

УДК 616.36-002

DOI: 10.14427/jipai.2024.2.75

Показатели клеточного иммунитета и метаболизм лимфоцитов у детей с аутоиммунным гепатитом первого типа при разных стадиях фиброза печени

О.В. Курбатова¹, Г.Б. Мовсисян¹, С.В. Петричук¹, Д.Г. Купцова¹, Д.С. Демьянов¹, Д.В. Парахина¹, Т.В. Радыгина¹, Е.Л. Семикина^{1,2}, А.С. Потапов^{1,2}, А.О. Анущенко¹, А.П. Фисенко¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва

² Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва

Indicators of cellular immunity and lymphocyte metabolism in children with type 1 autoimmune hepatitis at different stages of liver fibrosis

O.V. Kurbatova¹, G.B. Movsisyan¹, S.V. Petrichuk¹, D.G. Kuptsova¹, D.S. Demyanov¹, D.V. Parakhina¹, T.V. Radygina¹, E.L. Semikina^{1,2}, A.S. Potapov^{1,2}, A.O. Anushenko¹, A.P. Fisenko¹

¹ National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia

² Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Аннотация

Аутоиммунный гепатит (АИГ) – это прогрессирующее гепатоцеллюлярное воспаление неясной этиологии, сопровождающееся процессом фиброза печени (ФП). Повреждения в печени ассоциированы с образованием высокореактивных молекул, которые содержат неспаренные электроны (свободных радикалов), которые, в свою очередь, индуцируют перекисное окисление липидов, что приводит к развитию митохондриальной дисфункции. Митохондриальные DAMP, высвобождаемые из поврежденных митохондрий гепатоцитов (с мтДНК в качестве основного активного компонента), непосредственно активируют звездчатые клетки печени и вызывают рубцевание печени. Оценку клеточного метаболизма можно проводить, исследуя активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) – ключевого фермента, который участвует как в цикле трикарбоновых кислот, так и в ОХРНОС. Цель работы: изучить показатели клеточного иммунитета и активность СДГ в популяциях лимфоцитов на разных стадиях фиброза печени у детей с АИГ I типа.

Материалы и методы. В рамках госпитализации обследовано 69 детей с АИГ I типа в возрасте от 12 до 18 лет, Me=15,5 [12,8;16,9]. 62 здоровых ребенка составили группу сравнения. С помощью аппарата FibroScan F502 проводили оценку стадии фиброза печени. Методом проточной цитометрии проводили оценку субпопуляционного состава лимфоцитов и активности СДГ в них. Оценивали популяции лимфоцитов: Т-лимфоциты, активированные Т-клетки, В-лимфоциты, NK-клетки, CD16/56+CD3+лимфоциты, цитотоксические Т-лимфоциты, Т-хелперы, включая малые популяции: активированные Т-хелперы, регуляторные Т-клетки, Th17-лимфоциты. Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 10.0 (США).

Summary

Autoimmune hepatitis (AIH) is a progressive hepatocellular inflammation of unknown etiology, accompanied by the process of liver fibrosis. Damage in the liver is associated with the formation of highly reactive molecules that contain unpaired electrons (free radicals), which in turn induce lipid peroxidation, leading to the development of mitochondrial dysfunction. Mitochondrial DAMPs released from damaged hepatocyte mitochondria (with mtDNA as the main active component) directly activate hepatic stellate cells and cause liver scarring. Assessing cellular metabolism can be done by examining the activity of succinate dehydrogenase (SDH), a key enzyme involved in both the tricarboxylic acid cycle and OXPHOS.

Aim. to examine indicators of cellular immunity and succinate dehydrogenase activity in lymphocyte populations at different stages of liver fibrosis in children with type I AIH.

Materials and methods. During hospitalization, 69 children with AIH type I, aged 12 to 18 years, Me=15.5 [12.8;16.9], were examined. 62 healthy children made up the comparison group. The stage of liver fibrosis was assessed using the FibroScan F502. The subpopulation composition of lymphocytes and the activity of succinate dehydrogenase in them were assessed using flow cytometry. The following lymphocyte populations were evaluated: T-lymphocytes, activated T-cells, B-lymphocytes, NK cells, CD16/56+CD3+ lymphocytes, cytotoxic T-lymphocytes, T-helpers, including small populations: activated T-helpers, regulatory T-cells, Th17 lymphocytes. Statistica 10.0 (USA) program was used for statistical data processing.

Results. The study included 47 girls and 22 boys. Children with AIH were on standard therapy with glucocorticosteroids

Результаты. Исследование включало 47 девочек и 22 мальчика. Дети с АИГ находились на стандартной терапии глюкокортикостероидами в течение 2,6 [1,1;5,4] лет. У 53 детей АИГ протекал в сочетании с гастроэзофагеальным рефлюксом (76,8% наблюдений), у 12 детей – с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью (17% наблюдений). У 7 детей отмечались коморбидные аутоиммунные заболевания или их комбинация: у 5-ти пациентов – аутоиммунный тиреоидит (7% наблюдений), у 2-х детей – витилиго (3% наблюдений), а также сахарный диабет 1 типа, ювенильный ревматоидный артрит и целиакия по одному случаю (1,5%). У 3-х детей (5% наблюдений) отмечен множественный аутоиммунный синдром. У детей с АИГ выявлено увеличение относительного содержания Т-клеток, Т-хелперов. Относительное количество НК-клеток и В-клеток было снижено при всех стадиях ФП относительно группы сравнения. Получено значимое увеличение абсолютного количества Thact и Treg при всех стадиях фиброза относительно группы сравнения, тогда как относительное количество Thact (% CD4+) было достоверно выше только на стадиях F0, F3 и F4, а относительное количество Treg (% CD4+) достоверно выше только на стадиях F0 и F4. Доля Th17-лимфоцитов (% CD4+) была достоверно снижена относительно группы сравнения на стадиях F0 и F2. От стадии F0 к F3 относительное количество В-клеток снижалось, а затем к стадии F4 достоверно увеличивалось. Доля Т-хелперов, Treg и Thact у большинства пациентов была выше группы сравнения, однако, достоверных отличий между разными стадиями не было выявлено. Доля Th17-лимфоцитов повышалась с увеличением стадии фиброза печени, максимальные значения выявлены на стадии F4. Исследование СДГ выявило достоверное снижение активности этого фермента во всех популяциях лимфоцитов. Наибольшее снижение активности выявлено в двойных негативных CD3+CD4-CD8-клетках на 18,5% и NK-клетках на 17,5% относительно группы сравнения. В популяциях Th17 и Treg лимфоцитов активность СДГ была достоверно ниже в состоянии обострения заболевания, относительно состояния ремиссии. Анализ показателей активности СДГ в зависимости от стадии фиброза печени выявил нелинейную зависимость: в популяциях Т-хелперов, Т-цитотоксических и Thact – увеличение к стадии F2-3, а затем снижение к стадии F4. Активность СДГ в популяции Th17-лимфоцитов максимально повышалась на стадии F1 и с последующим снижением к стадии F4. С увеличением стадии фиброза печени достоверно увеличивалась активность СДГ в популяции Treg, однако не достигала нормативных значений. Дети с аутоиммунным гепатитом нуждаются в диспансерном наблюдении и строгом контроле развития заболевания.

