

ПЕДИАТРИЧЕСКАЯ РЕВМАТОЛОГИЯ

Ранние артриты у детей и подростков — иммунный статус больных и перспективы лечения

*В.А. Кельцев, Л.И. Гребенкина, Л.В. Лимарева, М.А. Бочкарева, Ю.Е. Григорьева
ГОУ ВПО Самарский государственный медицинский университет Росздрава РФ*

Резюме

Цель. Изучить состояние иммунного статуса у детей и подростков, больных ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА), на ранних этапах формирования заболевания и перспективы их лечения.

Материал и методы. Обследованы 286 детей и подростков в возрасте от 3 до 18 лет с олиго- и полиартикулярными вариантами ЮИА. Проведены исследования клеточных маркеров лимфоцитов (CD4+, CD8+, CD16+, CD95+, IgA, IgG, IgM, РФ), цитокинов [интерлейкинов (ИЛ) 1 β , 4, 6, 8, 10 и фактора некроза опухоли (ФНО)- α], морфометрия лимфоцитов.

Результаты. В активный период ЮИА отмечаются высокие показатели маркеров лимфоцитов CD4+, CD8+, CD16+, CD95+, уровни про- и противовоспалительных интерлейкинов в крови, особенно у больных полиартритом и олигоартритом распространившимся. Между изменением средних морфометрических показателей лимфоцитов и относительным содержанием маркеров лимфоцитов выявлена обратная корреляционная линейная зависимость, что свидетельствует о взаимосвязи процессов пролиферации, цитотоксичности и увеличения числа циркулирующих в крови апоптозных клеток. Однако увеличение количества «клеток программируемой гибели» может отражать не только пролиферацию, но и не способность клеток запускать программу клеточной гибели под действием провоцирующих факторов. В группе больных с очень высокими гуморальными показателями маркеров лимфоцитов и цитокинов адекватная терапия чаще индуцирует клинико-лабораторную ремиссию, чем у больных с более низкими показателями.

Заключение. Состояние иммунного и цитокинового статуса у детей и подростков, больных ЮИА, определяет эволюцию артрита. Раннее назначение базисных противовоспалительных препаратов чаще индуцирует клинико-лабораторную ремиссию у больных с высокими уровнями клеточных маркеров лимфоцитов и противовоспалительных цитокинов.

Ключевые слова: маркеры лимфоцитов, цитокины, ювенильный идиопатический артрит, иммунный ответ, прогноз

Одной из актуальных проблем ревматологии являются ювенильные идиопатические артриты (ЮИА) — хронические воспалительные заболевания суставов у детей, что обусловлено ростом их распространенности, выраженным ухудшением качества

жизни пациентов, высоким уровнем инвалидизации, социально-экономическими потерями для общества. В последние годы на первое место выходят проблемы ранней диагностики и начала терапии ревматических заболеваний [2,3,4,11,9,13,15]. Установлено, что именно первые годы с момента развития ревматоидного артрита (РА) являются решающими с точки зрения прогрессирования патологического процесса [1,2,3,4]. Показано, что в самый ранний период РА, когда процесс находится в первичной экссудативной фазе, обратимость заболевания существенно

Адрес: 443001, г.Самара, СГМУ
Тел.: 8(846) 268-89-95
E-mail: keltsev@mail.ru

выше ввиду еще не окончательно сформировавшихся аутоиммунных механизмов и отсутствия паннуса — морфологической основы суставной деструкции. Однако уже через 2-4 месяца от начала заболевания в суставах определяются морфологические признаки хронического синовита.

Ранний РА является условно выделенной клинико-патогенетической стадией болезни, характеризующейся антигенспецифической активацией CD4+ Т-лимфоцитов, гиперпродукцией «провоспалительных» цитокинов, пролиферацией сосудистой стенки капилляров с последующей пролиферацией синовиальных клеток и отложением фибрина на синовиальной оболочке и наличием активного синовита в течение не более года.

Целью исследования было изучение состояния иммунного статуса у детей и подростков, больных ЮИА на ранних этапах формирования заболевания и перспектив их лечения.

