

## УРОВЕНЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА 17 И ИНТЕРФЕРОНА $\gamma$ В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ АНТИТЕЛАМИ К CD3 И CD28 У ДЕТЕЙ С АРТРИТАМИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

© 2019 г. И. А. Пашнина\*, И. М. Криволапова

\*E-mail: [irina\\_pashnina@list.ru](mailto:irina_pashnina@list.ru)

ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница»,  
Екатеринбург, Россия

Поступила: 22.05.2019. Принята: 28.06.2019

Обследованы дети 2–17 лет с ювенильным идиопатическим артритом (n=100), неуточненной реактивной артропатией (n=15), а также 31 клинически здоровый ребенок (контроль). У детей в супернатантах культур цельной крови определяли концентрацию IL-17 и IFN $\gamma$  методом ИФА: в спонтанном варианте, при стимуляции антителами к CD3, антителами к CD3 и CD28. У детей с артритами различной этиологии спонтанный уровень IFN $\gamma$  был выше, чем в контроле, а при обоих вариантах стимуляции, напротив, — ниже. Спонтанная продукция IL-17 у больных не отличалась от таковой у здоровых детей, в условиях стимуляции синтез этого цитокина в группах с артритами был выше, чем в контроле.

**Ключевые слова:** ювенильный артрит, реактивная артропатия, цитокины

DOI: 10.31857/S102872210007262-3

Адрес: 620149 Екатеринбург, ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Пашнина Ирина Александровна.  
Тел.: 8(343) 272-91-39; E-mail: [irina\\_pashnina@list.ru](mailto:irina_pashnina@list.ru)

**Авторы:**

**Пашнина И. А.**, д.б.н., заведующая клинико-диагностической лабораторией ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург, Россия;

**Криволапова И. М.**, биолог клинико-диагностической лаборатории ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Цитокины (ЦК) участвуют во всех реакциях иммунной системы и регулируют функционирование всех иммунокомпетентных клеток [1]. Роль этих белков чрезвычайно высока как в физиологических условиях, так и при развитии различных патологических процессов, особенно — связанных с воспалением. Причем, в ряде случаев, возникновение патологии обусловлено именно нарушением цитокинового баланса [2, 3]. При чрезмерной выработке провоспалительных ЦК могут возникать аутовоспалительные заболевания [4].

Одним из наиболее распространенных среди детского населения аутоиммунно-аутовоспалительных заболеваний соединительной ткани является ювенильный идиопатический артрит (ЮИА) [5, 6]. Это разнородная группа заболеваний, включающая в себя несколько вариантов, различающихся по патогенетическим особенностям и симптоматике [5]. Близкими к ЮИА по клиническим проявлениям заболеваниями являются реактивные артропатии, развивающиеся в ответ на внесуставную инфекцию. Особую сложность для диагностики представляет группа неуточненных реактивных артропатий (нРеА), выделяемых в МКБ-10 при отсутствии хронологической связи артрита и инфекционного процесса [5].

При всех вариантах течения ЮИА, а также при артритах любой другой этиологии, развивается воспалительный процесс в суставах, несомненное участие в котором принимают различные ЦК. При этом, данные разных авторов относительно концентрации ЦК в сыворотке крови при ЮИА существенно отличаются друг

от друга [7, 8, 9]. Отчасти это может быть обусловлено сложностями измерения цитокинов в сыворотке крови, связанными с коротким временем жизни этих белков. Одним из подходов, позволяющих преодолеть указанный недостаток, является исследование продукции ЦК клетками периферической крови, культивируемых *in vitro*, в том числе – при добавлении различных стимуляторов [1].

В качестве стимуляторов при исследовании ЦК часто используют растительные митогены: фитогемагглютинин, конканавалин А, митоген лаконоса [1]. Однако возможно использование других стимуляторов, например, целенаправленное воздействие на клеточные рецепторы. Стимуляция Т-клеточного рецептора (ТКР) антителами к CD3 активирует клетки и, по некоторым представлениям, имитирует контакт Т-лимфоцитов с аутоантигенами и «фоновую» стимуляцию, необходимую для поддержания периферической толерантности. Комбинированная стимуляция антителами к CD3 и к корецепторной молекуле CD28 моделирует ситуацию контакта наивных Т-лимфоцитов с чужеродными антигенами, представленными антигенпрезентирующими клетками [10]. На изолированную стимуляцию через ТКР в большей степени способны отвечать активированные Т-лимфоциты, что подтверждается потерей ими способности экспрессировать CD28 [11].