Заключение. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и активность СДГ в популяциях лимфоцитов объективно отражают тяжесть состояния пациента на момент обследования и могут быть использованы для дополнительной лабораторной оценки прогрессирования фиброза печени. Выявленные признаки митохондриальной дисфункции обосновывают применение коррекции метаболических нарушений в качестве терапии, улучшающей основное лечение пациентов с АИГ 1 типа.

Ключевые слова

Аутоиммунный гепатит I типа, фиброз печени, точная цитометрия, Treg, Thact, Th17, аутоиммунитет, множественный аутоиммунный синдром, сукцинатдегидрогеназа.

for 2.6 [1.1;5.4] years. In 53 children, AIH occurred in combination with gastroduodenitis (76.8% of observations), in 12 children – with gastroesophageal reflux disease (17% of observations). 7 children had comorbid autoimmune diseases or a combination of them: 5 patients had autoimmune thyroiditis (7% of cases), 2 children had vitiligo (3% of cases), as well as type 1 diabetes mellitus, juvenile rheumatoid arthritis and celiac disease in one case (1.5%), 3 children (5% of cases) had multiple autoimmune syndrome. In children with AIH, an increase in the relative content of T cells and T helper cells was detected. The relative number of NK cells and B cells was reduced in all stages of AF relative to the comparison group. A significant increase in the absolute number of Thact and Tregs was obtained at all stages of fibrosis relative to the comparison group, while the relative number of Thact (% CD4+) was significantly higher only at stages F0, F3 and F4, and the relative number of Tregs (% CD4+) was significantly higher only at stages F0 and F4. The proportion of Th17 lymphocytes (% CD4+) was significantly reduced relative to the comparison group at stages F0 and F2. From the F0 to F3 stage, the relative number of B cells decreased, and then significantly increased by the F4 stage. The proportion of T helper cells, Tregs and Thact in most patients was higher than the comparison group, however, no significant differences were found between different stages. The proportion of Th17 lymphocytes increased with increasing stage of liver fibrosis, the maximum values were detected at stage F4. A study of SDH revealed a significant decrease in the activity of this enzyme in all populations of lymphocytes. The greatest decrease in activity was detected in double negative CD3+CD4-CD8- cells by 18.5% and NK cells by 17.5% relative to the comparison group. In the populations of Th17 and Treg lymphocytes, SDH activity was significantly lower in the state of exacerbation of the disease, relative to in the state of remission. Analysis of SDH activity indicators depending on the stage of liver fibrosis revealed a nonlinear relationship: in the populations of T-helpers, T-cytotoxic and Thact – an increase to stage F2-3, and then a decrease to stage F4. SDH activity in the population of Th17 lymphocytes increased maximally at the F1 stage and subsequently decreased to the F4 stage. With increasing stage of liver fibrosis, SDH activity significantly increased in the Treg population, but did not reach normative values. Children with autoimmune hepatitis need clinical observation and strict monitoring of the development of the disease.

Conclusion. The subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes and the activity of succinate dehydrogenase in lymphocyte populations objectively reflect the severity of the patient's condition at the time of examination and can be used for additional laboratory assessment of the progression of liver fibrosis. The identified signs of mitochondrial dysfunction justify the use of correction of metabolic disorders as a therapy that improves the basic treatment of patients with type 1 AIH.

Keywords

Type I autoimmune hepatitis, liver fibrosis, flow cytometry, Treg, Thact, Th17, autoimmunity, multiple autoimmune syndrome, succinate dehydrogenase.

Введение

Аутоиммунные заболевания печени представляют собой хронические воспалительные гепатобилиарные расстройства, которые при классическом определении охватывают три различных клинических проявления: первичный билиарный холангит, первичный склерозирующий холангит и аутоиммунный гепатит (АИГ). АИГ – это прогрессирующее гепатоцеллюлярное воспаление неясной этиологии, характеризующееся наличием перипортального гепатита и печёночно-ассоциированных сывороточных аутоантител.

Частота встречаемости АИГ у детей на территории Российской Федерации составляет 2% среди хронических гепатитов [1]. Как правило, дебют заболевания происходит в 6-10 лет [1]. У взрослых пациентов распространённость составляет от 4,8 до 42,9 на 100000 населения [2]. Показатель распространённости у детей с АИГ колеблется в диапазоне от 2,4 до 9,9 на 100000 человек, что может свидетельствовать о значительной вариабельности данного показателя в зависимости от возраста ребёнка, региона, условий проживания и многих других факторов [3]. Эпидемиология АИГ различается в зависимости от социально-демографических и географических факторов, однако в целом отмечается увеличение заболеваемости и распространённости АИГ [2,4].

Иммуноопосредованные заболевания связаны с риском развития рака, причём чаще отмечается органоспецифичный рак, реже в близлежащих и отдалённых органах [5]. АИГ связан с 1,5-кратным увеличением риска развития рака в течение 10 лет по сравнению с контрольной группой того же возраста и пола, риск развития рака был выше у лиц с циррозом печени и увеличивался при большей длительности иммуносупрессорной терапии [6].

