

И.З. Турцевич<sup>1</sup>, Г.А. Новик<sup>1</sup>, Н.В. Бычкова<sup>2</sup>, Н.М. Калинина<sup>2</sup>, Н.И. Давыдова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России, Российская Федерация

<sup>2</sup> Всероссийский центр экстремальной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

## Th17-фенотип ювенильного идиопатического артрита

### Контактная информация:

Турцевич Инга Зауровна, аспирант кафедры педиатрии им. проф. И.М. Воронцова ФП и ДПО ГБОУ ВПО СПбГПМУ Минздрава России

Адрес: 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2, тел.: +7 (981) 739-02-10, e-mail: iturtsevich@gmail.com

Статья поступила: 14.09.2014 г., принята к печати: 24.12.2014 г.

**Актуальность.** Ювенильный идиопатический артрит (ЮИА) остается одной из наиболее актуальных проблем детской ревматологии в связи с развитием инвалидизации на ранних сроках заболевания. Установлено, что именно первые годы с момента развития артрита являются решающими с точки зрения прогрессирования патологического процесса. Несмотря на значительный прогресс в лечении ЮИА генно-инженерными биологическими препаратами, некоторые пациенты не отвечают на эту терапию, усугубляя тем самым течение болезни. **Цель исследования.** Совершенствование диагностики и лечения детей с ЮИА путем изучения основных иммунологических факторов Th17 пути дифференцировки лимфоцитов с разработкой рекомендаций по оценке прогноза течения и исходов болезни. **Методы.** В исследование были включены 108 детей в возрасте от 2 до 18 лет с различными вариантами ЮИА. Группу сравнения составили 18 условно здоровых детей в возрасте от 6 до 17 лет с неотягощенной наследственностью по аутоиммунным заболеваниям и отсутствием каких-либо клинических признаков заболеваний. Всем пациентам, включая группу сравнения, проведено исследование общей популяции Т-хелперов и их субпопуляций (наивных Th-клеток и Th-клеток памяти), дубль-позитивных Th-клеток), субпопуляций Th17-клеток и провоспалительных цитокинов (IL 1 $\beta$ , IL 6, IL 17A и TNF  $\alpha$ ) в периферической крови. **Результаты.** Уровень Th17-клеток памяти и провоспалительных цитокинов (IL 1 $\beta$ , IL 6 и IL 17A) был достоверно выше у детей с энтезитассоциированным артритом (HLA B27+ ювенильным анкилозирующим спондилоартритом) и системным вариантом ЮИА. Выявлено влияние уровня Th17-клеток и высокого уровня IL 17A в крови на развитие активной болезни, а при одновременном повышении IL 6 — возрастание риска развития костно-хрящевой деструкции у детей с ЮИА. **Заключение.** Исходя из иммунологических данных, были выделены, по крайней мере, Th17-зависимый и Th17-независимый фенотипы. ЮИА с Th17-зависимым фенотипом характеризуется наиболее неблагоприятным течением заболевания с высоким риском развития костно-суставной деструкции, поэтому дети нуждаются в более раннем назначении генно-инженерных биологических препаратов. Th17-независимый фенотип, напротив, имеет более благоприятный исход заболевания и низкий риск развития костно-суставной деструкции.

**Ключевые слова:** ювенильный идиопатический артрит, артрит, Th17-клетки, IL 17A, IL 1 $\beta$ , IL 6, TNF  $\alpha$ , цитокины, энтезитассоциированный артрит, HLA B27, системный артрит.

(Педиатрическая фармакология. 2015; 12 (1): 30–37)

I.Z. Turtsevich<sup>1</sup>, G.A. Novik<sup>1</sup>, N.V. Bychkova<sup>2</sup>, N.M. Kalinina<sup>2</sup>, N.I. Davydova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Saint Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of Russia, Russian Federation

<sup>2</sup> Nikiforov All-Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, Saint Petersburg, Russian Federation

## Th-17 Phenotype of Juvenile Idiopathic Arthritis

**Urgency.** Juvenile idiopathic arthritis (JIA) remains one of the most urgent issues of pediatric rheumatology due to incapacitation at early stages of the disease. It has been established that the first years of arthritis are key in the aspect of progression of the pathological process. Despite significant progress in treating JIA with genetically engineered biopharmaceuticals, some patients do not respond to such a therapy and thus aggravate the disease course. **The study was aimed at** improving diagnosis and treatment of children with JIA by means of analyzing the main immunological factors Th17, suggesting methods of differentiating lymphocytes and developing recommendations on assessing prognosis of the disease's course and outcomes. **Methods.** The study included 108 2–18-years-old children with various forms of JIA. The control group was comprised of 18 conventionally healthy 6–17-years-old children with unburdened heredity regarding autoimmune diseases and without any clinical symptoms of diseases. The total T helper population and subpopulations thereof (naive Th cells and Th memory cells, double-positive Th cells), subpopulations of Th17 cells and anti-inflammatory cytokines (IL 1 $\beta$ , IL 6, IL 17A and TNF  $\alpha$ ) in the peripheral blood were analyzed in all the patients, including the control group. **Results.** The levels of Th17 memory cells and anti-inflammatory cytokines (IL 1 $\beta$ , IL 6 and IL 17A) were significantly higher in children with enthesitis-associated arthritis (HLA B27+ juvenile ankylosing spondyloarthritis) and systemic JIA. The level of Th17 cells and high blood level of IL 17A affect development of an active disease; simultaneous increase in IL 6 results in higher risk of osteochondral destruction in children with JIA. **Conclusion.** According to the immunological data, there are at least 2 JIA phenotypes: Th17-dependent and Th17-independent. Th17-dependent JIA is characterized by the most adverse course of the disease and high risk of osteoarticular destruction, which is why children require earlier prescription of genetically engineered biopharmaceuticals. By contrast, Th17-independent phenotype features a more favorable disease outcome and low risk of osteoarticular destruction.

**Key words:** juvenile idiopathic arthritis, arthritis, Th17 cells, IL 17A, IL 1 $\beta$ , IL 6, TNF  $\alpha$ , cytokines, enthesitis-associated arthritis, HLA B27, systemic arthritis.

(Pediatricheskaya farmakologiya — Pediatric pharmacology. 2015; 12 (1): 30–37)

## АКТУАЛЬНОСТЬ

Под понятием «фенотип» понимают совокупность внешних и внутренних признаков организма, приобретенных в результате онтогенеза. Термин «фенотип» был предложен датским ученым Вильгельмом Йогансенем в 1909 г. вместе с концепцией генотипа с целью различать наследственность организма от того, что получается в результате ее реализации. Совокупность генетических и средовых факторов определяют богатство и разновидность фенотипа: чем многомернее и чувствительнее фенотип, тем он дальше от генотипа и богаче в своих проявлениях.

