

МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ У ДЕТЕЙ ИЗ КРУПНОГО ПРОМЫШЛЕННОГО ЦЕНТРА

© 2009 В.А. Кельцев, Л.И. Гребенкина, Ю.А. Яхина, Ю.Ю. Антонова
Самарский государственный медицинский университет
Статья получена 14.09.2009 г.

Проведено исследование взаимосвязи морфо-функционального состояния и особенностей цитокиновой регуляции иммунной системы с основными клиническими проявлениями ювенильного идиопатического артрита (ЮИА) и ювенильной склеродермии (ЮСКЛ) у детей в крупном промышленном центре. Обследовано 219 детей, из них 143 с ЮРА и 76 с ЮСКЛ. Субпопуляционный состав лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD19+, CD95+, HLA-DR+) определяли с помощью моноклональных антител методом непрямой иммунофлюоресценции. Методом ИФА в сыворотке крови определяли спонтанную секрецию цитокинов: ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО- α , γ -ИНФ. Выявлены единые изменения в функционировании иммунной системы у детей, страдающих ЮИА и ЮСКЛ. Определяющим моментом в формировании аутоиммунных реакций при ЮИА и ЮСКЛ у детей является разнонаправленные изменения процесса апоптоза основных субпопуляций лимфоцитов, определяемые по цитоморфометрическим показателям и содержанию лимфоцитов, несущих рецептор CD95+. Изменения цитокинового профиля у детей, больных ЮИА и ЮСКЛ, подтверждают аутоиммунный характер воспаления и в тоже время выявляют существенные различия в механизмах, лежащих в основе формирования патогенетических особенностей каждого заболевания.

Ключевые слова: *ювенильный идиопатический артрит, ювенильная склеродермия, цитокины, иммунологические исследования*

В настоящее время актуальной проблемой детской ревматологии является выбор оптимального индивидуализированного лечения конкретного больного. В отсутствие этиотропного лечения сложность данной проблемы заключается в следующем: выбор патогенетической терапии должен проводиться с учетом всех возможных факторов, определяющих пути развития ревматических заболеваний у детей. В связи с этим особенно важным является выяснение и уточнение морфо-функционального состояния и регуляторных механизмов иммунной системы при наиболее часто встречающихся ревматических заболеваниях у детей [1-17].

Целью работы было исследование взаимосвязи морфо-функционального состояния и особенностей цитокиновой регуляции иммунной системы с основными клиническими проявлениями ювенильного идиопатического артрита (ЮИА) и ювенильной склеродермии (ЮСКЛ) в условиях крупного промышленного центра.

Материалы и методы. Обследовано 219 детей, поступивших в детское кардиоревматологическое отделение Самарского областного

Материалы и методы. Обследовано 219 детей, поступивших в детское кардиоревматологическое отделение Самарского областного клинического кардиологического диспансера за 2002-2006 годы. В исследование включались дети с предварительными диагнозами: ЮИА и ЮСКЛ. Все дети обследовались в течение первых 3-5 дней госпитализации до постановки клинического диагноза и назначения базисной терапии. Распределение обследованных детей по полу и клиническим диагнозам представлено в таблице 1. Контрольную группу составили 22 практически здоровых ребенка (13 девочек и 9 мальчиков) с аналогичным распределением по возрасту и полу.

Всем детям проводилось полное клиническое и лабораторное обследование, принятое в ревматологической клинике. Все данные, полученные в процессе исследования, обработаны стандартными статистическими приложениями "Excel-97". Исследования проводились в иммунологическом отделе ЦНИЛ СамГМУ.

