

ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ АУТОАГРЕССИИ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА У ДЕТЕЙ

© Дементьева Е.А., Степанова А.А., Гурина О.П., Блинов А.Е., Варламова О.Н., Блинов Г.А.

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет.
194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2

Резюме: Представлен анализ данных иммунологического обследования детей, страдающих болезнью Крона. Иммунодиагностика включала: иммунофенотипирование лимфоцитов, исследование концентрации иммуноглобулинов классов IgA, IgM, IgG, IgE в сыворотке крови, циркулирующих иммунных комплексов, концентрации аутоиммунных антител ASCA IgA и IgG, ANCA MPO, ANCA PR3, ANA, DNAds, DNAss. В результате иммунологического обследования детей с установленным диагнозом болезнь Крона обнаружен ряд признаков аутоиммунной агрессии. Выявление гипериммуноглобулинемии свидетельствует об активности иммунного хронического воспалительного процесса. Атипичная антигенная стимуляция через воспаленные отделы кишечника создает предпосылки для клеточно-опосредованного иммунного ответа с чрезмерной активацией Т-хелперов. Иммунологическая диагностика при болезни Крона необходима для оценки тяжести течения заболевания, оптимизации дифференциальной диагностики, определения прогноза и подбора индивидуальной иммунокорректирующей терапии.

Ключевые слова: иммунодиагностика, фенотипирование, аутоантитела, болезнь Крона.

IMMUNOLOGICAL DIAGNOSIS IN CROHN'S DISEASE IN CHILDREN

© Dementeva E.A., Stepanova A.A., Gurina O.P., Blinov A.E., Varlamova O.N., Blinov G.A.

St. Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia

Abstract: The immunological diagnosis in children with Crohn's disease was carried out. Immunophenotyping of lymphocytes was performed, the concentration of immunoglobulins of IgA, IgM, IgG, IgE classes in blood serum and circulating immune complexes was studied. Concentrations of autoimmune antibodies ASCA IgA and IgG, ANCA MPO, ANCA PR3, ANA, DNAds, DNAss were diagnosed. As a result of the immunological examination of children with an established diagnosis of Crohn's disease, a number of signs of autoimmune aggression were found. Detection of hyperimmunoglobulinemia indicates the activity of the immune chronic inflammatory process. Atypical antigenic stimulation through the inflamed parts of the intestine creates prerequisites for a cell-mediated immune response with excessive activation of T-helpers. Immunological diagnosis in Crohn's disease is necessary to assess the severity of the disease, optimize differential diagnosis, determine the prognosis and selection of individual immunocorrecting therapy.

Key words: immunodiagnosis, phenotyping, autoantibodies, Crohn's disease.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Крона — хроническое воспалительное рецидивирующее заболевание желудочно-кишечного тракта с развитием аутоиммунных реакций, вследствие потери толерантности к нормальным антигенам пищи [1–5]. Согласно эпидемиологическим исследованиям в 20% случаев болезнь Крона дебютирует в возрасте до 18 лет [1, 6–8]. В виду неуклонного роста частоты заболевания со значительным увеличением числа детей среди наблюдаемых пациентов необходимо проведение ранней диагностики и назначение адекватной терапии [5–9].

Выявление специфических аутоантител при иммунологической диагностике у пациентов с болезнью Крона доказывает аутоиммунный характер заболевания [1–5, 10–12]. Повышенная проницаемость слизистой оболочки кишечника создаёт предпосылки для усиленной антигенной нагрузки и, как следствие, локального и системного высвобождения медиаторов воспаления [1, 5, 12].

Аутоиммунное реагирование в ряде случаев развивается на фоне снижения отдельных функций иммунологического профиля, т.е. возникает на фоне иммунодефицитного состояния [13–15].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка результатов иммунологической диагностики у детей, страдающих болезнью Крона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 62 пациента в возрасте 2–17 лет с установленным диагнозом болезни Крона (БК), из них 33 мальчика и 29 девочек.

Проведено иммунофенотипирование лимфоцитов методом проточной цитометрии (проточный цитометр Epics XL-MCL, Beckman Coulter, USA) по безотмывочной технологии с использованием моноклональных антител, конъюгированных с FITC, PE, PC-5 (Beckman Coulter, USA). Определена концентрация в сыворотке крови иммуноглобулинов классов IgA, IgM, IgG, IgE (реакция преципитации, иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием набора «Алкор-Био», Россия), антител к *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) классов IgA, IgG, антинейтрофильных цитоплазматических антител (ANCA) к миелопероксидазе (МРО) и протеиназе 3 (PR3), анти-нуклеарных антител (ANA), антител к DNAds, DNAss (к двухспиральной и одноцепочечной ДНК) (ИФА с использованием ИФТС фирмы «Orgentec», Германия), циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК).