Согласно современным представлениям, ювенильный идиопатический артрит (ЮИА) остается одним из наиболее распространенных заболеваний детского возраста, в структуру которого входят все формы артрита, и характеризуется как хроническое воспалительное заболевание суставов неизвестной этиологии, которое начинается до 16-летнего возраста, длительностью более 6 нед. при исключении другой патологии суставов [1].

ЮИА рассматривается как понятие, объединяющее гетерогенную группу хронических заболеваний суставов, имеющих различный этиопатогенез и иммуногенетическое происхождение, различную нозологическую принадлежность и неоднозначный прогноз [2]. Ведущим механизмом в развитии заболевания у детей является антигензависимый аутоиммунный воспалительный процесс [3, 4].

Выделение новой субпопуляции Th (Th17) в 2005 г. (Harrington, Langrish, Park и соавт.) расширило знание о патогенезе многих воспалительных и инфекционных заболеваний [5–8]. В течение последних лет Th17 лимфоциты подверглись интенсивному изучению, в результате которого удалось показать источники происхождения, пути дифференцировки и часть функциональных особенностей. Acosta-Rodriguez E. V. и соавт. [8], исследовав процесс дифференцировки Th17 в образцах крови человека *in vitro*, обнаружили, что активированные моноциты и циркулирующие дендритные клетки, продуцирующие большое количество IL 1 $\beta$  и IL 6, достаточны для дифференцировки Th17. При добавлении антител, нейтрализующих эти цитокины, дифференцировка Th17 блокировалась. Исследователями была проанализирована субпопуляция Th17 с целью доказать их отличие от Th1 и Th2, а также от других клеток иммунной системы. В качестве молекул, идентифицирующих этот подтип Th, были выбраны мембранные хемокиновые рецепторы, которые являются инструментом для характеристики Th клеток памяти, так как позволяют с большой долей вероятности отличить один тип Th от другого. Эти предпосылки позволили показать, что экспрессия CCR6 и CCR4 идентифицирует у человека гомогенную популяцию T клеток памяти, которая продуцирует IL 17, но не интерферон  $\gamma$ . При этом CCR6 является более специфичным хемокиновым рецептором, так как экспрессируется только на поверхности Th17 клеток, в то время как CCR4 представлен и на Th1 лимфоцитах [8, 9].

IL 17 был идентифицирован в 1993 г. P. Rouvier и соавт., задолго до открытия непосредственно Th17 клеток, и первоначально назывался CTLA-8 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen 8). Семейство цитокинов IL 17 включает в себя 6 членов: 17A, 17B, 17C, 17D, 17E (или IL 25) и 17F. Различные члены семейства IL 17, вероятно, играют разнообразную биологическую роль, однако Th17 клетки продуцируют лишь 2 представителя этого семейства — IL 17A и IL 17F, но биологически более эффективным является IL 17A [10].

Основной функцией IL 17A является активация гранулопоэза из клеток-предшественников в костном мозге человека. Гиперэкспрессия IL 17A приводит к существенному

повышению уровня нейтрофилов в периферической крови и повышению предшественников нейтрофилов в селезенке. Гранулопоэтический ответ является важным в контроле иммунной защиты против внеклеточных патогенов, включая бактерии и грибы. IL 17A, охарактеризованный как цитокин-индуцирующий полипептидный медиатор, проявляет свои провоспалительные и гемопоэтические функции за счет способности к стимуляции и высвобождению вторичных цитокинов и хемокинов, оказывая свои биологические свойства на различных типах клеток [6, 10, 11].

Th17 могут влиять на биологию остеокластов, экспрессируя RANKL (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B ligand) и фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF)  $\alpha$ , которые напрямую индуцируют остеокластогенез. Существует и непрямой путь индукции этого процесса — IL 17A способствует экспрессии RANKL синовиальными фибробластами и остеобластами через активацию синовиальных макрофагов, приводя к секреции остеокластогенных факторов, таких как TNF  $\alpha$  и IL 1 $\beta$ . Эта Th17-опосредованная индукция остеокластогенеза может представлять важный клеточный механизм в патогенезе костной деструкции при аутоиммунном артрите [11, 12].

Роль Th17 и IL 17A в развитии ЮИА до конца не изучена. Так, остается неясным влияние Th17 на течение и исход заболевания у детей при различных вариантах течения ЮИА, а также способны ли современные генно-инженерные биологические препараты (ГИБП), применяемые у детей, ингибировать дифференцировку Th17 из наивных Th клеток.

**Цель исследования.** Совершенствование диагностики и лечения детей с ЮИА путем изучения основных иммунологических факторов Th17 пути дифференцировки лимфоцитов с разработкой рекомендаций по оценке прогноза течения и исходов болезни.

## ПАЦИЕНТЫ

В исследование включали детей в возрасте от 2 до 18 лет с различными вариантами ЮИА. Диагноз и вариант болезни устанавливали согласно критериям Международной лиги ревматологических ассоциаций (ILAR, Durban, Edmonton, 2001; second revision 2004) [13]. Все дети были разделены на подгруппы: с активной и неактивной болезнью. Активная болезнь определялась как наличие одного или более суставов с признаками воспаления в виде отека/выпота, болезненности и ограничения функции на фоне лечения. Неактивная болезнь — отсутствие всех клинико-лабораторных признаков суставного воспаления и увеита, совпадающие с нулевой активностью по визуально-аналоговой шкале, в течение минимум 1 года на фоне проводимого лечения (табл. 1) [2]. Исследование носило характер рандомизированного контролируемого. Критериями исключения из исследования считались дети с ювенильным псориатическим артритом и SEA-синдромом.

В группу сравнения включили 18 условно здоровых детей с неотягощенной наследственностью по аутоиммунным заболеваниям и отсутствием каких-либо клинических признаков заболеваний.

## МЕТОДЫ

Всем пациентам было проведено рентгенологическое и ультразвуковое исследование костно-суставной системы. Отдельным пациентам проведена ультразвуковая денситометрия. Важным преимуществом данного исследования в отличие от рентгеновской денситометрии является полное отсутствие лучевой нагрузки на пациента и, соответственно, отсутствие противопоказаний к его проведению.

