

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ В-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

Будкова А.И.¹, Лапин С.В.¹, Серебрякова М.К.^{2,3}, Кудрявцев И.В.^{1,3},
Тришина И.Н.⁴, Маслянский А.Л.⁴, Тотолян Арег А.^{1,5}

¹ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. При многих системных ревматических заболеваниях, сопровождающихся поликлональной гиперреактивностью В-лимфоцитов, наблюдаются изменения в В-клеточных субпопуляциях. У пациентов с системными ревматическими заболеваниями иммуносупрессивная и цитостатическая терапия также избирательно влияет на субпопуляции В-клеток. Мы исследовали субпопуляции В-клеток у больных системными ревматическими заболеваниями во время их лечения цитостатиками. Мы проанализировали В-клеточные фенотипы у 99 больных с системными ревматическими заболеваниями: 25 с системной красной волчанкой, 27 с системной склеродермией, 47 с синдромом Шегрена, проходивших лечение в стационаре. Группу контроля составили 49 здоровых доноров. Измерение фенотипов В-клеточных субпопуляций проводилось с помощью проточного цитофлуометра (Beckman Coulter, США). «Наивные» В-клетки у больных системной красной волчанкой, получавших циклофосфан, были снижены по сравнению с группой контроля, в то время как плазмобласты были повышены, независимо от терапии.

В-клеточная популяция является гетерогенной по своей природе, именно поэтому каждую В-клеточную субпопуляцию при системных ревматических заболеваниях необходимо рассматривать как самостоятельную функциональную единицу. Несмотря на проводимую иммуносупрессивную терапию у пациентов с системной красной волчанкой, уровень плазмобластов, активно вырабатывающих антитела, оставался высоким. Таким образом, терапия, направленная на определенные В-клеточные субпопуляции, способна увеличить эффективность лечения больных системными ревматическими заболеваниями.

Ключевые слова: системные ревматические заболевания, проточная цитометрия, субпопуляции В-лимфоцитов

Адрес для переписки:

Будкова Анна Игоревна
ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени
академика И.П. Павлова» Министерства
здравоохранения РФ
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого,
6-8, корп. 28.
Тел.: 8 (965) 018-97-58.
E-mail: annajbm@hotmail.com

Address for correspondence:

Budkova Anna I.
Pavlov First St. Petersburg State Medical University
197022, Russian Federation, St. Petersburg, L. Tolstoy str.,
6-8, Bldg 28.
Phone: 7 (965) 018-97-58.
E-mail: annajbm@hotmail.com

Образец цитирования:

А.И. Будкова, С.В. Лапин, М.К. Серебрякова,
И.В. Кудрявцев, И.Н. Тришина, А.Л. Маслянский,
Арег А. Тотолян «Субпопуляционный состав в-клеток
периферической крови у больных системной красной
волчанкой» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2.
С. 175–184. doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-175-184
© Будкова А.И. и соавт., 2017

For citation:

A.I. Budkova, S.V. Lapin, M.K. Serebriakova, I.V. Kudryavtsev,
I.N. Trishina, A.L. Maslyansky, Areg A. Totolian “B-cell
subpopulations of peripheral blood in systemic lupus erythematosus”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2017, Vol. 19, no. 2, pp. 175–184.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-175-184
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-2-175-184

B-CELL SUBPOPULATIONS OF PERIPHERAL BLOOD IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Budkova A.I.^a, Lapin S.V.^a, Serebriakova M.K.^{b, c}, Kudryavtsev I.V.^{a, c}, Trishina I.N.^d, Maslyansky A.L.^d, Totolian Areg A.^{a, e}

^a Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, St. Petersburg, Russian Federation

^c Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^d Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

^e St. Petersburg L. Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Distinct changes of B-cell subpopulations are observed in most systemic rheumatic diseases associated with polyclonal B cell hyperreactivity. Immunosuppressive and cytostatic therapy may also differentially influence B lymphocyte subsets in these. We studied subpopulations of B cells in systemic rheumatic patients along treatment with cytostatics. We analyzed B cell phenotypes in ninety-nine blood samples from the patients with systemic lupus erythematosus (SLE, n = 25), systemic sclerosis (n = 27), Sjogren's syndrome (n = 47) in the course of their hospital treatment. Control group consisted of 49 healthy blood donors. Phenotyping of blood B-cell subpopulations was performed by means of flow cytometry (Beckman Coulter, USA). Na^{ve} B-cell subpopulations in SLE patients who underwent cyclophosphan treatment, were under-represented, if compared with normal control group, whereas plasmablast levels were increased irrespectively of medication mode.

B cell population exhibits a natural heterogeneity, thus making it necessary to analyze distinct B cell subpopulations as independent functional units, when studying different rheumatic diseases. The levels of plasmablasts which are active antibody producers, remain high, despite immunosuppressive therapy performed in SLE. Thus, therapy targeted against certain B cell subsets, could be able to provide a more effective treatment for the patients with systemic rheumatic diseases.

Keywords: systemic rheumatic diseases, flow cytometry, B-lymphocyte subpopulations

Введение

Аутоиммунные реакции – это патологические процессы, основой которых служит самоподдерживающийся иммунный ответ на собственные антигены организма, что приводит к повреждению клеток, экспрессирующих эти аутоантигены [3, 6, 7]. Аутоиммунные реакции лежат в основе многих заболеваний человека, в развитии которых участвуют как клеточный, так и гуморальный компоненты [11]. Долгое время считалось, что Т-клетки могут играть ведущую роль в патогенезе большинства аутоиммунных заболеваний, тогда как значение В-клеток сводилось лишь к синтезу аутореактивных антител. Современные данные указывают, что в развитии аутоиммунных патологических состояний роль В-лимфоцитов существенна, что связано с их участием в презентации аутоантигенов, синтезе и секреции провоспалительных цитокинов [4], образовании экопических герминативных центров и регуляции иммунного ответа в целом [5, 16].