Результаты и обсуждение. Анализ клинических данных обследованных детей выявил некоторые особенности в проявлениях в зависимости от диагноза ЮИА или ЮСКЛ. При ЮИА отмечалась более выраженная лабораторная активность воспалительного процесса, чем при ЮСКЛ, несмотря на большую среднюю длительность заболевания. Вообще, по нашим наблюдениям для современного течения ЮСКЛ является очень характерным прогрессирование заболевания с минимальной

Кельцев Владимир Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой факультетской педиатрии. E-mail: keltsev@mail.ru

Гребенкина Людмила Ивановна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры факультетской педиатрии
Яхина Юлия Александровна, старший лаборант кафедры факультетской педиатрии
Антонова Юлия Юрьевна, аспирант

активность со стадии дебюта и значительная клинико-лабораторная диссоциация основных проявлений болезни. У детей, больных ЮИА, отмечалась более частая встречаемость полиартикулярных поражений суставов (78 детей), сопровождающихся существенными рентгенологическими изменениями (II и III стадии) практически у 46% детей этой группы. Кроме этого среди детей больных, ЮСКЛ отмечено наибольшее количество системных проявлений (у 32 детей), а у детей с ЮИА у 14 человек.

Относительные показатели выявления системных проявлений при ЮСКЛ еще более значимые (42,1%), чем при ЮИА (9,8%). Следовательно, развитие системных проявлений у больных ЮСКЛ нельзя объяснить исключительно активностью воспалительного процесса при этом заболевании, скорее всего системные проявления при склеродермии у детей определяются выраженностью иммунопатологических процессов.

Таблица 1. Распределение больных по клиническим диагнозам

Клинический диагноз	Количество больных (n)	Девочки		Мальчики	
		n	в %	n	в %
ЮИА	143	84	38,4	59	26,9
ЮСКЛ	76	47	21,5	29	13,2
Всего	219	131	59,9	88	40,1

При анализе состояния иммунной системы у обследованных больных и детей контрольной группы статистически значимых различий в зависимости от пола и возраста детей не выявлено. Индивидуальные колебания абсолютных значений основных популяций лимфоцитов и их субпопуляций не позволяли достоверно оценить функциональное состояние иммунной системы, поэтому при анализе использовались только относительные значения (процентное содержание) тех или иных показателей. При распределении больных по заболеваниям выявлены определенные различия в состоянии иммунной системы, представленные в таблице 2.

Наиболее выраженные отклонения в иммунологическом статусе при ЮИА и ЮСКЛ отмечались со стороны клеточного звена иммунной системы. При этом для ЮИА были характерны следующие изменения: повышение Т-хелперов (CD4+) на фоне существенного дефицита Т-супрессоров (CD8+), значительный подъем иммунорегуляторного индекса, и самое большое количество клеток, несущих рецептор готовности к апоптозу (CD95+). В тоже время у больных этой группы обнаружены умеренные признаки, характеризующие дисбаланс в функционировании гуморального звена иммунной системы: повышение IgM и дефицит системы комплемента. У детей, больных ЮСКЛ отмечались изменения в иммунном статусе в зависимости от наличия или отсутствия системных проявлений. Причем, закономерно были более выражены при системных проявлениях заболевания и сосредоточены исключительно со стороны клеточных

показателей функционирования иммунной системы и заключались в более выраженном дисбалансе между хелперной активностью (CD4+) и супрессорной функцией (CD8+) Т-лимфоцитов, что отражается в максимальном повышении ИРИ.

По-видимому, отсутствием сколько-либо значимых изменений со стороны гуморального звена иммунной системы можно объяснить низкую лабораторную активность воспалительного процесса при ЮСКЛ. В тоже время выраженные изменения в содержании HLA-DR-лимфоцитов свидетельствует о значительной активации иммунной системы, особенно при системной форме ЮСКЛ.

