

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА И МЕТАБОЛИЗМА ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С БОЛЕЗНЬЮ ВИЛЬСОНА – КОНОВАЛОВА**О.В. Курбатова^{1*}, С.В. Петричук¹, Д.Г. Купцова¹, Т.В. Радыгина¹, Е.Л. Семикина^{1,2}, А.С. Потапов^{1,2}, Г.Б. Мовсисян¹, А.Д. Комарова¹, А.О. Анушенко¹, М.Г. Вершинина¹, А.П. Фисенко¹**¹ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, Москва² ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва**AGE-RELATED FEATURES OF SUBPOPULATION COMPOSITION AND LYMPHOCYTE METABOLISM IN CHILDREN WITH WILSON-KONOVALOV DISEASE****O.V. Kurbatova^{1*}, S.V. Petrichuk¹, D.G. Kuptsova¹, T.V. Radygina¹, E.L. Semikina^{1,2}, A.S. Potapov^{1,2}, G.B. Movsisyan¹, A.D. Komarova¹, A.O. Anushenko¹, M.G. Vershinina¹, A.P. Fisenko¹**¹ National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia² Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia***E-mail:** putintseva@mail.ru**Аннотация**

В основе болезни Вильсона – Коновалова (БВ) лежит нарушение экскреции меди из организма, приводящее к жировой дистрофии гепатоцитов, гепатиту, фиброзу и циррозу печени. Формирование фиброза печени сопровождается изменением количественных характеристик популяций лимфоцитов и их функциональной активности. **Цель исследования** – оценить содержание популяций лимфоцитов и показатели их метаболической активности у детей с БВ. **Материалы и методы.** Обследовано 73 пациента с БВ в возрасте от 6 до 18 лет и 54 здоровых ребенка, сопоставимых по возрасту. Оценку стадии фиброза печени проводили методом транзитной эластографии печени. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови было выполнено на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500. Активность дегидрогеназ определяли цитоморфоденситометрическим и иммуноцитохимическим методами. Статистические расчеты проводили с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). **Результаты.** Выявлена зависимость показателей клеточного иммунитета от возраста детей с БВ: изменение процентного состава Т-лимфоцитов вследствие увеличения доли цитотоксических Т-лимфоцитов, Thact, Th17, снижение В-лимфоцитов с возрастом и изменение соотношения В1 и В2 субпопуляций. Абсолютное количество основных популяций уменьшалось с возрастом аналогично возрастной динамике снижения абсолютного числа лимфоцитов крови. Выявлены характерные особенности субпопуляционного состава лимфоцитов у детей с БВ – повышение содержания Т-клеток вследствие популяции Т-хелперов при снижении цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и NK-клеток на фоне повышения Thact, Th17-лимфоцитов и Treg. Получено снижение активности дегидрогеназ лимфоцитов у детей с БВ: сукцинатдегидрогеназа (СДГ) – на 27%, НАДН-дегидрогеназа – на 16%, лактатдегидрогеназа – на 36% от показателей условно здоровых детей, снижение СДГ выявлено в Т-, В-лимфоцитах и NK-клетках. С увеличением стадии фиброза печени снижается содержание Treg и активность СДГ в них. Наибольшее количество пациентов с повышенным содержанием Th17 выявлено на стадиях F2-3 фиброза печени, при сохранении активности СДГ. **Заключение.** Выявленные нарушения ферментного статуса лимфоцитов вносят вклад в понимание патогенеза формирования фиброза печени и определяют необходимость поиска возможной фармакологической коррекции выявленных иммунологических и метаболических нарушений у детей с БВ.

Ключевые слова: дети, болезнь Вильсона – Коновалова, Treg, Th17, фиброз печени, метаболизм лимфоцитов.**Abstract**

Wilson-Konovalov disease (WD) is triggered by impairments in the copper excretion from the body leading to fatty degeneration of hepatocytes, hepatitis, fibrosis and cirrhosis of the liver. Progressing liver fibrosis is accompanied by changes in the quantitative characteristics of lymphocyte populations and their functional activity. **Purpose.** To assess the level of lymphocyte populations and indicators of their metabolic activity in children with Wilson-Konovalov disease. **Materials and methods.** 73 patients with WD, aged 6–18, and 54 age-matched healthy children were examined. Liver fibrosis stages were determined at the transient liver elastography. Subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes was studied at flow cytometer CYTOMICS FC500. Dehydrogenase activity was assessed at cytomorphodensitometric and immunocytochemical testings. Statistical calculations were made with Statistica 10.0 program (StatSoft, USA). **Results.** The dependence of cellular immunity parameters on the age of children with WD was revealed: changes in percentage composition of T-lymphocytes due to the increase in cytotoxic T-lymphocytes, Thact, Th17 proportion; decrease of B-lymphocytes with age and changes in the ratio of B1 and B2 subpopulations. The absolute number of main populations decrease with age, similar to the age dynamics with the decrease in the absolute number of blood lymphocytes. Characteristic features of lymphocyte subpopulation composition in children with WD were revealed: increase of T-cell level due to T-helper population under the decrease of cytotoxic T-lymphocytes, B-lymphocytes and NK cells at the increase of Thact, Th17-lymphocytes and Treg. Children with WD had a decreased activity of lymphocyte dehydrogenases: SDH – by 27%, NADH-DH – by 16%, LDH – by 36%, if to compare with parameters

of conditionally healthy children. SDH decrease was found in T-, B-lymphocytes and NK-cells. With the progressing of liver fibrosis, Treg level and SDH activity were decreasing. The largest number of patients with elevated Th17 levels was found at stages F2-3 of liver fibrosis under the maintained SDH activity. **Conclusion.** The revealed disorders in the lymphocyte enzyme status contribute to the understanding of pathogenesis in liver fibrosis formation and underline the need to search for possible pharmacological corrections of the revealed immunological and metabolic disorders in children with WD.

