

CHANGES OF IMMUNE REGULATORY INDICATORS AT CHILDREN IN THE CONDITIONS OF AN EXPOSITION STRONTIUM

Otavina E. A., Dolgich O. V.

*FBUN «Federal scientific center of medico-preventive technologies
of risk management to health of the population, Perm, Russia*

The analysis of marker indicators of immune regulation at children in the conditions of excess intake of strontium with drinking water is carried out. Research showed that markers of specific hypersensitivity and mediators of intercellular immune regulation: IgG specific to strontium, cytokines of IL-6, IL-12, IL-17, α -TNF, LTC₄/D₄/E₄ – spontaneous and specifically stimulated, and osteoprotegerin can be used by RANKL for an assessment of risk of violation of health as early markers of changes of immunoregulation at the children living in exposition conditions strontium.

Key words: immunoregulation, leukotrienes, strontium

УРОВЕНЬ СПОНТАННОЙ И СТИМУЛИРОВАННОЙ АНТИТЕЛАМИ К CD3 ЭКСПРЕССИИ CD38 НА Т-ЛИМФОЦИТАХ У ДЕТЕЙ С АУТОИММУННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Пашнина И. А.^{1,2}

*¹Областная детская клиническая больница; ²Институт иммунологии
и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия*

Обследованы дети 6-17 лет с системной красной волчанкой (n=10), с ювенильной склеродермией (n=10), с ювенильным идиопатическим артритом (n=47), а также здоровые дети соответствующего возраста (n=30). Методом проточной цитометрии выявлено, что после 24-х часовой инкубации (37 °C, 5 % CO₂) спонтанное и стимулированное антителами к CD3 количество CD38-позитивных Т-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток у больных с ревматическими заболеваниями было ниже контрольного уровня.

Ключевые слова: экспрессия CD38, аутоиммунные заболевания, проточная цитометрия

Введение. CD38 – мембранный гликопротеин, обладающий рядом ферментативных функций, является одним из «ранних» активационных маркеров лимфоцитов. Он участвует в регуляции концентрации внутриклеточного кальция, в активации Т-лимфоцитов и в процессах их селекции в тимусе, проявляет эктонуклеотидазную, аденозиндифосфат-рибозил-циклазную, циклический аденозиндифосфат-рибозил-гидролазную и другие активности [1, 2]. Т-лимфоциты экспрессируют CD38 после стимуляции антителами против специфических антигенных рецепторов, взаимодействие CD38 с экто-моно-АДФ-рибозилтрансферазами является одним из меха-

низмов, определяющих баланс между выживанием и программируемой клеточной гибелью активированных клеток [3].

Наибольшее число публикаций, в которых оценена экспрессия CD38 на Т-лимфоцитах, посвящено ВИЧ-инфекции и СПИД, при которых наблюдается экстремальное увеличение CD4⁺CD38⁺ и, особенно, CD8⁺CD38⁺-лимфоцитов, причем число этих клеток позитивно коррелирует с тяжестью заболевания и с неблагоприятным прогнозом [4,5]. Имеются лишь единичные литературные источники, посвященные исследованию уровня экспрессии CD38 при аутоиммунной патологии [6, 7, 8].

В отношении нормального уровня экспрессии CD38 на Т-лимфоцитах у здоровых лиц данные литературы значительно разнятся. В некоторых литературных источниках спонтанное количество CD38-позитивных лимфоцитов среди цитотоксических Т-клеток и Т-хелперов у здоровых доноров составило менее 10% [9]. Другие авторы, в частности Xing Y. et al., указывают более высокие цифры: спонтанное количество CD38-позитивных лимфоцитов среди цитотоксических Т-клеток у здоровых доноров равнялось $43 \pm 12\%$ [10]. Противоречивость результатов при оценке экспрессии CD38 может объясняться методическими особенностями. Для уточнения методики определения CD8⁺CD38⁺ Onlmoon N. с соавт. проведено исследование на ВИЧ-инфицированных пациентах, в котором параллельно использовались FITC- и PE-конъюгированные моноклональные антитела к CD38 [11]. В случае использования анти-CD38-PE количество CD8⁺CD38⁺ лимфоцитов было в 2-3 раза больше, чем при использовании анти-CD38-FITC. То есть при цитометрическом анализе экспрессии CD38 результаты существенно зависят от качества моноклональных антител и использованного флюорохрома.

