

## Показатели местного иммунитета околоушной слюнной железы у пациентов с болезнью и синдромом Шегрена

Е.И. Селифанова<sup>1</sup>, Т.Б. Сульимова<sup>1</sup>, С.И. Глухова<sup>2</sup>, А.П. Алексанкин<sup>2</sup>, И.А. Белова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» УД Президента РФ, Москва,

<sup>2</sup>ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой, Москва,

<sup>3</sup>Многопрофильная клиника «Столица», Москва

## Secretory immune parameters of parotid saliva in patients with sjogren's disease and syndrome

E.I. Selifanova<sup>1</sup>, T.B. Sultimova<sup>1</sup>, S.I. Glukhova<sup>2</sup>, A.P. Alekxankin<sup>2</sup>, I.A. Belova<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs. Moscow, Russia,

<sup>2</sup>Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute of Rheumatology" named after V. A. Nasonova", Moscow, Russia,

<sup>3</sup>OOO Medical Centre «The CAPITAL». Moscow, Russia

### Аннотация

**Актуальность.** Изучение закономерностей функционирования системы иммунитета, механизмов нарушения и разработка корректирующих подходов относятся к приоритетным направлениям фундаментальной и практической медицины. Критериями оценки иммунного статуса является неинвазивная среда (слюна), что не противоречит Хельсинскому соглашению проведения бескровных исследований. В статье представлены результаты изучения иммунного статуса секрета околоушной слюнной железы (ОСЖ) у пациентов с болезнью и синдромом Шегрена. Полученные данные несут новую информацию о степени поражения ОСЖ у пациентов с болезнью и синдромом Шегрена. **Цель исследования:** выявление степени поражения ОСЖ у пациентов с болезнью и синдромом Шегрена путем изучения качественного и количественного состава лимфоцитов в слюне. **Материалы и методы.** Исследование проводилось у 40 пациенток в возрасте от 19 до 60 лет, находившихся на лечении в НИИР им В.А. Насоновой, в секрете ОСЖ изучалось иммунофенотипирование лимфоцитов методом многоцветной проточной цитофлуорометрии. Основную группу составили женщины с хроническим паротитом с вторичным СШ в сочетании с: РА – 13 человек, СКВ – 8, ССД – 7, БШ – 12. Контролем служила группа из 15 добровольцев без признаков заболеваний СЖ и соматической патологии. **Результаты исследования.** В слюне у пациентов с БШ и СШ содержались лимфоциты, при этом в контрольной группе они полностью отсутствовали. При иммунофенотипировании лимфоцитов средняя составляющая общей популяции Т-клеток (CD3+) была 71,7%, Т-хелперов (CD3+CD4+) – 41,6% и Т-цитотоксических клеток (CD3+CD8+) – 53%. Иммунорегуляторный индекс у всех больных был меньше 1. При СШ в сочетании с: РА равен 0,9, СКВ – 0,7, ССД – 0,8. У пациенток с БШ отмечался самый низкий индекс – 0,6.

**Ключевые слова:** слюнные железы, слюна, лимфоциты, иммунный статус, синдром и болезнь Шегрена, хронический паренхиматозный паротит.

### Abstract

**Relevance.** The study of immune system functioning regularities, the mechanisms of violation and the development of corrective approaches are among the priority areas of basic and practical medicine. The criteria for assessing the immune status is a non-invasive environment (saliva), which does not contradict the Helsinki Agreement for conducting bloodless studies. The article presents the results of the parotid saliva immune status in patients with Sjogren's disease and syndrome. The obtained data carry new information on the extent of PSJ (parotid salivary gland) damage in patients with Sjogren's disease and syndrome. **Study goal:** to determine the degree of PSJ damage in patients with Sjogren's disease and syndrome by studying the qualitative and quantitative composition of lymphocytes in parotid saliva. **Materials and methods.** The study was carried out on 40 patients aged 19-60 years, treated in V.A.Nasonova Scientific and Research Institute of Rheumatology, immunophenotyping of lymphocytes in parotid saliva was studied by the method of multicolor flow cytofluorometry. The main group consisted of women with chronic mumps with secondary Sjogren's syndrome in combination with: rheumatoid arthritis – 13 people; systemic lupus erythematosus – 8; diffuse scleroderma 7; Sjogren's disease – 12. Control was 15 volunteers with no signs of SJ and somatic pathology. Control was 15 volunteers with no signs of salivary gland diseases and somatic pathology. **Results of the study.** In parotid saliva, patients with Sjogren's disease and Sjogren's syndrome had lymphocytes, while in the control group they were completely absent. In immunophenotyping of lymphocytes, the average component of the general population of T cells (CD3 +) was 71.7%, of T-helpers (CD3 + CD4 +) – 41.6% and T-cytotoxic (CD3 + CD8 +) – 53%. The immunoregulatory index in all patients was less than 1. Sjogren's syndrome in combination with: rheumatoid arthritis is 0.9; systemic lupus erythematosus – 0.7; diffuse scleroderma – 0.8. Patients with Sjogren's disease had the lowest index – 0.6.