Key words: children, Wilson-Konovalov disease, Treg, Th17, liver fibrosis, lymphocyte metabolism.

Ссылка для цитирования: Курбатова О.В., Петричук С.В., Купцова Д.Г., Радыгина Т.В., Семикина Е.Л., Потапов А.С., Мовсисян Г.Б., Комарова А.Д., Анушенко А.О., Вершинина М.Г., Фисенко А.П. Возрастные особенности субпопуляционного состава и метаболизма лимфоцитов у детей с болезнью Вильсона – Коновалова. Кремлевская медицина. Клинический вестник. 2023; 2: 5–11.

Болезнь Вильсона – Коновалова (БВ) – тяжелое прогрессирующее наследственное заболевание, передающееся по аутосомно-рецессивному типу. В основе заболевания лежит нарушение экскреции меди из организма, приводящее к избыточному накоплению этого микроэлемента в тканях и сочетанному поражению паренхиматозных органов (прежде всего печени) и головного мозга (преимущественно подкорковых ядер) [1]. Описано почти 700 мутаций белка АТР7В (Cu⁺⁺ transporting beta polypeptide; бета-полипептид медь-переносящей аденозинтрифосфатазы), которые могут приводить к нарушению метаболизма меди [1, 2].

Медь выполняет множество функций в организме. В основном она выступает в качестве кофактора для некоторых ферментов, таких как церулоплазмин, цитохром-с-оксидаза, дофамин бета-гидроксилаза, супероксиддисмутаза и тирозиназа. Медь всасывается из желудочно-кишечного тракта. Транспортный белок на клетках тонкой кишки СМТ1 (Copper Membrane Transporter 1) перемещает медь внутрь клеток. Часть меди связывается с металлотионеином, а другая перемещается в сеть Гольджи с помощью транспортного белка АТОХ1 (Antioxidant Protein 1). В аппарате Гольджи в ответ на повышение концентрации меди фермент АТР7А (Copper-transporting ATPase 1) способствует высвобождению меди в кровотоке, которая затем через воротную вену попадает в печень. Удаление меди может происходить двумя путями: в гепатоцитах белок АТР7В связывает медь с церулоплазмином, высвобождая его в кровь, и удаляет избыток меди с выделяющейся желчью. Обе функции белка АТР7В нарушены при БВ [3].

Избыточное накопление меди катализирует образование свободных радикалов и запускает процесс перекисного окисления липидов. Это приводит к нарушению мембран клеток и митохондрий, выходу лизосомальных ферментов в клетку, нарушению функционирования ДНК и белков, снижению содержания антиоксидантов – глутатиона и витамина Е. Образующийся в результате перекисного окисления липидов малоновый диальдегид стимулирует синтез коллагена, способствуя фиброгенезу. Токсическое действие меди на ткань печени может проявляться в форме жировой дистрофии гепатоцитов, гепатита, фиброза и цирроза печени [4]. Доказано наличие нарушений регуляции ядерных рецепторов и митохондриальной дисфункции клеток печеней при БВ [5].

Вовлеченность иммунной системы в процесс фиброобразования печени показана при различных болезнях накопления, аутоиммунных и вирусных гепатитах, неалкогольной жировой дистрофии печени [6]. Кроме того показано, что пациенты с болезнями накопления более восприимчивы к инфекциям, у них чаще развиваются аутоиммунные и злокачественные заболевания [7]. Описаны нарушения в иммунной системе у пациентов с БВ, прогрессирующие с увеличением стадии фиброза печени [8].

В основе многих хронических заболеваний лежат не только количественные изменения клеток иммунной системы и нарушения процессов дифференцировки, но и изменения их функциональной активности (пролиферации, продукции цитокинов, нарушения метаболизма и др.) [9].

Известно, что каждый этап иммунного ответа характеризуется определенным метаболическим профилем лимфоцитов [10]. В наивных Т-клетках преобладают процессы окислительного фосфорилирования (ОХРНОС), а в пролиферирующих – процессы гликолиза и глутаминолиза. Дифференцировка Т-лимфоцитов также связана с активацией разных метаболических путей: для Th1, Th2 и Th17-клеток (Th17) – это гликолиз, а для Т-регуляторных клеток (Treg) – цикл окисления жирных кислот [11]. Показано, что изменения метаболизма лимфоцитов регулируют соотношение Th17-лимфоцитов и Treg, играющих ключевую роль при аутоиммунных и воспалительных заболеваниях [11, 12]. Для выполнения своих функций клетка должна вырабатывать достаточное количество энергии, 90% которой образуется в митохондриях. Высокий уровень процессов ОХРНОС в митохондриях необходим для активации, пролиферации и функционирования иммунных клеток [11, 12].

Метаболическую активность клеток крови можно охарактеризовать рядом ферментов, таких как сукцинатдегидрогеназа (СДГ), НАДН-дегидрогеназа (НАДН-ДГ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Все вышеперечисленные ферменты строго связаны друг с другом структурно и функционально. Нарушения в работе одного звена неизбежно ведут к нарушению активности работы другого [13]. СДГ – белковый комплекс, расположенный во внутренней мембране митохондрий, одновременно участвует в цикле трикарбоновых кислот и дыхательной цепи переноса электронов. НАДН-ДГ является I звеном ОХРНОС, представляет из себя комплекс никотинамид-зависимых дегидрогеназ, которые катализируют перенос водорода с НАДН на ФМН [13]. ЛДГ – цитоплазматический фермент гликолиза, который катализирует реакции взаимопревращения пирувата и лактата. В условиях недостатка кислорода ЛДГ преобразует пируват (конечный продукт гликолиза) в лактат, таким образом, клетка поддерживает собственные энергетические потребности за счет активации процессов анаэробного окисления, который частично компенсирует недостаток АТФ [13].

