

# ОЦЕНКА ОСОБЕННОСТЕЙ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА И ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ СОЕДИНİТЕЛЬНОЙ ТКАНИ: ДИСКРИМИНАНТНЫЙ АНАЛИЗ

Пашнина И.А.<sup>1,2</sup>, Кшнясев И.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Клиническая лаборатория, Областная детская клиническая больница;

<sup>2</sup>Лаборатория иммунологии воспаления, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН;

<sup>3</sup>Лаборатория популяционной экологии и моделирования, Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия

У детей с аутоиммунной патологией соединительной ткани методом проточной цитометрии исследованы: субпопуляционный состав, спонтанная и стимулированная экспрессия маркеров активации лимфоцитов периферической крови. Обследованы дети 6-17 лет с системной красной волчанкой (n=15), с ювенильной склеродермией (n=16), с идиопатическим ювенильным артритом (n=75), с реактивным артритом (n=16), а также условно здоровые дети (n=32) и больные с хроническим гепатитом С (n=24). С помощью дискриминантного анализа выявлено, что группы детей с различными ревматическими заболеваниями по исследованным параметрам отличались друг от друга в существенно меньшей степени, чем от здоровых детей и от больных с хроническим гепатитом С. Группы с заболеваниями суставов – ювенильным идиопатическим артритом и реактивным артритом, статистически не различались. Данные нозологии являются близкими по клиническим проявлениям, схожесть функционального состояния лимфоцитов периферической крови подтверждает аналогию изменений в иммунной системе при развитии ювенильного идиопатического артрита и реактивного артрита.

**Ключевые слова:** аутоиммунные заболевания, лимфоциты, проточная цитометрия

**Введение.** Совершенствование методов лабораторной диагностики аутоиммунной патологии соединительной ткани (ревматических заболеваний) представляет актуальную проблему современной ревматологии [1]. Это обусловлено, с одной стороны, широкой распространенностью данной группы болезней, а с другой – недостаточной чувствительностью и специфичностью имеющихся лабораторных методов [1, 2, 3]. Определение субпопуляционного состава и экспрессии маркеров активации широко используется для оценки функционального состояния лимфоцитов периферической крови при различной патологии [4, 5]. Лимфоциты, как центральные клетки иммунной системы, вовлечены в патогенез аутоиммунных заболеваний, при которых выявлены различные изменения субпопуляционного состава и экспрессии маркеров активации

иммунокомpetентных клеток [6, 7, 8]. Однако, результаты работ разных авторов по данной проблематике не всегда согласуются между собой, литературные данные о функциональном состоянии лимфоцитов у детей с аутоиммунной патологией фрагментарны.

Целью настоящей работы явилась оценка методом дискриминантного анализа функционального состояния лимфоцитов периферической крови по параметрам их субпопуляционного состава, спонтанной и стимулированной экспрессии маркеров активации у детей с аутоиммунной патологией соединительной ткани.

Обследованы дети 6-17 лет с ревматическими заболеваниями в стадии активности: с системной красной волчанкой (СКВ, n=15), с ювенильной склеродермией (ЮСД, n=16), с ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА, n=75), с реактивным артритом (РеА,

n=16).  
мунно  
с физи  
ческим  
дованы  
группа  
ным ге  
Лаб  
тодом  
ем мо  
USA).  
делено  
цитов  
фоцит  
цитоте  
дубль-  
дубль-  
натура  
тураль  
фоцит  
(CD3+CD  
DR<sup>+</sup>);  
лавши  
T-клет  
рованн  
Для оц  
CD3<sup>+</sup>С  
и CD3  
vitro о  
ви ра  
RPMI-  
1:9 и  
5% СС  
фитоге  
ной ко  
(Биокс  
2 мкг/1  
телами  
0,8 мкг  
Для  
ностей

Таблица  
ции мар  
ноничес  
Группа  
ЮСД  
ЮИА  
РеА  
ХГС  
Контро  
Примеч

n=16). Для сопоставления изменений в иммунной системе при аутоиммунной патологии с физиологической нормой, а также с хроническим инфекционным заболеванием исследованы условно здоровые дети (контрольная группа, n=32) и больные с хроническим вирусным гепатитом С (ХГС, n=24).