**Key words:** salivary glands, saliva, lymphocytes, immune status, Sjogren's syndrome and disease, chronic parenchymal parotitis.

Профилактика и лечение воспалительных заболеваний слюнных желез (СЖ) остаются актуальными проблемами в стоматологии. Среди всех воспалительных и дистрофических заболеваний СЖ хронические сиалоадениты составляют 42-54,4% [5]. По данным В.И.Васильева (2007), частота поражения слюнных желез при ревматической патологии колеблется от 10 до 50% [2].

В настоящее время, например, доказана корреляция хронического сиалоаденита с различными сопутствующими заболеваниями организма, при которых он протекает или впервые выявляется [4].

Понятие местного (секреторного) иммунитета в настоящее время включает совокупность реагирования всех клеток лимфоидного ряда. Слюна поддерживает гомеостаз полости рта. СЖ обладают разнообразными функциями, имеют способность к своеобразным реакциям на различные внешние воздействия и внутриорганные нарушения. К такой патологии относится болезнь и вторичный синдром Шегрена. У лиц, страдающих данной патологией, преобладает паренхиматозный сиалоаденит. Слюнные железы являются одним из основных органов-мишеней при первичном и вторичном синдроме Шегрена [2,3].

Болезнь Шегрена (БШ) — гетерогенное заболевание, в основе которого лежит сложное взаимодействующее влияние генетически детерминированных и приобретенных дефектов нормальных иммунорегуляторных механизмов, ограничивающих патологическую активацию иммунной системы в ответ на экзогенные или эндогенные стимулы. БШ рассматривается как классическое аутоиммунное заболевание. Основные аутоиммунные феномены подразумевают очаговую лимфоплазматическую инфильтрацию эпителиальных желез и поликлональную В-клеточную активацию с образованием органоспецифических/неспецифических аутоантител. При данной патологии синтезируется большое количество антител, поликлональных и моноклональных иммуноглобулинов, преимущественно G/M-класса [10].

Хотя процессы, которые лежат в основе клеточного и гуморального аутоиммунного ответа при БШ, неизвестны, установлено, что Т- и В-лимфоциты вовлечены во взаимодействие с эндотелиальными и активированными эпителиальными клетками СЖ, а также с дендритическими клетками, что способствует прогрессированию заболевания и развитию системных лимфоцитарных нарушений [7]. Хронический очаговый перидуктальный лимфоцитарный сиалоаденит является характерной морфологической картиной и включен в классификационные критерии заболевания [3].

Развитие лимфоцитарного сиалоаденита при БШ является многоступенчатым процессом, ко-

торый включает рассеянный небольшой периваскулярный лимфоидный инфильтрат, последовательное развитие типичного очагового перидуктального лимфоидного сиалоаденита, далее диффузного лимфоцитарного сиалоаденита с образованием эктопических зародышевых центров, приводящего окончательно к деструкции и замещению пораженной железистой ткани. Тканевые лимфоидные инфильтраты в начале заболевания включают преимущественно активированные CD4+(CD45Ro+) Т-клетки. В продвинутых стадиях болезни преобладают В- и плазматические клетки, особенно при образовании эктопических зародышевых центров. Эпителиальные клетки СЖ имеют активированный статус с нарушенным апоптозом и способностью стимулировать адгезию с функцией антигенпрезентирующих клеток и костимуляцией инфильтрирующих CD4+ Т-клеток. Однако инфильтрирующие CD4+ Т- и дендритические клетки могут также локально продуцировать широкое разнообразие В-клеточно-нацеленных цитокинов и факторов выживания, включая цитокины BAFF и APRIL. Таким образом, плотное взаимодействие между активированными эпителиальными клетками СЖ, инфильтрирующими лимфоцитами и дендритическими клетками ведет к хронизации и прогрессированию заболевания [7].