Изучение активности дегидрогеназ может быть выполнено разными лабораторными методами [14–16]. Оценка метаболизма лимфоцитов является перспективным направлением иммунологических исследований для прогноза течения и эффективности терапии при различных заболеваниях [12, 17, 18].

Материалы и методы

Обследовано 73 пациента с БВ в возрасте от 6 до 18 лет, Me 13.6 [11.0; 16.4]. Группу сравнения составили 54 здоровых ребенка без соматической, аутоиммунной, онкологической

патологий, сопоставимые по возрасту. С учетом известной возрастной динамики показателей клеточного иммунитета у детей, обследованные пациенты были разделены на три возрастные группы: 6–8 лет (n = 7), 9–11 лет (n = 17) и старше 12 лет (n = 49) [19].

Оценку стадии фиброза печени проводили методом транзитной эластографии печени на аппарате FibroScan F502 (EchoSense, Франция). Для диагностики степени фиброза печени использовали шкалу METAVIR: стадия F1 – плотность в интервале 5.9–7.2 кПа; стадия F2 – 7.3–9.5 кПа; стадия F3 – 9.6–12.5 кПа, стадия F4 (цирроз печени) – плотность 12.6 кПа и более [20]. В зависимости от стадии фиброза дети были разделены на четыре группы: группа 1 – отсутствие фиброза печени (F0, n = 19); группа 2 – минимальные фибротические изменения печени (F1, n = 25); группа 3 – выраженный фиброз печени (F2– м3, n = 15) и группа 4 – цирроз печени (F4, n = 14).

Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови было выполнено на проточном цитофлуориметре CYTOMICS FC500 с использованием моноклональных антител производства Beckman Coulter (США): CD4-FITC, CD3-FITC, HLA-DR-FITC, CD8-PE, CD19-PE, CD(16+56)-PE, CD127-PE, CD161-PE, CD294-PE, CD3-PerCP, CD45-PerCP, CD45-PC7, CD25-PC7, CD5-PC7. Протокол подготовки образцов периферической крови для многоцветного анализа проводили в соответствии со стандартизированной технологией [21]. В исследовании оценивали следующие популяции: Т-лимфоциты (CD3⁺CD45⁺), Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺CD45⁺), цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8⁺CD45⁺), активированные Т-лимфоциты (CD3⁺CD45⁺HLA-DR⁺), Th17 (CD3⁺CD4⁺CD161⁺CD45⁺), Treg (CD3⁺CD4⁺CD127^{low}CD45⁺), активированные Т-хелперы (Thact – CD3⁺CD4⁺CD127^{high}CD45⁺), Th2-лимфоциты (CD3⁺CD4⁺CD294⁺CD45⁺), В-лимфоциты (CD19⁺CD3⁺CD45⁺), включая В1-популяцию (CD45⁺CD3⁺CD19⁺CD5⁺) и В2-популяцию (CD45⁺CD3⁺CD19⁺CD5⁺) лимфоцитов, NK-клетки (CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD45⁺), NKT-клетки (CD3⁺CD16⁺CD56⁺CD45⁺).

Показатели субпопуляций лимфоцитов были проанализированы в процентах отклонения от возрастной нормы для выявления наиболее типичных изменений у детей с БВ. Формула расчета отклонений:

$$X_n = (X_{\min} - X) / 0,01 * (X_{\max} - X_{\min}), \text{ где}$$

X_n – значение индивидуального показателя, нормированное на возрастную норму; X – значение изучаемого показателя; X_{\max} – верхняя граница возрастной нормы; X_{\min} – нижняя граница возрастной нормы. Диапазон возрастной нормы принимали за 100%.

Активность дегидрогеназ определяли цитоморфоденситометрическим методом с помощью АПК «ВидеоТест» и программы «Морфология 5.2» (комплекс аппаратно-программной визуализации морфологических препаратов, анализа и регистрации оптических и морфологических показателей «ВидеоТест», регистрационное удостоверение № 29/20010702/6102-04 в ГРМИ). Активность ферментов оценивали по оптической плотности площади гранул ферментной реакции и общему продукту реакции.

Активность СДГ в основных и малых популяциях лимфоцитов определяли иммуноцитохимическим методом на проточном цитометре CYTOMICS FC500 [14]. Метод основан на увеличении гранулярности клеток (показатель бокового светорассеяния – SSC) после проведения цитохимической реакции на выявление активности фермента в пермеабелизованных и окрашенных моноклональными антителами клетках.

Статистические расчеты проводили с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). Описательная статистика представлена в виде Me ($Q_{0,25}$; $Q_{0,75}$). Достоверность результатов оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни, за достоверные принимали отличия при $p < 0,05$.

Результаты

У детей с БВ оценка основных популяций лимфоцитов показала достоверные изменения процентного состава Т-лимфоцитов вследствие увеличения доли цитотоксических Т-лимфоцитов с возрастом. Процентное содержание В-лимфоцитов достоверно снижалось с возрастом. Относительное количество Т-хелперов, NK-клеток, активированных Т-лимфоцитов (CD3HLA-DR), а также NKT-клеток не зависело от возраста детей. Абсолютное количество основных популяций уменьшалось с возрастом аналогично возрастной динамике снижения абсолютного числа лимфоцитов крови (табл. 1).