**Таблица 1.** Распределение детей с ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА) в зависимости от варианта течения и активности болезни

Активность	Вариант ЮИА									
	Олигоартрит		Полиартрит		ЭАС		Системный		Всего	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Активный	23	21,6	26	24,4	26	24,4	12	11,3	87	81,5
Неактивный	9	7,9	4	3,5	7	6,2	1	0,9	21	18,5
Всего	32	29,6	30	27,8	33	30,6	13	12,0	108	100,0

Примечание. ЭАС — энтезитассоциированный артрит.

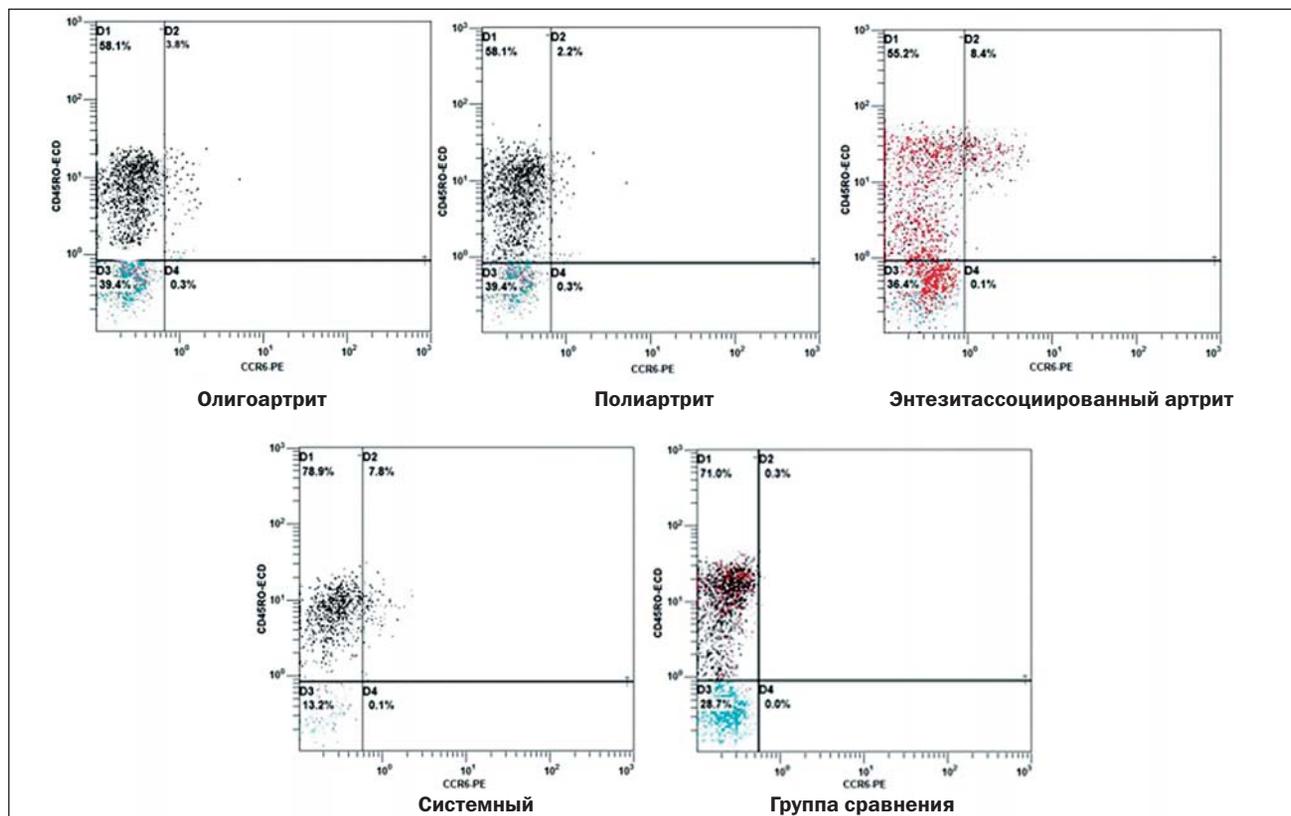
Для оценки активности заболевания и эффективности проводимого лечения применялись шкалы, специально разработанные для использования в педиатрической ревматологической практике — АКР<sub>педи</sub> (критерии Американской коллегии ревматологов) и JADAS-71CRP (критерий активности артрита у детей с ЮИА).

Количественное определение лимфоцитов и их субпопуляций в условиях *in vitro* осуществлялось методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью проточной цитометрии с использованием моноклональных антител к их поверхностным антигенам (CD). В основной группе и группе сравнения проведено иммунологическое обследование, включающее определение общего количества CD4+ (мономерный трансмембранный гликопротеин, экспрессирующийся преимущественно на Т хелперах) Т клеток, а также определение дифференцировочного антигена CD45 с изоформами RA — маркера наивных Th клеток (CD4+CD45RO-CD45RA+) и RO, экспрессируемой на Th клетках памяти (CD4+CD45RO+CD45RA-). Также выделяют переходную форму Th клеток, несущую обе изоформы — дубль-позитивные Th клетки (CD4+CD45RO+CD45RA+). Для определения популяции

Th17 был измерен мембранный хемокиновый рецептор CCR6 (CD196), экспрессирующийся на поверхности этих клеток и являющийся их маркером, позволивший выявить субпопуляцию наивных Th17 клеток (CCR6+RA) и Th17 клеток памяти (CCR6+RO) (рис. 1).

Для определения количества Т хелперов (CD4+) и их субпопуляций в периферической крови, взятой из локтевой вены в вакутейнер с K<sub>2</sub>ЭДТА, были использованы моноклональные антитела CD45RA-FITC, CD45RO-ECD, CD4-PC5 (все реактивы Beckman Coulter, США) и моноклональные антитела к мембранному хемокиновому рецептору CCR6 (PE conjugated anti-human CD196, Clon: R6H1, eBioscience, San Diego, CA, США). Лизис эритроцитов осуществляли реагентом OptiLyse C (Beckman Coulter, США). Анализ проб проводили в многоцветном протоколе с использованием безотмывочной технологии на проточном цитометре NAVIOS (Beckman Coulter, США). Количество Т хелперов выражали в процентах от общего числа лимфоцитов, а количество наивных и клеток памяти рассчитывали относительно пула CD4+ клеток. Все реагенты были использованы согласно инструкции фирмы-производителя.

**Рис. 1.** Примеры гистограмм распределения Th17 клеток памяти у пациентов с различными вариантами ювенильного идиопатического артрита



Количественное содержание цитокинов IL 1 $\beta$ , 6, 17 и TNF  $\alpha$  в сыворотке крови больных ЮИА и группы сравнения определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА-ELISA) с применением набора реагентов для IL 1 $\beta$ , IL 6 и TNF  $\alpha$  фирмы ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), для IL-17A — eBioscience (Сан-Диего, США).

