

Клеточный состав воспалительных инфильтратов малой слюнной железы как дополнительный диагностический критерий первичного синдрома Шегрена

Е.С. Кувардин¹, И.Н. Григорьева¹, И.А. Бехтерева², А.Л. Маслянский¹, Ю.А. Криволапов², Е.А. Белякова²

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России 197341, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2
²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России 198015, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

¹Almazov National Medical Research Centre 197341, Russian Federation, Saint Petersburg, Akkuratova str., 2
²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov 191015, Russian Federation, Saint-Petersburg, Kirochnaya str., 41

Контакты: Кувардин Евгений Сергеевич, evgenkuv23@yandex.ru

Contacts: Evgeny Kuvardin, evgenkuv23@yandex.ru

Поступила 08.10.2019
Принята 02.07.2021

Болезнь Шегрена, или первичный синдром Шегрена (ПСШ), — одна из самых частых нозологических форм в группе диффузных заболеваний соединительной ткани. Важнейшим методом диагностики ПСШ является гистологическое исследование малой слюнной железы (МСЖ). Имеющиеся в настоящее время гистологические критерии ПСШ не обладают абсолютной чувствительностью и специфичностью, что делает поиск дополнительных морфологических признаков актуальным.

Цели исследования — изучение качественного и количественного составов клеточных популяций воспалительных инфильтратов малой слюнной железы при первичном синдроме Шегрена с разработкой дополнительных диагностических критериев заболевания.

Материалы и методы. В исследование включены 55 пациентов с ПСШ, соответствующих критериям ACR/EULAR (2016), не получавших ранее генно-инженерные биологические препараты. В группу контроля вошли 18 здоровых добровольцев. Всем исследуемым выполнялась биопсия МСЖ для проведения гистологического и иммуногистохимического исследований с количественной оценкой CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD21+, CD68+, CD138+-клеток. Статистический анализ результатов проведен с использованием прикладной программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft Inc., США). Для сравнения количественных признаков использовался U-критерий Манна — Уитни. Для определения диагностического порога (ДП) для удельного количества клеток проводился ROC-анализ, строилась кривая операционной характеристики, рассчитывались площадь под кривой (ППК), показатели диагностической специфичности (ДС), диагностической чувствительности (ДЧ), диагностической точности (ДТ), отношение правдоподобия положительного (ОППР) и отрицательного (ОПОР) результатов теста. Построение классификационных моделей, включающих удельное количество разных типов клеток, осуществлялось при помощи линейного дискриминантного анализа.

Результаты и обсуждение. Количество CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD138+ клеток в 4 мм² (площадь среза) было значимо выше в группе ПСШ. Наибольшая ППК наблюдалась для количественной оценки CD3+-клеток — 0,88 [95%-й доверительный интервал (ДИ): 0,80–0,96] и CD8+-клеток — 0,87 [95% ДИ: 0,79–0,95], что при заданных ДП соответствовало ДЧ 70,9% [95% ДИ: 57,86–81,23] и 65,45% [95% ДИ: 52,25–76,64]; ДС — 94,4% [95% ДИ: 74,24–99,72] и 100% [95% ДИ: 82,41–100] соответственно.

CD21+ фолликулярные дендритные клетки выявлялись только в группе ПСШ. ППК при количественной оценке этих клеток составляла 0,65 [95% ДИ: 0,52–0,78], ДЧ — 29,1% [95% ДИ: 18,77–42,14], ДС — 100% [95% ДИ: 82,41–100].

Методом дискриминантного анализа были построены классификационные модели, включающие различные комбинации исследуемых клеточных популяций. Наибольшая ППК среди всех возможных сочетаний наблюдалась для десятичных логарифмов удельного количества CD3+ и CD68+-клеток — 0,92 [95% ДИ: 0,85–0,98], что при заданном ДП соответствовало ДЧ 81,82% [95% ДИ: 69,67–89,81] и ДС — 94,4% [95% ДИ: 74,24–99,72].

Ключевые слова: первичный синдром Шегрена, биопсия, иммуногистохимическое исследование, малая слюнная железа, Т-клетки, В-клетки, макрофаги, фолликулярные дендритные клетки, плазматические клетки

Для цитирования: Кувардин ЕС, Григорьева ИН, Бехтерева ИА, Маслянский АЛ, Криволапов ЮА, Белякова ЕА. Клеточный состав воспалительных инфильтратов малой слюнной железы как дополнительный диагностический критерий первичного синдрома Шегрена. *Научно-практическая ревматология*. 2021;59(4):434–441.

CELLULAR COMPOSITION OF THE MINOR SALIVARY GLAND INFLAMMATORY INFILTRATES AS AN ADDITIONAL DIAGNOSTIC CRITERION FOR PRIMARY SJOGREN'S SYNDROME

Evgeny S. Kuvardin¹, Irina N. Grigor'yeva, Irina A. Bekhtereva², Alexey L. Maslyansky¹, Yuri A. Krivolapov², Elena A. Belyakova²

Primary Sjogren's syndrome (pSS) is one of the most frequent among the connective tissue diseases. Histological examination of the minor salivary gland (MSG) is important diagnostic method. The currently established histological criteria for pSS do not have absolute sensitivity and specificity, which makes the search for additional morphological hallmark relevant.