**Целью** работы явилась оценка концентрации IL-17 и IFN $\gamma$  в супернатантах клеточных культур у детей с ювенильным идиопатическим артритом и неуточненной реактивной артропатией при стимуляции антителами к CD3 и к CD3/CD28 в сравнении со здоровыми детьми.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы дети в возрасте от 2 до 17 лет с ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА, n=100), с недифференцированной реактивной артропатией (нРеА, n=15), условно здоровые дети без признаков аутоиммунных и аллергических заболеваний (контроль, n=31). Средний возраст в группах составил 8,4; 9,0 и 8,7 лет, соответственно. Диагноз ЮИА устанавливался на основании критериев ILAR (Международной лиги ревматологических ассоциаций второго пересмотра в Edmonton, 2001), диагноз нРеА – в соответствии с диагностическими критериями, принятыми на Международном совещании по Реактивным артритам в Берлине в 1996 г. Все дети были серонегативны по ревматоидному фактору.

Группу с ЮИА составили дети с различными его вариантами: олигоартикулярный вариант (n=52); полиартикулярный вариант (n=21); системный вариант (n=9); артрит, ассоциированный с энтезитом (n=17). На момент обследования все дети не имели острых или хронических инфекционных заболеваний. Больные с ЮИА и нРеА получали патогенетическую и симптоматическую терапию в соответствии с существующими стандартами лечения.

Для определения уровня цитокинов кровь забиралась в вакуумные гепаринизированные пробирки. Образцы крови разводили глутаминсодержащей средой RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), в соотношении 1:9, готовили серию из 3 образцов с конечным объемом 500 мкл: контрольный образец без стимулятора; образец, стимулированный агонистическими антителами к CD3 (aCD3, Биокон, Россия), в конечной концентрации 2 мкг/мл; образец, стимулированный агонистическими антителами к CD3 (Биокон, Россия), в конечной концентрации 2 мкг/мл и агонистическими антителами к CD28 в конечной концентрации 0,8 мкг/мл (aCD28, Beckman Coulter, США). Образцы инкубировали в течение 24 часов (37 °С, 5% CO<sub>2</sub>). После инкубации разведенную кровь центрифугировали 10 мин. при 1500 об/мин и отбирали по 400 мкл супернатантов. Определение концентрации IL-17 и IFN $\gamma$  в супернатантах клеточных культур проводилось методом ИФА (Вектор-Бест, Россия). Статистическая обработка выполнена с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни в рамках программного обеспечения Statistica для Windows (версия 6.0) и Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании спонтанной и стимулированной продукции цитокинов у детей с различными вариантами ЮИА не было выявлено различий между группами. На этом основании, дальнейшие исследования проводились в объединенной группе пациентов с ЮИА.

Спонтанный синтез IL-17 и IFN $\gamma$  клетками крови, как больных, так и здоровых детей был невелик (**Таб. 1**). При этом концентрация IL-17 у всех пациентов была практически нулевой и не различалась между группами. Спонтанная концентрация IFN $\gamma$  у детей с артритами была существенно выше, чем у здоровых детей. Изолированная стимуляция через ТКР и сочетанная (через ТКР и корецептор CD28), во всех случаях приводила к значительной активации выра-

**Таблица 1.** Концентрация IL-17 и IFN $\gamma$  в супернатантах культур цельной крови у детей с артритами различной этиологии и у здоровых детей.

ЦК	Условия инкубации	Группа		
		Контроль	ЮИА	нРеА
IL-17	Без стимулятора	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,6)	0,0 (0,0–0,25)
	aCD3	10,0 (1,0–16,5)	17,0 (5,0–34,0)***	26,0 (9,0–44,5)**
	aCD3/aCD28	4,0 (1,5–14,0)	18,0 (5,0–38,0)***	29,5 (12,0–39,5)***
IFN $\gamma$	Без стимулятора	0,0 (0,0–4,0)	1,0 (0,0–47,0)*	10,0 (0,0–46,0)*
	aCD3	1075,0 (187,0–1561,0)	136,0 (92,0–274,0)***	134,0 (60,0–197,0)***
	aCD3/aCD28	926,0 (351,0–1591,0)	197,0 (116,0–402,0)***	170,0 (83,0–252,0)***

**Примечание:** Данные представлены в виде: Медиана (Нижняя квартиль – Верхняя квартиль); различия с контролем: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$