Целью настоящей работы явилась оценка экспрессии CD38 на Т-лимфоцитах при стимуляции *in vitro* у детей с аутоиммунной патологией.

Материалы и методы. Обследованы дети 6-17 лет с системной красной волчанкой (СКВ, n=10), с ювенильной склеродермией (ЮСД, n=10), с ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА, n=47), а также 30 условно здоровых детей (УЗД). Для оценки спонтанной и индуцированной экспрессии CD38 на Т-лимфоцитах образцы цельной периферической крови разводили глутаминсодержащей средой RPMI-1640 (Пан-Эко, Россия) в соотношении 1:9 и инкубировали в течение 24-х часов (37°C, 5% CO₂) без стимулятора и при стимуляции через Т-клеточный рецептор антителами к CD3 (анти-CD3, Биокон, Россия) в конечной концентрации 2 мкг/мл. Подсчет количества CD38-позитивных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD38⁺), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD38⁺) и цитотоксических Т-клеток (CD3⁺CD8⁺CD38⁺) проведен методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA). Для анализа данных использовали ковариационный анализ в рам-

ках унифицированного аппарата теории общих линейных моделей. Эффекты половой принадлежности и возраста обследованных детей оценивали в качестве ковариат; принадлежность к определенной исследуемой группе параметризовали как номинальную переменную, группа УЗД служила референтным уровнем. Перед процедурой анализа проводили логит-преобразование. Приведение в исходную шкалу ожидаемых значений (M) и их 95% доверительных интервалов (95% ДИ) выполняли с помощью обратного антилогит-преобразования. Для апостериорных (post hoc) сравнений использован критерий Тьюки для выборок не равного размера.

Результаты и обсуждение. В результате анализа полученных данных установлено, что уровни спонтанной и стимулированной экспрессии CD38 на Т-лимфоцитах, Т-хелперах и цитотоксических Т-клетках не были взаимосвязаны с возрастом обследованных пациентов и их половой принадлежностью. Спонтанное и стимулированное количество CD38-позитивных клеток во всех исследованных популяциях у детей с ревматическими заболеваниями было ниже, чем в контрольной группе, хотя не во всех случаях выявленные различия были статистически достоверными (Таблица). Во всех исследованных группах больных наблюдалось однотипное снижение числа клеток, экспрессировавших CD38, – как в общем пуле Т-лимфоцитов, так и в их субпопуляциях.

Таким образом, количество CD38-позитивных клеток при обоих вариантах инкубации у больных с аутоиммунной патологией соединительной ткани (СКВ, ЮСД, ЮИА) было меньше соответствующих контрольных значений. По данным Sempere-Ortells J.M. с соавт. (2009) у взрослых больных с ревматоидным артритом число CD4⁺CD38⁺ также было снижено по сравнению со здоровым контролем и отрицательно коррелировало с активностью заболевания [8]. Согласно результатам работ других авторов [6, 7], у взрослых пациентов с активной формой СКВ, напротив, выявлено увеличение количества CD3⁺CD4⁺CD38⁺ и CD3⁺CD8⁺CD38⁺ по сравнению со здоровыми донорами. В исследованной нами группе больных с СКВ количество CD38-позитивных лимфоцитов было ниже, чем у клинически здоровых детей. Однако, в детском и взрослом возрасте субпопуляционный состав и реактивность иммунокомпетентных клеток могут отличаться.