В основе иммунопатогенеза АИГ лежит нарушение толерантности к собственным антигенам. Снижение субпопуляции Т-супрессорных лимфоцитов (или Т-регуляторных клеток – Treg) приводит к неуправляемому синтезу В-клетками IgG и разрушению мембран гепатоцитов. При АИГ поддержание и прогрессирование повреждения печени сопровождается дисбалансом между эффекторными и регуляторными клетками [7]. Секретируемые аутоантитела, направленные против клеток печени, способствуют дальнейшему повреждению этого органа и фиброзу печени (ФП) [8]. При АИГ поддержание и прогрессирование повреждения печени сопровождается дисбалансом между эффекторными и регуляторными

клетками [9]. Дифференцировка клеток Th17 требует перестройки их метаболизма, перехода от катаболического фенотипа с преобладанием окислительного фосфорилирования (ОХРНOS) в покоящихся наивных Т-клетках к анаболическому фенотипу, управляемому метаболизмом глюкозы, включая липогенез [10]. Т-клетки быстро преобразуют свои клеточные метаболические потребности после активации, переключаясь на гликолиз для удовлетворения своих всё более сложных энергетических потребностей. Метаболические различия были установлены для регуляторных клеток Foxp3⁺(Treg) и Th17-лимфоцитов, изменение содержания которых могут вызывать и способствовать прогрессированию заболевания [11].

Повреждения в печени ассоциированы с образованием высокореактивных молекул, содержащих неспаренные электроны (свободных радикалов), которые в свою очередь индуцируют перекисное окисление липидов, что приводит к развитию митохондриальной дисфункции. Помимо этого, происходит стимуляция синтеза коллагена и усиление фиброгенеза за счёт действия малонового диальдегида, который образуется в результате повреждения липидов [12]. Митохондриальные DAMP, высвобождаемые из повреждённых митохондрий гепатоцитов (с мтДНК в качестве основного активного компонента), непосредственно активируют звёздчатые клетки печени и вызывают рубцевание печени [13].

Оценку клеточного метаболизма можно проводить, исследуя активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ). СДГ является ключевым ферментом, который участвует как в цикле трикарбоновых кислот, так и в ОХРНOS – двух основных метаболических путях [14].

Цель работы: изучить показатели клеточного иммунитета и активность СДГ в популяциях лимфоцитов при разных стадиях фиброза печени у детей с АИГ I типа.

Материалы и методы

В рамках госпитализации обследовано 69 детей с АИГ I типа в возрасте от 12 до 18 лет, Me=15,5 [12,8;16,9]. 62 здоровых ребёнка составили группу сравнения. Методом проточной цитометрии проводили оценку субпопуляционного состава лимфоцитов и активности СДГ в них. С помощью аппарата FibroScan F502 проводили оценку стадии фиброза печени согласно рекомендациям [15]. В зависимости от стадии фиброза дети были разделены на 5 групп: группа 1 – F0, n=7; группа 2 – F1, n=16; группа 3 – F2, n=10, груп-

па 4 – F3, n=13 и группа 5 – F4, n=23. С помощью метода пошагового гейтирования оценивали популяции лимфоцитов, представленные в табл. 1.

В качестве маркера интенсивности энергообмена исследовали активность митохондриальной СДГ, непосредственно связанной с дыхательной цепью митохондрий. Для определения показателя активности СДГ в популяциях лимфоцитов был использован иммуноцитохимический метод. Метод выявления активности фермента в клетках лимфоцонцентра, окрашенных моноклональными антителами, после проведения цитохимической реакции и инкубации в водяной бане в течение 30 минут. В результате происходит увеличение коэффициента бокового светорассеяния в полученных образцах [16]. Оценка активности СДГ была проведена для каждой исследованной популяции лимфоцитов.

Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 10.0 (США). Описательная статистика результатов представлена в виде медианы (нижняя; верхняя квартиль). Оценка достоверности отличий между группами была проведена с использованием критерия Манна-Уитни (при $p < 0,05$).

Результаты

Из 69 детей с АИГ было 22 мальчика и 47 девочек. Дети с АИГ находились на стандартной терапии преднизолоном или метилпреднизолоном в течение 2,6 [1,1;5,4] лет. Доза глюкокортикоидной терапии в исследуемой группе варьировала от 0,07 до 0,66 мг/кг, и на момент обследования была высокой (0,6-1,0 мг/кг) у 1 пациента (1,5%), средней (0,3-0,5 мг/кг) – у 4-х пациентов (5,8%) и низкой (до 0,2 мг/кг) – у 64 детей (92,7%). У 56% пациентов в схему лечения входил приём азатиоприна в дозе от 0,6 до 1,8 мг/кг.

Время от момента начала заболевания составило от 3-х месяцев до 13 лет Me=3,83 [1,66;6,13]. Возраст появления первых симптомов заболевания в исследуемой группе составил Me=11,3 [8;13,8].

У 53 детей АИГ протекал в сочетании с гастродуоденитом (76,8% наблюдений), у 12 детей – с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью (17% наблюдений). У 7 детей отмечались коморбидные аутоиммунные заболевания или их комбинация: у 5-ти пациентов – аутоиммунный тиреоидит (7% наблюдений), у 2-х детей – витилиго (3% наблюдений), а также сахарный диабет 1 типа, ювенильный ревматоидный артрит и целиакия по одному случаю (1,5%). У 3-х детей (5% наблюдений) отмечен множественный аутоиммунный синдром.

У детей с АИГ выявлено увеличение относительного содержания Т-клеток, Т-хелперов, относительное количество НК-клеток и В-клеток было снижено при всех стадиях ФП относительно группы сравнения (табл. 2). Содержание Т-цитотоксических лимфоцитов на стадиях F3-F4 было достоверно выше, тогда как на стадиях F0-F2 не отличалось от группы сравнения. Получено значимое увеличение абсолютного количества Thact и Treg при всех стадиях фиброза относительно группы сравнения, тогда как относительное количество Thact (% CD4⁺) было достоверно выше только на стадиях F0, F3 и F4, а относительное количество Treg (% CD4⁺) достоверно выше только на стадиях F0 и F4 (табл. 2). Доля Th17-лимфоцитов (% CD4⁺) была достоверно снижена относительно группы сравнения на стадиях F0 и F2 (табл. 2).

