

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616-002.77-092:612.017.11-076.5-073.537

Супоницкая Е.В., Алексанкин А.П., Александрова Е.Н., Авдеева А.С., Панафидина Т.А., Верижников Ж.Г., Насонов Е.Л.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ В-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРОМЕТРИИ У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И БОЛЬНЫХ РЕВМАТИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

ФГБУ «Научно-исследовательский институт ревматологии» РАМН им. В.А. Насоновой, 115522, Москва

Цель – использовать методику проточной цитофлуорометрии для иммунофенотипирования субпопуляций В-клеток периферической крови у здоровых лиц и больных ревматическими заболеваниями (РЗ).

В периферической крови 27 здоровых доноров, 16 пациентов с ревматоидным артритом (РА) и 9 пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) изучали относительное количество CD19⁺ В-клеток, общей популяции В-клеток памяти (CD19⁺CD27⁺); непереключенных (CD19⁺IgD⁺CD27⁺) и переключенных (CD19⁺IgD⁻CD27⁺) В-клеток памяти, наивных (CD19⁺IgD⁺CD27⁻) и транзиторных (CD19⁺IgD⁺CD10⁺CD38⁺⁺CD27⁻) В-клеток, плазмобластов (CD19⁺CD38⁺⁺⁺IgD⁻CD27⁻CD20⁺) и долгоживущих плазматических клеток (CD19⁺CD138⁺). Субпопуляции В-клеток определялись методом многоцветной проточной цитофлуорометрии с использованием панели моноклональных антител к поверхностным мембранным маркерам В-лимфоцитов.

В норме относительное количество (медиана – Ме; интерквартильный размах 25–75 процентиля) CD19⁺ В-лимфоцитов составило 9,1 (6,6–11,6)%; CD19⁺CD27⁺ В-клеток памяти – 2,2 (1,6–3,3)%; непереключенных и переключенных В-клеток памяти – 10 (6,4–12,7) и 17,7 (14,9–27,0)%; наивных В-клеток – 65,8 (55,1–73,4)%; транзиторных – 0,1 (0,1–0,3)%; плазмобластов – 7,0 (5,0–9,4)%. Долгоживущие плазматические клетки в периферической крови отсутствовали. У больных РА процентное содержание общей популяции В-клеток памяти было ниже, чем у доноров (1,6; 1,00–2,3%, $p=0,038$). При СКВ отмечено уменьшение количества наивных В-клеток (40,2; 19,7–58,2) и повышение уровня переключенных В-клеток памяти (34,2; 21,0–52,7) по сравнению с донорами ($p=0,003$ в обоих случаях). Достоверных различий в остальных субпопуляциях В-лимфоцитов между здоровыми донорами и пациентами с РА и СКВ не обнаружено ($p>0,05$).

Разработанную методику многопараметрической проточной цитофлуорометрии можно рекомендовать для изучения гомеостаза В-клеток периферической крови у здоровых лиц и больных аутоиммунными РЗ, а также для оценки и прогнозирования эффективности анти-В-клеточной терапии.

Ключевые слова: проточная цитофлуорометрия; CD19⁺ В-клетки; В-клетки памяти; наивные В-клетки; транзиторные В-клетки; плазмобласты; долгоживущие плазматические клетки; ревматоидный артрит; системная красная волчанка.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60(6): 30–33.

Suponitskaia E.V., Aleksankin A.P., Aleksandrova E.N., Avdeeva A.S., Panafidina T.A., Verijnikova J.G., Nasonov E.L.