Aim — to study of the qualitative and quantitative composition of cellular populations inflammatory infiltrates in MSG pSS patient with the assessment of additional diagnostic criteria for disease based on the data obtained.

Subjects and methods. The study included 55 patients with a diagnosis of pSS according to the criteria of ACR/EULAR 2016. The control group consisted of 18 healthy volunteers. A MSG biopsy was performed all subjects for histological and immunohistochemical studies with a quantitative assessment of CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD21+, CD68+, CD138+ cells. Statistical data analysis was performed using the Statistica 10.0 for Windows (StatSoft Inc., USA). For comparison of quantitative traits, the Mann — Whitney U-test was used. To determine

the diagnostic threshold of the number of a ROC analysis was performed. An operating characteristic curve was plotted. The area under the curve (AUC), diagnostic specificity, diagnostic sensitivity, diagnostic accuracy, likelihood ratio of the positive and negative results of the test were calculated. The construction of classification models, including the number of different cell types, was carried out using linear discriminant analysis. **Results and discussion.** The number of CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD138+ cells in 4 mm² (area of section) was significantly higher in the pSS group. The largest AUC were observed for the quantitative evaluation of CD3+ cells – 0.88 [95% confidence interval (CI): 0.80–0.96] and CD8+ cells – 0.87 [95% CI: 0.79–0.95], which at the specified diagnostic thresholds corresponded to the sensitivity of 70.9% [95% CI: 57.86–81.23] and 65.45% [95% CI: 52.25–76.64], specificity of 94.4% [95% CI: 74.24–99.72] and 100% [95% CI: 82.41–100], respectively.

The CD21+ follicular dendritic cells were detected only in MSG of pSS group. AUC for quantitative assessment of these cells was 0.65 [95% CI: 0.52–0.78], sensitivity 29.1% [95% CI: 18.77–42.14] and specificity 100% [95% CI: 82.41–100].

Using the method of discriminant analysis, we designed classification models that included various combinations of the studied markers. The highest AUC among all possible combinations was observed for the decimal logarithms of the number of CD3+ and CD68+ cells – 0.92 [95% CI: 0.85–0.98], which for a given diagnostic threshold corresponded sensitivity – 81.82% [95% CI: 69.67–89.81], specificity – 94.4% [95% CI: 74.24–99.72].

Key words: primary Sjogren's syndrome, biopsy, immunohistochemistry, small salivary gland, T cells, B cells, macrophages, follicular dendritic cells, plasmacytes

For citation: Kuvardin ES, Grigor'yeva IN, Bekhtereva IA, Maslyansky AL, Krivolapov YuA, Belyakova EA. Cellular composition of the minor salivary gland inflammatory infiltrates as an additional diagnostic criterion for primary Sjogren's syndrome. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2021;59(4):434–441 (In Russ.).

doi: 10.47360/1995-4484-2021-434-441

Болезнь Шегрена, или первичный синдром Шёгрена (ПСШ), – системное заболевание неизвестной этиологии, характерной чертой которого является хронический аутоиммунный и лимфопролиферативный процесс в секретирующих эпителиальных железах с развитием паренхиматозного сиалоаденита с ксеростомией и сухого кератоконъюнктивита с гипоплакирией [1].

По данным эпидемиологических исследований, распространенность ПСШ в разных популяциях колеблется от 11 до 86 случаев на 100 тыс. человек [2] и наиболее значительна среди женщин в возрасте 35–55 лет. Эти показатели позволяют его считать одним из самых частых диффузных заболеваний соединительной ткани, но распространенность ПСШ в России не известна.

За период с 1965 по 2002 г. были опубликованы 11 вариантов классификационных/диагностических критериев ПСШ, но ни один из них не был принят Американской коллегией ревматологов (ACR, American College of Rheumatology) и Европейской антиревматической лигой (EULAR, European League Against Rheumatism) [3]. В 2002 г. Американско-Европейской группой (AECG, American-European Consensus Group) разработаны критерии, получившие наибольшее распространение и активно использовавшиеся на протяжении десяти лет, в течение которых были выявлены недостатки новой классификации. Превалирование на ранних стадиях ПСШ фибромиалгического синдрома при отсутствии признаков ксеростомии и ксерофтальмии не позволяло использовать критерии в дебюте заболевания. Проведение сиалографии околоушных слюнных желез сопряжено с высоким риском осложнений, техническими трудностями и было недоступно в большинстве медицинских учреждений. Одновременное включение клинических, лабораторных и инструментальных данных усложняло критерии, затрудняя их использование в практической деятельности.

Учитывая недостатки предыдущих классификаций, ACR и EULAR в 2016 г. совместно предложили новые критерии ПСШ.

Согласно критериям ПСШ ACR/EULAR (2016), диагностика основывается на объективных признаках сухого синдрома, выявлении аутоантител к Ro-SSA и результатах гистологического исследования малой слюнной железы (МСЖ). Лабораторные и гистологические исследования обладают наибольшим удельным диагностическим весом.

Характерная гистологическая картина ПСШ – очаговый сиалоаденит с наличием фокусов, содержащих ≥50 мононуклеарных клеток (преимущественно лимфоцитов), расположенных перидуктально и/или периваскулярно (рис. 1), при значении Focus Score (FS) ≥1. FS – показатель, который вычисляется по формуле $FS = n/a \times 4 \text{ мм}^2$, где n – количество фокусов, содержащих ≥50 мононуклеарных клеток, a – площадь среза биоптата МСЖ). Полученное значение соответствует количеству фокусов на 4 мм² гистологического среза.