Всем детям, включенным в исследование, и их родителям предварительно была предоставлена вся информация о методах и задачах исследования, а также связанном с ними риске. Письменные информированные согласия на участие были получены от всех родителей или законных представителей и от детей старше 15 лет. Разъяснено, что перед осуществлением медицинского вмешательства пациент или его законный представитель имеет право отказаться от вмешательства.

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с использованием пакетов SPSS IBM версия 19.0 и Statistica 10. Для сравнения выборок данных использовался анализ таблиц сопряженности, где оценивались критерий Пирсона хи-квадрат ( $\chi^2$ ) для анализа номинальных переменных, заданных таблицами сопряженных признаков типа N $\times$ M. Двусторонний критерий Фишера использовался для таблиц 2 $\times$ 2. Непараметрический U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U-Test) использовался для сравнения медиан двух выборок, если распределение хотя бы одной из них существенно отличалось от нормального. Определение зависимости средних значений популяций Th и их субпопуляций, наивных Th17 клеток (CCR6+RA+), Th17 клеток памяти (CCR6+RO+), а также IL 1 $\beta$ , IL 6, IL 17 и TNF  $\alpha$  от порядковых значений определялось с помощью построения трех порядковых регрессий с определением значения  $\chi^2$ . Для анализа факторов риска персистенции симптомов ЮИА применялась логистическая регрессия с построением дерева решений и ROC-кривой.

Для выявления фенотипов ЮИА был использован иерархический кластерный анализ. Данный вид анализа позволяет классифицировать многомерные наблюдения, не требуя априорных предположений о наборе данных и не накладывая ограничения на представление иссле-

дуемых объектов. Он позволяет анализировать показатели различных типов данных. Для оценки различий между выделенными в процессе анализа кластерами был использован пошаговый дискриминантный анализ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Критериям включения в основную группу соответствовало 108 детей (средний возраст 10,5  $\pm$  3,8 года). В зависимости от варианта суставного поражения дети распределились следующим образом: с олигоартритом — 32 (29,6%); с полиартритом, серонегативным по ревматоидному фактору — 30 (27,8%); с энтезитассоциированным артритом (ЭАС) — 33 ребенка (30,6%) с ювенильным анкилозирующим спондилоартритом, положительным по HLA B27; с системным вариантом течения ЮИА — 13 (12,0%).

Сравнительная оценка общей популяции CD4+ клеток не выявила различий между основной и группой сравнения ( $p = 0,088$ ), уровень этих клеток был в пределах нормальных значений. В подгруппах детей с активным и неактивным артритом статистически значимых отличий уровня общей популяции CD4+ клеток не выявлено ( $p > 0,05$ ; табл. 2).

Наименьшее количество Th клеток памяти и наибольшее количество наивных Th клеток отмечалось у пациентов с олиго- и полиартритом вне зависимости от активности процесса ( $p = 0,022$ ,  $p = 0,005$ , соответственно), в то время как при энтезитассоциированном и системном варианте ЮИА статистически значимых различий не получено ( $p > 0,05$ ). Уровень дубль-позитивных Th клеток (CD45RO+CD45RA+) в периферической крови не отличался при различных вариантах течения ЮИА как при активной, так и неактивной форме болезни ( $p > 0,05$ ; см. табл. 2).

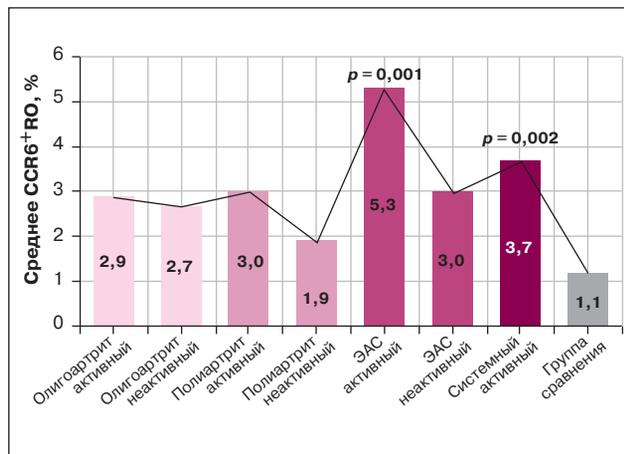
Сравнительная оценка уровня маркера Th17 на наивных Th клетках — CCR6+RA — не выявила статистически значимых различий между детьми с ЮИА и группой сравнения ( $p > 0,05$ ). Уровень Th17 клеток памяти (CCR6+RO) статистически значимо отличался при всех вариантах течения ЮИА при сопоставлении с группой сравнения ( $p = 0,001$ ). Наиболее высокий уровень этих клеток был

**Таблица 2.** Сравнительная характеристика общей популяции T-хелперов и их субпопуляций

Вариант ЮИА	CD4+, %			CD45+RO, %			CD45+RA, %			CD45+RO+RA+, %		
	M $\pm$ SD	SE	Min-Max	M $\pm$ SD	SE	Min-Max	M $\pm$ SD	SE	Min-Max	M $\pm$ SD	SE	Min-Max
Олигоартрит активный	40,6 $\pm$ 8,9	1,9	29,0–64,0	31,8 $\pm$ 12,8	2,7	8,9–53,5	62,9 $\pm$ 12,9	2,7	42,8–89,0	4,1 $\pm$ 2,7	0,6	1,2–10,3
Олигоартрит неактивный	40,2 $\pm$ 5,4	1,8	32,0–47,0	30,6 $\pm$ 8,1	2,7	18,1–40,7	65,3 $\pm$ 7,7	2,6	54,9–75,8	3,9 $\pm$ 1,3	0,4	1,7–6,1
Полиартрит активный	39,3 $\pm$ 7,2	1,4	23,0–50,0	30,9 $\pm$ 8,5	1,7	10,0–49,0	61,7 $\pm$ 12,3	2,4	36,8–88,4	4,8 $\pm$ 2,6	1,5	0,2–9,8
Полиартрит неактивный	36,3 $\pm$ 8,3	4,1	28,0–46,0	31,6 $\pm$ 9,5	4,8	20,3–43,4	59,2 $\pm$ 8,5	4,2	53,6–71,8	4,7 $\pm$ 2,3	2,1	2,4–11,9
ЭАС активный	40,9 $\pm$ 7,1	1,4	21,0–54,0	38,8 $\pm$ 11,9	2,3	9,5–52,0	53,8 $\pm$ 14,1	2,8	29,9–82,7	4,2 $\pm$ 2,9	1,8	1,7–9,3
ЭАС неактивный	40,7 $\pm$ 6,6	2,5	33,0–54,0	38,8 $\pm$ 13,3	5,0	21,8–61,0	54,6 $\pm$ 12,6	4,8	38,0–70,9	3,9 $\pm$ 2,1	0,8	1,3–7,5
Системный активный	41,6 $\pm$ 10,2	2,8	27,0–58,0	38,3 $\pm$ 5,8	1,6	29,7–50,5	54,5 $\pm$ 6,6	1,8	44,5–65,5	4,0 $\pm$ 2,6	0,7	2,3–10,4
Группа сравнения	39,3 $\pm$ 6,0	1,4	30,0–50,0	38,4 $\pm$ 7,8	1,8	23,4–47,0	54,4 $\pm$ 8,7	2,0	43,2–73,8	3,8 $\pm$ 1,7	0,4	1,0–7,7