Получено, что содержание CD3⁺ и CD8⁺ Т-клеток было значимо выше на стадии F3 по сравнению с ранними стадиями фиброза печени F0 и F1 (рис. 1А, Б). На стадии F4 по сравнению со стадией F3 относительное количество CD8⁺ Т-клеток достоверно ниже, $p=0,043$ (рис. 1Б). Содержание В-клеток значимо снижалось от стадии F0 к F3, однако к стадии F4 значимо увеличивалось, не выходя за пределы верхней границы показателей контрольной группы (рис. 1В). Для большинства пациентов с АИГ характерно снижение доли НК-клеток, однако значимых изменений данного показателя в зависимости от стадий фиброза на данной когорте пациентов не выявлено (рис. 1Г).

Доля Т-хелперов была повышена относительно группы сравнения на всех стадиях фиброза печени, однако достоверных отличий между разными стадиями выявлено не было (рис. 2А).

Treg и Thact клетки характеризовались большим разбросом показателей и у большинства пациентов превышали показатели группы сравнения, однако достоверных отличий между разными стадиями фиброза не было выявлено (рис. 2Б, В).

Выявлено значимое повышение доли Th17-лимфоцитов с увеличением стадии фиброза печени, максимальные значения были характерны для стадии F4 (рис. 2Г).

Исследование СДГ выявило достоверное снижение активности этого фермента во всех популяциях лимфоцитов. Наибольшее снижение активности выявлено в двойных негативных CD3⁺CD4⁻CD8⁻-клетках на 18,5% и НК-клетках на 17,5% относительно группы сравнения (табл. 3). Наименьшее снижение активности СДГ было выявлено в популяции Thact.

Таблица 1. Исследованные популяции клеток и использованные для их определения моноклональные антитела

Популяция	Сокращение	Фенотип популяции
Т-лимфоциты	CD3+	CD3+CD45+
В-лимфоциты	CD19+	CD19+CD3-CD45+
NK-клетки	CD16+CD56+	CD3-CD16+CD56+CD45+
CD16/56+Т-лимфоциты	CD16/56+Т-лимфоциты	CD3+CD16+CD56+CD45
Т-хелперы	CD4+	CD3+CD4+CD45+
Цитотоксические Т-лимфоциты	CD8+	CD3+CD8+CD45+
Двойные негативные CD4-CD8-Т-клетки	CD4-CD8-Т-клетки	CD3+CD4-CD8-CD45+
Активированные Т-клетки	HLA-DR+	HLA-DR+CD3+CD45+
Регуляторные Т-клетки	Treg	CD3+CD4+CD127 ^{low} CD45+
Th17-лимфоциты	Th17	CD3+CD4+CD161+CD45+
Активированные Т-хелперы	Thact	CD3+CD4+CD127 ^{high} CD45+

Таблица 2. Относительное и абсолютное содержание основных и малых популяций лимфоцитов у детей с АИГ I типа в зависимости от стадии фиброза печени

Показатель	F0 (n=7)	F1 (n=16)	F2 (n=10)	F3 (n=13)	F4 (n=23)	Группа сравнения
CD3, % LPh	84,9 * [77,1;88,7]	82,7 * [80,6;86,1]	85,4 * [83,5;90,4]	91,0 * [85,8;91,8]	82,0 * [77,7;92,1]	74,1 [68,9;80,2]
CD3, abs	2104 [1394;2276]	1772 * [1526;2805]	1993 [1239;2526]	2119 * [1974;2441]	1723 [1405;1935]	1491 [1278;1785]
CD4, % LPh	46 * [45,2;54,4]	49,0 * [43,9;51,6]	50,9 * [50,1;52,6]	49,9 * [48,3;51,6]	49,5 * [44,2;54,4]	43,6 [37,9;48,1]
CD4, abs	1228 [769;1460]	1047 * [907;1506]	1092 [796;1591]	1371 [1077;1576]	968 [818;1167]	882 [748;1030]
CD8, % LPh	26,8 [24,9;31,1]	29,2 [24,3;33,8]	28,5 [26,8;29,8]	35,5 * [29,4;38,1]	28,9 * [26,4;34,9]	26,7 [23,87;32,2]
CD8, abs	691 [529;762]	685 [493;938]	776 [393;862]	782 * [661;852]	614 [487;689]	563 [439;713]
CD4/CD8	1,7 [1,5;2,0]	1,7 [1,4;1,9]	1,8 [1,7;2,1]	1,4 [1,3;2,1]	1,8 [1,5;1,9]	1,5 [1,3;1,9]
CD4 ⁺ CD8 ⁻ , % LPh	5,9 [1,7;8,9]	1,7 [1,4;4,6]	3,8 [1,6;4,6]	2,8 * [2,2;3,1]	2,4 * [1,6;2,9]	5,1 [3,3;6,9]
CD4 ⁺ CD8 ⁻ , abs	95 [40;157]	37 [29;152]	57 * [23;57]	70 * [60;77]	39 * [31;50]	132 [81;179]
HLA-DR ⁺ , % LPh	5,3 [3,5;7,8]	3,9 [2,3;6,4]	3,5 [2,5;5,3]	4,0 [3,1;9,9]	4,3 [2,8;7,2]	6,2 [3,8;7,9]
HLA-DR ⁺ , abs	82 [74;238]	75 [52;142]	74 [60;94]	99 [68;162]	79 [58;140]	128 [72;169]
CD19, % LPh	10,1 * [6,9;13,9]	10,9 * [7,3;15,4]	8,9 * [5,9;12,6]	6,3 * [4,1;8,4]	11,5* [5,5;16,5]	12,9 [10,1;16,9]
CD19, abs	216 * [154;286]	282 [152;365]	247 [96;306]	143 * [108;197]	216 * [98;349]	294 [190;378]
NK, % LPh	4,4 * [2,2;10,3]	6,4 * [2,5;9,4]	4,8 * [3,7;6,0]	3,2 * [2,0;4,3]	4,5 * [2,8;5,4]	11,5 [6,9;15,7]
NK, abs	89 * [59;175]	149 * [56;260]	94 * [72;146]	68 * [49;123]	81 * [59;123]	222 [132;337]
CD16/56 ⁺ Т-лф,% LPh	5,1 [2,3;6,8]	4,2 [1,7;7,8]	3,9 * [3,5;4,6]	5,4 * [2,6;6,8]	3,7 * [2,6;6,7]	2,4 [1,2;4,3]
CD16/56 ⁺ Т-лф, abs	74 [62;121]	84 [32;191]	93 * [54;110]	103 * [64;137]	72 * [47;120]	41 [25;97]
Treg, % CD4	9,3 * [8,8;11,5]	7,8 [6,8;12,5]	9,5 [7,2;11,6]	8,2 [6,8;9,2]	9,8 * [7,9;11,5]	7,4 [6,8;9,2]
Treg, abs	118 * [68;159]	107 * [74;129]	98 * [87;141]	100 * [79;122]	94 * [71;137]	68 [55;81]
Thact, % CD4	20,3 * [16,1;22,5]	18,3 [15,1;21,4]	19 [17,3;20,7]	22,5 * [15,8;26,9]	21,8 * [17,6;28,5]	16,3 [12,8;22,9]
Thact, abs	188 * [149;276]	222 * [144;278]	252 * [147;314]	234 * [160;402]	205 * [138;309]	143 [105;220]
Th17, % CD4	14,1 * [12,8;16,7]	17,1 [12,2;18,5]	14,5 * [10,8;17,7]	18,6 [12,1;21,7]	21 [15,3;23,6]	17,8 [15,5;26,3]
Th17, abs	157 [127;206]	221 [128;265]	158 [118;252]	181 [148;343]	199 [138;244]	187 [152;226]