Состав слюны может претерпевать изменения при болезни и синдроме Шегрена (СШ) [3].

Таким образом, исследование слюны является ценным неинвазивным методом оценки общего состояния организма и особенно СЖ при болезни и синдроме Шегрена.

Сбор слюны удобен, прост и безболезнен, риск заражения медицинского персонала значительно меньше, чем при работе с кровью, а содержание некоторых веществ в секрете (например, гормонов, антител, лекарств и т.д.) отражает их концентрацию в кровотоке [2, 4].

Современные технологии исследования белков в биологических средах позволяют определять уровни различных иммунных показателей и их биологическую активность в слюне и других секретах, содержащих изучаемые белки в минимальных концентрациях [9].

В настоящее время фенотипирование лимфоцитов имеет диагностическое значение при первичных и приобретенных иммунодефицитах и лимфопролиферативных заболеваниях. При данной патологии уже довольно четко сформулированы диагностические критерии и фенотипические особенности клеток. Исследование поверхностных маркеров лимфоцитов позволяет оценивать распространенность, тяжесть процесса и па-

тогенетические особенности воспаления, прогнозировать развитие патологии [8, 11, 12].

Цель исследования: выявление степени поражения ОСЖ у пациентов с болезнью и синдромом Шегрена путем изучения качественного и количественного состава лимфоцитов в слюне.

### Материалы и методы

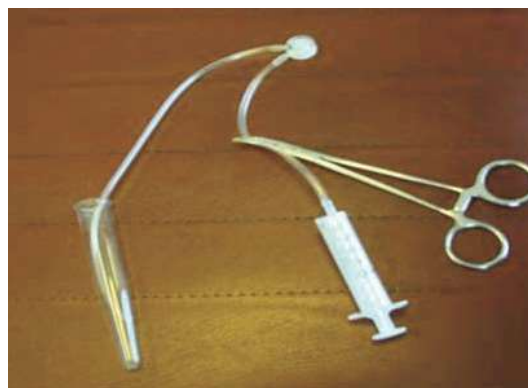
Исследование проводилось у 40 пациенток в возрасте от 19 до 60 лет, находившихся на лечении в НИИР им. В.А. Насоновой. Критерии включения: лица женского пола с хроническим паротитом в сочетании с ревматоидным артритом (РА), системной красной волчанкой (СКВ), системной склеродермией (ССД) и БШ. Критерии исключения: возраст старше 60 лет и стадия обострения паротита.

В основную группу вошли пациенты с вторичным СШ в сочетании с: РА — 13 человек, СКВ — 8, ССД — 7, БШ — 12.

Группу сравнения составили 15 добровольцев из числа сотрудников НИИР им. В.А. Насоновой без признаков заболеваний СЖ и соматической патологии. Материалом исследования служил секрет ОСЖ.

Всем пациентам было проведено комплексное клиничко-лабораторное обследование с использованием общих и специальных методов. Стоματοлогический диагноз БШ и СШ устанавливался на основании стандартных клинических критериев: сиалометрии, сиалографии ОСЖ с введением контрастного вещества Омнипак 350 и морфологической картины биоптата малой слюнной железы, взятой со слизистой нижней губы.

Секрет ОСЖ получали по методике М.В.Симоновой (1982) с помощью капсулы Лешли-Красногорского. Канюля присасывалась к слизистой оболочке щеки в области устья выводного протока ОСЖ на 5 мин на фоне стимуляции 3% раствором аскорбиновой кислоты. Слюну собирали в течение 5 мин в градуированные стеклянные центрифужные пробирки (рис. 1).



Анализ различных субпопуляций лимфоцитов осуществляли в иммунологической лаборатории НИИР им. В.А. Насоновой. Образцы слюны разводили 10-кратным объемом фосфатно-солевого буфера (ФСБ), с последующим центрифугированием при 500 g в течение 5 мин. После удаления супернатанта к осадку добавляли 50 мкл ФСБ.

В полученном растворе проводили иммунофенотипирование лимфоцитов методом многоцветной проточной цитофлуорометрии, включая определение процентного количества общей популяции Т-клеток (CD3+), Т-хелперов (CD3+CD4+), Т-цитотоксических клеток (CD3+CD8+), естественных клеток-киллеров (CD3-CD56+) и В-клеток (CD3-CD19+). Использовались готовые коммерческие наборы мышиных моноклональных антител: CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 ("Beckman Coulter", США) и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 ("Beckman Coulter", США).