Как в красном костном мозге, так и во вторичных лимфоидных органах В-лимфоциты представлены разнообразными популяциями клеток. Даже в периферической крови присутствует несколько субпопуляций В-клеток, которые находятся на разных стадиях созревания и различаются по своей миграционной способности, уровню

активации и спектру выполняемых функций при реализации защитных реакций организма [20, 28]. После прохождения антиген-независимой дифференцировки в красном костном мозге, завершающей стадией которой является проверка способности клетки к переключению класса синтезируемых антител (появление IgD на плазматической мембране), В-лимфоцит перемещается в периферическую кровь [10]. При этом клетка приобретает фенотип IgD^{dim}CD38^{low} и обозначается как Vm1 (“virgin naive”) В-клетка. С момента контакта со специфическим АГ начинается антиген-зависимая стадия развития В-клеток, для прохождения которой В-лимфоциту необходимо мигрировать в В-клеточные фолликулы периферических лимфоидных органов. Такие Vm2-клетки, или «активированные “наивные” клетки» (фенотип IgD^{dim}CD38^{dim}), покидают кровяное русло и перемещаются вглубь фолликула, превращаясь в Vm2'-клетки или клетки-предшественники герминативного (зародышевого) центра (фенотип IgD^{dim}CD38^{hi}). В дальнейшем они дифференцируются в клетки герминативного центра – Vm3-центробласты, которые, подвергаясь соматическим гипермутациям в Ig-вариабельных участках генов, трансформируются в Vm4-центроциты, экспрессирующие высокоаффинные антитела (обе популяции обладают

фенотипом IgD^{low}CD38^{hi} и в периферической крови обнаруживаются в очень малом количестве). Часть клеток последней из упомянутых популяций способна к формированию В-клеток памяти, тогда как другая часть популяции Vm4 превращается в плазмобласты. Обе эти субпопуляции характеризуются высокой экспрессией CD27. Параллельно на этой стадии дифференцировки снижается способность к экспрессии IgD на поверхности клеток, так как в зародышевом центре имело место переключение класса синтезируемых антител с IgM на IgG, IgA или IgE. Именно поэтому одна из применяемых в настоящее время классификаций В-клеток базируется на оценке уровней экспрессии IgD и CD27. Ее применение позволяет выявить следующие популяции В-лимфоцитов: «наивные» клетки (IgD^{dim}CD27^{low}) и клетки памяти, которые еще не переключили (“unswitched” IgD^{dim}CD27^{dim}) или уже переключили (“switched” IgD^{low}CD27^{dim}) класс синтезируемых антител [13].

При системных ревматических заболеваниях (СРЗ), сопровождающихся гаммаглобулинемией и поликлональной активацией В-лимфоцитов, наблюдаются значительные изменения в В-клеточных субпопуляциях. Например, у пациентов с первичным синдромом Шегрена (СШ) отмечено снижение Vm1-клеток [9]. Показано, что у детей, больных системной красной волчанкой (СКВ), содержание «наивных» В-клеток и клеток памяти на 90 % снижено, тогда как плазмобластов в 3 раза больше, независимо от активности заболевания и тактики лечения [8]. Обострения СКВ могут коррелировать с выходом в кровотоки большого количества плазмобластов [23].

Иммуносупрессивная терапия ревматических заболеваний биологическими и базисными препаратами также влияет на популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов. Обнаружено значимое снижение транзиторных и «наивных» В-клеток под влиянием метотрексата у больных ювенильным идиопатическим артритом [15]. Терапия ритуксимабом у больных СКВ приводит к быстрому сокращению популяций «наивных» В-клеток и клеток памяти [17], а длительное использование белимумаба ведет к сокращению числа плазмобластов [19].

Чтобы проанализировать характер изменений субпопуляций В-клеток при СКВ, а также влияние базовых иммуносупрессивных препаратов (циклофосфана), методом проточной цитофлуориметрии были исследованы субпопуляции В-лимфоцитов у больных, не получавших биологическую терапию и находившихся на лечении в ревматологическом отделении многопрофильного стационара.

Материалы и методы

Были обследованы 25 больных с СКВ (23 женщины, 2 мужчин) в возрасте от 18 до 65 лет, про-

ходивших лечение в СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова с 2014 по 2015 г. Диагнозы устанавливались на основе общепризнанных международных критериев [25].

Группу контроля составили 49 здоровых доноров (28 женщин, 21 мужчина) в возрасте 35-62 лет. В качестве группы сравнения были обследованы 27 больных с системной склеродермией (ССД) и 47 больных с СШ. Из базовой иммуносупрессивной терапии 32% (n = 8) больных СКВ получали последние 3 месяца циклофосфан, 100% (n = 25) – глюкокортикоиды. Венозная кровь здоровых доноров и больных СРЗ была получена путем пункции периферической вены и собрана в вакуумные пробирки с добавлением К₃ЭДТА. Все исследования проводились в день взятия крови. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили согласно рекомендациям, изложенным Байдун Л.А. и соавт. [1]. Для выявления популяции В-лимфоцитов периферической крови использовали антитела против CD45 и CD19. Для анализа распределения В-лимфоцитов по основным субпопуляциям применяли антитела против поверхностных IgD, CD38 и CD27. В работе использовали антитела производства Beckman Coulter (США). Окраску антителами производили в соответствии с рекомендациями производителя. Подбор оптимальных комбинаций антител и конъюгированных с ними флуорохромов производили в соответствии с принципами, изложенными в литературе [2,21]. Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США). Для каждого из образцов анализировали не менее 10 000 одиночных В-лимфоцитов. Удаление слипшихся клеток из зоны анализа производили на основании оценки соотношения пикового и интегрального сигналов по параметрам прямого и бокового светорассеяния для каждой из клеток.

На рисунке 1 представлены варианты классификации В-клеток в зависимости от экспрессии поверхностных маркеров.

Полученные результаты по содержанию субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови выражали в абсолютном значении (клетки/мкл). Все статистические исследования были проведены с помощью непараметрических методов программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США). Для сравнения субпопуляций В-клеток между исследуемыми нозологиями и группой

контроля был использован критерий Краскела–Уоллиса, а для оценки влияния преимущественной иммуносупрессивной терапии на содержание субпопуляций В-клеток у больных СКВ – критерий Манна–Уитни. Таким образом, было исследовано влияние циклофосфана на субпопуляции В-клеток у больных СКВ. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Мы исследовали содержание различных субпопуляций В-клеток у больных СКВ, ССД, СШ и группы контроля, а также влияние на В-клеточные субпопуляции базисной иммуносупрессивной терапии циклофосфаном

у больных СКВ. Полученные данные касаются изменений только абсолютного количества В-клеток и представлены в данном разделе статьи и таблице 1.