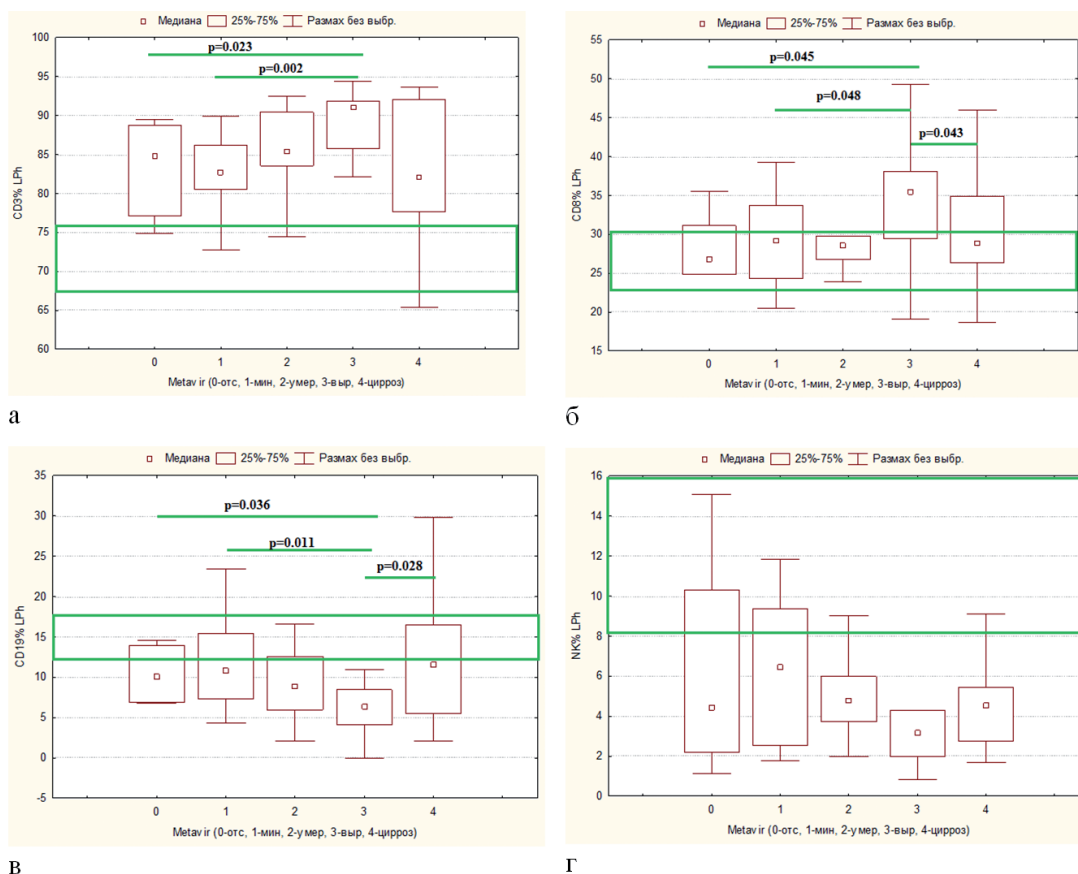


Рис. 1. Доля основных популяций лимфоцитов у детей с АИГ при разных стадиях фиброза печени, зелёной линией выделен диапазон референсных значений