Оценка концентраций субпопуляций лимфоцитов, IgA, IgM, IgG, IgE в сыворотке крови проводилась в соответствии со стандартными нормами, установленными в зависимости от возраста обследуемого пациента [7, 14, 16, 17]. Допустимые значения концентраций антител к DNAds, DNAss в сыворотке крови — 0–20 Ед/мл [16]. Нормой концентрации ЦИК в сыворотке крови считали 0–54 усл. ед. [14, 16]. Нормальные значения концентрации ASCA IgA и IgG в сыворотке крови — 0–10 Ед/мл [11]. Концентрации в сыворотке крови ANCA МРО, ANCA PR3, ANA оценивали в соответствии с коэффициентом позитивности — 0–1 [12, 16].

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием стандартных пакетов программ прикладного статистического анализа (Microsoft Office Excel 2010, Statistica for Windows v. 6.1). Методы описательной статистики включали оценку среднего арифметического (M), ошибки среднего значения (m) и среднеквадратичного отклонения (σ) для признаков, имеющих нормальное распределение. Для оценки взаимозависимости величин использованы методы корреляционного анализа. Сила корреляционной связи оценивалась по следующей классификации: сильная связь — $\pm 0,7$ –1; средняя — $\pm 0,3$ –0,699; слабая — ± 0 –0,299.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У 30% обследованных детей отмечается относительный Т-лимфоцитоз за счет повышения уровня Т-хелперов CD3+CD4+ (в 50% случаев), цитотоксических Т-клеток CD3+CD8+ (у 20% обследованных), NKT-лимфоцитов CD3+CD(16+56)+ (у 10% детей). Иммунорегуляторный индекс снижен у 30% обследованных детей, что может являться признаком развития иммунодефицитного состояния, а у 15% пациентов индекс соотношения CD3+CD4+/CD3+CD8+ повышен, т.е. заболевание протекает на фоне аутоиммунной агрессии. Относительный В-лимфоцитоз отмечается у 15% детей, В-лимфопения — у 20%. В 45% случаев относительный уровень натуральных киллеров CD3-CD(16+56)+ снижен. Активированные NK-клетки, экспрессирующие CD8, у 30% обследованных снижены, у 25% — повышены. Уровень $\gamma\delta$ -Т-клеток повышен у 38,9% детей.

У всех детей с БК выявлены изменения в гуморальном звене иммунной защиты, при этом дисиммуноглобулинемии различных типов отмечаются в 13,6% случаев. Гипериммуноглобулинемия с различными сочетаниями повышенных концентраций иммуноглобулинов диагностирована у 47 (75,8%) из 62 пациентов. При этом гипериммуноглобулинемия М обнаружена в 68,2% случаев, G — у 27,3% пациентов, A — у 22,7% детей. «Иммуноглобулиновый взрыв» (сочетанное повышение концентрации IgA, IgM, IgG в сыворотке крови) выявлен в 9,1% случаев. Гипериммуноглобулинемия E обнаружена у 31,8% обследованных пациентов. При этом средняя концентрация общего IgE в сыворотке крови этих пациентов достигает 301,9 МЕ/мл.

Гипоиммуноглобулинемия отмечена у 22 (35,5%) из 62 обследованных пациентов, из них I тип дисиммуноглобулинемии (сочетанное снижение концентраций IgA и IgM) выявлен у 1 (4,55%) пациента, II тип (сочетанное снижение содержания IgA и IgG) — у 3 (13,6%), III тип (гипоиммуноглобулинемия G) — у 1 (4,55%), IV тип (снижение концентрации IgA) — у 17 (77,3%).

Циркулирующие иммунные комплексы выявлены у 18,1% детей. Их уровень коррелирует с содержанием IgM ($r=0,5$) и IgG ($r=0,3$).

У 22 (35,5%) из 62 обследованных пациентов с БК наблюдается повышение концентрации ASCA (IgA, IgG). Уровень ASCA IgA превышал норму у 16,1% больных, повышенный уровень ASCA IgG выявлен у 32,3% детей.

Антинейтрофильные цитоплазматические антитела к МРО положительны у 9,5%, к PR3 — у 33,3% детей. Обнаружена прямая

корреляция между ASCA IgG и антителами к МРО ($r=0,3$), а также ASCA IgA и антителами к PR3 ($r=0,3$). Выявлена умеренная корреляция гипериммуноглобулинемии А с концентрацией ASCA IgA ($r=0,3$). Высокая степень корреляции отмечена между ASCA IgG и ANA ($r=0,8$), при этом уровень ANA у всех обследованных детей не превышает норму.