Таблица 1

Показатели основных популяций лимфоцитов у детей с БВ в зависимости от возраста

Популяция	Группы по возрасту			Уровень достоверности		
	6–8 лет (n = 7)	9–11 лет (n = 17)	Старше 12 лет (n = 49)	p1–2	p2–3	p1–3
LPh abs	3140 [2600; 3564]	2098 [1695; 2511]	1981 [1443; 2281]	0.013	0.491	0.004
CD3% LPh	70.6 [62.4; 75.0]	73.5 [70.7; 76.2]	77.0 [71.7; 83.0]	0.114	0.215	0.018
CD3abs	2213 [1890; 2612]	1523 [1187; 1856]	1535 [1137; 1778]	0.001	0.960	0.000
CD4% LPh	38.5 [37.1; 55.9]	45.1 [37.8; 46.1]	46.8 [39.8; 51.2]	0.970	0.153	0.592
CD4abs	1369 [1195; 1918]	909 [616; 1010]	848 [622; 1156]	0.001	0.770	0.000
CD8% LPh	21.4 [21.0; 22.3]	26.5 [22.5; 29.7]	26.4 [22.5; 32.1]	0.065	0.462	0.010
CD8abs	764 [536; 886]	567 [382; 612]	536 [385; 695]	0.023	0.813	0.025
CD19% LPh	19.6 [12.4; 20.7]	12.9 [9.7; 19.4]	11,6 [9.4; 14.5]	0.130	0.099	0.019
CD19 abs	641 [290; 772]	304 [177; 392]	235 [155; 292]	0.013	0.341	0.000
NK% LPh	8.5 [7.2; 21.5]	8.6 [5.7; 16.5]	10.5 [6.0; 13.6]	0.382	0.749	0.512
NK abs	316 [168; 821]	175 [128; 272]	204 [87; 320]	0.047	0.994	0.049
CD4/CD8	1.85 [1.67; 2.64]	1.65 [1.27; 2.10]	1.63 [1.41; 2.18]	0.166	0.663	0.275
CD3HLA-DR% LPh	3.8 [3.5; 7.0]	4.2 [3.5; 10.8]	6.4 [4.7; 9.5]	0.494	0.427	0.066
CD3HLA-DR abs	135 [108; 203]	95 [53; 204]	120 [80; 182]	0.534	0.544	0.543
NKT% LPh	2.6 [1.8; 4.1]	2.7 [1.1; 3.6]	2.9 [1.7; 4.8]	0.757	0.095	0.545
NKT abs	104 [62; 126]	44 [19.3; 61.0]	54 [32; 86]	0.047	0.133	0.222

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически достоверные различия.

Показатели малых популяций лимфоцитов у детей с БВ в зависимости от возраста

Популяция	Группы по возрасту			Уровень достоверности		
	6–8 лет (n = 7)	9–11 лет (n = 17)	Старше 12 лет (n = 50)	p1–2	p2–3	p1–3
Treg% LPh	4.4 [4.0; 5.0]	4.4 [3.6; 4.9]	4.2 [3.4; 5.3]	0.951	0.903	0.896
Treg abs	140 [102; 189]	91 [62; 119]	79 [63; 110]	0.005	0.563	0.001
Thact% LPh	3.1 [2.2; 6.5]	7.5 [5.3; 9.8]	7.3 [5.5; 9.2]	0.028	0.994	0.013
Thact abs	84 [70; 216]	154 [104; 191]	136 [88; 182]	0.644	0.770	0.677
Th2% LPh	1.0 [0.9; 1.2]	0.4 [0.3; 0.5]	0.7 [0.5; 1.01]	0.095	0.042	0.235
Th2abs	31 [21; 42]	7 [5; 10]	12 [9,0; 15,0]	0.194	0.119	0.059
Th17% LPh	4.4 [3.8; 6.4]	8.2 [6.6; 10.1]	9.6 [7.0; 12.9]	0.003	0.126	0.000
Th17abs	144 [119; 210]	147 [120; 183]	164 [134; 225]	0.852	0.232	0.527
B1% CD19	34.45 [27.05; 46.15]	27.3 [25.35; 34.7]	38.7 [17.2; 47.5]	0.266	0.910	0.293
B1abs	222 [116; 284]	59 [36; 129]	59 [37; 116]	0.053	0.819	0.010
B2% CD19	65.55 [53.85; 72.95]	72.7 [65.3; 74.65]	61.3 [52.50; 82.80]	0.866	0.007	0.154
B2abs	338 [187; 550]	240 [98; 281]	135 [98; 203]	0.142	0.034	0.007

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически достоверные различия.

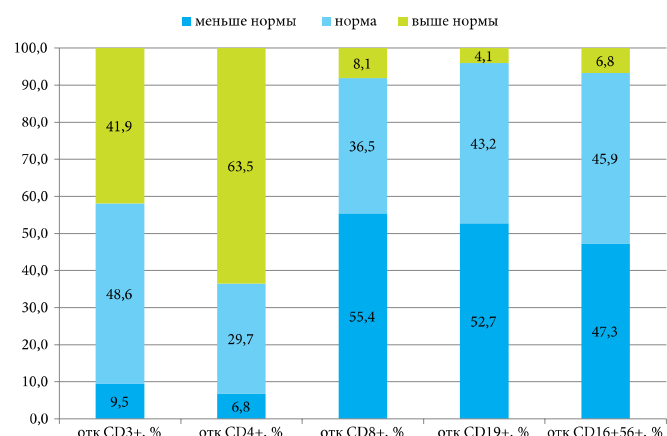


Рис. 1. Распределение пациентов с БВ в зависимости от индивидуальных отклонений основных популяций лимфоцитов

Получено достоверное увеличение процентного содержания Thact и Th17 с возрастом, а доля Treg и Th2, B1 и B2-лимфоцитов не зависела от возраста. Наблюдалось изменение соотношения B1 и B2-субпопуляций: увеличение количества B2 (%CD19) и снижение количества B1 (%CD19) с возрастом. Абсолютное количество Treg, B1- и B2-лимфоцитов достоверно снижалось с возрастом пациентов (табл. 2).