THE IDENTIFICATION OF SUB-POPULATIONS OF B-LYMPHOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD USING TECHNIQUE OF FLOW CYTOFLUOROMETRY IN HEALTHY INDIVIDUALS AND PATIENTS WITH RHEUMATOID DISEASES

The V.A. Nasonova research institute of rheumatology of the Russian academy of medical sciences, 115522 Moscow, Russia

The study was carried out to apply technique of flow cytofluorometry for immunofenotyping of sub-populations of B-cells of peripheral blood in healthy persons and patients with rheumatoid diseases. The samples included 27 healthy donors, 16 patients with rheumatoid arthritis and 9 patients with systemic lupus erythematosus. The peripheral blood of all participants was analyzed for relative number of CD19⁺ B-cells, total population of memory B-cells (CD19⁺CD27⁺); unswitched (CD19⁺IgD⁺CD27⁺) and switched (CD19⁺IgD⁻CD27⁺) memory B-cells, naive (CD19⁺IgD⁺CD27⁻) and transitory (CD19⁺IgD⁺CD10⁺CD38⁺⁺CD27⁻) B-cells, plasmablasts (CD19⁺CD38⁺⁺⁺IgD⁻CD27⁻CD20⁺) and long-lived plasmatic cells (CD19⁺CD138⁺). The sub-populations of B-cells were identified by technique of multicolor flow cytofluorometry using panel of monoclonal antibodies to surface membrane markers of B-lymphocytes. In normal state, relative number (median-Me; interquartile range 25-75 percentiles) of CD19⁺ B-lymphocytes amounted to 9.1 (6.6-11.6)%; CD19⁺CD27⁺ memory B-cells - 2.2 (1.6-3.3)%; unswitched and switched memory B-cells - 10 (6.4-12.7)% and 17.7 (14.9-27.0)%; naive B-cells - 65.8 (55.1-73.4)%; transitory B-cells - 0.1 (0.1-0.3)%; plasmablasts - 7.0 (5.0-9.4)%. The long-lived plasmatic cells in peripheral blood were absent. In patients with rheumatoid arthritis percentage of content of total population of memory B-cells were lower than in donors (1.6; 1.00-2.3%; $p=0.038$). Under systemic lupus erythematosus was detected decreasing of number of naive B-cells (40.2; 19.7-58.2) and increasing of level of switched memory B-cells (34.2; 21.0-52.7) as compared with donors ($p=0.003$ in both cases). The study established no reliable differences between healthy donors and patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in the rest of sub-populations of B-lymphocytes. The developed technique of multi-parametric flow cytofluorometry can be recommended for studying homeostasis of B-cells of peripheral blood in healthy persons and patients with auto-immune rheumatoid diseases and also for evaluating and forecasting effectiveness of anti-B-cells therapy.

Key words: flow cytofluorometry; CD19⁺ cells; memory B-cells; naive B-cells; transitory B-cells; plasmablast; long-lived plasmatic cells; rheumatoid arthritis; systemic lupus erythematosus

Citation: Klinicheskaja Laboratornaia Diagnostika. 2015; 60 (6): 30–33.

Для корреспонденции: Супоницкая Екатерина Валерьевна, ekaterina.s@mtu-net.ru

For correspondence: Suponitskaya E.V., ekaterina.s@mtu-net.ru

В последние годы понимание роли В-лимфоцитов в аутоиммунном воспалении при ревматических заболеваниях (РЗ) существенно изменилось. Стало известно, что В-клетки презентуют антигены Т-лимфоцитам, влияют на их активацию, участвуют в синтезе провоспалительных цитокинов и аутоантител [1–4].

Поликлональная активация В-клеток при аутоиммунных РЗ сопровождается нарушением гомеостаза В-лимфоцитов периферической крови [5] и выраженной экспансией CD27⁺ В-клеток памяти [6]. Мониторинг субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови все шире используется при назначении анти-В-клеточных препаратов у больных ревматоидным артритом (РА) и системной красной волчанкой (СКВ) для оценки эффективности лечения, а также выявления взаимосвязи показателей деплеции и восстановления субпопуляций В-клеток с ответом на проводимую терапию [7, 8].