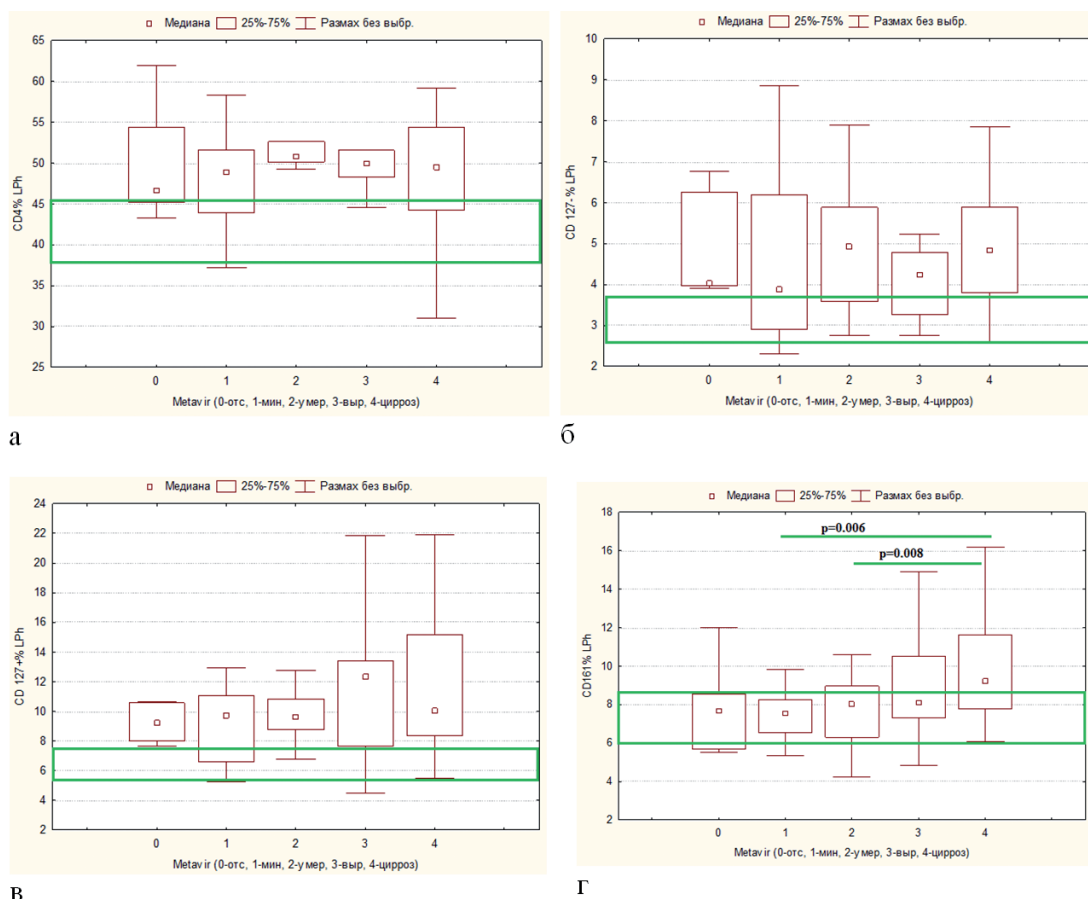


Рис. 2. Показатели популяций CD4+ лимфоцитов (% от LPh) у детей с АИГ при разных стадиях фиброза печени

Было выявлено, что в популяциях Th17 и Treg лимфоцитов активность СДГ достоверно ниже в состоянии обострения заболевания, чем в состоянии ремиссии и составляла: для Th17 – 158 [154;191] против 174 [168;192], ($p=0,020$) и 172 [165;189] против 186 [180;195] для Treg ($p=0,038$).

Анализ показателей активности СДГ в зависимости от стадии фиброза печени выявил нелинейную зависимость: в популяциях Т-хелперов, Т-цитотоксических и Thact – увеличение к стадии F2-3, а затем снижение к стадии F4 (рис. 3А).

Активность СДГ в популяции Th17-лимфоцитов также была нелинейной, с максимальным повышением активности на стадии F1 и снижением к стадии F4 (рис. 3Б).

Активность СДГ в популяции Treg с увеличением стадии фиброза печени достоверно увеличивалась, однако не достигала нормативных значений (рис. 3В).

Обсуждение

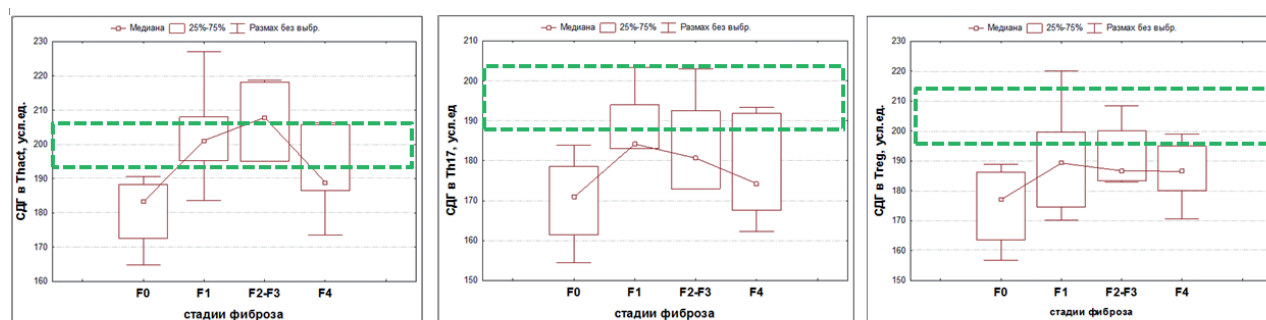
Анализ нашей выборки детей с АИГ показал, что частота встречаемости АИГ у девочек выше, чем у мальчиков (69% против 31%), что согласуется с данными мировой литературы [1].

Известно, что АИГ довольно часто протекает в сочетании с гастродуоденитом (76,8% наблюдений). Возможно, это связано с влиянием терапии кортикостероидами на проницаемость гастродуоденальной слизистой оболочки для сахарозы [17].

У 7 детей, включённых в исследование, было зарегистрировано наличие дополнительно от одного до трёх аутоиммунных заболеваний, что свидетельствует о возможном развитии множественного аутоиммунного синдрома у детей. Данный факт диктует необходимость более внимательного наблюдения за такими детьми и требует дополнительного изучения сочетан-

Таблица 3. Активность сукцинатдегидрогеназы у детей с АИГ I типа в основных и малых популяциях лимфоцитов

Популяция лимфоцитов	Активность сукцинатдегидрогеназы (усл.ед.)		Уровень достоверности, р	% снижения
	аутоиммунный гепатит	условно здоровые		
CD3	176 [160;184]	195 [184;204]	<0,001	9,6
CD4	182 [173;196]	193 [185;204]	<0,001	6,1
CD8	175 [156;184]	201 [193;207]	<0,001	12,7
CD19	130 [125;135]	150 [142;154]	<0,001	12,9
NK	152 [144;164]	185 [177;198]	<0,001	17,5
Treg	184 [170;195]	203 [196;211]	<0,001	9,7
Thact	190 [180;204]	199 [191;207]	0,04	4,6
CD3+CD4+CD8	161 [155;178]	197 [190;203]	<0,001	18,5
Th17	175 [162;190]	199 [189;203]	<0,001	11,7



А
 $P_{F0-F1}=0,001$
 $P_{F0-F2-3}=0,012$
 $P_{F0-F4}=0,048$
 $P_{F3-F4}=0,049$

Б
 $P_{F0-F1}=0,031$

В
 $P_{F0-F1}=0,049$
 $P_{F0-F4}=0,048$

Рис. 3. Активности сукцинатдегидрогеназы в популяциях лимфоцитов при разных стадиях фиброза печени у детей с аутоиммунным гепатитом

Примечание: нормативные значения выделены зелёным пунктиром.