Лабораторные исследования проведены методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA). В образцах периферической крови определено количество: лейкоцитов (CD45<sup>+</sup>); лимфоцитов (CD45<sup>high</sup>); Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>); В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>); Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>); цитотоксических Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>); дубль-негативных Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>); дубль-позитивных Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>); натуральных киллеров (CD3<sup>-</sup>CD16/56<sup>+</sup>); Т-натуральных киллеров (CD3<sup>+</sup>CD16/56<sup>+</sup>); Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры активации (CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>); цитотоксических Т-клеток, экспрессировавших CD25 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>); регуляторных Т-клеток (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/neg</sup>) и активированных Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>). Для оценки количества CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low/neg</sup> и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> при стимуляции *in vitro* образцы цельной периферической крови разводили глутаминсодержащей средой RPMI-1640 (Пан-Эко, Россия) в соотношении 1:9 и инкубировали в течение 4-х часов (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) без стимулятора и при воздействии: фитогемагглютинина (ФГА, Sigma) в конечной концентрации 20 мкг/мл; антител к CD3 (Биокон, Россия) в конечной концентрации 2 мкг/мл – отдельно, или в сочетании с антителами к CD28 в конечной концентрации 0,8 мкг/мл (Beckman Coulter, США).

Для оценки сходства, или наоборот, особенностей детей с установленными диагнозами

в многомерном пространстве изученных параметров использован дискриминантный анализ, позволяющий оценить особенности функционального состояния лимфоцитов периферической крови по комплексу признаков [9, 10].

Проведенный многомерный анализ позволил статистически значимо дискриминировать почти все исследованные группы по параметрам функционального состояния лимфоцитов периферической крови (таблица). Исключением стали лишь группы с ЮИА и РeA, квадрат расстояния Махаланобиса между центроидами групп был наименьшим (таблица). Наибольшую дистанцию от других групп имела группа с ХГС, на втором месте по удаленности находилась контрольная группа (таблица). Таким образом, группы с аутоиммунной патологией в меньшей степени отличались друг от друга по функциональному состоянию лимфоцитов периферической крови, чем от группы здоровых детей и больных с хроническим инфекционным заболеванием (ХГС).

Использование дискриминантного анализа обеспечило классификацию случаев (пациентов), верную на 85,3%. Наилучшие результаты достигнуты для групп клинически здоровых детей и ХГС, где доля корректной классификации превысила 90%, а за пределами исходной группы оказалось лишь по два и по одному обследованному ребенку, соответственно. Худший результат достигнут для группы с реактивным артритом (РeA), доля корректной классификации составила 37,5%. Следует отметить, что более трети больных из этой группы в результате проведенного анализа были автоматически классифицированы в группу с ЮИА. Ювенильный идиопатический артрит и реактивный артрит относятся к поражениям суставной системы, имеющим в своем патогенезе аутоиммунную составляющую [2]. Эти заболевания имеют схожую клиническую

Таблица. Результаты дискриминантного анализа параметров субпопуляционного состава лимфоцитов и экспрессии маркеров активации Т-клеток у детей в норме и при патологии, расстояния между группами в проекции на канонические дискриминантные функции (квадрат расстояния Махаланобиса)

Группа	СКВ	ЮСД	ЮИА	РeA	ХГС
ЮСД	12,25***				
ЮИА	11,44***	5,97***			
РeA	13,39***	8,92**	2,67 <sup>ns</sup>		
ХГС	17,55***	27,05***	24,38***	22,50***	
Контроль	16,69***	14,01***	14,72***	19,50***	27,00***

Примечание: \*\* – p<0,01; \*\*\* – p<0,001; <sup>ns</sup> – статистически не значимо

картину, и, зачастую, характеризуются аналогичными результатами инструментальных и лабораторных исследований [2]. Минимальная дискриминация больных с ЮИА и с РeA по параметрам функционального состояния лимфоцитов периферической крови подтверждает общность патогенеза этих двух заболеваний.