Основным маркером, используемым для идентификации периферических В-лимфоцитов человека, является мембранный антиген CD19. По степени экспрессии других поверхностных маркеров (IgD, IgM, CD27, CD38, CD10) различают несколько субпопуляций В-клеток. Так, В-клетки памяти (CD19⁺CD27⁺) делятся на непереключенные (CD19⁺IgD⁺CD27⁺) и переключенные (CD19⁺IgD⁻CD27⁺) клетки. Отсутствие антигена CD27 характерно для наивных В-клеток (CD19⁺IgD⁺CD27⁻) [9]. По экспрессии CD38 в сочетании с IgD и CD10/CD24 можно отличить В-клетки на разных этапах созревания. Незрелые и транзиторные В-клетки (CD19⁺IgD⁺CD10⁺CD24⁺⁺CD38⁺⁺CD27⁻) характеризуются средней степенью экспрессии CD38 [5, 10]. Высокая степень экспрессии CD38 проявляется на конечной стадии дифференцировки В-клеток – у плазмочитов и плазмобластов (CD38⁺⁺⁺IgD⁻CD27⁻CD20⁻) [5, 11]. Долгоживущие плазматические клетки экспрессируют CD138 (CD19⁺IgD⁻CD38⁺⁺⁺CD138⁺) [11].

Однако результаты определения субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови в норме и при аутоиммунных РЗ достаточно противоречивы, зависят от групп больных и методических особенностей фенотипического анализа В-клеток.

Цель исследования – разработать методику проточной цитофлуориметрии для иммунофенотипирования субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови у здоровых лиц и больных РЗ.

Материалы и методы. Обследовано 27 здоровых доноров (24 женщины, 3 мужчины; возраст – медиана (Ме) – 42,1 года; интерквартильный размах (ИР) – 27,0–58,0 года) и 25 больных аутоиммунными РЗ (16 пациентов с РА и 9 – с СКВ). Больные с достоверным диагнозом РА (критерии ACR, 1987 г.) [12] (13 женщин и 3 мужчины; возраст 54 (43,5–62) года; продолжительность заболевания 10 (5–17,5) лет в большинстве случаев были серопозитивными по ревматоидному фактору (81%) и антителам к циклическому цитруллинированному

пептиду (81%), имели высокую клиническую (DAS28 – 5,2 (4,6–5,9) балла) и лабораторную активность заболевания (СОЭ – 44 (27–60) мм/ч; С-реактивный белок – 17,4 (7,3–40,1) мг/л), II функциональный класс (75,0%), рентгенологические изменения суставов II (37,5%) и III (37,5%) стадии. Внеуставные проявления отмечались у 11 пациентов. Больные РА получали базисные препараты, глюкокортикоиды и нестероидные противовоспалительные средства. Диагноз СКВ основывался на критериях SLICC/ACR [13]. В исследование вошли 8 женщин и 1 мужчина в возрасте 30 (27–29) лет с длительностью заболевания 5 (4–7) лет. Активность СКВ у 2 больных была высокой степени, у 5 – средней, индекс активности по шкале SELENA-SLEDAI составлял 8 (6–12) баллов [14]. Больным СКВ проводилась терапия преднизолоном (5–30 мг в сутки), плаквенилом (200–400 мг в сутки).

Кровь из локтевой вены в количестве 2,7 мл собирали в вакуумную пробирку с добавлением солей ЭДТА в концентрации 1,6 мг/мл (S-monovette, 2,7 ml КЗЕ; Sarstedt, Германия).

Для каждого донора (пациента) использовали три полипропиленовые пробирки Coulter (12×75 мм, Beckman Coulter, США), в которые вносили 100 мкл цельной крови с ЭДТА, добавляли 2 мл 2,5% раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) (Sigma, США) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) (Биолот, Россия) и центрифугировали 8 мин со скоростью 1360 об/мин при комнатной температуре. После удаления надосадка проводили повторную отмывку.