В критериях ПСШ ACR/EULAR подчеркивается необходимость участия в гистологическом исследовании морфолога с опытом выявления очагового лимфоцитарного сиалоаденита и подсчета FS. Гистологические критерии ПСШ обеспечивают чувствительность и специфичность 61,2–93,7% и 61,2–100% соответственно [4]. Поэтому поиск дополнительных гистологических признаков, которые увеличат чувствительность и специфичность этого метода исследования, представляется весьма актуальным.

При окраске гематоксилином-эозином состав очаговых скоплений мононуклеаров в МСЖ не может быть охарактеризован достаточно точно. Иммуногистохимический (ИГХ) метод позволяет более детально изучить

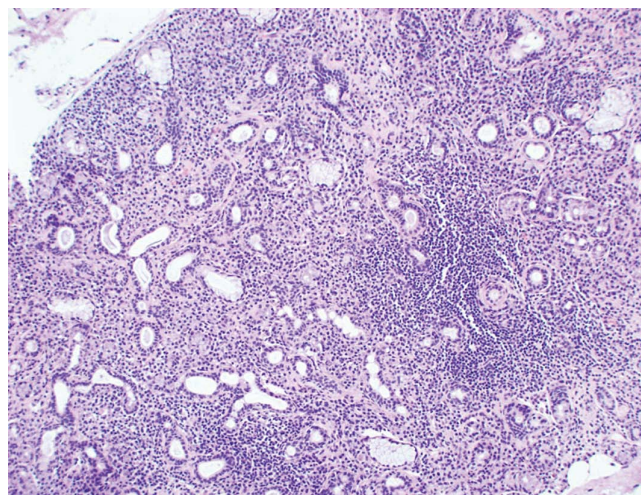


Рис. 1. Фокусы лимфогистиоцитарной инфильтрации в ткани малой слюнной железы при ПСШ. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение ×100

состав воспалительного инфильтрата МСЖ и представляется одним из наиболее перспективных направлений в разработке дополнительных гистологических критериев диагностики заболевания.

Ранее с этой целью предлагалась оценка процентного соотношения плазматических клеток, секретирующих разные классы иммуноглобулинов [5, 6]. Ввиду недостаточного количества данных, несмотря на демонстрируемые в работах высокие уровни специфичности и чувствительности, этот признак в настоящий момент не рассматривается как дополнительный критерий диагностики [7].

Целью настоящей работы является изучение качественного и количественного составов клеточных популяций воспалительных инфильтратов малой слюнной железы при первичном синдроме Шегрена с разработкой дополнительных диагностических критериев заболевания.

Материалы и методы

В одномоментное исследование включены пациенты с ПСШ в возрасте старше 18 лет, обследованные в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России в течение 2016–2018 гг., не получавшие ранее генно-инженерные биологические препараты. Диагноз ПСШ соответствовал классификационным критериям ACR/EULAR (2016).

Контрольную группу составили здоровые добровольцы в возрасте старше 30 лет, имеющие результаты теста Ширмера более 15 мм за 5 мин, нестимулированной сиалометрии — более 1,5 мл за 15 мин, титр антинуклеарного фактора (АНФ) — не более 1:100.

Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено комитетом по этике ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России.

Тест Ширмера проводился без применения локальных анестетиков с использованием специальных тест-полосок (Contacare, Индия). Измерение нестимулированной сиалометрии осуществлялось согласно общепринятым рекомендациям [8]. Исследование АНФ проводилось методом непрямой иммунофлюоресценции на клетках линии Нер-2 с определением титра и типа свечения. Ro/SS-A антитела определялись методом лайн-блоттинга.

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ), уровни С-реактивного белка (СРБ), С3-, С4-фракций комплемента определялись стандартными методами с использованием коммерческих реагентов.

Оценка активности заболевания проводилась с помощью индекса активности ПСШ EULAR (ESSDAI, EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index) и индекса активности ПСШ EULAR, указанного пациентом (ESSPRI, EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index).

Всем обследуемым (основная и контрольная группы) в асептических условиях под местной анестезией 1%-м раствором лидокаина выполнялась биопсия МСЖ согласно методу Н. Терро (2006) [9]. Полученный биоптат фиксировался в 10%-м нейтральном забуференном формалине. Кусочки подвергали стандартной проводке с последующей заливкой в парафин. Из полученных блоков готовили срезы толщиной 2–3 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизону, трихромом по Массону, реактивом

Шиффа (PAS-реакция). Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах. Использовалась панель антител: CD3 (polyclonal rabbit, DAKO), CD4 (monoclonal rabbit, clone SP35, CELL MARQUE), CD8 (monoclonal mouse, clone CB/1448, DAKO), CD20 (monoclonal mouse, clone L26, DAKO), CD21 (monoclonal mouse, clone 2G9, ImmunoLogic), CD68 (monoclonal mouse, clone KP1, DAKO), CD138 (monoclonal mouse, clone M15, DAKO); система визуализации Envision FLEX (DAKO). Препараты докрашивали гематоксилином и заключали под покровное стекло. Оценка результатов проводилась с помощью светового микроскопа OLYMPUS BX-46.