Отдельного обсуждения заслуживают результаты исследования количества лимфоцитов, несущих рецептор готовности к апоптозу (CD95+/Fas-антиген). Наибольшие значения экспрессии Fas-антигена отмечались у больных ЮИА, причем для системной формы заболевания они были выше, чем в среднем по группе (77,3 против 71,9). Для группы детей с ЮСКЛ характерна не столь существенно повышенная экспрессия CD95+рецептора. Однако при системных проявлениях ЮСКЛ этот показатель статистически не отличался от группы больных с ЮИА. Вообще была отмечена достаточно высокая положительная корреляционная связь между тяжестью течения ревматологических заболеваний (наличие системных проявлений ($r=0,68$), количество пораженных суставов ($r=0,72$), площадью участков склеродермической атрофии кожи ($r=0,57$) и длительность заболевания ($r=0,61$) и количеством презентующих Fas-антиген клеток.

Таблица 2. Изменения иммунологических показателей у детей, больных ЮИА и ЮСКЛ

Показатели	Здоровые дети	Больные ЮИА	Больные ЮСКЛ	Больные ЮСКЛ с системными проявлениями
	n=22	n=143	n=76	n=32
CD3+(%)	69,3±6,21	66,7±8,44	64,2±7,9	61,2±4,6
CD4+(%)	35,1±2,27	59,1±4,92*	54,3±4,63*	58,7±3,96*
CD8+(%)	22,5±2,79	13,9±3,38*	21,2±2,84	11,4±3,18*
CD16+(%)	9,4±2,14	7,8±2,43	8,2±2,28	9,1±2,63
CD19+(%)	13,4±2,86	17,8±3,12	15,1±2,65	14,7±2,58
CD95+(%)	27,5±4,31	71,9±6,54*	51,3±5,26*	69,3±7,64*
HLA-DR+(%)	12,1±2,47	16,1±3,71	15,4±3,22	19,7±3,46*
ИРИ (CD4+/CD8+)	1,6±0,32	4,3±1,08*	2,56±0,48*	5,16±0,82*
IgG (г/л)	11,8±3,24	16,7±3,82	14,6±2,76	13,2±2,76
IgM (г/л)	2,2±0,38	4,4±0,44*	2,9±0,61	3,2±0,83
ЦИК (ед)	96,3±4,8	98,6±5,2	99,2±5,12	94,2±4,26
Комплемент титр (ед)	59,6±5,7	42,6±4,2*	58,3±4,2	57,4±6,1
Фагоцитарный индекс	6,2±0,9	5,9±1,1	5,6±0,82	5,5±0,67

Примечание. * - статистически достоверные различия с контролем при $p < 0,05$.

Достаточно важным является вопрос о том, какие субпопуляции лимфоцитов вносят наибольший вклад в повышенную экспрессию CD95+ при различных ревматических заболеваниях. Для решения данной задачи была построена корреляционная матрица с использованием R-коэффициента корреляции Спирмэна, показывающая связь между процентным содержанием CD95+ лимфоцитов и остальными субпопуляциями лимфоцитов у обследованных детей. У здоровых детей умеренная степень взаимосвязи между презентацией CD95+ и CD3+ и CD4+ лимфоцитами показывает, что происходит нормальный процесс формирования антигенспецифичных Т-клеток и их окончательного дифференцирования. В тоже время при исследуемых заболеваниях у детей отмечаются существенные различия в корреляционных взаимосвязях субпопуляций лимфоцитов и экспрессией Fas-антигена, которые могут отражать определенную направленность патогенетических механизмов формирования заболеваний. При ЮИА и ЮСКЛ отмечается достаточно высокая положительная взаимосвязь между экспрессией CD95+ и CD8+ лимфоцитами, а также умеренная степень корреляции с HLA-DR+ лимфоцитами, что происходит на фоне высокой отрицательной зависимости CD95+ и CD4+ лимфоцитов. Такие результаты корреляционного анализа можно рассматривать как проявление достаточно серьезного Т-супрессорного дефицита, связанного с их выраженной апоптической гибелью и

элиминацией из периферической крови. Выявленная отрицательная взаимосвязь между CD95+ и Т-лимфоцитами-хелперами свидетельствует о нарушении апоптического процесса со стороны Т-хелперов, приводящего к избыточной циркуляции этих клеток, сопровождающейся длительной чрезмерной стимуляции других субпопуляций лимфоцитов, что подтверждается повышением количества HLA-DR+ лимфоцитов. Данные результаты подтверждают основные положения патогенеза ЮИА и ЮСКЛ, рассматриваемые как количественный и/или качественный дефицит Т-супрессорной активности лимфоцитов и позволяют предположить, что в основе этого лежит нарушение процессов апоптоза различных субпопуляций лимфоцитов.