Имунофенотипирование В-лимфоцитов периферической крови, включая определение В-клеток (CD19⁺), общей популяции В-клеток памяти (CD19⁺CD27⁺), непереключенных (CD19⁺IgD⁺CD27⁺) и переключенных (CD19⁺IgD⁻CD27⁺) В-клеток памяти, наивных (CD19⁺IgD⁺CD27⁻), транзиторных (CD19⁺IgD⁺CD10⁺CD38⁺⁺CD27⁻) В-клеток, плазмобластов (CD19⁺CD38⁺⁺⁺IgD⁻CD27⁻CD20⁻) и долгоживущих плазматических клеток (CD19⁺CD138⁺), проводилось методом многоцветной проточной цитофлуориметрии. Использовались конъюгированные мышинные моноклональные антитела (мАТ): CD19-ЕCD (R Phycoerythrin-Texas Red®-X, IgG1, фикоэритрин техасский красный); CD45-PC7 (R Phycoerythrin Cyanin 7, IgG1, фикоэритрин цианин 7), CD38-PC5 (R Phycoerythrin Cyanin 5.1, IgG1, фикоэритрин цианин 5.1); CD20-PC5; CD138-PE (R-phycoerythrin, IgG1, фикоэритрин) (Beckman Coulter, США); CD10-PE (IgG1, H110a), CD27-PE (IgG1, MT271) (Becton Dickinson, США), а также человеческие мАТ: IgD-FITC (fluorescein isothiocyanate, IA62, флуоресцеинизотиоцианат) (Becton Dickinson, США). Изотипический (негативный) контроль проводился для определения границ неспецифического связывания рецепторов В-лимфоцитов с мАТ с помощью набора реагентов Simultest IMK Plus Kit (CD45-FITC, CD14-PE, CD3-FITC, CD19-PE, CD4-FITC, CD8-PE) и IgG1-FITC, IGG2a-PE (Becton Dickinson, США).

Таблица 1

Субпопуляции В-лимфоцитов периферической крови у здоровых доноров и пациентов с РА и СКВ

Показатель	Ме (ИР: 25–75), %		
	Доноры (n = 27)	РА (n = 16)	СКВ (n = 9)
CD19 ⁺ В-клетки	9,1 (6,6–11,6)	5,7 (3,1–10,7)	4,9 (3,3–10,3)
В-клетки памяти (общая популяция) CD19 ⁺ CD27 ⁺	2,2 (1,6–3,3)	1,6 (1,00–2,3)*	1,8 (1,3–2,4)
Непереключенные В-клетки памяти CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺	10 (6,4–12,7)	7,4 (3,5–10,4)	6,3 (1,6–10,5)
Переключенные В-клетки памяти CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁻	17,7 (14,9–27,0)	22,9 (16,4–42,3)	34,2 (21,0–52,7)**
Наивные В-клетки CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁺	65,8 (55,1–73,4)	58,7 (39,7–68,7)	40,2 (19,7–58,2)**
Транзиторные В-клетки CD19 ⁺ CD38 ⁺⁺ CD10 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁻	0,1 (0,1–0,3)	0,1 (0,05–0,2)	0,2 (0,1–0,3)
Плазмобласты CD19 ⁺ CD38 ⁺⁺⁺ CD27 ⁻ IgD ⁻ CD20 ⁻	7,0 (5,0–9,4)	4,3 (2,9–9,7)	3,0 (2,3–9,4)
Долгоживущие плазмочиты CD19 ⁺ CD138 ⁺⁺⁺	0,0–0,0	0,0–0,0	0,0–0,0

* – p < 0,05 по сравнению с донорами; ** – p < 0,005 по сравнению с донорами.

Таблица 2

Сравнение собственных результатов определения субпопуляций В-клеток периферической крови у здоровых доноров с данными исследования SMART [14]

Показатель	Собственные результаты (n = 27) Me (ИР)	Данные исследования SMART (n = 47) M ± SD
CD19 ⁺ В-клетки, %	9,1 (6,6–11,6)	12,8±5,2
Непереключенные В-клетки памяти CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ , %	10 (6,4–12,7)	9,9 ± 7,7
Переключенные В-клетки памяти CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ , %	17,7 (14,9–27,0)	23,1 ± 15,8
Наивные В-клетки CD19 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁺ , %	65,8 (55,1–73,4)	57,7 ± 20,1