Статистический анализ результатов проведен с использованием лицензионных прикладных статистических программ Statistica 10.0 для Windows (StatSoft Inc., США). При выявлении ненормального характера распределения результаты описывались в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей. Для сравнения количественных признаков использовался U-критерий Манна – Уитни. Корреляционный анализ проводился с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Для определения диагностического порога (ДП) для каждого изучаемого признака проводился ROC-анализ, строилась кривая операционной характеристики, рассчитывались площадь под кривой (ППК), показатели диагностической специфичности (ДС), диагностической чувствительности (ДЧ), диагностической точности (ДТ), отношение правдоподобия положительного (ОППР) и отрицательного (ОПОП) результатов теста. Приведение несимметрично распределенных данных к приближенно нормальному распределению проводилось при помощи логарифмирования. Построение классификационных моделей, включающих удельное количество разных типов клеток, осуществлялось при помощи линейного дискриминантного анализа. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В исследовании приняли участие 55 пациентов (табл. 1) с ПСШ. Медиана возраста составляла 52 [42; 63] года, продолжительности заболевания — 7 [4; 12] лет. На момент включения в исследование у 34 (61,8%) пациентов в течение разного времени проводилась терапия.

На момент обращения к ревматологу 30 (54,5%) пациентов предъявляли жалобы на сухость слизистых оболочек. У 22 (40%) пациентов методом нестимулированной сиалометрии была выявлена ксеростомия, ксерофотальмия по результатам теста Ширмера отмечалась у 27 (49%) больных.

Только в 58,2% случаев выявлялись антитела к Ro-SSA антигену, что согласуется с ранее опубликованными данными [10] и подчеркивает ценность гистологического метода диагностики.

При ИГХ-исследовании удельное количество CD3+, CD4+ (рис. 2), CD8+ (рис. 3), CD20+ (рис. 4), CD138+ (рис. 5) клеток в биоптатах МСЖ было статистически значимо выше в группе ПСШ (табл. 2).

CD21-позитивные фолликулярные дендритные клетки в МСЖ выявлены у 17 (30,9%) пациентов (рис. 6) и не обнаружены у добровольцев из группы контроля ($p = 0,008$).

Таблица 1. Клиническая характеристика больных ПСШ (n=55)

Показатели	Значение
Соотношение мужчины/женщины, n	3/52
Клинические проявления, n (%)	
конституциональные изменения	1 (1,8)
лимфаденопатия	4 (7,2)
увеличение размеров слюнных желез	1 (1,8)
суставной синдром	25 (45,5)
кожные изменения	0 (0)
поражение лёгких	4 (7,2)
поражение почек	1 (1,8)
поражение мышц	2 (3,6)
поражение периферической нервной системы	5 (9)
поражение центральной нервной системы (поперечный миелит)	1 (1,8)
аутоиммунная цитопения	11 (20)
снижение концентрации C3- и/или C4-фракций комплемента	5 (9)
гипергаммаглобулинемия	19 (34,5)
Терапия на момент включения в исследование, n (%)	
без лечения	22 (40)
гидроксихлорохин	8 (14,5)
глюкокортикоиды	22 (40)
метотрексат	6 (10,9)
лефлуномид	2 (3,6)
циклоsporин	2 (3,6)
циклофосфамид	3 (5,4)
нестероидные противовоспалительные препараты	5 (9)
Возраст (годы), Me [25-й; 75-й перцентили]	52 [42; 63]
Длительность заболевания (годы), Me [25-й; 75-й перцентили]	7 [4; 12]
ESSPRI (баллы), Me [25-й; 75-й перцентили]	4,9 [3,3; 6]
ESSDAI (баллы), Me [25-й; 75-й перцентили]	4 [2; 8]
Титр АНФ, Me [25-й; 75-й перцентили]	1000 [320; 1820]
Анти-Ro/SSA, n (%)	32 (58,2)
Анти-La/SSB, n (%)	18 (32,8)
Анти-Ro52, n (%)	23 (41,8)
Тест Ширмера (мм), Me [25-й; 75-й перцентили]	6 [3; 15]
Нестимулированная сиалометрия (мл), Me [25-й; 75-й перцентили]	1 [0,5; 2,5]
СОЭ (мм/ч), Me [25-й; 75-й перцентили]	26 [12; 40]
СРБ (мг/л), Me [25-й; 75-й перцентили]	3 [1,2; 6,1]
C3 (г/л), Me [25-й; 75-й перцентили]	1,15[1,0; 1,38]
C4 (г/л), Me [25-й; 75-й перцентили]	0,21 [0,16; 0,3]
FS, Me [25-й; 75-й перцентили]	1,3 [0,5; 3,3]
FS<1, n (%)	19 (34,5)
FS≥1, n (%)	36 (65,5)

Таблица 2. Содержание клеточных популяций в биоптатах ткани МСЖ у пациентов с ПСШ и в контрольной группе, Me [25-й; 75-й перцентили]