Превышающая норму концентрация антител к DNAds, DNAss в сыворотке крови отмечается у 4,8% и у 16,1% обследованных соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате иммунологического обследования детей с установленным диагнозом БК обнаружен ряд признаков иммуноагрессии. Атипичная антигенная стимуляция через воспаленные отделы кишечника создает предпосылки для клеточно-опосредованного иммунного ответа с чрезмерной активацией Т-хелперов. Обнаруженный повышенный уровень $\gamma\delta$ -Т-клеток свидетельствует о хронической антигенной стимуляции на слизистых оболочках [18]. Снижение уровня натуральных киллеров обуславливает возможность развития сопутствующего вирус-ассоциированного воспалительного процесса в кишечнике [19, 20]. У всех обследованных пациентов выявлены изменения в гуморальном звене иммунной защиты. Обнаруженная у 75,8% детей гипериммуноглобулинемия с различными сочетаниями повышенных концентраций иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG, IgE указывает на характерную для БК выраженную активность хронического аутоиммунного воспалительного процесса [5, 12, 20–22]. Выявленное наличие гипоиммуноглобулинемии у обследованных больных с БК согласуется с данными исследований, указывающих на тесную взаимосвязь гипоиммуноглобулинемии как проявления снижения части функций иммунной системы и аутоиммунных реакций как варианта гиперфункции в других отделах иммунной системы [13, 14]. Обнаружение дисиммуноглобулинемии IV типа (изолированное снижение концентрации IgA) согласуется с данными исследований, указывающих на то, что дисиммуноглобулинемия IV типа является наиболее часто встречающимся вариантом гипоиммуноглобулинемии [13, 14, 16].

Появление ASCA и ANCA антител при БК расценивается как прогностически неблагоприятный признак, сопровождающий осложненное течение заболевания с частыми эпизодами кишечной непроходимости [8, 23, 24]. Отмечено, что ANA также в значительной степени коррелирует с ASCA IgA и IgG. При этом, согласно

полученным результатам, концентрация ANA в 100% случаев соответствует норме.

Повышенный уровень ЦИК, рассматриваемых как предиктор аутоиммунного воспалительного процесса, коррелировал с уровнями аутоантител ANCA PR3 и DNAss. Данный факт подтверждает участие аутоиммунного механизма в патогенезе воспалительной реакции при БК [5, 9, 12, 24, 25, 26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты подтверждают наличие аутоиммунного воспаления у детей, страдающих болезнью Крона. Наличие гипериммуноглобулинемии свидетельствует об активности аутоиммунного хронического воспалительного процесса. Обнаружение аутоантител к *Saccharomyces cerevisiae*, к одноцепочечной и двуцепочечной ДНК, антигенам цитоплазмы нейтрофилов, а также выраженная степень корреляции многих показателей аутоиммунного реагирования позволяют судить об интенсивности иммунопатологического процесса при БК. Наличие аутоантител ASCA, ANCA при БК является прогностически неблагоприятным признаком. Отмечается тенденция к клеточно-опосредованному иммунному ответу с чрезмерной активацией Т-хелперов. Снижение уровня натуральных киллеров обуславливает возможность развития сопутствующего вирус-ассоциированного воспалительного процесса в кишечнике. Повышенный уровень $\gamma\delta$ -Т-клеток наряду с гипоиммуноглобулинемией А могут свидетельствовать о хроническом воспалительном процессе из-за повышенной антигенной стимуляции на слизистых оболочках.

Иммунологическая диагностика при болезни Крона необходима для оценки тяжести течения заболевания, оптимизации дифференциальной диагностики, определения прогноза и подбора индивидуальной иммунокорригирующей терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Денисова М.Ф., Дыба М.Б. Болезнь Крона у детей. Особенности клиники и диагностики. Современная педиатрия. 2009; 6(28): 83.
2. Бельмер С.В., Разумовский А.Ю., Хавкин А.И., Алхасов А.Б., Бехтерева М.К., Волюнец Г.В., Воронин В.А., Воронцова Л.В., Гасилина Т.В., Голованев М.А., Гончар Н.В., Гуревич А.И., Дронов А.Ф., Ермоленко К.Д., Залихин Д.В., Иванов Д.О., Ионов А.Л., Калинина Е.Ю., Комарова О.Н., Корниенко Е.А. и др. Болезни кишечника у детей. Москва, 2018. Том 2
3. Ивашкин В.Т., Лапина Т.Л., ред. Гастроэнтерология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР Медиа, 2008.
4. Мельникова И.Ю., Гончар Н.В., Григович И.Н., Думова Н.Б., Корниенко Е.А., Косенко И.М., Луппо-