Примечание. ЮИА — ювенильный идиопатический артрит, ЭАС — энтезитассоциированный артрит.

**Рис. 2.** Средняя концентрация Тh клеток памяти у детей с ювенильным идиопатическим артритом и группы сравнения

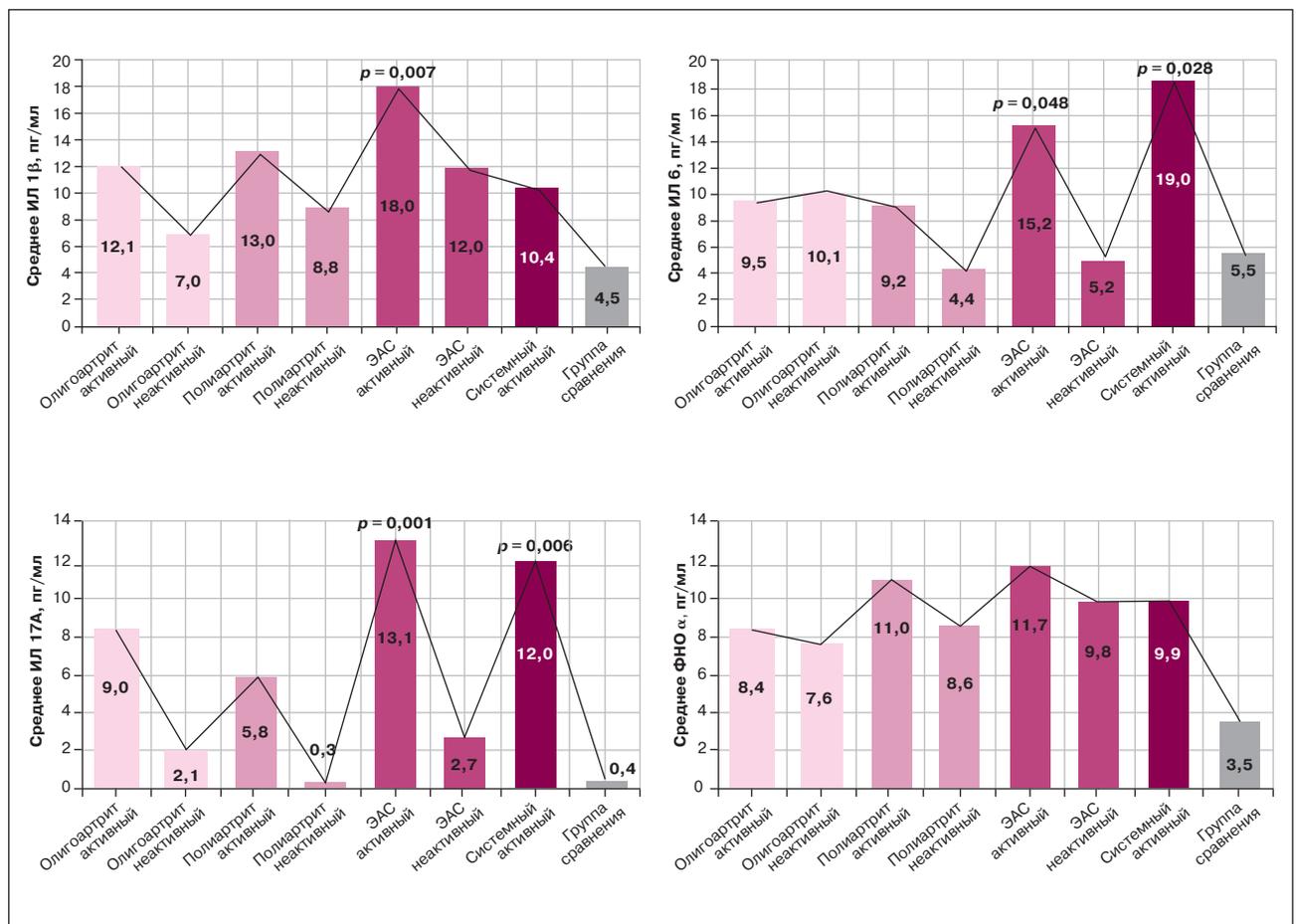


Примечание. ЭАС — энтезитассоциированный артрит.

выявлен у детей с активным HLA B27-ассоциированным артритом ( $p = 0,001$ ) и системным вариантом артрита ( $p = 0,002$ ; рис. 2).

Уровень IL 1 $\beta$  у детей с ЮИА как в активной, так и неактивной болезни статистически достоверно был выше при сопоставлении с группой сравнения ( $p = 0,038$ ). Особенно высокий уровень IL 1 $\beta$  отмечался у больных с активным HLA B27-ассоциированным артритом ( $p = 0,007$ ; рис. 3).

**Рис. 3.** Уровень цитокинов в зависимости от варианта течения ювенильного идиопатического артрита



Примечание. ЭАС — энтезитассоциированный артрит.

Концентрация IL 6 в сыворотке крови у детей с ЮИА вне зависимости от формы артрита и его активности была статистически достоверно выше, чем в группе сравнения ( $p = 0,005$ ). Наиболее высокий уровень IL 6 отмечался у пациентов с системным вариантом артрита ( $p = 0,028$ ) и у детей с энтезитассоциированным артритом ( $p = 0,048$ ; см. рис. 3).

Сравнительный анализ уровня IL 17A в сыворотке крови выявил статистически значимые различия между подгруппами детей с ЮИА и группой сравнения ( $p = 0,001$ ), но наиболее высокие значения IL 17A отмечались у детей с активным ЭАС ( $p = 0,001$ ) и системным вариантом ЮИА ( $p = 0,006$ ; см. рис. 3).