Тип клеток	Контрольная группа (n=18)	Пациенты с ПСШ (n=55)	p
CD3 ⁺ Т-клетки	30 [21; 42]	132 [61; 533]	p<0,001
CD4 ⁺ Т-клетки	16 [12; 33]	73 [31; 227]	p<0,001
CD8 ⁺ Т-клетки	11 [7; 16]	36 [20; 80]	p<0,001
CD20 ⁺ В-клетки	13 [8; 17]	63 [24; 261]	p<0,001
CD138 ⁺ плазматические клетки	111 [58; 196]	340 [190; 700]	p<0,001
CD21 ⁺ фолликулярные дендритические клетки*	0 [0; 0]	0 [0; 2]	p=0,008
CD68 ⁺ тканевые макрофаги	7 [5; 15]	13 [6; 33]	p=0,086

Примечание: * – у 38 из 55 пациентов с ПСШ в биоптате МСЖ CD21-позитивные клетки не выявлены, поэтому медиана их количества в этой подгруппе – 0, среднее значение – 14, стандартное отклонение – 46

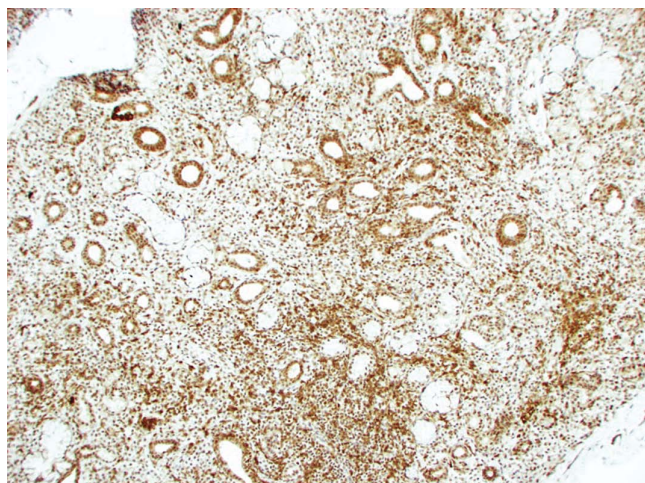


Рис. 2. Выраженная экспрессия CD4 в ткани малой слюнной железы при ПСШ. ИГХ-реакция. Увеличение $\times 100$

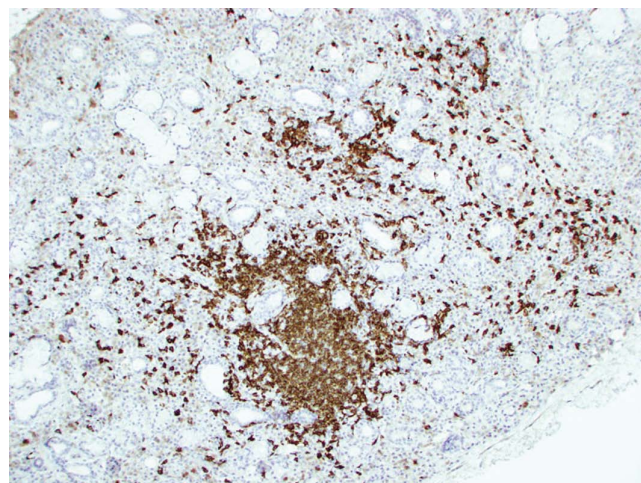


Рис. 3. Скопления CD20-позитивных В-лимфоцитов в ткани малой слюнной железы при ПСШ. ИГХ-реакция. Увеличение $\times 100$

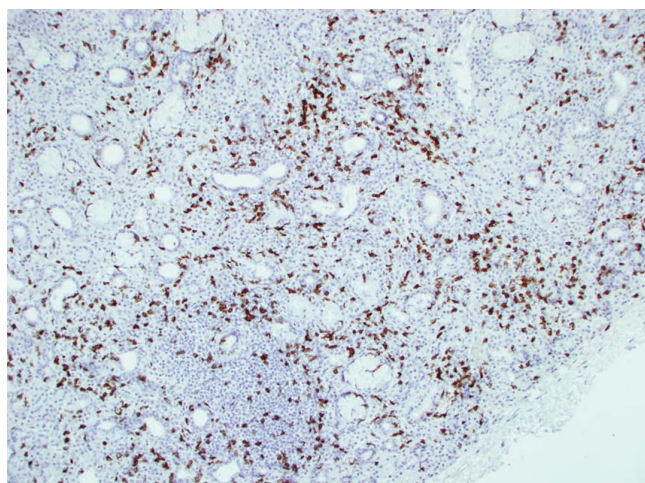


Рис. 4. Экспрессия CD8 в ткани малой слюнной железы при ПСШ. ИГХ-реакция. Увеличение $\times 100$

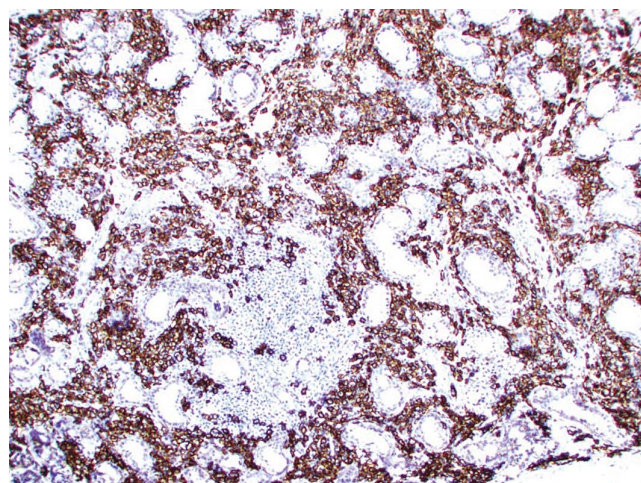


Рис. 5. Множественные скопления CD138-позитивных плазматических клеток в ткани малой слюнной железы при ПСШ. ИГХ-реакция. Увеличение $\times 100$