Выявленные изменения в функциональном состоянии иммунной системы подтвердились при изучении цитоморфометрических показателей лимфоцитов периферической крови у обследованных детей. Цитоморфометрия лимфоцитов была проведена у 20 детей каждой группы (здоровые, больные ЮИА, больные ЮСКЛ и больные ЮСКЛ с системными проявлениями). Данные цитоморфометрических исследований лимфоцитов приведены в таблице 3. Средние морфометрические показатели лимфоцитов у больных всех групп претерпевали значительные изменения по сравнению с нормой. Размер цитоплазмы лимфоцитов был в 1,2-1,5 раза меньше, а цитоплазмально-ядерное отношение в 1,2 раза.

Таблица 3. Средние цитоморфометрические показатели лимфоцитов крови детей, больных ЮИА и ЮСКЛ

Показатель	Контроль-ная группа	ЮИА	ЮСКЛ	ЮСКЛ с системными проявлениями
средний размер клетки, мкм	8,52±0,22	7,16±0,37*	6,39±0,44*	5,96±0,42*
средний размер ядра, мкм	5,87±0,18	5,12±0,26*	4,83±0,31*	4,66±0,36*
цитоплазмально-ядерное отношение	0,45±0,06	0,38±0,04	0,34±0,07	0,27±0,08*

Примечание: * - статистически достоверные различия с контролем при $p < 0,05$

Важно отметить, что уменьшение средних размеров лимфоцитов в обеих группах в большей степени происходило за счет размеров цитоплазмы. Встает вопрос, за счет чего происходит уменьшение средних цитоморфометрических показателей иммунокомпетентных клеток при ревматических процессах. Согласно литературным данным, Т-клетки-супрессоры крупные. Они имеют высокое цитоплазмально-ядерное отношение, а Т-хелперы небольшого размера (значительно меньше, чем Т-супрессоры), имеют низкое цитоплазмально-ядерное отношение. Можно предположить, что значительное снижение средних цитоморфометрических показателей лимфоцитов у детей, больных ЮИА и ЮСКЛ, объясняется преобладанием клеток с небольшими размерами ядра и цитоплазмы (CD4+) и уменьшением числа “крупных”

клеток (CD8+). Следовательно, цитоморфометрические исследования косвенно подтверждают данные определения клеточных маркеров лимфоцитов при ЮИА и ЮСКЛ, что нарушение процессов апоптоза приводит к нарушению иммуносупрессорной функции цитотоксических лимфоцитов (CD8+) и способствует неконтрольному функционированию Т-хелперов, обеспечивающих поддержание аутоиммунных процессов.

Мы исследовали содержание цитокинов в сыворотке крови у 36 детей, больных ЮРА, и у 32 детей, больных ЮСКЛ (в том числе у 14 с системными проявлениями). Средние значения концентрации цитокинов в сыворотке крови представлены в табл. 4.

Таблица 4. Содержание цитокинов в сыворотке крови у детей, больных ЮИА и ЮСКЛ

Параметры (нг/мл)	здоровые	ЮИА	ЮСКЛ	ЮСКЛ системная
ФНО	43,2±0,23	73,4±0,35*	56,7±0,08*	69,7±0,39*
ИНФ-g	47,6±0,34	108,4±0,44*	112,7±0,12*	128,2±0,42*
ИЛ-4	45,5±0,04	47,6±0,32*	46,1±0,28*	47,9±0,02*
ИЛ-8	19,8±0,45	38,4±0,07*	29,6±0,44*	37,7±0,11*

Примечание: * - статистически достоверные различия с контролем при $p < 0,05$.