Уровень TNF  $\alpha$  в сыворотке крови практически во всех подгруппах ЮИА был выше, чем в группе сравнения ( $p = 0,005$ ). Статистически значимых межгрупповых и внутригрупповых различий у детей с ЮИА обнаружено не было ( $p > 0,05$ ; см. рис. 3).

Оценка общего количества CD4<sup>+</sup> клеток (Th) и их субпопуляций в периферической крови выявила прямую связь между общей популяцией Th с наивными Th клетками (CD45RA<sup>+</sup>) и негативную корреляцию с Th клетками памяти (CD45RO<sup>+</sup>). При дальнейшей оценке этих показателей была выявлена отрицательная корреляция между уровнем CD45RO<sup>+</sup> и CD45RA<sup>+</sup>, а также CD45RA<sup>+</sup> с дублированными Th клетками (CD45RO<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>).

Для более достоверной оценки степени влияния Th17 клеток и основных провоспалительных цитокинов на основные клинико-лабораторные показатели был при-

менен метод линейной корреляции с построением уравнения множественной регрессии, где  $p < 0,05$  считался статистически достоверным.

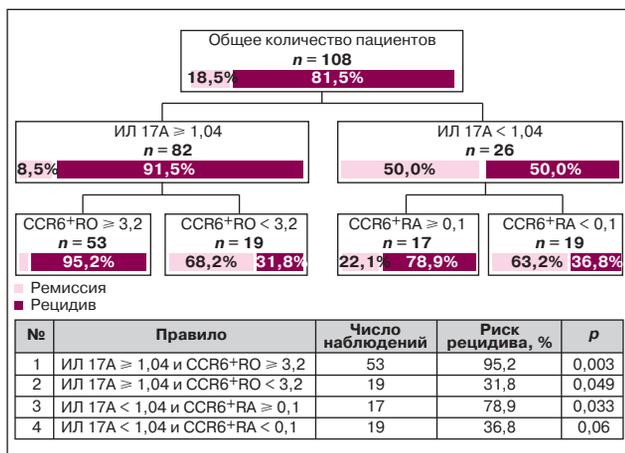
Как у мальчиков, так и у девочек выявлена положительная корреляция Th17 клеток памяти (CCR6+RO) с общим уровнем Th клеток памяти ( $R^2 = 0,178$ ;  $p = 0,03$ ) и отрицательная корреляция с наивными Th клетками ( $R^2 = 0,285$ ;  $p = 0,0001$ ). При дальнейшей оценке взаимосвязей была выявлена сильная положительная корреляция IL 1 $\beta$  с IL 6 ( $R^2 = 0,324$ ;  $p = 0,001$ ) и IL 1 $\beta$  с TNF  $\alpha$  ( $R^2 = 0,229$ ;  $p = 0,001$ ).

Оценка показателей относительного риска активного артрита и ремиссии у детей с ЮИА в зависимости от уровня Th17 клеток и основных цитокинов проводилась с помощью дерева решений как в общей группе мальчиков и девочек, так и в подгруппах с различными вариантами ЮИА с дальнейшей интерпретацией полученных результатов. Модель регрессионного анализа показала, что совокупность 2 исследуемых факторов имеет достоверное диагностическое значение. Таким образом, было обнаружено, что при значении IL 17A в сыворотке крови выше 1,04 пг/мл риск рецидива заболевания повышается на 91,5% (OR = 2,755; 95% ДИ 0,884–8,588;  $p = 0,04$ ), а в сочетании с повышением CCR6+RO в периферической крови выше 3,2% риск повышается на 95,2% (OR = 3,030; 95% ДИ 0,867–10,590;  $p = 0,003$ ; рис 4).

Применение ROC-анализа прогнозирования активного артрита с построением характерной кривой показало хорошую прогностическую способность модели «рецидив заболевания — уровень CCR6+RO» (AUC 0,656;  $p = 0,05$ ; ДИ 0,544–0,768) и «рецидив заболевания — уровень IL 17A» (AUC 0,745;  $p = 0,0001$ ; ДИ 0,625–0,866), хотя наибольшие показатели специфичности и чувствительности показала модель «рецидив заболевания — IL 17A».

При оценке влияния основных иммунологических параметров на рентгенологические показатели было обнаружено, что при совокупности уровней IL 17A выше 1,04 пг/мл и IL 6 выше 10,1 пг/мл в сыворотке крови риск развития остеопороза повышается до 77,5% (OR 2,902; 95% ДИ 0,584–14,421;  $p = 0,008$ ), а при значении IL 6 в сыворотке крови менее 10,1 пг/мл риск развития остеопороза резко понижается — 27,5% (OR 0,394; 95% ДИ 0,097–1,598;  $p = 0,037$ ). При этом оценка совокупности уровней IL 17A и IL 1 $\beta$  не показала статистически достоверной зависимости с риском развития остеопороза (рис. 5).

**Рис. 4.** Схематическое изображение оценки относительного риска рецидива заболевания в зависимости от уровней CCR6+RO, CCR6+RA и IL 17A



Применение ROC-анализа прогнозирования развития остеопороза с построением характерной кривой показало хорошую прогностическую способность модели «остеопороз — уровень IL 6» (AUC 0,678;  $p = 0,045$ ; ДИ 0,485–0,732). Модели «остеопороз и уровни IL 17A» (AUC 0,608;  $p = 0,069$ ; ДИ 0,491–0,725) и «остеопороз — IL 1 $\beta$ » (AUC 0,584;  $p = 0,157$ ; ДИ 0,469–0,699) показали плохую прогностическую способность при рассмотрении каждого показателя в отдельности.

Заключительным этапом исследования являлось выделение кластеров с использованием иерархического кластерного анализа с последующим дискриминантным анализом. Выделенные кластеры позволяют охарактеризовать особенности динамики ЮИА в сочетании с определенными иммунологическими показателями.

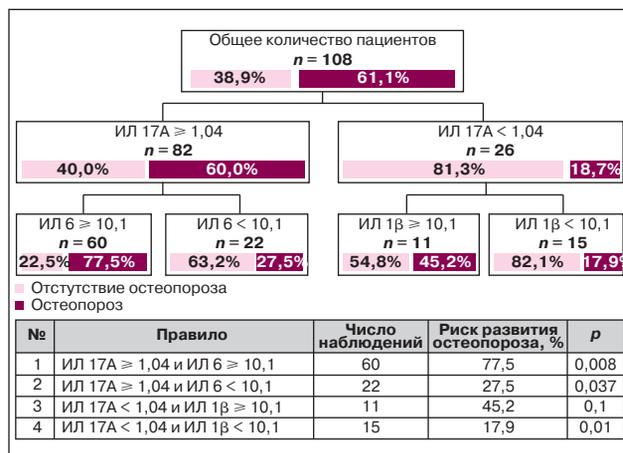
В анализ было включено 100 пациентов с различными вариантами течения ЮИА. Для кластеризации было использовано 10 бинарных и 5 количественных переменных, характеризующих динамику заболевания и основные изученные клинико-лабораторные показатели. В результате данного анализа было выявлено 3 кластера ЮИА.