С использованием подхода, основанного на выявлении субпопуляций В-клеток, различающихся по экспрессии поверхностного IgD и CD38 [27] было показано, что количество Vm1-клеток достоверно снижено у больных СКВ по сравнению с контролем ($p < 0,0001$), независимо от терапии циклофосфаном (рис. 2А). Vm2-клетки достоверно ниже у больных СКВ по сравнению с больными ССД, независимо от наличия терапии, и группой контроля ($p < 0,01$) (рис. 2Б). Также было отмечено влияние терапии циклофосфаном на Vm2-субпопуляцию ($p = 0,0003$).

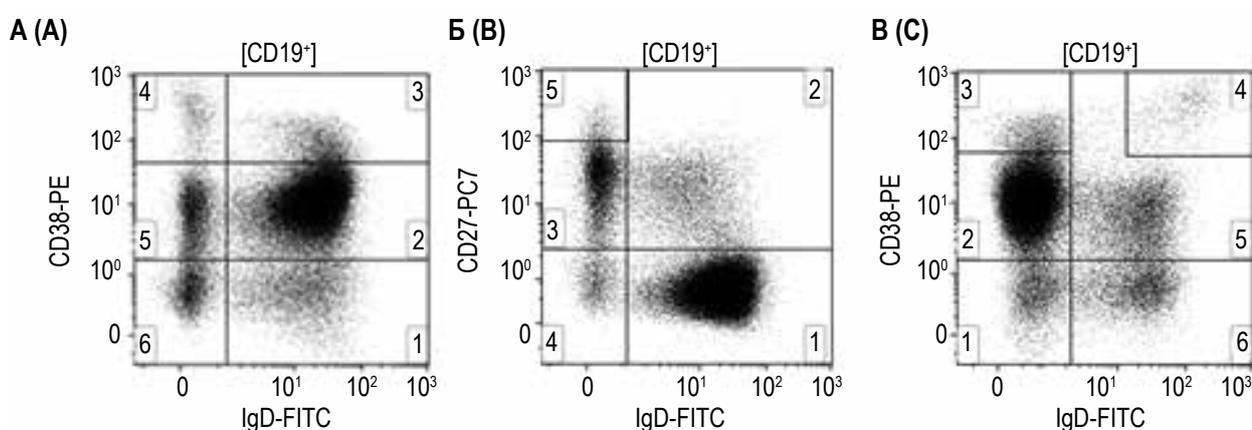


Рисунок 1. Выявление основных субпопуляций В-клеток периферической крови на основании коэкспрессии IgD и CD38 (гистограмма А), IgD и CD27 (гистограмма Б), а также CD27 и CD38 (гистограмма В)

Примечание. Гистограмма А: по оси абсцисс – экспрессии поверхностного IgD, по оси ординат – экспрессии CD38. Популяция 1 – Vm1, “virgin naïve” В-клетки с фенотипом $IgD^{dim}CD38^{low}$, 2 – активированные «наивные» клетки Vm2 с фенотипом $IgD^{dim}CD38^{dim}$, 3 – клетки-предшественники герминативного (зародышевого) центра Vm2 с фенотипом $IgD^{dim}CD38^{hi}$, 4 – популяция центробластов Vm3 и centrocytes Vm4 с фенотипом $IgD^{low}CD38^{hi}$, 5 и 6 – «ранние» eVm5 и поздние Vm5 В-клетки памяти с фенотипами $IgD^{low}CD38^{dim}$ и $IgD^{low}CD38^{low}$ соответственно.

Гистограмма Б: по оси абсцисс – экспрессии поверхностного IgD, по оси ординат – экспрессии CD27. Популяция 1 – «наивные» клетки ($IgD^{dim}CD27^{low}$), 2 и 3 – клетки памяти, которые еще не переключили (“unswitched” $IgD^{dim}CD27^{dim}$) или уже переключили (“switched” $IgD^{low}CD27^{dim}$) класс синтезируемых антител, 4 – плазмобласты с фенотипом $IgD^{low}CD27^{hi}$, 5 – «дважды-негативные» В-клетки памяти с фенотипом $IgD^{low}CD27^{low}$.

Гистограмма В: по оси абсцисс – экспрессии CD27, по оси ординат – экспрессии CD38. Популяция 1 – «дважды-негативные» клетки с фенотипом $CD27^{low}CD38^{low}$, 2 – зрелые «наивные» В-клетки с фенотипом $CD27^{dim}CD38^{low}$, 3 – транзиторные В-клетки с фенотипом $CD27^{low}CD38^{hi}$, 4 – плазмобласты с фенотипом $CD27^{hi}CD38^{hi}$, 5 – активированные зрелые В-клетки с фенотипом $CD27^{dim}CD38^{dim}$, 6 – покоящиеся В-клетки памяти с фенотипом $CD27^{dim}CD38^{low}$.

Figure 1. Detection of main peripheral B cell populations based on IgD and CD38 (histogram A), IgD and CD27 (histogram B), as well as CD27 and CD38 expression (histogram C)

Note. Histogram A: abscissa, surface IgD expression; ordinate, CD38 expression. Population 1, Bm1, virgin naïve B cells with $IgD^{dim}CD38^{low}$ phenotype; 2, activated naïve Bm2 cells with $IgD^{dim}CD38^{dim}$ phenotype; 3, precursor cells from the germinal centre (Bm2) with $IgD^{dim}CD38^{hi}$ phenotype; 4, centroblastic population Bm3 and centrocytes (Bm4) with $IgD^{low}CD38^{hi}$ phenotype; 5 and 6, early eBm5 and late Bm5 B memory cells with, respectively, $IgD^{low}CD38^{dim}$ and $IgD^{low}CD38^{low}$ phenotypes.

Histogram B: Histogram B: abscissa, surface IgD expression; ordinate, CD27 expression; Population 1, naïve cells ($IgD^{dim}CD27^{low}$); 2 and 3, memory cells (“unswitched” $IgD^{dim}CD27^{dim}$), or cells re-switched to the antibody production (“switched” $IgD^{low}CD27^{dim}$); 4, plasmoblasts with $IgD^{low}CD27^{hi}$ phenotype; 5, double-negative memory B cells with $IgD^{low}CD27^{low}$ phenotype.