К 100 мкл (1·10⁶ клеток) отмытых образцов крови добавляли 10 мкл меченных МАТ и инкубировали 15 мин при 4°С. Затем проводили лизис эритроцитов в 1 мл реагента VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter, США) с инкубацией в темноте в течение 10 мин. Клетки центрифугировали 8 мин при 1360 об/мин при комнатной температуре и после удаления надосадка дважды отмывали в 2 мл 2,5% БСА раствора в ФСБ, однократно – в 2 мл ФСБ. Оценку результатов пятицветного окрашивания В-клеток проводили на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). Для каждого анализа было подсчитано 50 000 событий. В-клеточные популяции идентифицировали с помощью программного обеспечения СХР (Beckman Coulter, США). При гейтировании по горизонтальной и вертикальной осям определяли процентное содержание лимфоцитов (CD45⁺) и В-клеток (CD19⁺), а на основании экспрессии поверхностных мембранных маркеров IgD, CD20, CD27, CD38, CD10 и CD138 проводили количественное измерение субпопуляций В-клеток (см. рисунок на 2-й пол. обл.).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием компьютерной программы Statistica 8.0. При сравнении двух групп использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Данные указаны в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом 25–75-й процентиля. Различия считались значимыми при p<0,05.

Результаты и обсуждение. Результаты определения процентного содержания субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови у доноров и больных РА и СКВ представлены в табл. 1. При РА и СКВ отмечалась тенденция к уменьшению относительного количества CD19⁺В-лимфоцитов в крови (p=0,065 и p=0,09 соответственно по сравнению с донорами). Снижение уровня CD19⁺В-клеток (6% и менее) наблюдалось у 50% пациентов с РА и 56% пациентов с СКВ. Общее количество CD19⁺CD27⁺В-клеток памяти в крови больных РА было ниже, чем у доноров (p=0,038). Уровни переключенных и непереключенных В-клеток памяти, наивных и транзиторных В-лимфоцитов, плазмобластов у доноров и больных РА достоверно не различались (p>0,05). При СКВ выявлено уменьшение относительного количества наивных В-лимфоцитов периферической крови и повышение переключенных В-клеток памяти (p=0,003 по сравнению с донорами в обоих случаях). При сравнении остальных субпопуляций В-клеток достоверных различий между донорами и больными СКВ не найдено.

В нашей работе показатели процентного соотношения субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови у здоровых доноров совпадают с результатами клинического исследования SMART (табл. 2) [15]. Наряду с этим мы получили сходные с J. Sellam и соавт. [15] данные о снижении относительного количества общей популяции CD19⁺CD27⁺В-клеток памяти и наивных CD27⁺IgD⁺В-лимфоцитов у больных РА по сравне-

нию с донорами, однако в нашей группе пациентов уменьшение процентного содержания наивных В-клеток не достигало статистической значимости (p=0,059), что может быть связано с меньшей численностью больных, включенных в исследование. Также J. Sellam и соавт. [15] обнаружили достоверно меньшее количество переключенных В-лимфоцитов памяти у больных РА, в то время как в нашей работе уровень этих клеток при РА не отличался от нормы. По современным данным, при СКВ отмечается снижение уровня наивных В-лимфоцитов и увеличение количества переключенных В-клеток памяти и плазмобластов в крови [16, 17]. Действительно, мы выявили уменьшение относительного количества наивных В-клеток и повышение уровня переключенных В-клеток, но не обнаружили увеличения процентного содержания плазмобластов. Полученные данные об отсутствии долгоживущих плазматических клеток (CD19⁺CD138⁺) в периферической крови у здоровых лиц и больных РА согласуются с результатами M. Rehnberg и соавт. [11].

Показано, что клиническая эффективность ритуксимаба (РТМ) (моноклональных антител к мембранному CD20-антигену В-клеток) зависит от степени деплеции В-клеток и динамики восстановления В-клеточных популяций периферической крови [15]. Важным индикатором полной В-клеточной деплеции и эффективности лечения РТМ у больных СКВ и РА считается позднее восстановление CD19⁺CD27⁺-клеток памяти [18]; исходно низкий уровень В-клеток памяти и плазмобластов может служить предиктором хорошего эффекта РТМ [15]. Отсюда оценка базального уровня, деплеции и регенерации субпопуляций В-лимфоцитов на фоне анти-В-клеточной терапии имеет актуальное значение для разработки новых подходов к прогнозированию эффективного ответа на данную группу лекарственных средств.