Показатели содержания популяций лимфоцитов у детей с БВ в основном соотносятся с возрастными референсными значениями здоровых детей, тем не менее отмечен значительный разброс индивидуальных показателей. Для выявления наиболее типичных изменений популяций лимфоцитов у детей с БВ мы провели анализ индивидуальных отклонений от возрастных нормативных диапазонов.

Наиболее частым изменением у детей с БВ было повышение уровня Т-клеток в 42% наблюдений за счет популяции Т-хелперов (64%), при этом в 55% случаев отмечалось снижение процента цитотоксических Т-лимфоцитов. Содержание В-клеток и NK-клеток в 50% наблюдений было снижено и в 43–46% находилось в пределах референсных значений. Стоит отметить небольшой процент пациен-

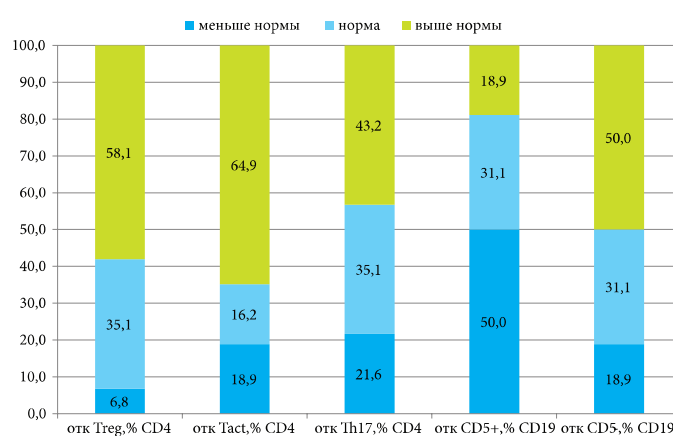


Рис. 2. Распределение пациентов с БВ в зависимости от индивидуальных отклонений малых популяций лимфоцитов

тов с повышением содержания В-лимфоцитов, NK-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов в 4,1; 6,8 и 8,1% случаев соответственно (рис. 1).

При анализе малых популяций лимфоцитов у детей с БВ показано, что содержание Treg повышено у 58%, Thact – у 65% и Th17 – у 43% пациентов (рис. 2). У половины пациентов наблюдалось изменение субпопуляционного состава В-клеток: снижение процента B1- и увеличение B2-лимфоцитов (процент от CD19+).

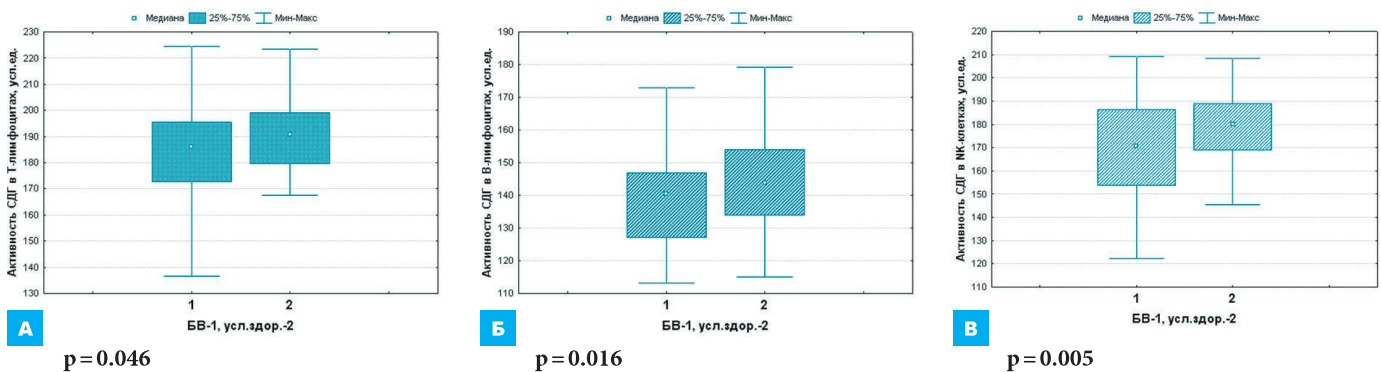
Исследование активности дегидрогеназ лимфоцитов у детей с БВ выявило снижение активности ферментов вне зависимости от возраста. При этом степень снижения ферментов была разной: СДГ в среднем на 27%, НАДН-ДГ – на 16%. ЛДГ – на 36% от показателей условно здоровых детей. Стоит отметить, что снижение активности дегидрогеназ (продукта ферментной реакции) обусловлено снижением площади ферментной реакции, а не оптической плотности гранул (табл. 3).

Исследование активности СДГ в Т-, В-лимфоцитах и NK-клетках выявило достоверное снижение активности фермента во всех основных популяциях у детей с БВ относительно группы сравнения (рис. 3).

Показатели активности дегидрогеназ лимфоцитов у детей с БВ и в группе сравнения (усл. ед.)

Фермент	Показатель активности	Болезнь Вильсона – Коновалова	Группа сравнения	Достоверность
СДГ	Оптическая плотность общая	0.42 [0.32; 0.52]	0.42 [0.39; 0.45]	0.816
	Площадь ферментной реакции	10.5 [8.9; 12.2]	13.9 [13.3; 14.9]	0.000
	Продукт ферментной реакции	743 [649; 942]	1025 [961; 1085]	0.000
НАДН-ДГ	Оптическая плотность общая	0.39 [0.29; 0.48]	0.39 [0.35; 0.42]	0.659
	Площадь ферментной реакции	10.3 [8.1; 13.3]	12.7 [11.7; 13.4]	0.001
	Продукт ферментной реакции	728 [623; 855]	867 [791; 972]	0.000
ЛДГ	Оптическая плотность общая	0.32 [0.24; 0.4]	0.33 [0.32; 0.35]	0.247
	Площадь ферментной реакции	6.6 [5.1; 8.0]	9.3 [8.5; 10]	0.000
	Продукт ферментной реакции	367 [303; 456]	579 [447; 671]	0.000

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически достоверные различия.



Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически достоверные различия.

Рис. 3. Активность СДГ в популяциях Т- (А), В-лимфоцитах (Б) и НК-клетках (В) у детей с БВ и в группе сравнения

Прямой зависимости активности СДГ от возраста детей с БВ выявлено не было. Тем не менее большой разброс показателей активности ферментов позволяет предположить, что изменение активности связано с тяжестью заболевания на момент обследования. Были проанализированы изменения активности СДГ и количественные характеристики малых популяций лимфоцитов в зависимости от стадии фиброза печени у детей с БВ.

Анализ показал увеличение абсолютного количества Treg при F0 и F1 стадиях фиброза. С увеличением стадии фиброза печени содержание Treg достоверно снижается и на стадиях F2–3 и F4 не превышает возрастных нормативных показателей (рис. 4 А). Абсолютное количество Th17-лимфоцитов в 38% случаев было выше возрастных нормативных показателей, однако достоверной зависимости от стадии фиброза выявлено не было (рис. 4 Б). Наибольшее количество пациентов с повышенным содержанием Th17 выявлено на стадиях F2–3 фиброза печени.

Активность СДГ в популяции Treg достоверно снижается с увеличением стадии фиброза печени и при стадии F4 достоверно ниже показателей условно здоровых детей (рис. 4 В), в то время как активность СДГ в Th17-лимфоцитах при всех стадиях фиброза соответствует значениям показателя у здоровых детей (рис. 4 Г).

Обсуждение

Выявлена зависимость показателей клеточного иммунитета от возраста детей с БВ. В результате анализа получены характерные особенности субпопуляционного состава лимфоцитов – повышение содержания Т-клеток вследствие популяции Т-хелперов при снижении цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и НК-клеток на фоне повышения Thact, Th17-лимфоцитов и Treg.

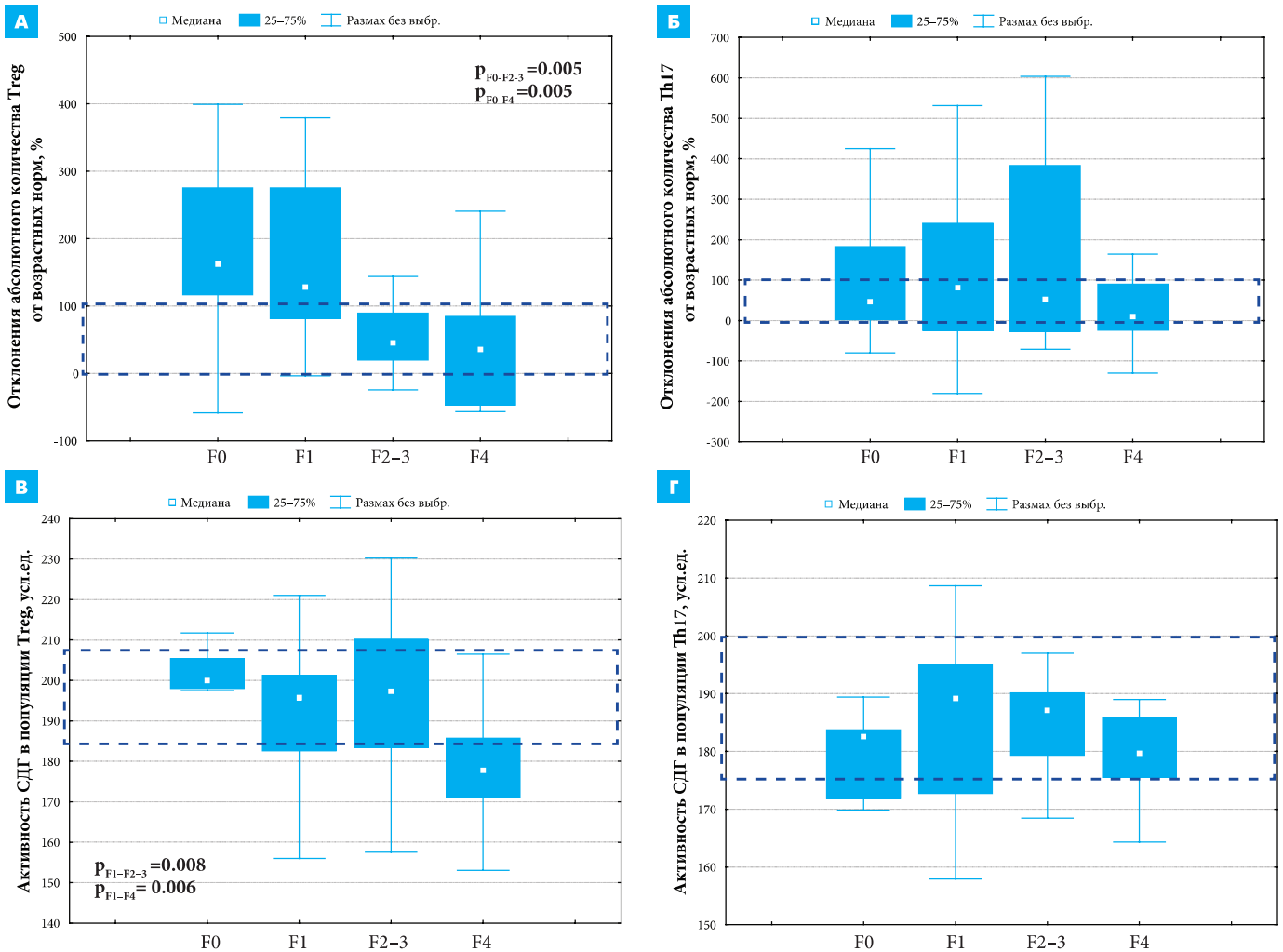
Динамика изменений основных популяций лимфоцитов повторяет таковую у условно здоровых детей, тем не менее отмечены отклонения многих показателей от возрастных нормативных значений [22].