Histogram C: abscissa, CD27 expression; ordinate, CD38 expression. Population 1, double-negative cells with $CD27^{low}CD38^{low}$ phenotype; population 2, mature naïve B cells with $CD27^{dim}CD38^{low}$ pattern; population 3, transitory B cells with $CD27^{low}CD38^{hi}$ phenotype; population 4, plasmoblasts with $CD27^{hi}CD38^{hi}$ phenotype; population 5, activated mature B cells with $CD27^{dim}CD38^{dim}$ pattern; population 6, resting memory B cells with $CD27^{dim}CD38^{low}$ phenotype.

Для более детального анализа В-клеток, прошедших антиген-зависимую дифференцировку в периферических лимфоидных органах, мы использовали подход, предложенный Mahnke Y.D. [21], в основе которого находился анализ уровней экспрессии поверхностного IgD и CD27, последний из которых рассматривается в качестве основного маркера клеток памяти. Количество IgD^{dim}CD27^{low} «наивных» В-клеток было достоверно снижено у больных СКВ по сравнению с группой контроля и больными ССД, независимо от наличия терапии ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно) (рис. 2В).

У больных СКВ, независимо от терапии, оказалось достоверно выше содержание IgD^{low}CD27^{hi} В-клеток, т.е. плазмобластов, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$) (рис. 2Д). Достоверных различий между больными СКВ с терапией циклофосфаном и без не получено.

Уровень клеток с фенотипом IgD^{dim}CD27^{dim}, отличающим клетки памяти, еще не переключивших класс синтезируемых антител в ходе антиген-зависимой дифференцировки и несущие на своей поверхности IgD, оказался достоверно ниже у больных СКВ по сравнению с контролем ($p < 0,01$). Прием циклофосфана не оказывал существенного влияния на количество «непереключенных» клеток памяти.

Также для анализа субпопуляционного состава В-клеток периферической крови нами оценивались уровни экспрессии CD27 и CD38 [26]. Снижение «наивных» В-клеток с фенотипом CD27^{low}CD38^{dim} было выявлено у больных СКВ по сравнению с контролем и больными СШ, независимо от терапии ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно) (рис. 2Г). Было обнаружено снижение данной субпопуляции у больных СКВ под действием терапии циклофосфаном ($p < 0,05$).

Независимо от проводимой терапии, у группы больных СКВ достоверно выше уровень плазмобластов с фенотипом CD27^{hi}CD38^{hi} при сравнении с группой контроля ($p < 0,001$) (рис. 2Е). В случае терапии циклофосфаном достоверных отличий между больными с терапией циклофосфаном и больными без нее, а также контрольной группой не выявлено.

Обсуждение

При аутоиммунных патологических состояниях отмечаются выраженные изменения субпопуляционного состава В-лимфоцитов периферической крови, функциональная активность которых тесно связана с тяжестью течения таких заболеваний, как СКВ, РА, ССД, рассеянный склероз и сахарный диабет 1 типа [30]. Понимание динамики изменений субпопуляций В-клеток и их роли в патогенезе аутоиммунных заболеваний позволит выработать более эффективную стратегию ведения таких пациентов. Мы исследовали

В-клеточные субпопуляции у больных системными ревматическими нарушениями (СШ, ССД, СКВ), а также оценили потенциальное влияние иммуносупрессивной базисной терапии (циклофосфан) на их содержание при СКВ.

Все три «тактики гейтирования» основных субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови, примененные в ходе данного исследования, показали, что у больных СКВ в циркуляции достоверно снижаются В-клетки «наивных» фенотипов – Vm2 (IgD^{dim}CD38^{dim}), IgD^{dim}CD27^{low} и «наивные» зрелые клетки CD38^{dim}27^{low}. Выявлено, что циклофосфан оказывает существенное влияние на уровень этих клеток в крови больных СКВ. Высокую экспрессию CD38 рассматривают в качестве маркера активации В-лимфоцитов и регуляции плазматических клеток [29]. Наличие на поверхности IgD (фенотип IgD^{dim}CD27^{dim}) указывает на то, что данная популяция клеток памяти еще не переключила класс синтезируемых антител, а клетки называют «непереключенные» В-клетки, которые синтезируют только IgD.

Влияние циклофосфана на субпопуляционный состав В-клеток отмечено и в зарубежных исследованиях. Исследовательская группа из госпиталя Шарите обнаружила, что у пациентов с СКВ, получавших более интенсивную терапию (азатиоприн, циклофосфан и циклоспорин), наблюдалось достоверное снижение CD27^{low} «наивных» В-клеток ($p = 0,0008$) [18]. Подробный механизм действия циклофосфана в отношении субпопуляций В-клеток остается не изученным. В одной из работ было высказано предположение о том, что влияние циклофосфана на сокращение пула «наивных» В-клеток связано с особой чувствительностью субпопуляции к данному цитостатику [14].

Также было отмечено достоверное повышение IgD^{low}CD27^{hi} и CD27^{hi}CD38^{hi} плазмобластов у больных СКВ, независимо от наличия терапии, по сравнению с группой контроля. Влияния терапии циклофосфаном на данную субпопуляцию отмечено не было. Так как при аутоиммунных заболеваниях часто наблюдается гиперпродукция аутоантител, не удивительно, что был обнаружен высокий уровень предшественников плазматических клеток, функция которых заключается в выработке антител в ходе дальнейшей дифференцировки [12]. В таком случае плазмобласты могут являться потенциальной мишенью терапии. При изучении влияния циклофосфана на клеточные и серологические параметры не было обнаружено значимых изменений в уровне плазмобластов после 15-недельного курса данного цитостатика. Была выявлена корреляционная взаимосвязь между уровнем плазмобластов и активностью заболевания по шкале SLEDAI 2k ($r = 0,1547$, $p = 0,0350$) [14]. Однако, несмотря на резистентность предшественников плазматических клеток к цитостатику, активность заболевания снизи-

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ТЕРАПИИ ЦИКЛОФОСФАНОМ НА ИЗМЕНЕНИЕ АБСОЛЮТНОГО СОДЕРЖАНИЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ В-КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ (КЛЕТКИ/МКЛ) У БОЛЬНЫХ СКВ [Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})]
TABLE 1. INFLUENCE OF CYCLOPHOSPHAN THERAPY ON CHANGES IN B-CELL SUBPOPULATIONS OF THE SLE PATIENTS' PERIPHERAL BLOOD (ABSOLUTE B-CELL COUNT PER MICROLITER) [Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})]