В I кластер вошли 32 пациента с ЮИА: 20 девочек и 12 мальчиков (средний возраст 10,9  $\pm$  4,2 года) с дебютом заболевания в дошкольном возрасте и длительностью заболевания 3,6  $\pm$  2,8 года. В эту группу вошли дети преимущественно с неактивной болезнью, без рентгенологических признаков костной деструкции и низким уровнем Th17 клеток, IL 1 $\beta$ , IL 6, TNF  $\alpha$  и повышенным уровнем IL 17A.

Во II кластер вошли 28 пациентов, из них дети из группы HLA B27-ассоциированного артрита (16 мальчиков и 6 девочек) и 6 мальчиков с системным вариантом течения ЮИА (средний возраст 11,8  $\pm$  2,5 года) с дебютом заболевания в позднем дошкольном возрасте и длительностью заболевания 4,1  $\pm$  3,3 года. Степень активности заболевания расценивалась как высокая (AKP<sub>педи</sub> < 50, JADAS-71CRP > 12,5). У всех детей, вошедших в данный кластер, отмечались рентгенологические признаки в виде остеопороза (преимущественно системного) и/или дефекта костной ткани, а также кистовидной деформации. Уровни Th17 клеток памяти, IL 1 $\beta$ , IL 6, TNF  $\alpha$  и IL 17A значительно превосходили нормальные значения и были наиболее высокими по сравнению с остальными кластерами.

В III кластер вошли 40 детей, преимущественно девочки (26 девочек и 14 мальчиков) в возрасте 9,1  $\pm$

**Рис. 5.** Схематическое изображение оценки относительного риска развития остеопороза в зависимости от уровней IL 1 $\beta$ , IL 6 и IL 17A



3,8 года, дебютом заболевания в младшем школьном возрасте и длительностью заболевания  $3,9 \pm 2,2$  года. У детей данной группы отмечался преимущественно активный полиартрит с умеренной степенью активности (АКР<sub>педи</sub> 50–70, JADAS-71CRP  $4,15 \pm 0,6$ ). При оценке рентгенологических изменений у 12% детей отмечался остеопороз без признаков костной деструкции. Уровни Th17 клеток памяти, IL 1 $\beta$ , IL 6, TNF  $\alpha$  были незначительно повышены. В отличие от детей, вошедших в I кластер, отсутствовало повышение уровня IL 17A в сыворотке крови (следовые количества; табл. 3).

В последующем дискриминантном анализе была показана статистическая значимость различий между образованными кластерами (табл. 4).

### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе были изучены особенности влияния Th17 клеток и основных провоспалительных цитокинов на течение ЮИА. Результаты нашего исследования показывают, что ЮИА у детей носит гетерогенную природу

и может быть представлен различными фенотипами. Необходимость дифференцировать варианты заболевания продиктована недостаточным контролем болезни у отдельных пациентов с ЮИА. Обращает на себя внимание то, что основные статистически значимые различия между кластерами отмечались между изученными иммунологическими показателями (CCR6+RO, IL 1 $\beta$ , IL 6, IL 17A и TNF  $\alpha$ ), критериями активности болезни и результатами рентгенологического исследования. Именно дети с системным вариантом ЮИА и ювенильным анкилозирующим спондилоартритом вошли во II кластер и характеризовались наиболее неблагоприятным течением заболевания с развитием высокой степени активности болезни и костно-суставной деструкцией на фоне высокого уровня Th17 клеток памяти, IL 1 $\beta$ , IL 6, TNF  $\alpha$  и IL 17A в периферической крови.

Исходя из изученных иммунологических показателей, можно выделить по крайней мере Th17-зависимый и Th17-независимый фенотипы ЮИА. В Th17-зависимый фенотип вошли преимущественно дети с системным

Таблица 3. Результаты кластерного анализа

Переменные, включенные в кластерный анализ	Кластеры ЮИА			p
	I кластер	II кластер	III кластер	
Возраст	10,9 $\pm$ 4,2	11,8 $\pm$ 2,5	9,1 $\pm$ 3,8	0,2
Пол	12М/20Ж	22М/6Ж	26Ж/14М	0,15
Возраст дебюта	5,1 $\pm$ 2,1	6,6 $\pm$ 1,7	7,8 $\pm$ 2,0	0,35
Длительность заболевания	3,6 $\pm$ 2,8	4,1 $\pm$ 3,3	3,9 $\pm$ 2,2	0,31
АКР <sub>педи</sub>	< 50	> 70	50–70	<b>0,037</b>
JADAS-71CRP	3,4 $\pm$ 0,8	> 12,4	4,15 $\pm$ 0,6	<b>0,041</b>
Остеопороз*	10	55	12	<b>0,038</b>
Дефект костной ткани*	1	16	2	<b>0,05</b>
Кистовидная деформация*	0	10	5	<b>0,042</b>
Эрозии*	0	1	1	0,43
CCR6+RO, %	2,4 $\pm$ 1,04	4,1 $\pm$ 2,3	3,2 $\pm$ 2,02	<b>0,004</b>
IL 1 $\beta$ , пг/мл	3,4 $\pm$ 2,8	17,6 $\pm$ 12,5	9,9 $\pm$ 11,5	<b>0,0001</b>
IL 6, пг/мл	5,5 $\pm$ 4,8	17,9 $\pm$ 15,0	9,04 $\pm$ 8,4	<b>0,0001</b>
IL 17A, пг/мл	6,5 $\pm$ 0,5	12,5 $\pm$ 10,4	0,2 $\pm$ 0,1	<b>0,0001</b>
TNF $\alpha$ , пг/мл	5,1 $\pm$ 2,6	12,8 $\pm$ 15,3	9,7 $\pm$ 9,1	<b>0,007</b>

Примечание. \* — значения переменных характеризуют частоту встречаемости признака в каждом кластере (%). ЮИА — ювенильный идиопатический артрит.