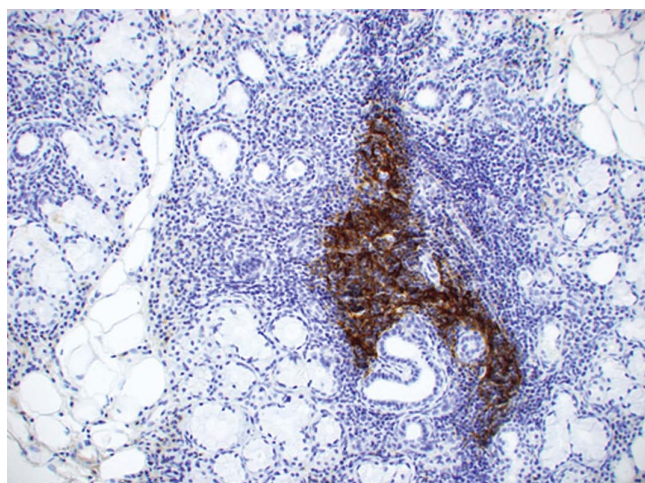


Рис. 6. Множественные скопления фолликулярных дендритных клеток (маркированы CD21) в ткани малой слюнной железы при ПСШ. ИГХ-реакция. Увеличение $\times 200$

Количество CD68+ клеток при ПСШ и в контроле статистически значимо не различалось ($p=0,086$).

Возможность использования количественной оценки клеточных популяций в биоптатах МСЖ как дополнительного критерия диагностики оценивалась с помощью ROC-анализа. Его результаты представлены в таблице 3.

Наибольшая ППК наблюдалась для оценки удельного количества CD3- (0,88 [95%-й доверительный интервал (ДИ): 0,80–0,96] и CD8-позитивных клеток (0,87 [95% ДИ: 0,79–0,95]), что при заданных ДП соответствовало ДЧ 70,9% [95% ДИ: 57,86–81,23] и 65,45% [95% ДИ: 52,25–76,64], ДС – 94,4% [95% ДИ: 74,24–99,72] и 100% [95% ДИ: 82,41–100] соответственно. При количественной оценке CD21-позитивных клеток ППК составляла 0,65 [95% ДИ: 0,52–0,78], ДЧ – 29,1% [95% ДИ: 18,77–42,41], а ДС достигала 100% [95% ДИ: 82,41–100].

Методом дискриминантного анализа были построены классификационные модели, включающие различные комбинации исследуемых маркеров. Наиболее информативным оказалось сочетание десятичных логарифмов удельного количества CD3- и CD68-позитивных клеток, которое имело следующие математическое выражение: $f(\text{CD3}; \text{CD68}) = 2,52 \times \lg(\text{CD3}+1) - 1,18 \times \lg(\text{CD68}+1) - 3,86$. ППК для этой комбинации биомаркеров составляла 0,92

Таблица 3. Параметры диагностического теста для количественной оценки клеточных популяций в ткани биоптатов МСЖ

Параметры	Типы клеток							
	CD3+	CD4+	CD8+	CD20+	CD138+	CD21+	CD68+	f (CD3; CD68)
ППК (95% ДИ)	0,88 (0,80–0,96)	0,82 (0,72–0,91)	0,87 (0,79–0,95)	0,85 (0,76–0,93)	0,84 (0,75–0,93)	0,65 (0,52–0,78)	0,64 (0,51–0,77)	0,92 (0,85–0,98)
ДП	78	46	26	26	219	1	25	–0,44
ДЧ при выбранных параметрах порогового значения, % (95% ДИ)	70,9 (57,86–81,23)	63,64 (50,42–75,07)	65,45 (52,25–76,64)	74,55 (61,7–84,19)	65,45 (52,25–76,64)	29,1 (18,77–42,14)	30,9 (20,28–44,03)	81,82 (69,67–89,81)
ДС при выбранных параметрах порогового значения, % (95% ДИ)	94,4 (74,24–99,72)	94,4 (74,24–99,72)	100 (82,41–100)	94,4 (74,24–99,72)	94,4 (74,24–99,72)	100 (82,41–100)	100 (82,41–100)	94,4 (74,24–99,72)
ДТ	83	79	83	84	80	64	64	88
ОППР	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
ОПОР	0,31	0,39	0,35	0,27	0,37	0,73	0,69	0,19
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,05	0,081	<0,001

[95% ДИ: 0,85–0,98], ДЧ – 81,82% [95% ДИ: 69,67–89,81], ДС – 94,4% [95% ДИ: 74,24–99,72].

В ряде случаев при клиничко-лабораторных проявлениях ПСШ в биоптатах МСЖ гистологическая картина не соответствует критериям диагностики этого заболевания. Другими словами, у пациентов с ПСШ в полученном биопсийном материале МСЖ не выявлялись мононуклеарные фокусы, содержащие не менее 50 клеток. В этих случаях в качестве дополнительных гистологических признаков заболевания может быть использована оценка количества CD3-, CD8-, CD68-позитивных клеток.