Субпопуляции В-клеток B-cell subpopulations	Циклофосфан (ц) Cyclophosphan (c)		Контроль Control group (n = 49)	Достоверность различий, p Statistical significance, p
	СКВ ц+ SLE c+ (n = 8)	СКВ ц- SLE c- (n = 17)		
	1	2		
Bm1 (IgD ^{dim} CD38 ^{low})	0,14 (0,06; 0,42)	0,48 (0,25; 0,96)	1,51 (1,04; 1,84)	p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ < 0,001
Bm2 (IgD ^{dim} CD38 ^{low})	0,85 (0,5; 2,66)	4,23 (3,23; 6,40)	6,99 (4,84; 9,38)	p ₁₋₂ = 0,042 p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,013
Плазмобласты Plasmablasts (IgD ^{low} CD27 ^{hi})	0,04 (0,02; 0,08)	0,08 (0,04; 0,10)	0,02 (0,01; 0,05)	p ₂₋₃ = 0,002
«Наивные» "Naive" (IgD ^{dim} CD27 ^{low})	0,74 (0,29; 4,13)	5,10 (2,97; 7,59)	7,69 (5,19; 10,8)	p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,046
Клетки памяти Memory cells IgD ^{dim} D27 ^{dim}	0,39 (0,09; 0,92)	0,99 (0,21; 1,5)	1,67 (1,1; 2,4)	p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,004
«Наивные» зрелые "Naive" mature CD27 ^{low} CD38 ^{dim}	0,94 (0,35; 2,8)	3,80 (2,15; 6,24)	6,424 (4,3; 8,7)	p ₁₋₂ = 0,048 p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,029
Плазмобласты Plasmablasts (CD27 ^{hi} CD38 ^{hi})	0,04 (0,02; 0,08)	0,07 (0,03; 0,13)	0,02 (0,01; 0,02)	p ₂₋₃ < 0,001

Примечание. СКВ – системная красная волчанка; ц – циклофосфан; «+» и «-» – наличие или отсутствие терапии; Me – медиана; n – количество.

Note. SLE, systemic lupus erythematosus; c, cyclophosphan; «+» and «-», presence or absence of therapy; Me, median; n, number.

лась при лечении циклофосфаном согласно шкале SLEDAI 2k (до терапии 14 [2-30] баллов, после терапии 12 [0-18] баллов, p = 0,0019) [14]. В другом исследовании немецкой научной группы терапия азатиоприном, циклофосфаном и циклоспорином никак не повлияла на плазмобласты у больных СКВ. Также была отмечена корреляция между уровнем плазмобластов и активностью заболевания (r = 0,2618, p = 0,0433) [18].

Изменения были обнаружены и в субпопуляции В-клеток памяти. Было отмечено снижение созревания клеток памяти с фенотипом IgD^{dim}CD27^{dim}. Данные литературы указывают на то, что у больных с синдромом Шегрена образованные в герминативном центре CD27^{dim}IgD^{low} В-клетки памяти остаются в слюнных железах. Их количество, наряду с CD27^{dim}IgD^{dim} В-клетками памяти, пропорционально уменьшено в периферической крови, что совпадает и с полученными нами результатами [24]. В ходе собственного исследования влияния терапии на сокращение IgD^{dim}CD27^{dim} В-клеток памяти обнаружено не было. Аналогичные результаты были получены и другой группой исследователей, которым также

не удалось выявить изменений в субпопуляциях IgD^{dim}CD27^{dim} и CD27^{dim}IgD^{low} клеток памяти после 15-недельных курсов циклофосфамида [14]. Хотя в рамках еще одного исследования у больных СКВ под действием циклофосфамида, азатиоприна и циклоспорины CD27^{dim} В-клетки памяти были достоверно снижены (p = 0,0209) [26]. Наглядные изменения субпопуляций В-клеток у больных СКВ, независимо от наличия терапии, приведены на рисунке 3.

В настоящее время в лечении аутоиммунных заболеваний активно используются биологические препараты, в частности ритуксимаб и белимумаб. Ритуксимаб – моноклональные антитела против антигена CD20, который экспрессируется на поверхности В-клеток вплоть до клеток памяти и теряется у плазмобластов. Применение ритуксимаба в качестве терапии СКВ до сих пор остается спорным в связи с различными данными о его эффективности [22]. Тем не менее ритуксимаб рекомендован Европейской антиревматической лигой в качестве препарата при волчаночном нефрите, трудно поддающемуся лечению. Белимумаб представляет собой человеческие