Результаты анализа содержания цитокинов у больных ЮИА и ЮСКЛ показывают принципиальные отличия в регуляции иммунного ответа при этих заболеваниях у детей. Наиболее значимые различия отмечаются в содержании ФНО- α , что объясняет отличие в показателях лабораторной активности при ЮИА и ЮСКЛ. Известно, что ФНО- α является ключевым цитокином, определяющим выработку таких острофазовых маркеров воспаления, как СРБ, серомукоид и др. Поэтому двукратное повышение у больных ФНО- α при ЮИА и при ЮСКЛ системном варианте и тенденция к нарастанию значений этого цитокина при ЮСКЛ очаговой формы являются важным моментом в иммунопатогенетическом объяснении различий в лабораторной активности при двух ревматических заболеваниях у детей. Эти различия могут достаточно четко прояснить отсутствие эффекта при лечении ЮСКЛ очаговой формы нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП). Фактически нормальный уровень ФНО- α при ЮСКЛ

лишает НПВП одной из точек приложения этих препаратов.

Достаточно несущественные различия отмечены в содержании ИЛ-4 при ЮИА и ЮСКЛ, которые свидетельствуют о том, что при ЮИА идет активация как клеточного – Th1-зависимого (повышение γ -ИНФ), так и гуморального – Th2-зависимого (повышение ИЛ-4) иммунного ответа. При ЮСКЛ практически происходит активация только клеточного (резкое повышение γ -ИНФ) звена иммунной системы, причем более выраженное при системных проявлениях ЮСКЛ. Присутствие ярко выраженной зависимости содержания ИЛ-8 в крови от клинических проявлений при ЮИА скорее всего объясняется тем, что данный цитокин определяет не только местные иммунные реакции. Следовательно, повышение ИЛ-8 возможно ожидать в синовиальной жидкости или в сыворотке крови при выраженных системных проявлениях заболеваний, что отмечается при системной форме ЮСКЛ.

Выводы:

1. Выявлены единообразные изменения в функционировании иммунной системы у детей, страдающих ЮИА и ЮСКЛ.

2. Определяющим моментом в формировании аутоиммунных реакций при ЮИА и ЮСКЛ у детей является разнонаправленные изменения процесса апоптоза основных субпопуляций лимфоцитов, определяемые по цитоморфометрическим показателям и содержанию лимфоцитов несущих рецептор CD95+.

3. Изменения цитокинового профиля у детей, больных ЮИА и ЮСКЛ подтверждают аутоиммунный характер воспаления и в тоже время выявляют существенные различия в механизмах, лежащих в основе формирования патогенетических особенностей каждого заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Алексеева, Е.И.* Принципы патогенетической терапии тяжелых системных вариантов ювенильного ревматоидного артрита // Серия. Аутоиммунные болезни. М.: 2002. – 130 с.
2. *Баранов, А.А.* Проблемы ревматических болезней у детей в Российской Федерации // Росс. Педиатр. Жур. – 2003, №5. – С. 4-10.
3. *Барышников, А.Ю.* Моноклональные антитела в лаборатории и клинике. М.: 1997. – 247 с.
4. *Кельцев, В.А.* Ювенильный идиопатический артрит. Самара: 2005. – 214 с.
5. *Кельцев, В.А.* Клиническая артродология // Руководство для врачей. - Самара, 2008. – 680 с.
6. *Кузьмина, Н.Н.* Эволюция взглядов на терминологию и классификацию ювенильных хронических артритов // Ж. Научно-практич. ревматол. – 2001. - №1. – С. 41-45.