В обследуемой группе пациентов с клиничко-лабораторной картиной ПСШ при гистологическом исследовании биоптатов МСЖ критериальный признак ПСШ отсутствовал в 19 случаях. При проведении ИГХ-исследования с оценкой клеточных популяций в этой подгруппе ДП, установленным для CD3-позитивных клеток, соответствовали 6 пациентов, для CD8 – 8 пациентов, для f(CD3; CD68) – 10. ДП нескольких биомаркеров одновременно отвечало следующее количество пациентов: CD3 и CD8 – 5 пациентов, CD3 и f(CD3; CD68) – 5 пациентов, CD8 и f(CD3; CD68) – 6 пациентов (рис. 7).

Обсуждение

Возможность получения биопсийного материала ткани-мишени малотравматичным, технически простым способом делает гистологическое исследование МСЖ ценным диагностическим методом.

В рутинной практике обычно используется окраска гематоксилином-эозином, которая не позволяет определить принадлежность мононуклеарных клеток к конкретным субпопуляциям. Применение ИГХ методик дает возможность изучить субпопуляционный состав воспалительного инфильтрата.

Характерный гистологический признак ПСШ – появление в МСЖ перидуктальных и периацинарных мононуклеарных инфильтратов, которые состоят преимущественно из Т- (в основном CD4+-клетки) и В-лимфоцитов. В меньшем количестве выявляются фолликулярные дендритные клетки, НК-клетки, тканевые макрофаги. При значительной активности аутоиммунного воспаления в МСЖ, что, как правило, сопряжено с высокими

значениями FS и формированием лимфоидных фолликулов, соотношение клеточных субпопуляций изменяется, отмечается уменьшение количества CD4+ Т-лимфоцитов, увеличение доли В-лимфоцитов, тканевых макрофагов и фолликулярных дендритных клеток [11].

В настоящем исследовании количественная оценка CD3- и CD8-позитивных клеток показала диагностическую значимость при исследовании состава воспалительных инфильтратов в МСЖ.

Количественная оценка CD4- и CD20-позитивных клеток для диагноза ПСШ имела близкие значения по параметрам ДЧ, ДС, ДТ, ППК, которые уступали показателям диагностической значимости количественной оценки CD3- и CD8-позитивных Т-лимфоцитов.

CD21 (рецептор комплимента 2-го типа) экспрессируется на поверхности фолликулярных дендритных клеток [12, 13]. По данным отдельных публикаций, некоторые В-клетки мононуклеарных фокусов МСЖ при ПСШ также экспрессируют CD21 [14, 15].

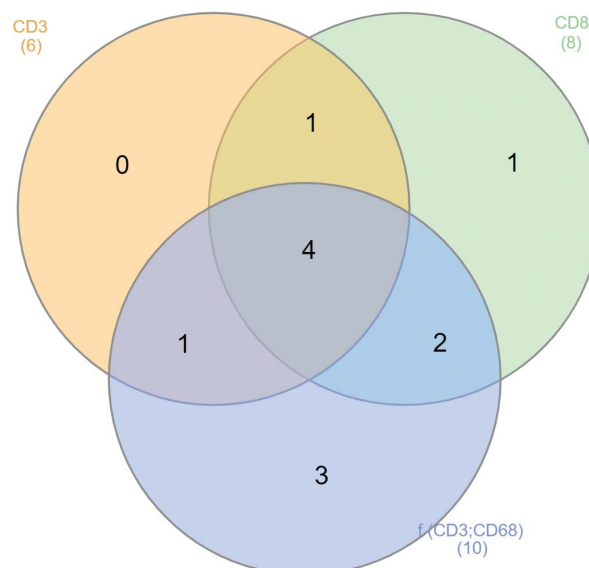


Рис. 7. Распределение пациентов с клиничко-лабораторной картиной ПСШ, не имеющих в биоптате МСЖ критериального гистологического признака ПСШ (n=19), по группам в соответствии с предлагаемыми дополнительными морфологическими критериями

В нашем исследовании CD21-позитивные фолликулярные дендритные клетки отсутствовали в биоптатах МСЖ группы контроля и выявлялись у 31% пациентов с ПСШ. Несмотря на невысокие значения ППК, ДТ, ДЧ в выборке малого объема, количественное определение этих клеток может рассматриваться как потенциально новый гистологических критерий ПСШ.

В биоптатах МСЖ, содержащих CD21-позитивные клетки, значение $FS \geq 2$ наблюдалось в 76,5% случаев. Принимая во внимание корреляционную связь между удельным количеством этих клеток и FS (коэффициент корреляции — 0,534; $p < 0,001$), определение экспрессии CD21 может иметь значение в оценке активности иммунного процесса в МСЖ.

Количество CD68-позитивных клеток (макрофаги/гистиоциты) в обследованных группах статистически значимо не различалось и по результатам ROC-анализа не может рассматриваться как информативный диагностический критерий. Математическая модель, включающая количественную оценку CD68- и CD3-позитивных клеток, показала наибольшие значения ППК, ДЧ, ДТ, ОПР по сравнению с определением удельного количества других типов клеток. В состав математической модели вошли два типа клеток, наиболее тесно взаимодействующие между собой и принимающие участие в патогенезе ПСШ [16, 17].