Оценку результатов пятицветного окрашивания лимфоцитов проводили на анализаторе NAVIOS ("Beckman Coulter", США). Клеточные популяции идентифицировали с помощью программного обеспечения CXP ("Beckman Coulter", США). При гейтировании по горизонтальной и вертикальной осям определяли процентное содержание Т, В-лимфоцитов и естественных клеток-киллеров.

Также проводили расчет иммунорегуляторного индекса — соотношение Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток (CD3+CD4+/CD3+CD8+). Индекс CD4/CD8 1,5-2,5 соответствовал нормергическому состоянию, более 2,5 - гиперактивности, менее 1,0 - иммунодефициту. При тяжелом течении воспалительного процесса соотношение CD4/CD8 может быть меньше 1. Полученные результаты обрабатывали с использованием программы Statistica 10 (StatSoft Inc., США).



Рис. 1. Сиалометрия с помощью капсулы Лешли-Красногорского.

**Результаты и обсуждение**

При осмотре слизистой оболочки у пациентов с БШ отчетливо проявлялись клинические признаки дисбактериоза и ранимость слизистой, что соответствовало ксеростомии III степени (рис. 2, а, б).

На сиалограммах у этих больных отмечались явления, характерные для разных стадий паренхиматозного паротита. Это размытость контуров анатомических структур, а вместо паренхимы визуализировались нечеткие крупные пятна контрастного вещества (рис.3, а, б).

Морфологическое исследование биоптата малой слюнной железы при БШ выявило лимфогистиоцитарный перидуктальный инфильтрат (ЛГИ) более 150 клеток. При нарастании процесса происходило усиление поствоспалительного

склероза в одних долях, а в других — полное замещение ЛГИ свыше 500 клеток.

Состояние слюнных желез при диффузных болезнях соединительной ткани в сочетании с СШ многообразно: в начальной стадии сухости в полости рта пациенты не замечали, при сиалометрии у них секреторная функция сохранялась либо определялось снижение секреции 1-й степени, а в выраженной и поздней стадиях — 2-й и 3-й степени соответственно. Паротидный секрет содержал осадок в виде свертков и хлопьев, указывающий на наличие латентного воспаления в СЖ.

При СШ в биоптатах малых слюнных желез ЛГИ был от 50 до 150 клеток в зависимости от выраженности стадии заболевания (рис. 4, а, б).

Данные, полученные нами при изучении слюны, свидетельствовали о том, что у пациентов с



Рис. 2, а. Заеды (проявление грибковой инфекции).

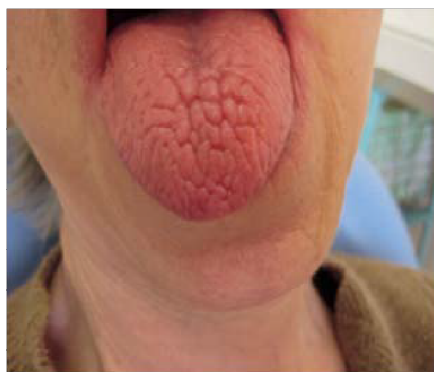


Рис. 2, б. Ксеростомия III степени.

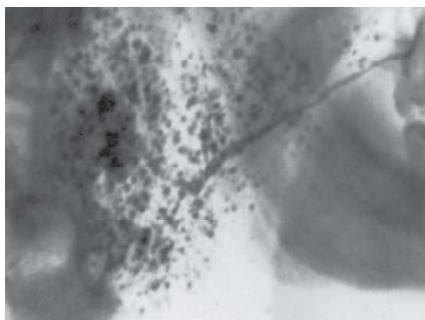


Рис. 3, а. Выраженная стадия.



Рис. 3, б. Поздняя стадия паренхиматозного паротита.



Рис. 4, а. ЛГИ 50 клеток.

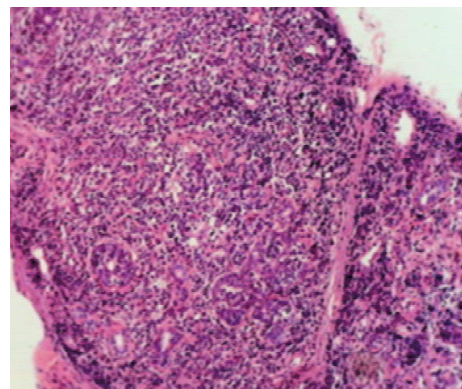


Рис. 4, б. ЛГИ более 500 клеток.