ботки ЦК Т-лимфоцитами по сравнению с соответствующим спонтанным уровнем ( $p < 0,01$ ). Однако уровень такой активации в исследованных группах был различен (Таб. 1). Концентрация IL-17 в супернатантах клеточных культур при обоих вариантах стимуляции у детей с артритами различной этиологии была выше, чем у здоровых детей. Стимулированный синтез IFN $\gamma$  у больных с ЮИА и нРеА, напротив, был менее интенсивным, чем в контрольной группе. Между группами с артритами различия не выявлены ни по одному из параметров.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Увеличение выработки IL-17 и IFN $\gamma$  в ответ на различные варианты стимуляции Т-клеточного рецептора, является закономерным, т.к. оба исследованных цитокина, в основном, продуцируются Т-лимфоцитами. Синтез ИФН $\gamma$  осуществляют преимущественно Т-хелперы 1-го типа, этот цитокин активирует макрофаги, нейтрофилы и натуральные киллеры, влияет на дифференцировку Т- и В-лимфоцитов, усиливает цитотоксическое действие Т-лимфоцитов и натуральных киллеров [1]. IL-17 синтезируется Т-хелперами 17 типа, участвует в развитии ранней стадии воспаления, стимулирует фибробласты; продукцию различных провоспалительных ЦК: IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ; синтез металлопротеиназ и других ферментов [1, 12].

IL-17 играет роль в развитии воспалительного процесса в синовиальной оболочке [13, 14]. У детей с ЮИА уровни IL-17 в сыворотке крови были значительно выше, чем у здоровых детей [15]. Имеются данные, что у больных с ЮИА [16] уровень сывороточного IL-17 коррелировал с клиническими параметрами активности заболева-

ния. Данные о роли IFN $\gamma$  в развитии синовита достаточно противоречивы. С одной стороны, внесение этого цитокина в смешанную культуру Т-клеток и моноцитов пациентов с ревматоидным артритом приводило к стимуляции синтеза TNF- $\alpha$  [17]. С другой стороны, IFN $\gamma$  способен снижать продукцию IL-1, матриксных металлопротеиназ и пролиферацию синовиоцитов при ревматоидном артрите [18].

Обращает на себя внимание, что выработка IL-17 у пациентов с артритами при обоих вариантах стимуляции была выше, чем у клинически здоровых детей, а синтез IFN $\gamma$ , напротив, – ниже. Возможно, это свидетельствует о большей патогенетической значимости IL-17 для развития воспалительных заболеваний суставов. Как уже говорилось выше, IFN $\gamma$  способен подавлять некоторые воспалительные иммунологические реакции при артрите. Возможно, его сниженная при стимуляции выработка *in vitro* отражает дефицит этого цитокина в условиях *in vivo*.

Другим дополнительным фактором, обуславливающим более низкий уровень стимулированной выработки IFN $\gamma$  у детей с ЮИА и нРеА, может быть истощение функциональных резервов клеток-продуцентов в условиях хронического воспаления и постоянной активации. Особенно, если учесть, что спонтанный уровень этого ЦК был повышен в обеих группах с артритами. В наших более ранних работах было установлено, что увеличение количества Т-лимфоцитов, экспрессировавших ранние активационные маркеры CD25, CD38 и CD69, у больных с ЮИА было существенно слабее, чем у здоровых детей, как в ответ на индукцию фитогемагглютинином, так и на индукцию антителами к CD3 и CD28 [19, 20]. Соответственно, снижение резервных возмож-

ностей лимфоцитов может проявляться как «дефицит активации» в ответ на стимуляцию и затрагивать разные аспекты функционирования клеток: синтез цитокинов, экспрессию активационных молекул и т.д. Кроме того, нами ранее выявлено, что при стимуляции фитогемагглютинином синтез IFN $\gamma$  у детей с артритами также был ниже, чем в контрольной группе, при этом стимулированные концентрации IL-17 в исследованных группах не различались [21]. Соответственно, стимуляция позволяет выявить особенности продукции ЦК, которые не проявляются при исследовании их спонтанного синтеза. При этом, клетки крови здоровых и больных детей по разному отвечают на разные стимуляторы.

Таким образом, у детей с артритами различной этиологии спонтанный уровень IFN $\gamma$  был выше, чем в контроле, а при стимуляции через Т-клеточный рецептор и корецептор CD28, напротив, — ниже. Спонтанная продукция IL-17 у больных с ЮИА и нРеА не отличалась от таковой у здоровых детей, в условиях стимуляции синтез этого цитокина в группах с артритами был выше, чем в контроле. Учитывая этот факт, а также результаты наших ранее опубликованных работ, можно заключить, что воздействие стимуляторов *in vitro* позволяет выявлять различия в реактивности иммунокомпетентных клеток больных и здоровых, что может способствовать более углубленному пониманию особенностей функционирования иммунной системы при различных заболеваниях.