Удельное количество CD138-позитивных клеток (плазматические клетки) было статистически значимо больше в биоптатах МСЖ группы ПСШ по сравнению с контрольной группой. Параметры диагностического теста, характеризующие результаты подсчета плазматических

клеток, уступали по сравнению с количественной оценкой CD3-, CD8-позитивных клеток.

Заключение

В представленной работе количественная оценка CD3- и CD8-позитивных клеток оказалась информативной для разработки дополнительных гистологических критериев диагноза ПСШ.

Сочетанная количественная оценка CD3- и CD68-позитивных клеток обладает большей диагностической ценностью по сравнению с определением этих субпопуляций по отдельности.

CD21-позитивные клетки в биоптате МСЖ могут рассматриваться как высокоспецифичный, но малочувствительный гистологический признак ПСШ.

В связи с высокой трудоемкостью количественной оценки клеточных популяций полученные данные могут быть использованы для разработки программного контента при автоматизации морфологической диагностики.

Прозрачность исследования

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Насонов ЕЛ (ред.). Ревматология. Российские клинические рекомендации. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017:464. [Nasonov EL (ed.). Rheumatology. Russian clinical guidelines. Moscow: GEOTAR-Media; 2017:464 (In Russ.)].
- Qin B, Wang J, Yang Z, Yang M, Ma N, Huang F, et al. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2015;74:1983-1989. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205375
- Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al. 2016 American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69:35-45. doi: 10.1002/art.39859
- Guellec D, Cornec D, Jousse-Joulin S, Marhadour T, Marcorelles P, Pers JO, et al. Diagnostic value of labial minor salivary gland biopsy for Sjögren's syndrome: A systematic review. *Autoimmun Rev*. 2013;12:416-420. doi: 10.1016/j.autrev.2012.08.001
- Bodeutsch C, de Wilde PC, Kater L, van Houwelingen JC, van den Hoogen FH, Kruize AA, et al. Quantitative immunohistologic criteria are superior to the lymphocytic focus score criterion for the diagnosis of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1992;35:1075-1087. doi: 10.1002/art.1780350913
- van Woerkom JM, Kruize AA, Barendregt PJ, Kater L, Hené R, Bootsma H, et al. Clinical significance of quantitative immunohistology in labial salivary glands for diagnosing Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45:470-477. doi: 10.1093/rheumatology/kei191
- Fisher BA, Jonsson R, Daniels T, Bombardieri M, Brown RM, Morgan P, et al. Standardisation of labial salivary gland histopathology in clinical trials in primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2017;76:1161-1168. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-210448
- Navazesh M, Kumar SKS. Measuring salivary flow. *Dent Assist J*. 2008;139:35S-40S. doi: 10.14219/jada.archive.2008.0353
- Teppo H, Revonta M. A follow-up study of minimally invasive lip biopsy in the diagnosis of Sjögren's syndrome. *Clin Rheumatol*. 2007;26:1099-1103. doi: 10.1007/s10067-006-0457-1
- Quartuccio L, Baldini C, Bartoloni E, Priori R, Carubbi F, Corazza L, et al. Anti-SSA/SSB-negative Sjögren's syndrome shows a lower prevalence of lymphoproliferative manifestations, and a lower risk of lymphoma evolution. *Autoimmun Rev*. 2015;14:1019-1022. doi: 10.1016/j.autrev.2015.07.002
- Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. *J Autoimmun*. 2010;34:400-407. doi: 10.1016/j.jaut.2009.10.004
- Jonsson MV, Skarstein K. Follicular dendritic cells confirm lymphoid organization in the minor salivary glands of primary Sjögren's syndrome. *J Oral Pathol Med*. 2008;37:515-521. doi: 10.1111/j.1600-0714.2008.00674.x
- Braun M, Melchers I, Peter HH, Illges H. Human B and T lymphocytes have similar amounts of CD21 mRNA, but differ in surface expression of the CD21 glycoprotein. *Int Immunol*. 1998;10(8):1197-1202.
- Daridon C, Pers JO, Devauchelle V, Martins-Carvalho C, Hutin P, Pennec YL, et al. Identification of transitional type II B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2006;54:2280-2288. doi: 10.1002/art.21936
- Le Pottier L, Devauchelle V, Fautrel A, Daridon C, Saraux A, Youinou P, et al. Ectopic germinal centers are rare in Sjögren's syndrome salivary glands and do not exclude autoreactive B cells. *J Immunol*. 2009;182:3540-3547. doi: 10.4049/jimmunol.0803588

16. Ushio A, Arakaki R, Yamada A, Saito M, Tsunematsu T, Kudo Y, et al. Crucial roles of macrophages in the pathogenesis of autoimmune disease. *World J Immunol.* 2017;7(1):1-8. doi: 10.5411/wji.v7.i1.1
17. Ushio A, Arakaki R, Otsuka K, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, et al. CCL22-producing resident macrophages enhance T cell response in Sjögren's syndrome. *Front Immunol.* 2018;9:2594. doi: 10.3389/fimmu.2018.02594

Кувардин Е.С. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8598-0391>

Григорьева И.Н. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9619-1048>

Бехтерева И.А. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5206-3367>

Маслянский А.Л. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2427-4148>

Криволапов Ю.А. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9872-0326>

Белякова Е.А. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1677-9237>