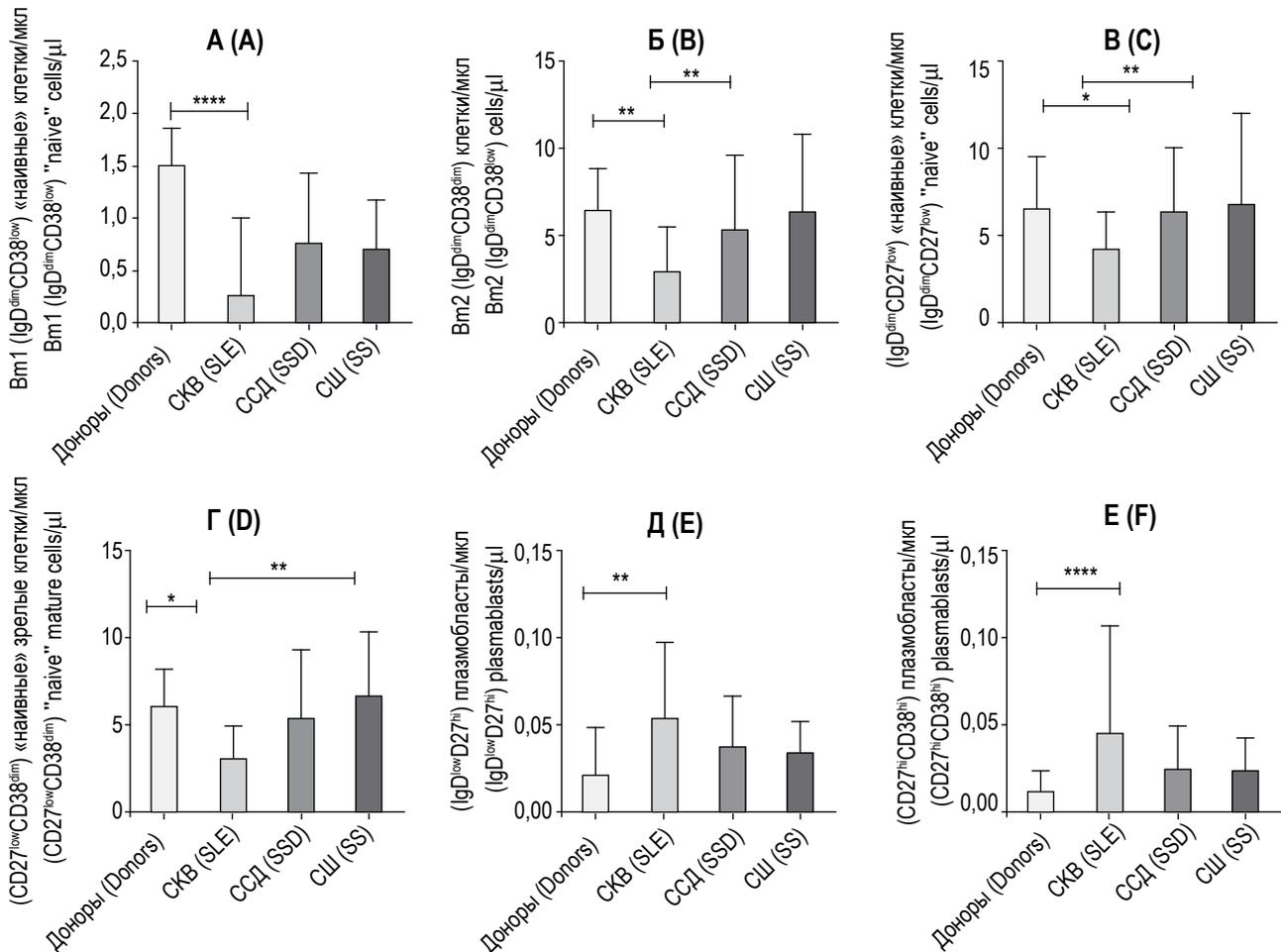


Рисунок 2. Субпопуляционный состав В-клеток периферической крови больных СКВ, ССД, СШ, независимо от наличия терапии, и группы контроля на основании коэкспрессии IgD и CD38 (гистограммы А, Б), IgD и CD27 (гистограммы В, Д), а также CD27 и CD38 (гистограммы Г, Е)

Примечание. А, Б – сравнение субпопуляций Bm1-, Bm2-клеток больных СКВ с субпопуляциями Bm1-, Bm2-клеток группы контроля и больных ССД и СШ.

В – сравнение субпопуляции 27-vs-IgD «наивных» клеток больных СКВ с субпопуляцией 27-vs-IgD «наивных» клеток группы контроля и больных ССД и СШ.

Г – сравнение субпопуляции 27-vs-38 «наивных» клеток больных СКВ с субпопуляцией 27-vs-38 «наивных» клеток группы контроля и больных ССД и СШ.

Д – сравнение субпопуляции 27-vs-IgD плазмобластов больных СКВ с субпопуляцией 27-vs-IgD плазмобластов группы контроля и больных ССД и СШ.

Е – сравнение субпопуляции 27-vs-38 плазмобластов больных СКВ с субпопуляцией 27-vs-38 плазмобластов группы контроля и больных ССД и СШ.

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; **** – $p < 0,0001$.

Figure 2. Subpopulation profile of peripheral blood B cells in SLE, SSD, SS independently on therapy, and control group, as based on IgD/CD38 co-expression (histograms A, B), IgD and CD27 (histograms C and D), as well as CD27 and CD38 (histograms E, F).

Note. A, B, Comparisons between Bm1, Bm2 cells in SLE patients with Bm1, Bm2 subpopulations in control groups, SSD and SS patients.

C, Comparisons between 27-vs-IgD "naïve" cells in SLE patients with 27-vs-IgD "naïve" cells in control groups, SSD and SS patients.

D, Comparisons between 27-vs-38 "naïve" cells in SLE patients with 27-vs-38 "naïve" cells in control groups, SSD and SS patients.

E, Comparisons between 27-vs-IgD plasmablasts in SLE patients with 27-vs-IgD plasmablasts in control groups, SSD and SS patients.

F, Comparisons between 27-vs-38 plasmablasts in SLE patients with 27-vs-38 plasmablasts in control groups, SSD and SS patients.

*, the difference is significant by $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.001$.