Авторы искренне благодарят врачей Областной детской клинической больницы (г. Екатеринбург) Козлову Е. С. и Скоробогатову О. В. за подбор пациентов для исследования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

1. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство: в 2 т. / под ред. В. В. Долгова, В. В. Меньшикова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 808 с. [Clinical laboratory diagnosis: national guideline: in 2 t. Ed. V.V. Dolgov. Moscow: GEOTAR-Media, 2012, 808 p].
2. Симбирцев А. С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека. Медицинский академический журнал 2013, 13 (3), 18–41. [Simbircev A. S. Cytokines in the pathogenesis of infectious and non-infectious human diseases. Medical Academic Journal 2013, 13 (3), 18–41].
3. Журавлева Ю. А., Соломатина Л. В., Гусев Е. Ю. Особенности цитокинемии при различных аутоиммунных заболеваниях. Российский иммунологический журнал 2017, 11 (20), (2), 315–316. [Zhuravleva Yu. A., Solomatina L. V., Gusev Ye. Yu. Characteristics of cytokinemia in various autoimmune diseases. Russian Journal of Immunology 2017, 11 (20), (2), 315–316].
4. Гатторно М. Аутовоспалительные заболевания у детей. Вопросы современной педиатрии 2014, 13 (2), 55–64. [Gottorno M. Auto-inflammatory diseases in children. Questions of modern pediatrics 2014, 13 (2), 55–64].
5. Алексеева Е. И., Литвицкий П. Ф. Ювенильный ревматоидный артрит: этиология, патогенез, клиника, алгоритмы диагностики и лечения, под ред. А. А. Баранова. М.: ВЕДИ. 2007. 368 с. [Alekseva E. I., Litvitskiy P. F. Juvenile rheumatoid arthritis: etiology, pathogenesis, clinic, algorithms of diagnostics and treatment. Ed. A. A. Baranov. Moscow: VEDI. 2007. 368 p].
6. Rypdal V., Arnstad E. D., Aalto K., Bertson L., Ekelund M., Fasth A., Glerup M., Herlin T., Nielsen S., Peltoniemi S., Zak M., Rygg M., Rypdal M., Nordal E. Predicting unfavorable long-term outcome in juvenile idiopathic arthritis: results from the Nordic cohort study. Arthritis Research & Therapy, 2018, 20:91.
7. Gorska A., Kowal-Bielecka O., Urban M., Pietrewicz E. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels in the serum and synovial fluid in relation to bone mineral density and turnover in children with juvenile idiopathic arthritis. Eur. J. Immunology 2008, 33 (4), 216–219.
8. Pietrewicz E., Urban M., Górska A. Cytokine levels in serum of patients with juvenile idiopathic arthritis depending on subtype and disease activity. Pol. Merkur. Lekarski 2004, 17 (99), 232–234.
9. Yilmaz M., Kendirli S. G., Altıntaş D., Bing G., Antmen B. Cytokine levels in serum of patients with juvenile rheumatoid arthritis. Clinical Rheumatology 2001, 20 (1), 30–35.
10. Kohler K., Ganser A., Andre T., Roth G., Grosse-Hovest L., Jung G., Brock R. Stimulus dependence of the action of small-molecule inhibitors in the CD3/CD28 signalling network. Chem. Med. Chem. 2008, 3 (9), 1404–1411.
11. Trimble L. A., Shankar P., Patterson M., Daily J. P., Lieberman J. Human Immunodeficiency Virus-Specific Circulating CD8 T Lymphocytes Have Down-Modulated CD3 and CD28, Key Signaling Molecules for T-Cell Activation. Journal Of Virology 2000, 74, 16, 7320–7330.
12. Agarwal S., Misra R., Aggarwal A. Interleukin 17 levels are increased in juvenile idiopathic arthritis synovial fluid and induce synovial fibroblasts to produce proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. J Rheumatol. 2008, 35 (3), 515–519.
13. Beringer A., Noack M., Miossec P. IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting. Trends Mol. Med. 2016, 22 (3), 230–241.
14. Chen K., Kolls J. K. Interleukin-17A (IL17A). Gene 2017, 30 (614), 8–14.
15. Szymańska-Kałuża J., Cebula-Obrzut B., Smolewski P., Stanczyk J., Smolewska E. Imbalance of Th17 and T-regulatory cells in peripheral blood and synovial fluid in treatment naïve children with juvenile idiopathic arthritis. Central European Journal of Immunology 2014, 39 (1), 71–76.