Заключение. Разработанную методику многопараметрической проточной цитофлуориметрии можно рекомендовать для изучения гомеостаза В-клеток периферической крови у здоровых лиц и больных аутоиммунными РЗ, в том числе для оценки эффективности анти-В-клеточной терапии.

Благодарность. Авторы выражают признательность профессору Н.Р. Тону и госпоже А. Koss-Kinzingер (Университет г. Вюрцбург, Германия) за помощь в разработке методики и оценке предварительных результатов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Edwards J.C., Cambridge G. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology*. 2001; 40: 205–11.
- Kim H.J., Berek C. B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2000; 2: 126–31.
- Metlay J.P., Pure E., Steinman R.M. Control of the immune response at the level of antigen-presenting cells: a comparison of the function of dendritic cells and B lymphocytes. *Adv. Immunol.* 1989; 47: 45–116.
- Takemura S., Klimiuk P.A., Braun A., Goronzy J.J., Weyand C.M. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J. Immunol.* 2001; 167: 4710–18.
- Lindenau S., Scholze S., Odendahl M., Dorner T., Radbruch A. et al. Aberrant activation of B cells in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003; 987: 246–8.
- Brezinschek H.-P., Rainer F., Brickmann K., Graninger W.B. B lymphocyte-typing for prediction of clinical response to rituximab. *Arthritis Res. Ther.* 2012; 14: R161.
- Vánca A., Szabó Z., Szamosi S., Bodnár N., Végh E., Gergely L. et al. Longterm effects of rituximab on B cell counts and autoantibody production in rheumatoid arthritis: use of high-sensitivity flow cytometry for more sensitive assessment of B cell depletion. *J. Rheumatol.* 2013; 40 (5): 565–71.
- Sanz I., Wei C., Lee F.E., Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin. Immunol.* 2008; 20: 67–82.
- Sims G.P., Ettinger R., Shirota Y., Yarboro C.H., Illei G.G., Lipsky P.E. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*. 2005; 105: 4390–8.

10. Anolik J.H., Looney R.J., Lund F.E., Randall T.D., Sanz I. Insights into the heterogeneity of human B cells: diverse functions, roles in autoimmunity, and use as therapeutic targets. *Immunol. Res.* 2009; 45: 144–58.
11. Rehnberg M., Amu S., Tarkowski A., Bokarewa M.I., Brisslert M. Short- and long-term effects of anti-CD20 treatment on B cell ontogeny in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2009; 11: R123.
12. Arnett F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A., McShane D.J., Fries J.F., Cooper N.S. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988; 31(3): 315–24.
13. Hochberg M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; 40(9): 1725.
14. Petri M., Kim M.Y., Kalunian K.C., Grossman J., Hahn B.H., Sammaritano L.R. et al; for the OC-SELENA Trial. Combined oral contraceptives in women with systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353: 2550–8.
15. Sellam J., Rouanet S., Hendel-Chavez H., Abbed K., Sibilia J., Tebib J. et al. Blood memory B cells are disturbed and predict the response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(12): 3692–701.
16. Anolik J.H., Barnard J., Cappione A., Pugh-Bernard A.E., Felgar R.E., Looney R.J. et al. Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(11): 3580–90.
17. Jacobi A.M., Reiter K., Mackay M., Aranow C., Hiepe F., Radbruch A. et al. Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 1762–73.
18. Leandro M.J., Cambridge G., Ehrenstein M.R., Edwards J.C.W. Reconstitution of peripheral blood B cell after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54: 613–20.

Поступила 16.01.14
Received 16.01.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.611-002-078.33

Карзакова Л.М.¹, Автономова О.И.², Степанова И.М.², Комелягина Н.А.¹, Кудряшов С.И.¹

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ВАРИАНТАХ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТА

¹ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н.Ульянова» Минобрнауки России, 428015, г. Чебоксары; ²БУ «Республиканская клиническая больница» Минздравсоцразвития Чувашии, 428018, г. Чебоксары

В работе представлены результаты определения показателей цитокинового статуса у 58 больных гломерулонефритом (ГН) с использованием твердофазного иммуноферментного анализа. Установлено, что у больных ГН повышен уровень циркулирующих в крови провоспалительных и противовоспалительных цитокинов – IL-1β, IL-2, IL-10 и Ra-IL-1β. Выявлены различия в цитокиновом статусе больных в зависимости от клинического варианта заболевания. Уровень продукции IL-10, коррелирующий с клубочковой, канальцевой и эритропоэтической функциями почек, оказывал значимое влияние на формирование различных клинических вариантов ГН.