Материал и методы

Под наблюдением находилось 286 детей и подростков (от 3 до 18 лет) с олиго- и полиартикулярными вариантами ЮИА, с длительностью заболевания до 3-х мес, 0-II рентгенологической стадией, 1-3 степенью активности. Исследование проводилось с 1995 по 2006 гг. У всех больных определялись клеточные маркеры лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD95+, IgA, IgG, IgM, ЦИК, РФ). Кровь для иммунологического исследования брали при первичном обследовании пациентов до начала терапии. Иммунокомпетентные клетки выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиккол-верографин (1,077 г/мл). Субпопуляционный состав лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD19+, CD95+, HLA-DR+) определяли с помощью моноклональных антител серии ЛТ (Институт иммунологии МЗ РФ) методом непрямой иммунофлюоресценции. Оценивали флюоресценцию не менее чем в 200 клетках. В каждом исследовании проводили контроль неспецифического связывания меченой сыворотки. Концентрацию иммуноглобулинов А, М, G в сыворотке крови определяли модифицированным методом радиальной иммунодиффузии (G. Mancini с соавт., 1965) с использованием моноспецифических сывороток, выпускаемых Нижегородским предприятием по производству бактериальных препаратов; результаты выражали в г/л. Оценку содержания ЦИК проводили методом спектрофотометрии, основанным на прямой регистрации потери проходящего света или интенсивности светорассеивания при добавлении ПЭГ с помощью спектрофотометра. Результаты выражали в единицах оптической плотности. Ревматоидный фактор (РФ) определяли с помощью реакции латекс-агглютинации. Использовали готовый диагностикум РФ, приготовленный на основе частиц латекса, нагруженных гамма-глобулином человека; результаты выражали в титрах антител.

Цитокины [интерлейкины (ИЛ) 1β, 4, 6, 8, 10 и фактор некроза опухоли (ФНО)-α] в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих тест-наборов для in-vitro диагностики (ТОО «Протеиновый контур», г. Санкт-Петербург) по прилагаемым инструкциям, результаты выражали в пг/мл. Морфометрия лимфоцитов проводилась у всех больных. При помощи винтового окуляра — микрометра МОВ-1-15X определяли диаметр ядра и цитоплазмы лимфоцитов, с последующим вычислением объема и цитоплазматического — ядерного отношения (ЦЯО) по формулам: $V_{к,я} = \pi ab^2/6$, где $V_{к,я}$ — объем клетки или ядра, а — малый диаметр клетки или ядра, b — большой диаметр клетки или ядра, $ЦЯО = (V_{к,я} - V_{я})/V_{я}$.

Исследования проводились в первый месяц заболевания и через 1 год от его начала.

Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи сертифицированной РС программы для биостатистики InStat 2.0 (Sigma, США). Определялись: M — средняя, m — ошибка средней, n — объем выборки, r — коэффициент корреляции, p — уровень значимости различия. Критическое значение уровня значимости — 0,05. Проверка нормальности распределения признаков проводилась с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Парное межгрупповое сравнение показателей производилось по критерию Стьюдента, изменение показателей при повышении степени активности ЮИА изучалось при помощи ANOVA теста, корреляционный анализ — по критерию Пирсона. Все больные получали базисные противовоспалительные препараты (БПВП): метотрексат, циклоспорин (сандимун неорал), сульфасалазин, а также нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) и симптоматические средства.

Диагноз «ювенильный идиопатический артрит» устанавливался в соответствии с международной классификацией и номенклатурой ЮИА, принятой в г. Дурбан в 1997 г. [5,7].

Группу контроля составили 30 практически здоровых детей и подростков.