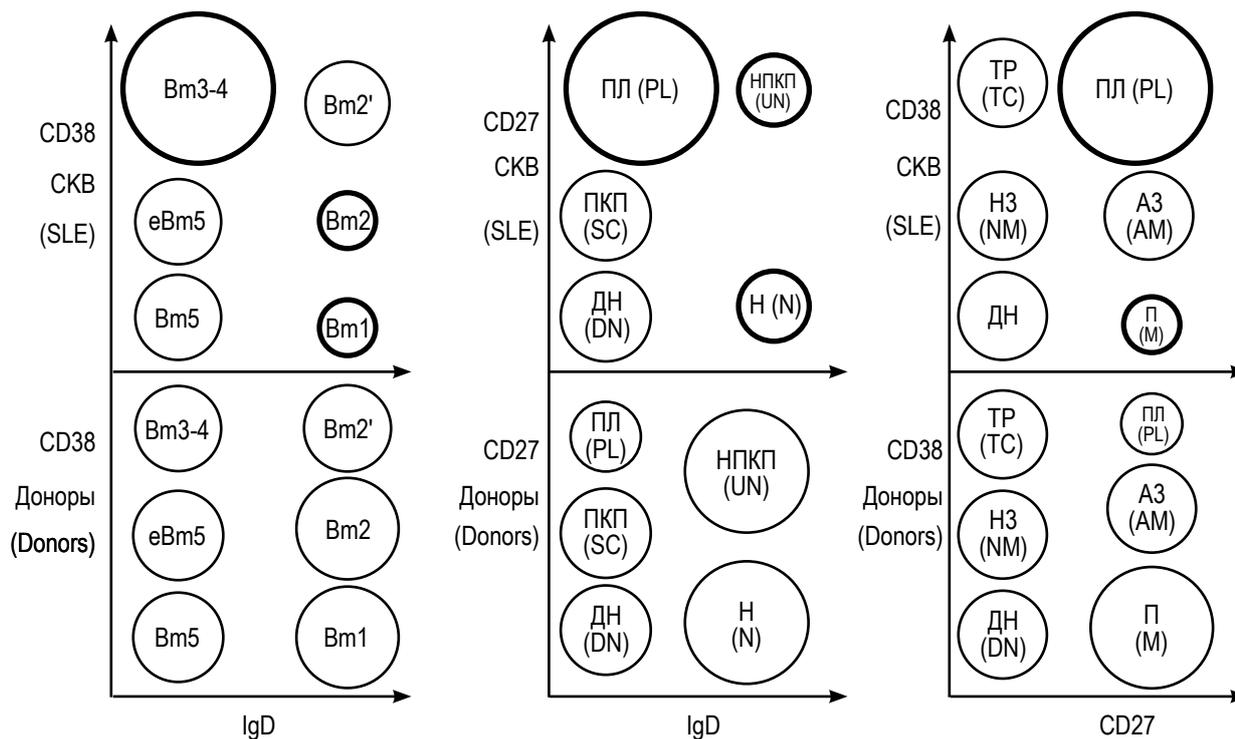


Рисунок 3. Сравнение В-клеточных субпопуляций между больными СКВ и донорами

Примечание. Размер круга отражает численность субпопуляций, увеличение толщины контура – изменение относительно группы контроля.

ПЛ – плазмобласты; П – В-клетки памяти; ПКП – «переключенные» В-клетки памяти; НПКП – «непереключенные» В-клетки памяти; ДН – двойные негативные клетки; Н – «наивные» клетки; НЗ – «наивные» зрелые клетки; ТР – транзиторные клетки; АЗ – активированные зрелые.

Figure 3. Comparison of B cell subpopulations in SLE patients and normal donors

Note. The circle diameter depicts a subpopulation size. Thicker contours mean significant changes against control group. PL, plasmoblasts; M, memory B cells; SC, "switched" memory B cells; UN, "non-switched" memory B cells; DN, double-negative cells; N, "naïve" cells; NM, "naïve" mature cells; TC, transition cells; AM, activated mature cells.

моноклональные антитела против BLys (стимулятора роста и пролиферации В-лимфоцитов). Однако к данному препарату плазмобласты тоже мало чувствительны.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при аутоиммунных заболеваниях патогенетические механизмы заболеваний и терапия приводят к сдвигам в содержании субпопуляций В-клеток. Однако необходимо отметить отсутствие влияния базисных препаратов у больных СКВ в отношении повышенного числа такой субпопуляции, как плазмобласты, вырабатывающей в большом количестве антитела. Учи-

тывая максимально двухнедельный срок жизни плазмобластов и отсутствие экспрессии CD20 антигена на их поверхности, возникает вопрос об актуальности базисной терапии и терапии ритуксимабом. Следовательно, необходимо продолжить изучение клинической значимости терапии, направленной против В-клеток. Использование в качестве мишени иммуносупрессивной терапии определенных субпопуляций В-клеток, возможно, является одним из перспективных способов достижения скорой и длительной ремиссии.

Список литературы / References

1. Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А., Хайдуков С.В. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением Проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С.255-268. [Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A., Khaydukov S.V. Standardized technology "Peripheral blood Lymphocyte subpopulations by using of flow cytometry-analizators" (proect). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. [In Russ.] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2012-3-255-268>
2. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестцветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V.,

Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp.19-26. [In Russ.] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-19-26>

3. Лазарева Н.М., Лапин С.В., Мазинг А.В., Булгакова Т.В., Иливанова Е.П., Маслянский А.Л., Тотолян А.А. Оптимизация комплекса серологических методов диагностики системных заболеваний соединительной ткани // Клиническая лабораторная диагностика, 2011. № 12. С. 12-17. [Lazareva N.M., Lapin S.V., Mazing A.V., Bulgakova T.V., Ilivanova E.P., Maslyansky A.L., Totolian A.A. Optimization of serological diagnostic methods of connective tissue diseases. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2011, no. 12, pp. 12-17. [In Russ.]

4. Маслянский А.Л., Пенин И.Н., Чешуина М.Д., Тришина И.Н., Новикова А.Н., Колесова Е.П., Лазарева Н.М., Мазинг А.В., Лапин С.В., Малышкин К.А., Сысоев К.А., Мазуров В.И., Конради А.О., Назаров П.Г. Общие закономерности продукции цитокинов и хемокинов у больных диффузными заболеваниями соединительной ткани, воспалительными артропатиями и атеросклерозом // Цитокины и воспаление, 2014. Т. 13, № 3. С. 9-21. [Maslyanskiy A.L., Penin I.N., Cheshuina M.D., Trichina I.N., Novikova A.N., Kolesova E.P., Lazareva N.M., Mazing A.V., Lapin S.V., Malishkin K.A., Sysoev K.A., Mazurov V.I., Konradi A.O., Nazarov P.G. Common consistent patterns of the cytokine and chemokine production in patients with diffuse connective tissue diseases, inflammatory arthropathies and atherosclerosis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2014, Vol. 13, no. 3, pp. 9-21. [In Russ.]

5. Насонов Е. Л., Соловьев С. К. Перспективы применения моноклональных антител к В-лимфоцитам (ритуксимаб) при воспалительных ревматических заболеваниях // Научно-практическая ревматология, 2007. № 1. С. 4-8. [Nasonov E.L., Solovyev S.K. Perspectives of monoclonal anti-B lymphocyte antibodies (rituximab) administration in inflammatory rheumatic diseases. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2007, no. 1, pp. 4-8. [In Russ.]

6. Созина А.В., Неустроева Ю.А., Тихомирова Т.А., Лапин С.В. Сочетанная встречаемость аутоантител у больных с диффузными болезнями соединительной ткани // Медицинская иммунология, 2007. Т. 9, № 1. С. 61-68. [Sozina A.V., Neustroeva U.A., Tihomirova T.A., Lapin S.V. Coincidence of autoantibodies among patients with diffuse connective tissue disorders. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2007, Vol. 9, no. 1, pp. 61-68. [In Russ.] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2007-1-61-68>

7. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. С. 354-479. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010, pp. 354-479.