Таблица 4. Результаты проверки статистически значимых различий методом дискриминантного анализа (Суммарный результат дискриминантного анализа; No. проверяемых переменных в модели: 7; Лямбда Уилкса: 0,56057; прил. F (12,184) = 5,1463;  $p < 0,0001$ )

	Лямбда Уилкса	Частная лямбда	F-критерий	p	Толерантность	1-Толерантность
АКР <sub>педи</sub>	0,565346	0,991546	0,392205	0,676689	0,839488	0,160512
JADAS-71CRP	0,571367	0,962113	1,336621	0,300875	0,932455	0,067545
CCR6+RO	0,565346	0,911546	4,392206	<b>0,016689</b>	0,839488	0,160512
IL 1 $\beta$	0,615553	0,910671	4,512197	<b>0,013509</b>	0,869842	0,130158
IL 6	0,620354	0,903623	4,906190	<b>0,009450</b>	0,930809	0,069191
IL 17A	0,640151	0,875679	6,530655	<b>0,002228</b>	0,871773	0,128227
TNF $\alpha$	0,580419	0,895796	4,629103	<b>0,021711</b>	0,854988	0,145012

вариантом ЮИА и ювенильным анкилозирующим спондилитом и высоким риском развития костно-суставной деструкции. Данный фенотип характеризуется высоким уровнем Th17 клеток памяти и IL 17A в периферической крови как в активной, так и неактивной болезни. В Th17-независимый фенотип вошли преимущественно с олиго- и полиартритом, с низким риском развития костно-суставной деструкции и нормальным уровнем Th17 клеток памяти и IL 17A в периферической крови (рис. 6).

Дети с ЮИА с Th17-зависимым фенотипом характеризуются более неблагоприятным течением заболевания, высоким риском развития костно-суставной деструкции и нуждаются в более раннем назначении ГИБП в случае неэффективности базисной терапии.

Несмотря на значительный прогресс в лечении ЮИА ГИБП, в частности антагонистами TNF  $\alpha$ , IL 1 $\beta$  или IL 6, 1/3 пациентов не достигает клинико-медикаментозной ремиссии. Вероятно, в патогенезе заболевания этих пациентов превалирующую роль играют Th17 клетки и их ключевые цитокины IL 17A и IL 17F. Испытания моноклональных антител к IL 17A/F секукиумаба (Secukinumab) и иксекизумаба (Ixekizumab) при таких аутоиммунных заболеваниях, как псориаз, ревматоидный артрит, болезнь Бехтерева, показывают многообещающие результаты, основными из которых являются полное блокирование симптомов и стойкая ремиссия [14, 15]. Основываясь на этих данных, вероятно, следующим шагом станет введение этих препаратов в реестр по лечению больных ЮИА с разработкой иммунологических маркеров прогноза костно-суставной деструкции и риска перехода в активную болезнь.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исследование Th17 пути и его влияние на течение заболевания в группе детей с ЮИА представляется наиболее перспективным исследовани-

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Е. И., Литвицкий П. Ф. Ювенильный ревматоидный артрит: этиология, патогенез, клиника, алгоритмы диагностики и лечения. Москва: ВЕДИ. 2007. 368 с.
2. Wallace C.A. Current management of juvenile idiopathic arthritis. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*. 2006; 20 (2): 279–300.
3. Wu Q., Pesenacker A.M., Stansfield A., King D., Barge D., Foster H.E., Abinun M., Wedderburn L.R. Immunological characteristics and T cell receptor clonal diversity in children with systemic juvenile idiopathic arthritis undergoing T cell depleted autologous stem cell transplantation. *Immunology*. 2014; 142 (2): 227–36.
4. Рохлина Ф. В., Новик Г. А., Калинина Н. М., Бычкова Н. В., Филиппова Ю. Н., Зарайский М. И. Влияние полиморфизма C3435E гена MDR1 на эффективность терапии ювенильного идиопатического артрита. *Педиатрическая фармакология*. 2013; 10 (5): 46–51.
5. Kurebayashi Y., Nagai S., Ikejiri A., Koyasu S. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells. *Genes to Cells*. 2013; 18 (4): 247–65.
6. Duurland C.L., Wedderburn L.R. Current developments in the use of biomarkers for juvenile idiopathic arthritis. *Current Rheumatology Report*. 2014; 16 (3): 406–11.
7. Yamaguchi M. The role of regucalcin in bone homeostasis: involvement as a novel cytokine. *Integrative Biology (Cambridge)*. 2014; 6 (3): 258–66.
8. Acosta-Rodriguez E.V., Napolitani G., Lanzavecchia A., Sallusto F. Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature immunology*. 2007; 8 (9): 942–49.

**Рис. 6.** Th17-зависимый и Th17-независимый фенотипы ювенильного идиопатического артрита



ем, носит практический интерес, связанный с тактикой ведения и лечения детей с ЮИА.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки/конфликта интересов, который необходимо обнародовать.

### ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ

Особую благодарность выражаем заведующему отделением кардиоревматологии ДГБ № 2 г. Санкт-Петербурга Николаю Владимировичу Слизовскому за содействие и помощь в данной работе.

9. Acosta-Rodriguez E.V., Rivino L., Geginat J., Jarrossay D., Gattorno M., Lanzavecchia A., Sallusto F., Napolitani G. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature Immunology*. 2007; 8 (9): 639–46.
10. Almanzar G., Zlomy M., Koppelstaetter C., Brunner A., Jeller V., Duftner Ch., Dejaco C., Brunner J., Prelog M. Increased replication of CD4+ naive T cells and changes in T cell homeostasis in a case of acute exacerbation of juvenile idiopathic arthritis: a case comparison study. *Journal of Medical Case Reports*. 2013; 7 (135): 1011–19.
11. Weitzmann M.N. The Role of Inflammatory Cytokines, the RANKL/OPG Axis, and the Immunological Interface in Physiological Bone Turnover and Osteoporosis. *Scientifica (Cairo)*. 2013. P. 705–11.
12. Lazic E., Jelusic M., Grcevic D., Marusic A., Kovacic N. Osteoblastogenesis from synovial fluid-derived cells is related to the type of severity of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Research and Therapy*. 2012; 14 (3): R139.
13. Petty R.E., Southwood T.R., Manners P. et al. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *Journal of Rheumatology*. 2004; 31 (2): 390–92.
14. Corrado A., Neve A., Maruotti N., Cantatore F.P. Bone Effects of Biologic Drugs in Rheumatoid Arthritis. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013. P. 105–12.
15. Hueber W., Sands B.E., Lewitzky S., Vandemeulebroecke M., Reinisch W., Higgins P.D., Wehkamp J. Secukinumab a human anti-IL-17 monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gut*. 2012; 61 (12): 1693–1700.