{reg} и Th17 у пациентов с неблагоприятным (клинический пример 1, рис. 3) и с благоприятным (клинический пример 2, рис. 3) исходом травмы.

Анализ параметров флуоресценции эктонуклеотидаз на T_{reg} и Th17 у детей с ТМТбл и ТМТнебл выявил достоверные различия для CD39 на T_{reg}. Для ТМТнебл отмечалось повышение флуоресценции CD39 на T_{reg} с 1 по 7 сутки после травмы (табл. 5). Для 2-х пациентов с летальным исходом значения параметров флуоресценции составили: FL CD39 T_{reg} — 3,95 (3,7–4,67), FL CD73 T_{reg} — 4 (2,55–4,55), FL CD39 Th17 — 6,77 (5–8,55), FL CD73 Th17 — 3,52 (3,1–3,95), значения FL CD39 T_{reg} оказались крайне низкими при сопоставлении с ТМТбл и ТМТнебл (табл. 5).

Для показателей, продемонстрировавших высокую прогностическую значимость при травматической болезни у детей, был проведен ROC-анализ для групп ТМТбл и ТМТнебл. Получено хорошее качество разделительной модели для CD39⁺ T_{reg} % (AUC = 0,741) и FL CD39 T_{reg} (AUC = 0,721). В результате для CD39⁺ T_{reg} cut-off составил 44,4% (чувствительность — 66,6 и специфичность — 84,7) и FL CD39 T_{reg} — 8,25 у.е. (чувствительность — 87,5 и специфичность — 62,5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследовании показано, что в результате травматического повреждения у детей с ТМТ развивается дисбаланс T_{reg}/Th17 в раннем посттравматическом периоде с незначительным смещением в сторону Th17 на фоне выраженного снижения абсолютного количества T_{reg} и Th17, что согласуется с данными других авторов [11–13, 17]. Среди T_{reg} и Th17 абсолютное число клеток, экспрессирующих CD39 и CD73, также пропорционально снижается в критическом периоде травматической болезни.

Анализ содержания клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73 в популяциях CD4⁺ лимфоцитов, у детей с ТМТ выявил наибольшую экспрессию CD39 в популяции T_{reg} до 76,6%, а CD73 — Th17 до 99,9%, в отличие от условно здоровых детей, для которых экспрессия CD39 в популяции T_{reg} колебалась от 19 до 49%, а экспрессия CD73 Th17 — от 7 до 35% [18].

В нашей работе мы обнаружили различия в экспрессии эктонуклеотидаз в раннем посттравматическом периоде ТМТ у детей в зависимости от исхода травматической болезни. Для детей с неблагоприятным исходом ТМТ отмечалось увеличение процентного содержания CD39 на T_{reg} и Th17, а также отмечалось повышение интенсивности флуоресценции CD39 на T_{reg} с первых по седьмые сутки после травмы в отличие от группы пациентов с благоприятным исходом. Это может быть связано с ролью эктонуклеотидаз, особенно

Таблица 5. Параметры флюоресценции (FL) пуриnergического сигналинга CD39 и CD73 на T_{reg} и Th17 в критическом периоде ТМТ у детей