8. Arce E., Jackson D.G., Gill M.A., Bennett L.B., Banchereau J., Pascual V. Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*, 2001, Vol. 8, p. 167.

9. Binard A., Le Pottier L., Devauchelle V., Saraux A., Youinou P., Pers J.O. Is the blood B-cell subset profile diagnostic for Sjögren syndrome? *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2009, Vol. 68, p. 447.

10. Bohnhorst J.Q., Björgran M.B., Thoen J.E., Natvig J.B., Thompson K.M. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *The Journal of Immunology*, 2001, Vol. 10, p. 167.

11. Cancro M.P., Hao Y., Scholz J.L., Riley R.L., Frasca D., Dunn-Walters D.K., Blomberg B.B. B cells and aging: molecules and mechanisms. *Trends Immunol.*, 2009, Vol. 30, no. 7, pp. 313-318.

12. Dörner T., Jacobi A.M., Lipsky P.E. B cells in autoimmunity. *Arthritis Research & Therapy*, 2009, Vol. 11, no. 5, p. 247.

13. Duchamp M. B-cell subpopulations in children: national reference values. *Immunity, Inflammation and Disease*, 2014, Vol. 11, pp. 131-140.

14. Fassbinder T., Saunders U., Mickholz E., Jung E., Becker H., Schlüter B., Jacobi A.M. Differential effects of cyclophosphamide and mycophenolate mofetil on cellular and serological parameters in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, 2015, Vol. 17, no. 1, p. 92.

15. Glaesener S., Quách T.D., Onken N., Weller-Heinemann F., Dressler F., Huppertz H.I., Thon A., Meyer-Bahlburg A. Distinct effects of methotrexate and etanercept on the b cell compartment in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 2014, Vol. 66, no. 9, pp. 2590-2600.

16. Hampe C.S. B cells in autoimmune diseases. *Scientifica*, 2012, Vol. 9, pp. 1-18.

17. Iwata S., Saito K., Tokunaga M., Yamaoka K., Nawata M., Yukawa S., Hanami K., Fukuyo S., Miyagawa I., Kubo S., Tanaka Y. Phenotypic changes of lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus who are in longterm remission after B cell depletion therapy with rituximab. *The Journal of Rheumatology*, 2011, Vol. 38, no. 4, pp. 633-641.

18. Jacobi A.M., Odendahl M., Reiter K., Bruns A., Burmester G.R., Radbruch A., Valet G., Lipsky P.E., Dörner T. Correlation between circulating cd27high plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 2003, Vol. 48, no. 5, pp. 1332-1342.

19. Jacobi A.M., Weiqing W.H., Tao, Freimuth W., Inaki S., Furie R., Mackay M., Aranow C., Diamond B., Davidson A. The effect of prolonged treatment with belimumab on b cells in human SLE. *Arthritis & Rheumatology*, 2010, Vol. 62, no. 1, pp. 201-210.

20. Leandro M.J. B-cell subpopulations in humans and their differential susceptibility to depletion with anti-CD20 monoclonal antibodies. *Arthritis Research & Therapy*, 2013, Vol. 15, Suppl 1, S3.

21. Mahnke Y.D., Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clinics in Laboratory Medicine*, 2007, Vol. 27, pp. 469-485.

22. Mariele Gatto, Emese Kiss, Yaakov Naparstek, and Andrea Doria. In-/off-label use of biologic therapy in systemic lupus erythematosus. *BMC Medicine*, 2014, Vol. 12, p. 30.

23. Odendahl M., Keitzer R., Wahn U., Hiepe F., Radbruch A., Dörner T., Bunikowski R. Perturbations of peripheral b lymphocyte homeostasis in children with systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2003, Vol. 62, pp. 851-858.

24. Pers J.O., Youinou P. Are the B cells cast with the leading part in the Sjögren's syndrome scenario? *Oral Diseases*, 2014, Vol. 20, no. 6, pp. 529-537.

25. Petri M., Orbai A.M., Alarcon G.S., Gordon C., Merrill J.T., Fortin P.R., et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology*, 2012, Vol. 64, no. 8, pp. 2677-2686.
26. Prak Luning E.T., Ross J., Sutter J., Sullivan K.E. Age-related trends in pediatric B-cell subsets. *Pediatric and Developmental Pathology*, 2011, Vol. 14, no. 1, pp. 45-52.
27. Sanz I., Wei C., Lee F.E., Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Seminars in Immunology*, 2008, Vol. 20, no. 1, pp. 67-82.
28. Vale A.M., Kearney J.F., Nobrega Alberto, Schroeder H.W. Molecular biology of B cells. 3rd ed. 2015, pp. 99-119.
29. Vences-Catalan F., Santos-Argumedo L. CD38 Through the life of a murine B lymphocyte. *IUBMB Life*, 2011, Vol. 63, no. 10, pp. 840-846.
30. Yanaba K., Bouaziz J.D., Matsushita T., Magro C.M., St. Clair E.W., Tedder T.F. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunological Reviews*, 2008, Vol. 223, no. 6, pp.284-299.

Авторы:

Будкова А.И. — врач-интерн клиники факультетской терапии, младший научный сотрудник лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний, Научно-методический Центр по молекулярной медицине ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Лапин С.В. — к.м.н., заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний, Научно-методический центр по молекулярной медицине ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Серебрякова М.К. — инженер, Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики; научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Тришина И.Н. — врач-ревматолог, отделение ревматологии ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Маслянский А.Л. — к.м.н., старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории ревматологии ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Budkova A.I., Junior Research Associate, Laboratory for Diagnostics of Autoimmune Diseases, Center for Molecular Medicine, Pavlov First St. Petersburg State Medical University; Internship Doctor of Therapy Clinic, Center for Molecular Medicine, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Lapin S.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory for Diagnostics of Autoimmune Diseases, Center for Molecular Medicine, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Serebriakova M.K., Engineer, St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics; Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Assistant Professor, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Trishina I.N., Rheumatologist, Department of Rheumatology, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Maslyansky A.L., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Laboratory of Rheumatology, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, St. Petersburg Pasteur Institute; Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 22.11.2016
Принята к печати 24.11.2016

Received 22.11.2016
Accepted 24.11.2016