ного возникновения заболеваний, учитывая, что, по данным литературы, примерно 25 процентов пациентов с аутоиммунными заболеваниями имеют тенденцию к развитию дополнительных аутоиммунных заболеваний (множественный аутоиммунный синдром) [18].

Выявленное значимое увеличение доли Th17-лимфоцитов к стадии F4, а также повышенное содержание Thact при всех стадиях ФП свидетельствуют о наличии дисбаланса между эффекторными и регуляторными клетками. Таким образом, подтверждается важность дисбаланса между эффекторными и регуляторными клетками в поддержании воспаления и прогрессировании повреждения печени при АИГ [9]. Данный факт подчёркивает необходимость динамического наблюдения за показателями иммунного статуса. Выявление эффективных подходов к избирательному подавлению развития и функции Th17-клеток представляет собой перспективную стратегию лечения АИГ [19].

Повышение содержания Treg в циркуляции, вне зависимости от стадии фиброза печени, с одной стороны, может указывать на компенсаторное увеличение данной популяции для сдерживания воспалительных процессов в печени, а с другой стороны, именно Treg клетки синтезируют противовоспалительный цитокин TGF- β , роль которого в фиброзе и раке сложна и противоречива. Данная теория подтверждается исследованиями Peng D. и соавт., которые подчёркивают двойную роль TGF- β в фиброзе и онкогенезе. Показано, что этот цитокин проявляет либо ингибирующие, либо стимулирующие эффекты в зависимости от стадии заболевания [20].

Выявленное в периферической крови снижение содержания NK-клеток, характерное для большинства детей с АИГ, с одной стороны, может быть обусловлено участием их в аутоиммунных воспалительных процессах непосредственно в печени [21]. С другой стороны, возможно, содержание NK-клеток снижается вследствие терапии кортикостероидами [22].

Снижение показателей метаболизма популяций лимфоцитов по активности СДГ может свидетельствовать о наличии митохондриальной дисфункции у детей с АИГ, что согласуется с данными о наличии печёночной митохондриальной дисфункции в тканях печени у пациентов с различными заболеваниями печени [23]. Окислительный стресс, вирусные инфекции, токсины нарушают гомеостатиче-

ский баланс в печени, вызывая повреждение и ремоделирование тканей. Окислительный стресс сопровождается множеством заболеваний печени, при которых часто наблюдается индукция митохондриальной дисфункции, повышенная экспрессия активных форм кислорода и истощение АТФ [24]. Полученные данные об увеличении активности СДГ в состоянии обострения заболевания у детей с АИГ свидетельствуют об активации процессов OXPHOS, которые сопровождают начало воспалительной реакции. Известно, что после активации иммунные клетки испытывают высокую потребность в энергии [25]. Описано, что высвобождаемые повреждёнными клетками митохондриальные DAMP даже без наличия инфекции могут вызывать воспалительную реакцию, приводящую к повреждению тканей и дисфункции органов [25]. Повышение показателей активности СДГ к стадии F2-3 фиброза печени в популяциях Т-хелперов, Т-цитотоксических и Thact, а затем снижение к стадии F4, описанное в нашей работе, повторяет подобную закономерность активации активности СДГ на начальных стадиях фиброза и снижении к стадии цирроза у детей с болезнью Вильсона, что свидетельствует об общих иммунологических механизмах повреждения печени [16]. Снижение активности СДГ к стадии F4, скорее всего, связано с тем, что на стадии F4 паренхима печени замещается соединительной тканью и воспалительные процессы уменьшаются, что сопровождается снижением концентрации АЛТ и АСТ в сыворотке крови. Таким образом, исследование клеточного метаболизма открывает перспективы коррекции выявленных метаболических нарушений в качестве возможной терапевтической мишени [10,16].

Заключение

Дети с АИГ нуждаются в диспансерном наблюдении и строгом контроле развития заболевания. Показатели иммунного статуса лимфоцитов периферической крови и активности СДГ в них объективно отражают тяжесть состояния пациента на момент обследования и могут быть использованы для дополнительной лабораторной оценки прогрессирования фиброза печени. Выявленные признаки митохондриальной дисфункции обосновывают применение коррекции метаболических нарушений в качестве терапии, улучшающей основное лечение пациентов с АИГ 1 типа.