Выявленные особенности субпопуляционного состава лимфоцитов у детей с БВ свидетельствуют о вовлеченности Т-клеточного звена иммунитета в процесс фиброза печени, как это показано при других заболеваниях печени. В частности сообщалось, что различные стадии фиброза при неалкогольной жировой печени сопровождаются накоплением в тканях печени субпопуляций Т-клеток и НК-клеток с различными функциями и фенотипами, что обычно приводит к провоспалительным эффектам [23].

Считается, что Th17-лимфоциты вызывают развитие фиброза печени при различных заболеваниях [24]. Нами не было отмечено прямой зависимости содержания Th17 и стадии фиброза печени, однако наибольшее количество пациентов с повышенным содержанием Th17 выявлено на стадиях F2–3 фиброза печени, при которых происходят самые активные воспалительные процессы в паренхиме печени.

У детей с БВ выявлено снижение активности ферментов энергетического метаболизма в лимфоцитах крови как окислительного фосфорилирования, так и гликолиза, что согласуется с данными S. Dev о наличии митохондриальной дисфункции в клетках печени при БВ [5]. Вероятно, что повышенная концентрация меди приводит к снижению метаболической активности во всех клетках организма, включая иммунокомпетентные.

Известно, что изменение метаболизма иммунокомпетентных клеток напрямую влияет на выполнение ими своих функций [9–12]. В нашей работе продемонстрировано, что



Примечание. Диапазон нормативных значений выделен пунктиром.

Рис. 4. Содержание Treg и Th17-лимфоцитов и активность СДГ в них при разных стадиях фиброза печени у детей с БВ.

повышенное содержание Treg-клеток сопровождалось снижением активности СДГ (ключевого митохондриального фермента) в них. Вероятно, снижение активности СДГ приводит к снижению супрессорной функции Treg, что обуславливает дисбаланс иммунного ответа и неспособность организма контролировать воспалительные процессы в печени.

С учетом накопленных знаний о метаболизме клеток иммунной системы мы считаем необходимым исследовать не только количественные характеристики клеток, но и их функциональную активность. Это открывает перед исследователями перспективы поиска способов коррекции митохондриальных дисфункций и теоретической возможности замедления течения процессов фиброза печени и, соответственно, улучшения качества жизни у детей с болезнью Вильсона – Коновалова. В частности, предложен вариант коррекции митохондриальных нарушений с помощью применения омега-3 жирных кислот, рассматриваются перспективы использования статинов для лечения гиперлипидемии [25].

Заключение

Показатели активности дегидрогеназ и субпопуляционного состава лимфоцитов могут быть использованы в качестве дополнительных критериев оценки степени фиброза пече-

ни у детей с БВ. При относительно умеренных изменениях количественных характеристик клеточного иммунитета существенное влияние на функциональную активность популяций лимфоцитов могут оказывать изменения метаболизма. Выявленные нарушения ферментного статуса лимфоцитов вносят вклад в понимание патогенеза формирования фиброза печени и определяют необходимость поиска возможной фармакологической коррекции выявленных иммунологических и метаболических нарушений у детей с БВ.

Литература

1. Фисенко А.П. и др. Болезнь Вильсона у детей. – М: НМИЦ здоровья детей. – 2019. – С. 84. [Fisenko A.P. et al. Wilson's disease in children. – Moscow: National Medical Research Center for Child Health. – 2019. – P. 84. In Russian].
2. Lu Z.K. et al. Phenotypes and ATP7B gene variants in 316 children with Wilson disease // Zhonghua Er Ke Za Zhi. – 2022. – V. 60. – № 4. – P. 317–322. DOI: 10.3760/cma.j.cn112140-20210827-00708.
3. Salman H.M. et al. Biochemical testing for the diagnosis of Wilson's disease: A systematic review // J. Clin. Lab. Anal. – 2022. – V. 36. – №. 2. – P. e24191. DOI: 10.1002/jcla.24191.