Таким образом, проведение дискриминантного анализа субпопуляционного состава и экспрессии маркеров активации лимфоцитов позволило разделить группы клинически здоровых детей, больных с аутоиммунной патологией и с хроническим вирусным гепатитом С. Группы пациентов с различными ревматическими заболеваниями отличались друг от друга в меньшей степени, чем от здоровых детей и от больных с ХГС. Это указывает на схожесть функционального состояния лимфоцитов периферической крови при ревматических болезнях у детей. Группы с заболеваниями суставов – ювенильным идиопатическим артритом и реактивным артритом, не различались между собой. Данные нозологии являются близкими по клиническим проявлениям [2], отсутствие существенных различий по параметрам функционального состояния лимфоцитов периферической крови при ЮИА и РeA подтверждает схожесть изменений в иммунной системе при развитии этих заболеваний.

## THE ASSESSMENT OF ESTIMATE OF SUBPOPULATION STRUCTURE AND ACTIVATION MOLECULES EXPRESSION ON PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN CHILDREN WITH AUTOIMMUNE DISEASES OF CONNECTIVE TISSUE: DISCRIMINANT ANALYSIS

Pashnina I. A., Kshnyasev I. A.

Children of 6-17 years old affected by autoimmune connective tissue diseases – systemic lupus erythematosus ( $n=15$ ), systemic sclerosis ( $n=16$ ), juvenile idiopathic arthritis ( $n=75$ ), reactive arthritis ( $n=16$ ) or chronic hepatitis C ( $n=24$ ) and conditionally healthy controls ( $n=32$ ) were examined. Subpopulation structure, spontaneous and stimulated expression of activation molecules on lymphocytes in peripheral blood were investigated by flow cytometry. Using discriminant analysis we revealed that differences among rheumatic diseases were less evident than between them and chronic hepatitis C or healthy children. Statistically significant differences were not observed between juvenile idiopathic arthritis and reactive arthritis, which characterized by the similar clinical manifestations too. Thus analogy in lymphocytes functional condition confirms a correspondence in immune system changes along autoimmune diseases development.

**Keywords:** autoimmune diseases, lymphocytes, flow cytometry

Авторы приносят искреннюю благодарность врачам ОДКБ № 1 Козловой Е. С., Скоробогатовой О. В., Каракиной М. Л. и Салохиной Е. Н. за подбор пациентов для исследования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ревматология: Клинические рекомендации /Под ред. Акад. РАМН Е. Л. Насонова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010, 752.
2. Алексеева Е. И., Литвицкий П. Ф. Ювенильный ревматоидный артрит: этиология, патогенез, клиника, алгоритмы диагностики и лечения: руководство для врачей, преподавателей, научных сотрудников /Под общ. ред. А. А. Баранова. ВЕДИ, Москва 2007, 368.
3. Hiraki L. T., Feldman C. H., Liu J. et al. Arthritis & Rheumatism, 2012, 64, 8, 2669-2676.
4. Зурочка, А. В., Хайдуков С. В., Кудрявцев И. В., Чешнин В. А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. УрО РАН, Екатеринбург 2014, 576.
5. Lisowska K. A., Dębska-Słomieś A., Jasulewicz A. et al. J. Clin. Immunol., 2012, 32, 189-200.
6. Торгашина А. В., Быковская С. Ю., Соловьев С. К., Насонов Е. Л. Научно-практическая ревматология, 2009, 3, 50-59.
7. Bijl M., Horst G., Limburg P. C., Kallenberg C. M. Ann. Rheum. Dis., 2001, 60, 523-526.
8. Lee I.-F., van den Elzen P., Tan R., Priatel J. J. The Journal of Immunology, 2011, 187, 2898-2904.
9. Tabachnick, B. G., Fidell, L. S. Using Multivariate Statistics. Pearson, Boston 2013, 983.
10. Quinn G. P., Keough M. J. Experimental Design and Data analysis for Biologists, Cambridge University Press, UK 2003, 537.