К л ю ч е в ы е с л о в а: гломерулонефрит; клинические варианты гломерулонефрита; цитокины.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60(6): 33–36.

Karzakova L.M.¹, Avtonomova O.I.², Stepanova I.M.², Komeliagina N.A.¹, Kudriashov S.I.¹

THE CHARACTERISTICS OF CYTOKINE STATUS UNDER DIFFERENT CLINICAL VARIANTS OF GLOMERULONEPHRITIS

¹The I.N. Ulianov Chuvash state university of Minobrnauka of Russia, 428015 Cheboksary, Russia; ²The Republican clinical hospital of Minzdrav of Chuvashia, 428018 Cheboksary, Russia

The article presents results of identification of indicators of cytokine status in 58 patients with glomerulonephritis using solid-phase immunoenzyme analysis. It is established that in patients with glomerulonephritis the level of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-2, IL-10 and Ra-IL-1β) circulating in blood is augmented. The differences are established concerning cytokine status of patients depending on clinical type of disease. The level of production of IL-10, correlating with glomerular, tubular and erythropoietic functions of kidneys significantly effected formation of various clinical types of glomerulonephritis.

Key words: glomerulonephritis; clinical type; cytokine

Citation: *Klinicheskaja Laboratornaia Diagnostika.* 2015; 60 (6): 33–36.

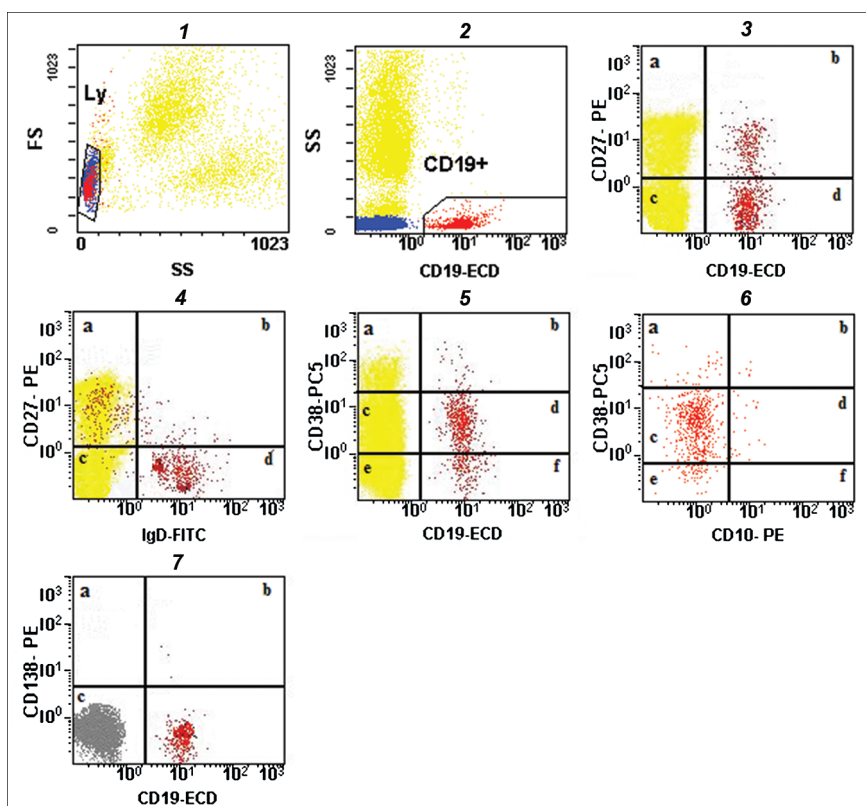
Введение. Изучение патогенеза гломерулярного поражения почек – гломерулонефрита (ГН), и поиск эффективных способов его лечения продолжают оставаться актуальной проблемой современной медицины [7]. Показана важная роль в развитии ГН факторов врожденного и приобретенного