Результаты и обсуждение

При изучении иммунного статуса и цитокинового профиля у 286 детей и подростков, больных ЮИА, выявлены некоторые особенности формирования иммунного ответа в зависимости от варианта и активности заболевания. Так, в активный период отмечались высокие показатели маркеров лимфоцитов CD4+, CD8+, CD16+, CD95+, уровня про- и противовоспалительных интерлейкинов (табл. 1). Наиболее значимые отклонения иммунологических показателей регистрировались у детей и подростков с полиартикулярным вариантом ЮИА и с олигоартритом распространившимся. При персистирующем варианте ЮИА также отмечалось повышение показателей иммунологической активности, но в

Таблица 1

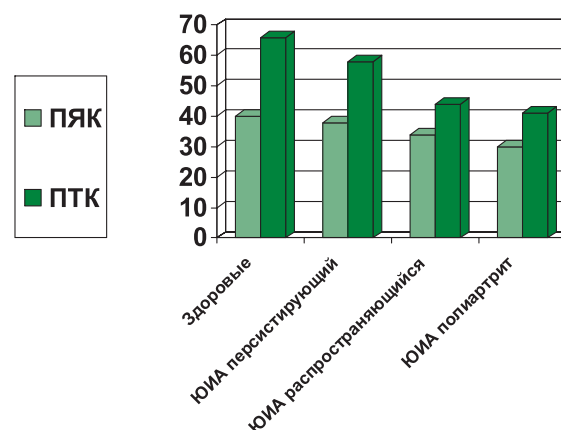
ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО И ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ, БОЛЬНЫХ ЮИА ДО ЛЕЧЕНИЯ

Показатели	Контроль n=30	Степени активности								
		Полиартрит			Олигоартрит распространившийся			Олигоартрит персистирующий		
		I n=19	II n=21	III n=11	I n=20	II n=32	III n=18	I n=118	II n=31	III n=16
CD4+%	35,1±1,1	49,4±1,2*	53,5±2,2*	62,6±1,5*	41,1±1,3*	44,5±0,5*	53,4±0,2*	39,6±0,1*	41,5±0,3*	43,6±1,2*
CD8+%	22,5±0,5	23,6±0,4	26,5±0,4*	28,7±0,3*	23,1±0,3	27,5±1,1*	28,1±0,6*	21,1±0,6	24,6±0,7*	25,6±0,4*
CD4+/CD8+	1,7±0,5	2,3±0,6	2,2±0,5	2,2±0,4	1,8±0,6	1,6±0,4	1,8±0,5	1,8±0,6	1,7±0,4	1,7±0,3
CD16+%	9,4±0,2	14,6±1,1*	15,5±0,5*	16,7±0,4*	14,2±0,3*	15,8±0,4*	16,4±0,3*	12,8±0,4*	14,8±0,5*	15,9±0,2*
CD95+%	27,5±1,5	49,6±1,6*	59,5±1,2*	76,6±2,1*	48,7±1,9*	58,8±1,3*	69,7±1,6*	44,5±2,1*	51,4±1,8*	57,6±1,6*
ИЛ-1β пг/мл	46,8±3,7	106,5±3,6*	121,3±4,2*	148,6±5,2*	102,3±3,6*	116,6±3,2*	128,7±3,3*	69,7±2,6*	76,5±2,4*	81,6±2,2*
ИЛ4 пг/мл	45,5±3,1	52,3±1,5*	57,6±2,1*	64,4±2,2*	49,8±2,1*	52,3±2,3*	54,5±2,1*	47,6±1,2	49,8±1,3*	52,3±1,6*
ИЛ6 пг/мл	7,5±1,1	12,3±1,3*	17,4±1,4*	24,6±2,6*	11,5±1,4*	15,8±2,1*	19,5±2,2*	9,7±1,2*	12,4±1,6*	15,6±1,4*
ФНО-α пг/мл	43,2±1,1	99,6±2,8*	114,5±3,5*	126,9±3,8*	84,5±3,1*	101,6±2,4*	111,4±2,6*	73,4±2,4*	82,1±2,2*	98,9±2,4*
ИЛ8 пг/мл	19,8±1,2	42,1±2,8*	61,6±2,4*	69,7±3,1*	39,5±2,1*	48,9±2,8*	56,6±3,1*	38,4±3,1*	42,6±2,4*	48,6±2,9*
ИЛ10 пг/мл	9,8±1,2	26,6±2,8*	34,6±3,1*	38,6±3,2*	25,5±2,5*	28,8±2,4*	32,5±2,7*	16,7±2,1*	22,7±2,2*	25,7±2,3*

Примечание: * - p < 0,05 по сравнению с контролем

менее выраженное. Выявлена прямая зависимость между повышением иммунологических показателей и степенью активности заболевания.