Показатели	ТМТбл, сутки с момента травмы					ТМТнебл, сутки с момента травмы				
	1	3	5	7	14	1	3	5	7	14
	n = 10	n = 18	n = 6	n = 14	n = 12	n = 6	n = 13	n = 8	n = 7	n = 12
FL CD39 T _{reg}	7,7 [5,1–9,3]*	7,3 [6,2–9] *	9,7 [5,6–14,8]	7,7 [5,6–9,9] *	7,5 [6,3–11,8]	10,7 [8,5–14]	10,8 [8,8–12,4]	8,5 [7,9–8,8]	12,9 [9,4–14,1]	10,3 [8,3–12]
FL CD39 Th17	6,5 [5,4–7]	7,3 [5,7–8,4]	9,9 [6,1–10,6]	7,9 [6,4–8,2]	7,3 [6,1–8,8]	7,3 [6–8,7]	8,7 [7,1–9,8]	7 [6,8–7,9]	9,3 [5,3–10,3]	8,2 [7,1–9]
FL CD73 T _{reg}	3,2 [2,7–5,9]	3,8 [3–4,8]	3,2 [3,1–4,9]	3,9 [2,4–4,8]	4,6 [2,8–6]	3,2 [2,6–3,7]	5,1 [3,7–8,7]	3,4 [2,8–5,5]	4,7 [4,3–7,1]	4,4 [3,8–5,6]
FL CD73 Th17	3,7 [3,1–6,1]	4,2 [3,7–4,8]	4,1 [3,9–5,1]	3,9 [3,1–5,7]	4,3 [3,3–7,4]	4,3 [4–6,9]	5,1 [3,3–8,4]	4,5 [3,9–7,9]	4,7 [3,3–5,9]	3,9 [3,2–5,3]

Примечание: Me [Q₂₅–Q₇₅%]; p — скорректированный уровень значимости с учетом поправки Бонферрони; * — p < 0,05 уровень значимости, U-критерий Манна-Уитни, группы сравнения (ТМТбл и ТМТнебл на первые, третьи, пятые, седьмые, 14-е сутки после травмы).

CD39, в усилении гидролиза eATФ и накопления в очаге повреждения внеклеточного аденозина, что приводит к запуску через систему аденозиновых рецепторов A2R каскада реакций, приводящего к подавлению иммунного ответа для предотвращения массивного повреждения тканей [14]. Выявленная нами прямая корреляционная связь между уровнем флюоресценции CD39 и процентным содержанием CD39⁺T_{reg} указывает на то, что в ответ на повреждение увеличивается доля T_{reg}⁺ высокоэкспрессирующих эктонуклеотидазу CD39. В более ранних работах на взрослых здоровых донорах было показано, что клетки с большим количеством CD39 на T_{reg} более эффективно гидролизуют АТФ [8]. Для эктонуклеотидазы CD73 связи процентного содержания с интенсивностью флюоресценции выявлено не было, вероятно, из-за того, что CD73 присутствует как на мембране клеток, так и в растворимой форме [19]. Для

пациентов с летальным исходом были обнаружены крайне низкие значения экспрессии эктонуклеотидаз, что может свидетельствовать о развитии декомпенсации функций иммунной системы при крайне тяжелых повреждениях.

Выводы

Полученные результаты показывают, что экспрессия CD39 и CD73 в популяциях T_{reg} и Th17 в значительной степени связана с тяжестью повреждения и может быть использована для прогноза исхода травматической болезни у детей. Более глубокое понимание роли пуриnergического сигналинга в патогенезе травматической болезни позволяет задуматься о терапевтическом потенциале биопрепаратов на основе растворимых форм эктонуклеотидаз для воздействия на иммунную систему при таких критических состояниях, как тяжелое травматическое повреждение [20].