иммунитета [1, 3, 9]. Различия в механизмах иммунопатологического повреждения клубочков при ГН обуславливают многообразие его морфологических форм и клинических вариантов. В последние годы получено много данных об участии цитокинов в патогенезе различных морфологических форм ГН [2, 10, 14], однако нет данных о цитокиновом профиле отдельных клинических вариантов ГН, в то время как терапевтический комплекс при лечении больных ГН во многом определяется преобладающим клиническим синдромом заболевания. В связи с этим проведено изучение показателей

Для корреспонденции: Карзакова Луиза Михайловна, luizak58@mail.ru

For correspondence: Karzakova L.M., luizak58@mail.ru

К ст. Супоницкой Е. В. и соавт.



Распределение субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови у здоровых доноров.

Общая популяция лимфоцитов $CD45^+$ (1); В-лимфоциты $CD19^+$ (2); В-клетки памяти $CD19^+CD27^+$ (3b); непереключенные В-клетки памяти $CD19^+CD27^+IgD^+$ (4b); переключенные В-клетки памяти $CD19^+CD27^+IgD^-$ (4a); наивные В-клетки $CD19^+CD27^-IgD^+$ (4d); плазмобласты $CD19^+CD38^{+++}CD27^-IgD^-CD20^+$ (5b); транзитные В-клетки $CD19^+CD38^{++}CD10^+IgD^-CD27^-$ (6b); долгоживущие плазмциты $CD19^+CD138^{+++}$ (7b).

К ст. Мавзютова А. Р. и соавт.

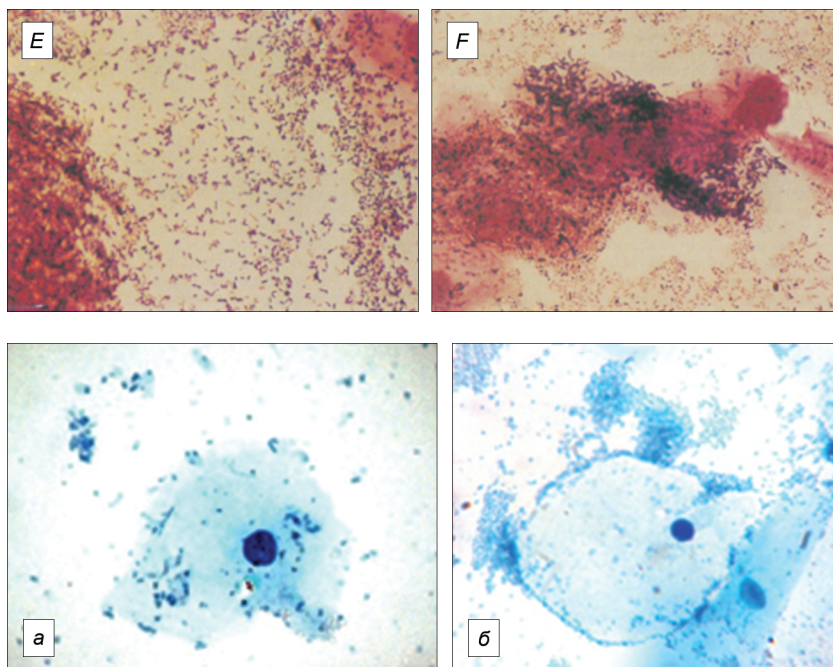


Рис. 1. Отделяемое со сводов влагалища.

Е – «...4+ грамтрицательные и -вариабельные палочковидные бактерии (8 баллов)...»; F – «...4+ грамтрицательные палочковидные бактерии и изогнутые палочковидные бактерии (10 баллов) [6].

Окрашивание по Граму. Ув. 1350.

Рис. 2. Отделяемое со сводов влагалища.

а – бактериальный вагиноз 1-й степени (компенсированный); б – бактериальный вагиноз 2-й степени (субкомпенсированный); в – бактериальный вагиноз 3-й степени (декомпенсированный).

Окраска метиленовым синим [3]. Ув. 1000.