Литература

1. Тюрина Е.Н., Горелов А.В., Сичинава И.В., и др. Аутоиммунный гепатит у детей как проявление аутоиммунного полигландулярного синдрома. Доктор.Ру. 2017;4(133):49–53. doi:10.21508/1027-4065-2021-66-4-101-108.
2. Trivedi PJ, Hirschfield GM. Recent advances in clinical practice: epidemiology of autoimmune liver diseases. *Gut*. 2021 Oct;70(10):1989–2003. doi:10.1136/gutjnl-2020-322362. Epub 2021 Jul 15. PMID: 34266966.
3. Mack CL, Adams D, Assis DN, et al. Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis in Adults and Children: 2019 Practice Guidance and Guidelines From the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2020 Aug;72(2):671–722. doi:10.1002/hep.31065. Epub 2020 May 12. PMID: 31863477.
4. Bittermann T, Lewis JD, Levy C, et al. Sociodemographic and geographic differences in the US epidemiology of autoimmune hepatitis with and without cirrhosis. *Hepatology*. 2023 Feb 1;77(2):367–378. doi:10.1002/hep.32653. Epub ahead of print. PMID: 35810446.
5. He MM, Lo CH, Wang K, et al. Immune-Mediated Diseases Associated With Cancer Risks. *JAMA Oncol*. 2022 Feb 1;8(2):209–219. doi:10.1001/jamaoncol.2021.5680. PMID: 34854871; PMCID: PMC8640951.
6. Jensen MD, Jepsen P, Vilstrup H, et al. Increased Cancer Risk in Autoimmune Hepatitis: A Danish Nationwide Cohort Study. *Am J Gastroenterol*. 2022 Jan 1;117(1):129–137. doi:10.14309/ajg.000000000001525. PMID: 34622808.
7. Sirbe C, Simu G, Szabo I, et al. Pathogenesis of Autoimmune Hepatitis-Cellular and Molecular Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 17;22(24):13578. doi:10.3390/ijms222413578. PMID: 34948375; PMCID: PMC8703580.
8. Patel AM, Liu YS, Davies SP, et al. The Role of B Cells in Adult and Paediatric Liver Injury. *Front Immunol*. 2021 Sep 23;12:729143. doi:10.3389/fimmu.2021.729143. PMID: 34630404; PMCID: PMC8495195.
9. Vuerich M, Wang N, Kalbasi A, et al. Dysfunctional Immune Regulation in Autoimmune Hepatitis: From Pathogenesis to Novel Therapies. *Front Immunol*. 2021 Sep 28;12:746436. doi:10.3389/fimmu.2021.746436. PMID: 34650567; PMCID: PMC8510512.
10. Shen H, Shi LZ. Metabolic regulation of Th17 cells. *Mol Immunol*. 2019 May;109:81–87. doi:10.1016/j.molimm.2019.03.005. Epub 2019 Mar 20. PMID: 30903829; PMCID: PMC7059830.
11. Wilson AN, Mosure SA, Solt LA. A Compass to Guide Insights into Th17 Cellular Metabolism and Autoimmunity. *Immunometabolism*. 2022;4(1):e220001. doi:10.20900/immunometab20220001. Epub 2021 Nov 18. PMID: 34900348; PMCID: PMC8654074.
12. Przybyłkowski A, Szeligowska J, Januszewicz M, et al. Evaluation of liver fibrosis in patients with Wilson's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2021 Apr 1;33(4):535–540. doi:10.1097/MEG.0000000000001754. PMID: 32433421; PMCID: PMC8565503.
13. An P, Wei LL, Zhao S, et al. Hepatocyte mitochondria-derived danger signals directly activate hepatic stellate cells and drive progression of liver fibrosis. *Nat Commun*. 2020 May 12;11(1):2362. doi:10.1038/s41467-020-16092-0. PMID: 32398673; PMCID: PMC7217909.
14. Moosavi B, Zhu XL, Yang WC, et al. Genetic, epigenetic and biochemical regulation of succinate dehydrogenase function. *Biol Chem*. 2020 Feb 25;401(3):319–330. doi:10.1515/hsz-2019-0264. PMID: 31408429.
15. Кулебина Е.А., Сурков А.Н., Куликов К.А., и др. Валидация показателей транзитной эластографии для оценки стадии фиброза печени у детей. *Лечащий Врач*. 2020;8:57–60. doi:10.26295/OS.2020.26.84.00.
16. Курбатова О.В., Петричук С.В., Купцова Д.Г., и др. Возрастные особенности субпопуляционного состава и метаболизма лимфоцитов у детей с болезнью Вильсона – Коновалова. *Кремлевская медицина. Клинический вестник*. 2023;2:5–11. doi:10.48612/cgma/a5rx-evxd-xkk9.
17. Kiziltaş S, Imeryüz N, Gürcan T, et al. Corticosteroid therapy augments gastroduodenal permeability to sucrose. *Am J Gastroenterol*. 1998;93(12):2420–2425. doi:10.1111/j.1572-0241.1998.00697.x.
18. Cojocar M, Cojocar IM, Silosi I. Multiple autoimmune syndrome. *Maedica (Bucur)*. 2010 Apr;5(2):132–134. PMID: 21977137; PMCID: PMC3150011.
19. Han L, Yang J, Wang X, et al. Th17 cells in autoimmune diseases. *Front Med*. 2015 Mar;9(1):10–9. doi:10.1007/s11684-015-0388-9.
20. Peng D, Fu M, Wang M, et al. Targeting TGF-β signal transduction for fibrosis and cancer therapy. *Mol Cancer*. 2022 Apr 23;21(1):104. doi:10.1186/s12943-022-01569-x. PMID: 35461253; PMCID: PMC9033932.
21. Highton AJ, Schuster IS, Degli-Esposti MA, et al. The role of natural killer cells in liver inflammation. *Semin Immunopathol*. 2021 Aug;43(4):519–533. doi:10.1007/s00281-021-00877-6. Epub 2021 Jul 7. PMID: 34230995; PMCID: PMC8260327.
22. Jeffery HC, Braitch MK, Bagnall C, et al. Changes in natural killer cells and exhausted memory regulatory T Cells with corticosteroid therapy in acute autoimmune hepatitis. *Hepatol Commun*. 2018 Feb 26;2(4):421–436. doi:10.1002/hep4.1163. PMID: 29619420; PMCID: PMC5880196.
23. Tanner MS. Mechanisms of liver injury relevant to pediatric hepatology. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2002 Feb;39(1):1–61. doi:10.1080/10408360290795439. PMID: 11890207.
24. Banerjee P, Gaddam N, Chandler V, et al. Oxidative Stress-Induced Liver Damage and Remodeling of the Liver Vasculature. *Am J Pathol*. 2023 Jun 25;S0002-9440(23)00212-2. doi:10.1016/j.ajpath.2023.06.002. Epub ahead of print. PMID: 37355037.
25. Faas MM, de Vos P. Mitochondrial function in immune cells in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis. Dis*. 2020;1866(10):1–13. doi:10.1016/j.bbadis.2020.165845.

Сведения об авторах

Курбатова О.В. – к.м.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия. E-mail: putintseva@mail.ru ORCID: 0000-0002-9213-5281.

Мовсисян Г.Б. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории редких наследственных болезней, врач-гастроэнтеролог гастроэнтерологического отделения ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-2881-4703.

Петричук С.В. – д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-0896-6996.

Купцова Д.Г. – к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ. ORCID: 0000-0001-7771-3314.

Демьянов Д.С. – врач-лабораторный генетик лаборатории молекулярной генетики. ORCID: 0000-0002-4622-3010.

Парахина Д.В. – врач-педиатр гастроэнтерологического отделения с гепатологической группой ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-8221-0364.

Радыгина Т.В. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-4704-6885.

Семикина Е.Л. – д.м.н., руководитель лабораторного отдела ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России. ORCID: 0000-0001-8923-4652.

Поталов А.С. – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории научных основ детской гастроэнтерологии и гепатологии, заведующий гастроэнтерологическим отделением ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» МЗ РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России. ORCID: 0000-0003-4905-2373.

Анушенко А.О. – врач-гастроэнтеролог гастроэнтерологического ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия, ORCID: 0000-0002-1549-2728.

Фисенко А.П. – д.м.н., профессор, директор ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, Москва, Российская Федерация. ORCID: 0000-0001-8586-7946.

Поступила 23.01.2024.