Иммунограмма секрета ОСЖ пациентов

Диагноз	Число больных	Показатели					
		Т-клетки (CD3+), %	Т-хелперы CD4+, %	Т-цитотоксические клетки CD8+, %	В-клетки (CD19-), %	Естественные клетки-киллеры (CD56+), %	Т-В-НК, %
БШ	12	90	43,7	64	9	9	62,5
РА+СШ	13	65	45	47,8	2,2	8,7	67,5
СКВ+СШ	8	66,8	36,4	51,4	0	0	64,5
ССД+СШ	7	64,5	41,5	48,9	0	0	63,5
Средняя ...		71,7	41,6	53	2,8	4,4	64,5

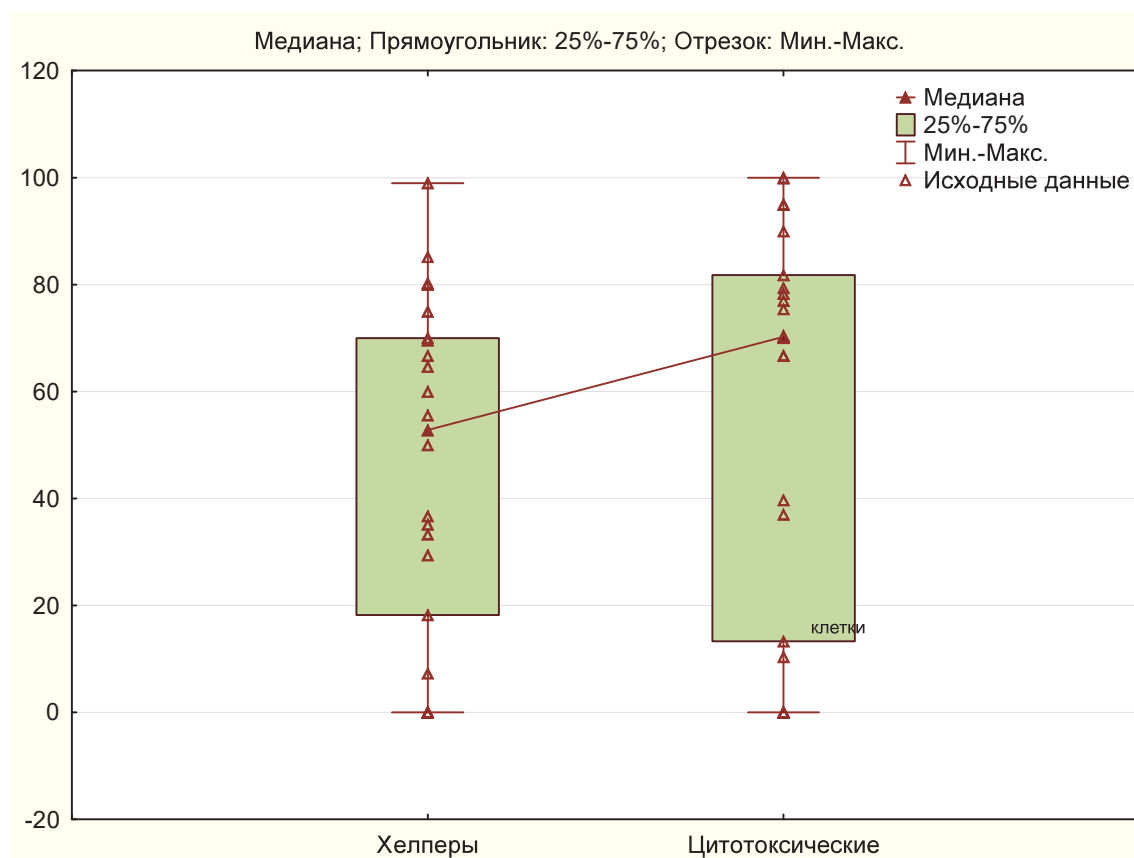


Рис. 5. Иммунограмма слюны пациентов.

БШ и СШ содержались лимфоциты, в контрольной группе они полностью отсутствовали. При иммунофенотипировании лимфоцитов средняя составляющая общей популяции Т-клеток (CD3+) была 71,7%, Т-хелперов (CD3+CD4+) – 41,6% и Т-цитотоксических клеток (CD3+CD8+) – 53% (см. таблицу).