16. *Vijatov-Djuric G., Doronjski A., Mitic I. Brkic S., Barisic N.* Interleukin-17A Levels Increase in Serum of Children With Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arch Rheumatol.* 2017, 32 (10), 1–10.
17. *Sebbag M., Parry S. L., Brennan F. M., Feldmann M.* Cytokine stimulation of T lymphocytes regulates their capacity to induce monocyte production of tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-10: possible relevance to pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 1997, 27 (3), 624–632.
18. *Moller B., Paulukat J., Nold M., Behrens M., Kukoc-Zivojnov N., Kaltwasser J. P., Pfeilschifter J., Mühl H.* Interferon- $\gamma$  induces expression of interleukin-18 binding protein in fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology* 2003, 42 (3), 442–445.
19. *Пашнина И. А.* Спонтанная и стимулированная фитогемагглютинином экспрессия маркеров активации CD25, CD38 и CD69 Т-лимфоцитами при заболеваниях различной этиологии у детей. *Российский иммунологический журнал* 2017, 11 (20), (3), 465–467. [*Pashnina I. A.* Spontaneous and phytohemagglutinin-stimulated expression of activation markers CD25, CD38 and CD69 on T-lymphocytes in children with different pathology. *Russian Journal of Immunology* 2017, 11 (20), (3), 465–467].
20. *Пашнина И. А.* Экспрессия CD69 на Т-лимфоцитах у детей с аутоиммунными заболеваниями при стимуляции через Т-клеточный рецептор или через Т-клеточный рецептор и ко-рецепторную молекулу CD28. *Российский иммунологический журнал* 2014, 8 (17), (3), 579–581. [*Pashnina I. A.* CD69 expression on T-lymphocytes in children with autoimmune diseases under stimulation through the T-cell receptor ore through T-cell receptor and the co-receptor CD28. *Russian Journal of Immunology* 2014, 8 (17), (3), 579–581].
21. *Криволапова И. М., Пашнина И. А., Черешнев В. А.* Уровень провоспалительных цитокинов в супернатантах культур цельной крови у детей с ювенильным идиопатическим артритом. *Вестник Уральской медицинской академической науки* 2018, 15 (3), 421–431. [*Krivolapova I. M., Pashnina I. A., Chereshev V. A.* The level of proinflammatory cytokines in cells cultures supernatants in children with juvenile idiopathic arthritis. *Bulletin of the Ural Medical Academic Science* 2018, 15 (3), 421–431].

## THE LEVEL OF INTERLEUKIN17 AND INTERFERON $\gamma$ IN CELL'S CULTURES SUPERNATANTS UNDER STIMULATION BY ANTIBODIES TO CD3 AND CD28 IN CHILDREN WITH ARTHRITIS OF DIFFERENT ETIOLOGY

© 2019 I. A. Pashnina\*, I. M. Krivolapova

\*E-mail: [irina\\_pashnina@list.ru](mailto:irina_pashnina@list.ru)


*Regional Children's Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russia*

**Received:** 22.05.2019. **Accepted:** 28.06.2019

Children of 2–17 years old with juvenile idiopathic arthritis (n = 100), unspecified reactive arthropathy (n = 15) and 31 healthy children (controls) were examined. The spontaneous, anti-CD3-stimulated and anti-CD3/CD28-stimulated concentrations of IL-17 and IFN- $\gamma$  in the cells cultures supernatants were determined by ELISA. The spontaneous IFN- $\gamma$  level in children with arthritis of various etiologies was higher than in control, while the IFN- $\gamma$  concentrations in both variants of stimulation in the patients were lower. The spontaneous IL-17 production in the patients and in healthy children was the same, while stimulated synthesis of IL-17 in the groups with arthritis was higher than in the control group.

*Key words:* juvenile idiopathic arthritis, reactive arthritis, cytokines

### Authors:

**Pashnina I. A.**,  PhD, Head of clinical diagnostics laboratory of Regional Children's Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russia. Yekaterinburg, Regional Children's Clinical Hospital. Phone: +79226004686, **E-mail:** [irina\\_pashnina@list.ru](mailto:irina_pashnina@list.ru);

**Krivolapova I. M.**, biologist of clinical diagnostics laboratory of Regional Children's Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russia.