Таблица. Количество Т-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток, экспрессировавших CD38 после инкубации, у детей, условно здоровых и с патологией

Группа	Инкубация	CD3 ⁺ CD38 ⁺ , % от CD3 ⁺		CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD38 ⁺ , % от CD3 ⁺ CD4 ⁺		CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD38 ⁺ , % от CD3 ⁺ CD8 ⁺	
		М	95%ДИ	М	95%ДИ	М	95%ДИ
СКВ	без стиму- лятора	15,97***	11,73-21,38	20,23***	14,63-27,29	8,54*	5,43-13,18
ЮСД		25,32	17,77-34,72	35,84	25,43-47,78	6,89*	3,85-12,00
ЮИА		22,13***	19,44-25,07	30,21***	26,57-34,10	7,10***	5,77-8,71
УЗД		37,79	33,13-42,68	50,22	44,66-55,77	18,29	14,51-22,79
СКВ	анти-CD3	31,66	23,16-41,6	40,9	29,29-53,61	15,87	9,35-25,66
ЮСД		32,16	21,62-44,89	44,67	29,74-60,63	14,54	7,37-26,68
ЮИА		31,87***	27,77-36,28	43,81**	38,15-49,63	14,52***	11,42-18,28
УЗД		48,94	42,76-55,15	61,54	54,31-68,29	32,62	25,44-40,72

Примечание: различия между группами: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001

Следует отметить, что у обследованных нами детей наблюдалось снижение стимулированного количества CD25- и CD69-позитивных Т-лимфоцитов [12, 13]. CD25-позитивные Т-хелперы в основном представлены регуляторными Т-клетками, осуществляющими супрессорные функции [14]. Согласно литературным данным, Т-лимфоциты, экспрессирующие CD69, также могут быть задействованы в негативной регуляции функционирования иммунной системы [15]. Рядом авторов показано, что CD38-позитивные Т-лимфоциты экспериментальных животных участвуют в негативной регуляции иммунного ответа, CD4⁺CD38^{high} лимфоциты человека способны подавлять пролиферацию эффекторных Т-хелперов *in vitro* [1, 16]. То есть, лимфоциты, экспрессирующие маркеры активации, в том числе CD38, могут принимать участие в супрессии иммунного ответа. Выявленное в наших работах снижение числа лимфоцитов, экспрессировавших CD25, CD69 и CD38, у детей с аутоиммунной патологией может свидетельствовать о сбое регуляторных механизмов при развитии хронического воспалительного процесса.

Автор приносит искреннюю благодарность врачам ГБУЗ СО ОДКБ№ 1 Козловой Е. С. и Скоробогатовой О. В. за подбор пациентов для исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bahri R., Bollinger A., Bollinger T. et al. PLoS ONE, 2012, 7(9), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3444472/>
- Gonzalez-Escribano M. F., Aguilar F., Torres B. et al. Human Immunology, 2004, 65, 660-664.
- Han M.-K., Cho Y.-S., Kim Y.S. et al. The Journal Of Biological Chemistry, 2000, 275, 27, 20799-20805.
- Kasang C., Ulmer A., N. et al. BMC Infectious Diseases, 2012, 12, 14-26.
- Yang Y., Al-Mozainia M., Buzon M.J. et al. AIDS, 2012, 26, 701-706.
- Miyamoto M., Ono E., Barbosa C. P. L. et al. Lupus, 2011, 20, 736-744.
- Pavona E. J., Munoz P., Navarro M. C. et al. Molecular Immunology, 2006, 43, 7, 1029-1039.
- Sempere-Ortells J.M., Perez-Garcia V., Marin-Alberca G. et al. Autoimmunity, 2009, 42 (8), 636-645.
- dos Santos D.C. M., Neves P.C. C., Azeredo E.L. et al. Liver International, 2012, 29, 147-157.
- Xing Y., Song H.M., Wei M. et al. J. Immunotoxicol., 2013, 10(4), 387-392.
- Onlamoon N., Tabprasit S., Sukapirom K. et al. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology, 2011, 29, 181-189.
- Пашнина И. А. Российский иммунологический журнал, 2014, 8 (17), 2(1), 126-128. [Pashnina I. A. Russian Journal of Immunology, 2014, 8 (17), 2(1), 126-128].
- Пашнина И. А., Криволапова И. М., Козлова Е. С., Скоробогатова О. В. Медицинская иммунология, 2015, 17, 92-93. [Pashnina I. A., Krivolapova I. M., Kozlova E. S., Skorobogatova O. V. Medical Immunology, 2015, 17, 92-93].
- Sakaguchi S. Methods in Molecular Biology, 2011, 707, 3-17.
- Cruz-Adalia A., Jimenez-Borreguero L. J., Ramirez-Huesca M. et al. Circulation, 2010, 122, 1396-1404.
- Viegas M. S., Silva T., Monteiro M.M. et al. Rheumatology, 2011, 50, 1569-1577.