Следует отметить, что при БШ в отличие от СШ в исследуемом секрете выявлялось преобладание общей популяции Т-клеток (CD3+) – на 24,6%. В то же время при паренхиматозном сиалоадените в сочетании с первичным и вторичным СШ в исследуемой слюне Т-хелперов было мень-

ше, чем Т-цитотоксических клеток (CD8+), на 11,4% (рис. 5).

Иммунорегуляторный индекс у всех больных был меньше 1. При СШ в сочетании с: РА равен 0,9, СКВ – 0,7, ССД – 0,8. У пациентов с БШ отмечался самый низкий индекс – 0,6.

Снижение соотношения в крови CD4/CD8 вследствие роста уровня CD8 характерно для ряда опухолей, что особо актуально у пациентов с БШ. Появление этих клеток в слюне может свидетельствовать о развитии лимфопролиферативного процесса и его прогрессировании, несмотря на проводимое ревматологом лечение. Диагноз пер-

вичного и вторичного синдрома Шегрена является сложным, и иммунологическое исследование слюны - это потенциальный способ улучшить существующие диагностические критерии.

Таким образом, всем пациентам с паренхиматозным паротитом в комплекс обследования следует включать иммунофенотипирование лимфоцитов слюны для раннего выявления аутоиммунных заболеваний железы.

### Литература

1. Афанасьев В.В. Классификация заболеваний и повреждение слюнных желез. *Стоматология*. 2010; 1: 63-65 [Afanasyev V. V. Classification of diseases and damage of salivary glands. *Dentistry*. 2010; 1: 63-65. In Russia].
2. Васильев В.И. Болезнь Шегрена: клинико-лабораторные, иммуноморфологические проявления и прогноз. Дис. ... д-ра мед. наук. М., 2007. 343 с. [Vasilyev V. I. Sjogren Disease: clinical - laboratory and immunomorphological manifestations and prognosis. Diss. dock. honey. sciences. M., 2007. 343 p. In Russia].
3. Васильев В.И., Симонова М.В., Сафонова Т.Н. Критерии диагноза болезни и синдрома Шегрена. Избранные лекции по клинической ревматологии. М.: Медгиз, 2001. 112-132 [Vasilyev V. I., Simonova M. V., Safonova T. N. Criteria for diagnosis of a disease and Sjogren's syndrome. Selected lectures on clinical rheumatology. M.: Medgiz, 2001. 112-132. In Russia].
4. Денисов А.Б. Слюнные железы. Слюна. М.: РАМН. 2003. 204с. [Denisov A. B.. Salivary glands. Saliva's. M.: RAMN, 2003. 204 p. In Russia].
5. Рунова М.Б. Современные принципы диагностики и лечения заболеваний слюнных желез. *Стоматология*. 2011; (3): 152-156 [Runova M. B. Modern principles of diagnostics and treatment of diseases of the salivary glands. *Dentistry*. 2011; (3): 152-156. In Russia].
6. Brandtzaeg P. Immunology of tonsils and adenoids: everything the ENT surgeon needs to know. *Int. J. Pediat. Otorhinolaryng*. 2003; 67(1): 69-76.
7. Hansen A., Lipsky P.E., Dorner T. B - cells in Sjogren's syndrome: indications for disturbed selection in ectopic lymphoid tissue. *Arthr. Res. Ther*. 2007; 9: 218-230.
8. Harris N.L. Lymphoid proliferations of the salivary glands. *Am. J. Clin. Pathol*. 1999; 111(1): 94-103.
9. Kagami H., Hiramatsu Y., Hishida S. et al. Salivary growth factors in health and disease. *Adv. Dent. Res*. 2000; 14: 99-102.
10. Kaufman E., Lamster I.B. Analysis of saliva for periodontal diagnosis - a review. *J. Clin. Periodontol*. 2000; 27: 453-465.
11. Schmid U., Helbron D., Lennert K. Development of malignant lymphoma in myoepithelial sialadenitis (Sjogren's syndrome). *Virch. Arch. Pathol. Anat. Histopathol*. 1982; 395: 11-43.
12. Freimark B., Fantozzi R., Bone R. et al. Detection of clonally expanded salivary gland lymphocytes in Sjogren's syndrome. *Arthr. Rheum.*, 1989; 32: 859-869.

Для корреспонденции/Corresponding author  
Селифанова Елена Ивановна/Selifanova Elena  
selifana@mail.ru