7. *Невская, Т.А.* Клиническое значение интерлейкина-4 при системной склеродермии // Научно-практическая ревматология. – 2002. - №1. - С. 9-13.
8. *Baier, A.* Apoptosis in rheumatoid arthritis // Curr. Opin. Rheumatol. – 2003, – V. 15, № 3. – P.274-279.
9. *Ciaran, M.* Nomenclature and Classification in Chronic Childhood Arthritis Time for a Change? // Arthritis Rheum. – 2005, – V. 52, № 2. – P. 382-385.
10. *Hashimoto, H.* Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. // Arth. Rheum. – 1998. – V. 41, №4. – P. 657-662.
11. *Kawakami, A.* Involvement of apoptotic cell death in autoimmune diseases. // Med. Electron. Microsc. – 2002. – V. 35, № 1. – P. 1-8.
12. *Mountz, J.D.* Apoptosis and rheumatoid arthritis: past, present and future directions. // Curr. Rheumatol. Rep. – 2001. – V. 3, №1. – P. 70-78.
13. *O'Dell, J.R.* Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis // N. Engl. J. Med. – 2004. – V. 350. – P. 2591-2602.
14. *Tsuboi, M.* Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts // J. Lab. Clin. Med. – 1999. – V. 134, №3. – P. 222-231.
15. *Van Everdinger, A.A.* Low dose prednisolone therapy for patients with early active rheumatoid arthritis; clinical efficacy, disease modifying propwerties and side effects: a randomized double-blind placebo-controlled trial // Ann. Intern. Med. – 2002. – V. 136. – P. 1-12.
16. *Wakisaka, S.* Modulation by proinflammatory cytokines of Fas/Fas ligand-mediated apoptotic cell death of synovial cells I patients with rheumatoid arthritis (RA) // Clin. Exp. Immunol. – 1998. – V.144, № 1. – P. 119-128.
17. *Zulian, F.* Comparison of intraarticular triamcinolone hexacetonide and triamcinolone acetonide in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis // Rheumatology. – 2003. – V. 42. – P. 1254-1259.

MORPHO-FUNCTIONAL STATE OF IMMUNE SYSTEM IN RHEUMATIC DISEASES AT CHILDREN FROM MEGAPOLICE

© 2008 V.A.Keltsev, L.I. Grebenkina, Yu.A. Yahina, Yu.Yu. Antonova
Samata State Medical University
Article is received 2009/09/14

It is carried out research of interrelation of a morpho-functional state and features of cytokine regulation of immune system with the basic clinical symptoms of juvenile idiopathic arthritis (JIA) and juvenile scleroderma (JSCL) at children in large industrial center. 219 children, from them 143 with JIA and 76 with JSCL are surveyed. Lymphocytes subpopulation structure (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD19+, CD95+, HLA-DR+) are defined by means of monoclonal antibodies by method of indirect immunofluorescence. By the help of IFA method in blood Serum it was defined spontaneous cytokines secretion: IL-4, IL-8, FNO- \square , \square -INF. Uniform changes in immune system functioning at children suffering from JIA and JSCL are revealed. The defining moment in formation of autoimmune reactions at JIA and JSCL at children is diversidirected changes of apoptosis process of the basic lymphocytes subpopulations, defined on cytomorphometrical parameters and maintenance of lymphocytes, carrying CD95+ receptor. Changes of cytokines profile at children, suffering from JIA and JSCL, confirm autoimmune character of inflammation and at the same time reveal essential distinctions in the mechanisms underlying in formation of pathogenetic features of each disease.

Key words: *juvenile idiopathic arthritis, juvenile scleroderma, cytokines, immune researches*

Vladimir Keltsev, Doctor of Medicine, Professor, Head of the Faculty Pediatrics Department. E-mail: keltsev@mail.ru
Lyudmila Grebenkina, Candidate of Medicine, Assistant at the Faculty Pediatrics Department
Yuliya Yahina, Senior Laboratorian at the Faculty Pediatrics Department
Yuliya Antonova, Graduate Student