4. Przybyłkowski A. et al. Evaluation of liver fibrosis in patients with Wilson's disease // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2021. – V. 33. – № 4. – P. 535–540. DOI: 10.1097/MEG.0000000000001754.
5. Dev S. et al. Wilson Disease: Update on Pathophysiology and Treatment // *Fron. Cell Dev. Biol.* – 2022. – V. 10 – № 871877. – P. 1–8. DOI: 10.3389/fcell.2022.871877.
6. Roehlen N. et al. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives // *Cells.* – 2020. – V. 9. – № 4. – P. 875. DOI: 10.3390/cells9040875.
7. Курбатова О.В. и др. Особенности Т-клеточного звена иммунитета у детей с гликогеновой болезнью // *Российский иммунологический журнал.* – 2014. – Т. 8. – № 3. – С. 331–334. [Kurbatova O.V. et al. Characteristics of the T-cell immunity in children with glycogen storage disease // *Russian Journal of Immunology.* – 2014. – V. 8. – № 3. – P. 331–334. In Russian].
8. Курбатова О.В. и др. Особенности иммунного статуса у детей с болезнью Вильсона-Коновалова при разных стадиях фиброза печени // *Российский иммунологический журнал.* – 2022. – Т. 25. – № 4. – С. 453–460. [Kurbatova O.V. et al. Features of immune status in children with Wilson–Konovalov disease at different stages of liver fibrosis // *Russian Journal of Immunology.* – 2022. – V. 25. – № 4. – P. 453–460. In Russian]. DOI: 10.46235/1028-7221-1193-FOI.
9. Angajala A. et al. Diverse roles of mitochondria in immune responses: novel insights into immunometabolism // *Front. Immunol.* – 2018. – V. 9. – № 1605. – P. 1–19. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01605.
10. Ron-Harel N. et al. Mitochondrial metabolism in T cell activation and senescence: a mini-review // *Gerontology.* – 2015. – V. 61. – № 2. – P. 131–138. DOI: 10.1159/000362502.
11. Steinert E.M. et al. Mitochondrial metabolism regulation of t cell-mediated immunity // *Annu. rev. immunol.* – 2021. – V. 39. – P. 395–416. DOI: 10.1146/annurev-immunol-101819-082015.
12. Faas M.M. de Vos P. Mitochondrial function in immune cells in health and disease // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis. Dis.* – 2020. – V. 1866. – № 10. – P. 1–13. DOI:10.1016/j.bbadis.2020.165845.
13. Кольман Я. и др. Наглядная биохимия. – М.: Бином. Лаб. знаний. – 2011. – С. 469. [Kolman J. et al. Visual biochemistry. – Moscow: Binom. Lab. knowledge. – 2011. – P. 469. In Russian].
14. Петричук С.В. и др. Способ измерения митохондриальной активности лимфоцитов. – Патент на изобретение RU 2302635 C1, 10.07.2007. – Заявка № 2005141145/15 от 28.12.2005. [Petrichuk S.V. et al. Method for measuring the mitochondrial activity of lymphocytes. – Patent for invention RU 2302635 C1, 10.07.2007. – Application No. 2005141145/15 dated 12/28/2005. In Russian].
15. Радыгина Т.В. и др. Количественное определение ферментов дыхательной цепи лимфоцитов методом мультиплексного анализа // *Российский иммунологический журнал.* – 2017. – Т. 11 (20). – № 4. – С. 753–755. [Radygina T.V. et al. Quantification of lymphocyte respiratory chain enzymes by multiplex analysis // *Russian Journal of Immunology.* – 2017. – V.11 (20). – № 4. – P. 753–755. In Russian].
16. Voss K. et al. A guide to interrogating immunometabolism // *Nat. rev. Immunol.* – 2021. – V. 21. – № 10. – P. 637–652. DOI: 10.1038/s41577-021-00529-8.
17. Комах Ю.А. и др. Метаболическая терапия прогнозируемых осложнений у иммунокомпроментированных реципиентов перед повторной трансплантацией роговицы // *Российский иммунологический журнал.* – 2021. – Т. 24. – № 4. – С. 495–500. [Komakh Yu.A. et al. Metabolic therapy of predicted complications in immunocompromised recipients before repeated corneal transplantation // *Russian Journal of Immunology.* – 2021. – Vol. 24. – № 4. – P. 495–500. In Russian]. DOI: 10.46235/1028-7221-1076-МТО.
18. Бойко А.Н. и др. Роль митохондрий в реализации патологических механизмов врожденного иммунитета при рассеянном склерозе // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* – 2020. – Т. 120. – № 7–2. – С. 32–37. [Boyko A.N. et al. The role of mitochondria in pathological mechanisms of innate immunity in multiple // *Journal of Neurology and Psychiatry.* С.С. Korsakov. – 2020. –V.120. – № 7–2. – P. 32–37. In Russian]. DOI:10.17116/jnevro202012007232.
19. Кокolina В.Ф. и др. Иммунология детского возраста. Практическое руководство по детским болезням. – М.: Медпрактика. – 2006. – Т. 8. – С. 432. [Kokolina V.F. et al. Immunology of childhood // A practical guide to childhood diseases. – M.: Medpraktika. – 2006. – V. 8. – P. 432. In Russian].
20. Кулебина Е.А. и др. Валидация показателей транзитной эластографии для оценки стадии фиброза печени у детей // *Лечащий Врач.* – 2020. – № 8. – С. 57–60. DOI: 10.26295/OS.2020.26.84.009.
21. Хайдуков С.В. и др. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» // *Российский иммунологический журнал.* – 2014. – Т. 8. – № 4 (17). – С. 974–992. [Khaydukov S.V. The Standardized technology: "Study of the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes using flow cytofluorometer-analyzers" // *Russian Journal of Immunology.* – 2014. – V. 8. – № 4 (17). – P. 974–992. In Russian].
22. Топтыгина А.П. и др. Изменение уровня субпопуляций Т-регуляторных клеток и Т-хелперов 17 в периферической крови здоровых людей в зависимости от возраста // *Медицинская иммунология.* – 2017. – Т. 19. – № 4. – С. 409–420. [Toptygina A.P. et al. Age-dependent changes of T-regulatory and Th17 subset levels in peripheral blood from healthy humans // *Medical Immunology.* – 2017. – V. 19. – № 4. – P. 409–420. In Russian]. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-409-420.
23. Gebru Y.A. et al. T Cell Subsets and Natural Killer Cells in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – № 12190. – P. 1–15. DOI: 10.3390/ijms22212190.
24. Li N. et al. Interleukin-17 in Liver Disease Pathogenesis // *Semin. liver dis.* – 2021. – V. 41. – № 4. – P. 507–515. DOI: 10.1055/s-0041-1730926.
25. Cooper J. et al. Liver Disease: Nonalcoholic Fatty Liver Disease // *FP essentials.* – 2021. – V. 511. – P. 29–35.