Как показали исследования, средние значения основных морфометрических показателей лимфоцитов крови у больных ЮИА имели закономерные изменения в зависимости от варианта клинического течения ЮИА (рис.1.). Отмечалось изменение размеров лимфоцитов, более выраженное при полиартрите и распространившемся олигоартрите. Динамика изменений морфометрических параметров лимфоцитов была направлена в сторону их уменьшения. Размеры клетки претерпевали изменения как за счет уменьшения площади тела клетки (ПТК), так и за счет уменьшения размеров ядра (ПЯК). Так, ПТК у больных с персистирующим вариантом ЮИА была уменьшена по сравнению с размерами клеток у здоровых детей уменьшалась, но эти различия оказались статистически недостоверными (p>0,05). При распространяющемся и полиартрикулярном вариантах ЮИА уменьшение ПТК у пациентов по сравнению с контрольной группой детей было достоверно значимо (p<0,05). ПЯК у больных ЮИА детей также уменьшалась, но статистически значимые изменения были выявлены только в группе пациентов с полиартрикулярным вариантом заболевания (p<0,05). Исследуя изменения средних значений морфометрических показателей лимфоцитов крови в зависимости от степени активности патологического процесса, мы отметили, что статистически значимые разли-

 Рисунок 1
ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У БОЛЬНЫХ ЮИА
ВТОРОЙ ГРУППЫ


чия по сравнению с показателями здоровых детей имелись в основном при 2 и 3 степенях активности ЮИА (p<0,05). Проведение сравнительного анализа между морфометрическими показателями лимфоцитов крови и средними значениями содержания CD4+, CD8+, CD95+ лимфоцитов и ФНО-α в периферической крови детей показало, что между изменением средних морфометрических показателей лимфоцитов (ПТК) и относительным содержанием CD8+, CD4+, CD95+ и ФНО-α лимфоцитов имелась обратная линейная зависимость. Это свидетельствует о взаимосвязи процессов пролиферации, цитотоксичности и увеличения числа циркулирующих в крови апоптотных клеток.

Однако увеличение количества «клеток программируемой гибели» может отражать не только пролиферацию, но и неспособность клеток запускать программу клеточной гибели под действием провоцирующих факторов [6,8,9,10,12,14]. В здоровом организме CD4+ лимфоциты секретируют поверхностные молекулы, такие как CD95-лиганд и ФНО-α, посредством которых передают сигнал апоптоза CD95+ клеткам-мишеням. Таким путем в физиологических условиях иммунные Т-клетки удаляют «лишние» CD95+ лимфоциты. Возможно,

так и иммунологических параметров (табл. 2). Однако при анализе цитокинового спектра была выявлена группа пациентов из 118 человек (I группа), у которых исходные показатели были очень высокими по сравнению со здоровыми ($p < 0,01$) (рис.2). У этих же больных отмечались высокие показатели маркеров лимфоцитов CD4+, CD16+, CD95+ ($p < 0,05$). На фоне применения БПВП, через 12 мес от начала лечения у них регистрировалась стабилизация иммунологических параметров и практически купировался суставной синдром.

Таблица 2

ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО И ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ, БОЛЬНЫХ ЮИА ЧЕРЕЗ 1 ГОД ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ

Показатели	Контроль	Степени активности								
		Полиартрит			Олигоартрит распространенный			Олигоартрит персистирующий		
		I n=30	II n=19	III n=21	I n=11	I n=20	II n=32	III n=18	I n=118	II n=31
CD4+%	35,1±1,1	39,6±1,2*	41,5±0,9*	43,6±1,0*	37,5±1,1*	39,9±1,1*	40,1±1,2*	34,6±1,8	36,6±2,1	38,9±1,1*
CD8+%	22,5±0,5	23,4±2,4	25,1±2,1	26,9±1,2*	23,1±1,9	24,6±2,2	25,1±2,4	21,2±1,3	20,4±1,9	20,1±2,1
CD4+/ CD8+	1,7±0,5	1,7±0,4	1,6±0,3	1,7±0,4	1,6±0,3	1,6±0,6	1,6±0,6	1,6±0,4	1,8±0,3	1,9±0,6
CD16+%	9,4±0,2	13,9±0,4*	14,9±0,8*	15,8±0,6*	12,9±0,4*	13,8±0,6*	14,2±0,7*	8,9±0,6*	9,2±0,7*	10,4±0,4*
CD95+%	27,5±1,5	36,1±1,6*	39,3±1,5*	40,2±1,4*	35,4±1,6*	36,8±1,7*	37,2±1,2*	28,6±1,9	29,0±1,6	32,8±1,3*
ИЛ-1β пк/мл	46,8±3,7	71,6±2,6*	82,5±2,9*	92,7±3,1*	61,8±3,4*	67,8±3,2*	70,4±2,9*	53,6±1,5*	59,8±2,1*	63,4±1,9*
ИЛ4 пк/мл	45,5±3,1	48,9±1,9	57,8±2,1*	61,3±1,8*	47,9±1,9	56,7±1,5*	58,8±1,6*	47,1±2,6	49,8±1,3*	50,7±1,5*
ИЛ6 пк/мл	7,5±1,1	11,3±1,3*	12,4±1,6*	14,6±1,5*	10,7±1,2*	11,8±1,3*	12,1±1,3*	8,2±1,6	8,9±1,5	9,1±1,9*
ФНО-α пк/мл	43,2±1,1	73,1±2,6*	81,7±2,5*	85,4±2,4*	54,6±2,1*	63,5±2,0*	66,5±2,4*	47,1±2,5*	48,9±2,1*	52,3±2,4*
ИЛ8 пк/мл	19,8±1,2	27,6±1,4*	29,6±1,7*	32,8±2,1*	25,7±1,5*	27,9±2,1*	28,8±	21,2±1,6	23,9±1,2*	25,8±1,4*
ИЛ10 пк/мл	9,8±1,2	16,6±1,6*	18,8±1,7*	21,2±1,3*	13,5±1,4*	14,7±1,7*	16,8±1,6*	10,9±1,1	11,5±1,4	14,9±1,3*

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с нормой

при ЮИА происходит утрата рецепторов и факторов, участвующих в реализации сигналов полноценного развития и завершения процесса апоптоза. Однако, несмотря на активную выработку факторов, индуцирующих апоптоз (CD95-лиганд и ФНО-α), оказываются заблокированными центры связывания на Fas-лиганде, что делает их недоступными для мембранного CD95 антигена, при этом процесс апоптоза не получает своего полного развития. Происходит чрезмерное патологическое накопление аутореактивных клонов – апоптозных клеток фенотипа CD4+, CD19+, CD95+, вследствие чего уровень аутоантител достигает патологических величин, что способствует поддержанию аутоиммунного процесса при ЮИА.

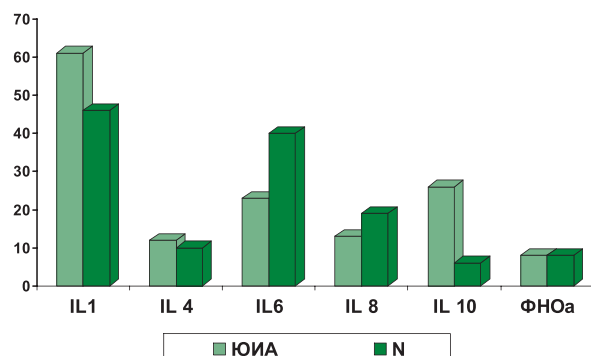
При анализе иммунологических показателей у детей и подростков, больных ЮИА, через 1 год на фоне адекватной терапии отмечалась положительная динамика как клинических проявлений заболе-

У 168 больных II группы в начальный период заболевания отмечалась более низкая хелперная и супрессорная активность лимфоцитов ($p < 0,05$). Изменения цитокинового статуса носил разнонаправленный характер. Уровень ИЛ-4 и ФНО-α практически не отличался от нормативных показателей, содержание ИЛ-6 и ИЛ-8 было сниженным, а сывороточные концентрации ИЛ-1β и ИЛ-10 – высокими (рис.3). Через 1 год терапии иммунологическая картина крови слабо изменялась, суставной синдром прогрессировал. При длительности ЮИА более года концентрации ИЛ-1β, ИЛ-10 оставались повышенными, уровни ИЛ-4, ИЛ-6 были низкими, что можно рассматривать как свидетельство прогрессирования заболевания, а соотношение этих показателей – как отражение сохранения активности процесса.