THE LEVEL OF SPONTANEOUS AND ANTI-CD3-STIMULATED CD38 EXPRESSION ON T-LYMPHOCYTES IN CHILDREN WITH AUTOIMMUNE PATHOLOGY

Pashnina I. A.^{1,2}

¹Regional Children's Clinical Hospital № 1; ²Institute of Immunology and Physiology, Urals Branch of the Russian Acad. Sci., Yekaterinburg, Russia

Children of 6-17 years old with systemic lupus erythematosus (n=10), with systemic sclerosis (n=10), with juvenile idiopathic arthritis (n=47) and conditionally healthy controls of corresponding age (n=30) were examined. It was revealed by flow cytometry that after 24-hours incubation (37°C, 5% CO₂) the spontaneous and anti-CD3-stimulated amount of CD38-positive T-lymphocytes, T-helpers and cytotoxic T-cells in children with rheumatic diseases was decreased in comparison with healthy control.

Key words: CD38 expression, autoimmune diseases, flow cytometry

ГУМОРАЛЬНЫЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ У ДЕТЕЙ С ЮВЕНИЛЬНЫМ ИДИОПАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ И РЕАКТИВНЫМ АРТРИТОМ

Пашнина И. А.^{1,2}, Криволапова И. М.^{1,2}, Черешнев В. А.²

¹Областная детская клиническая больница; ²Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

У больных с олигоартикулярным ювенильным идиопатическим артритом (n=98) и с реактивным артритом (n=26), а также у условно здоровых детей (n=42) в возрасте 2-17 лет определяли уровень гуморальных иммунологических параметров. Не выявлено различий по концентрации С-реактивного белка и антител к модифицированному цитруллинированному виментину между здоровыми детьми и пациентами с заболеваниями суставов. У детей с ювенильным артритом уровень антител к экстрагируемым ядерным антигенам и титр антинуклеарного фактора были выше, чем у здоровых детей и больных с реактивным артритом. Частота встречаемости антител к экстрагируемым ядерным антигенам и модифицированному цитруллинированному виментину при ювенильном артрите и реактивном артрите была невысокой, наиболее часто у этих детей выявлялся антинуклеарный фактор.

Ключевые слова: ювенильный идиопатический артрит, реактивный артрит, гуморальный иммунитет

Введение. Одной из актуальных проблем современной детской ревматологии является диагностика и лечение воспалительных заболеваний суставов, среди которых наиболее распространенными являются ювенильный идиопатический артрит (ЮИА) и реактивный артрит (РеА). [1, 2]. Считается, что на ранней стадии заболевания разграничить ЮИА и РеА крайне затруднительно из-за стертого субклинического течения первичного инфекцион-

ного процесса при РеА, отсутствия специфических лабораторных маркеров и схожести клинической картины РеА с другими видами ювенильных артритов. Наибольшие затруднения вызывают разграничения РеА с олигоартикулярным вариантом ЮИА [2]. Для диагностики ювенильного идиопатического артрита, в том числе, используют определение антинуклеарных антител. Эти антитела не являются специфичными для ЮИА, однако важность