Литература

1. Тимофеев В. В., Бондаренко А. В. Эпидемиологические аспекты политравмы у детей в крупном городе. Политравма. 2012; (4): 5–8.
2. Бондаренко А. В. Организация специализированной помощи при политравме в крупном городе. Вестник травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. 2005; (4): 81–84.
3. Cauwels A, Rogge E, Vandendriessche B, Shiva S, Brouckaert P. Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality. Cell Death Dis. 2014; 5 (3): e1102.
4. Moro N, Ghavim SS, Sutton RL. Massive efflux of adenosine triphosphate into the extracellular space immediately after experimental traumatic brain injury. Exp Ther Med. 2021; 21 (6): 575.
5. Farooqi AH, Lim MJ, Kee EC, Lee JH, Burgess JD, Chen R, Di Virgilio F, Delenclos M, McLean PJ. In Vivo Detection of Extracellular Adenosine Triphosphate in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. J Neurotrauma. 2021; 38 (5): 655–64.
6. Головкин А. С., Серебрякова М. К., Жидулева Е. В., Муртазалиева П. М., Титов В. А. Экспрессия рецепторов пуриnergического сигналинга на Т-лимфоцитах периферической крови здоровых доноров. Трансляционная медицина. 2017; 4 (5): 46–60.
7. Takenaka MC, Robson S, Quintana FJ. Regulation of the T Cell Response by CD39. Trends Immunol. 2016; 37 (7): 427–39.
8. Timperi E, Barnaba V. CD39 Regulation and Functions in T Cells. Int J Mol Sci. 2021; 22 (15): 8068.
9. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. Blood. 2007; 110 (4): 1225–32.
10. Zhang C, Li L, Feng K, Fan D, Xue W, Lu J: 'Repair' Treg Cells in Tissue Injury. Cell Physiol Biochem. 2017; 43: 2155–69.
11. Sturm R, Xanthopoulos L, Heftrig D, Oppermann E, Vrdoljak T, Dunay IR, et al. Regulatory T Cells Modulate CD4 Proliferation after Severe Trauma via IL10. J Clin Med. 2020; 9 (4): 1052.
12. Zhang Y, Li XF, Wu W, Chen Y. Dynamic changes of circulating T-helper cell subsets following severe thoracic trauma. Int J Clin Exp Med. 2015; 8 (11): 21106–13.
13. Hein F, Massin F, Cravoisy-Popovic A, Barraud D, Levy B, Bollaert PE, et al. The relationship between CD4⁺CD25⁺CD127⁺ regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states. Crit Care. 2010; 14 (1): R19.
14. Han L, Sugiyama H, Zhang Q, Yan K, Fang X, McCormick TS, et al. Phenotypical analysis of ectoenzymes CD39/CD73 and adenosine receptor 2A in CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ regulatory T-cells in psoriasis. Australas J Dermatol. 2018; 59 (1): e31–e38.
15. Holmes JF, Palchak MJ, MacFarlane T, Kuppermann N. Performance of the pediatric Glasgow coma scale in children with blunt head trauma. Acad Emerg Med. 2005; 12: 814.
16. Karaseva O, Roshal L. Pediatric Trauma in Earthquakes: General Principles of Care in Pediatric Trauma During Earthquakes. In: Wolfson N, Lerner A, Roshal L, eds. Orthopedics in Disasters: Orthopedic Injuries in Natural Disasters and Mass Casualty Events. Berlin Heidelberg: Springer, 2016.
17. Zhou X, Yao J, Lin J, Liu J, Dong L, Duan M. Th17/Regulatory T-Cell Imbalance and Acute Kidney Injury in Patients with Sepsis. J Clin Med. 2022; 11 (14): 4027.
18. Радыгина Т. В., Купцова Д. Г., Петричук С. В., Семикина Е. Л., Фисенко А. П. Экспрессия эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в популяциях CD4⁺ лимфоцитов у условно здоровых детей. Российский иммунологический журнал. 2022; 25 (3): 283–90.

19. Vaara ST, Hollmén M, Korhonen AM, Maksimow M, Ala-Kokko T, Salmi M, et al. FINNAKI Study Group. Soluble CD73 in Critically Ill Septic Patients — Data from the Prospective FINNAKI Study. *PLoS One*. 2016; 11 (10): e0164420.
20. Zhai X, Chen K, Yang H, Li B, Zhou T, Wang H, et al. Extracellular vesicles derived from CD73 modified human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate inflammation after spinal cord injury. *J Nanobiotechnology*. 2021; 19 (1): 274.