- ва Н.Е., Новикова В.П., Приворотский В.Ф., Прони-на Е.В., Храпцова Е.Г. Детская гастроэнтерология: практическое руководство / под ред. И. Ю. Мельниковой. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 480 с
5. Маев И.В., Андреев Д.Н., Дичева Д.Т., Великанов Е.В. Болезнь Крона: этиопатогенез, диагностика и консервативное лечение. Пособие для врачей. М.: Прима Принт; 2016.
 6. Березенко В.С. К вопросу об особенностях течения, диагностики и лечения болезни Крона у детей. Современная педиатрия. 2010; 5(33): 167.
 7. Турчунович М.В., Бовбель И.Э. Особенности клинической картины и диагностики болезни Крона в подростковом возрасте. Педиатрия. Восточная Европа. 2015; 2(10): 138–48.
 8. Cosnes J., Gower-Rousseau C., Seksik P., Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011; 140: 1785–94.
 9. Гурина О.П., Степанова А.А., Дементьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н., Блинов Г.А. Взаимосвязь показателей специфического гуморального иммунитета и показателей аутоагрессии при воспалительных заболеваниях кишечника у детей. Сб.: Воронцовские чтения. СПб. 2018; 17–18.
 10. Корниенко Е.А., Ломакина Е.А., Залетова Н.К., Фа-дина С.А. Топические стероиды в лечении воспалительных заболеваний кишечника у детей. Современная педиатрия. 2012; 8(48): 111.
 11. Bertin D., Grimaud J.C., Lesavre N., Benelmouloud C., Desjeux A., Garcia S. et al. Targeting Tissue Immune Response Improves Diagnostic Performance of Anti-Saccharomyces cerevisiae Antibodies (ASCA) in Crohn's Disease. *PLOS ONE*. 2013; 8(11): e80433.
 12. Prideaux L., De Cruz P., Ng S.C., Kamm M.A. Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis*. 2012; 18: 1340–55.
 13. Васильев А.Г., Чурилов Л.П. Иммунология и иммунопатология. СПб.: СОТИС; 2006.
 14. Корниенко Е.А., Крупина А.Н., Калинина Н.М., Бычкова Н.В. Иммунодефицитные состояния при воспалительных заболеваниях кишечника у детей. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2015; 5(117): 94.
 15. Пампура А.Н. Фармакотерапия аллергических заболеваний и первичных иммунодефицитов у детей. В кн.: Царегородцев А.Д., Таболин В.А., ред. Руководство по фармакотерапии в педиатрии и детской хирургии: В 8 т. М.: Медпрактика-М; 2006; 7.
 16. Калинина Н.М., Кетлинский С.А., Оковитый С.В., Шуленин С.Н. Заболевания иммунной системы. Диагностика и фармакотерапия. М.: Эксмо; 2008.
 17. Пичугина Л.В. Изменение фенотипа лимфоцитов при некоторых патологиях. Обзор литературы. М.: БиоХимМак; 2006.
 18. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. Челябинск.: Бумажный двор; 2008.
 19. Гурина О.П., Дементьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н. Иммунофенотип лимфоцитов при болезни Крона у детей. В кн.: Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. СПб; 2016; 3–4: M10b.
 20. Гурина О.П., Дементьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н., Блинов Г.А. Иммунологический профиль у детей с болезнью Крона. Медицинская иммунология. 2
 21. Гурина О.П., Степанова А.А., Дементьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н., Блинов Г.А. Особенности аутоиммунных реакций при болезни Крона у детей. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (1): 44–50.
 22. Денисова М.Ф., Дыба М.Б. Болезнь Крона у детей. Особенности клиники и диагностики. Современная педиатрия. 2009; 6(28): 83.017; 19 (Специальный выпуск): 111.
 23. Gologan S., Iacob R., Preda C., Vadan R., Cotruta B., Catuneanu A.M. et al. High titers of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies IgA and IgG are associated with more aggressive phenotypes in Romanian patients with Crohn's disease. *J. Gastrointest Liver Dis*. 2012; 21(1): 39–44.
 24. Israeli E., Grotto I., Gilburd B., Balicer R.D., Goldin E., Wiik A. et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease. *Gut*. 2005; 54(9): 1232–6.
 25. Гурина О.П., Дементьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н., Блинов Г.А. Аутоиммунные реакции при болезни Крона у детей. В кн.: Материалы XI российского форума «Здоровье детей: профилактика и терапия социально-значимых заболеваний. Санкт-Петербург — 2017». СПб; 2017: 23–4.
 26. Danese S., Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 2006; 12(30): 4807–12.