Анализируя полученные данные, можно предположить, что высокий уровень CD4+ у детей с

Рисунок 3

**МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ ЮИА**



ЮИА связан, по-видимому, с неспособностью данных клеток воспринимать сигнал апоптоза вследствие отсутствия или блокады их специфических рецепторов. Слабый сигнал апоптоза, возможно, может быть следствием недостаточной активности ФНО-α, что также приводит к повышению уровня Т-хелперов в крови. Нарастание CD95+, являющегося маркером суперсемейства рецепторов ФНО-α, свидетельствует о функциональной несостоятельности лимфоцитов, презентующих Fas-антиген.

ИЛ-6 оказывает значительный стимулирующий эффект на систему реагирования на стресс, он секретируется во время активации этой системы при воспалении. ИЛ-6 играет определенную роль в патогенезе заболеваний, связанных как с острым, так и хроническим стрессом, каким является ЮИА. Снижение концентрации ИЛ-6 у больных с большими сроками заболевания свидетельствует об истощении механизмов адаптации и хронизации процесса.

Таким образом, проведенные исследования показали, что состояние иммунного и цитокинового статуса у детей и подростков, больных ЮИА, может определять эволюцию артрита. Раннее назначение адекватной терапии у больных с высокой хелперной и супрессорной активностью лимфоцитов и высоким уровнем цитокинов чаще ведет к клинико-лабораторной ремиссии. Низкий уровень клеточных маркеров лимфоцитов в крови наряду с дисбалансом провоспалительных цитокинов являются маркером хронизации процесса и возможной неэффективности терапии. Всем больным ЮИА как можно раньше следует назначать БПВП, так как промедление с их применением является ошибкой, ведущей к прогрессированию заболевания.

Поступила 20.02.07

Abstract

V.A. Keltsev, L.I. Grebenkina, L.V. Limareva, M.A. Bochkareva, Y.E. Grigorjeva
Early arthritis in children and adolescents – immune status of patients and perspectives of treatment.

Objective. To study state of immune status in children and adolescents with juvenile idiopathic arthritis (JIA) at early stages of the disease development and perspectives of their treatment.

Materials and methods. 286 children and adolescents with oligo- and polyarticular variants of JIA aged 3 to 18 years were included. Examination of CD4, CD8, CD16, CD95 lymphocyte markers, IgA, IgG, IgM rheumatoid factor, interleukin 1β, 4, 6, 8, 10, tumor necrosis factor α as well as lymphocyte morphometry was performed.

Results. High blood levels of CD4, CD8, CD16, CD95, pro- and anti- inflammatory interleukins were revealed at active stage of JIA particularly in pts with polyarthritis and extended oligoarthritis. Changes of mean lymphocyte morphometric measures linearly inversely correlated with relative lymphocyte markers level what proves relationship of processes of proliferation, cytotoxicity and elevation of circulating apoptotic cell count in blood. However increase of “programmed death cells” may reflect not only proliferation but also capability of cells to induce cell death program in presence of provocative factors. In pts with very high humoral level of lymphocyte markers and cytokines appropriate therapy more often induces clinico-laboratory remission than in pts with lower values.

Conclusion. Immune and cytokine status in children and adolescents with JIA determines evolution of arthritis. Early administration of disease modifying drugs more often induces of clinico-laboratory remission in pts with high levels of lymphocyte markers and anti-inflammatory cytokines.

Key words: lymphocyte markers, cytokines, juvenile idiopathic arthritis, immune response, prognosis.