References

1. Timofeev VV, Bondarenko AV. Epidemiological aspects of polytrauma in children in major city. *Polytrauma*. 2012; (4): 5–8. Russian.
2. Bondarenko AV The organization of specialized care for polytrauma in a large city. *N.N. Priorov Journal of Traumatology and Orthopedics*. 2005; (4): 81–84. Russian.
3. Cauwels A, Rogge E, Vandendriessche B, Shiva S, Brouckaert P. Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality. *Cell Death Dis*. 2014; 5 (3): e1102.
4. Moro N, Ghavim SS, Sutton RL. Massive efflux of adenosine triphosphate into the extracellular space immediately after experimental traumatic brain injury. *Exp Ther Med*. 2021; 21 (6): 575.
5. Farooqi AH, Lim MJ, Kee EC, Lee JH, Burgess JD, Chen R, Di Virgilio F, Delenclos M, McLean PJ. In Vivo Detection of Extracellular Adenosine Triphosphate in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2021; 38 (5): 655–64.
6. Golovkin AS, Serebryakova MK, Zhiduleva EV, Murtazaliev PM, Titov VA, Irtuga OB, Moiseeva OM, Krobiniec II, Kudryavtsev IV. Purinergic signaling receptors expression on peripheral T-lymphocytes of healthy donors. *Translational Medicine*. 2017; 4 (5): 46–60. Russian.
7. Takenaka MC, Robson S, Quintana FJ. Regulation of the T Cell Response by CD39. *Trends Immunol*. 2016; 37 (7): 427–39.
8. Timperi E, Barnaba V. CD39 Regulation and Functions in T Cells. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (15): 8068.
9. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007; 110 (4): 1225–32.
10. Zhang C, Li L, Feng K, Fan D, Xue W, Lu J: 'Repair' Treg Cells in Tissue Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 43: 2155–69.
11. Sturm R, Xanthopoulos L, Heftrig D, Oppermann E, Vrdoljak T, Dunay IR, et al. Regulatory T Cells Modulate CD4 Proliferation after Severe Trauma via IL10. *J Clin Med*. 2020; 9 (4): 1052.
12. Zhang Y, Li XF, Wu W, Chen Y. Dynamic changes of circulating T-helper cell subsets following severe thoracic trauma. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8 (11): 21106–13.
13. Hein F, Massin F, Cravoisy-Popovic A, Barraud D, Levy B, Bollaert PE, et al. The relationship between CD4+CD25+CD127-regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states. *Crit Care*. 2010; 14 (1): R19.
14. Han L, Sugiyama H, Zhang Q, Yan K, Fang X, McCormick TS, et al. Phenotypical analysis of ectoenzymes CD39/CD73 and adenosine receptor 2A in CD4+ CD25high Foxp3+ regulatory T-cells in psoriasis. *Australas J Dermatol*. 2018; 59 (1): e31–e38.
15. Holmes JF, Palchak MJ, MacFarlane T, Kuppermann N. Performance of the pediatric Glasgow coma scale in children with blunt head trauma. *Acad Emerg Med*. 2005; 12: 814.
16. Karaseva O, Roshal L. Pediatric Trauma in Earthquakes: General Principles of Care in Pediatric Trauma During Earthquakes. In: Wolfson N, Lerner A, Roshal L, eds. *Orthopedics in Disasters: Orthopedic Injuries in Natural Disasters and Mass Casualty Events*. Berlin Heidelberg: Springer, 2016.
17. Zhou X, Yao J, Lin J, Liu J, Dong L, Duan M. Th17/Regulatory T-Cell Imbalance and Acute Kidney Injury in Patients with Sepsis. *J Clin Med*. 2022; 11 (14): 4027.
18. Radygina TV, Kuptsova DG, Petrichuk SV, et al. Expression of CD39 and CD73 ectonucleotidases in CD4+ lymphocyte populations in healthy children. *Russian Journal of Immunology*. 2022; 25 (3): 283–290. Russian.
19. Vaara ST, Hollmén M, Korhonen AM, Maksimow M, Ala-Kokko T, Salmi M, et al. FINNAKI Study Group. Soluble CD73 in Critically Ill Septic Patients — Data from the Prospective FINNAKI Study. *PLoS One*. 2016; 11 (10): e0164420.
20. Zhai X, Chen K, Yang H, Li B, Zhou T, Wang H, et al. Extracellular vesicles derived from CD73 modified human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate inflammation after spinal cord injury. *J Nanobiotechnology*. 2021; 19 (1): 274.