

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Авдеева А.С.¹, Алексанкин А.П.^{1,2}, Горбунова Ю.Н.¹, Панафидина Т.А.¹, Попкова Т.В.¹

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СУБПОПУЛЯЦИИ В-ЛИМФОЦИТОВ И УРОВНЯ CD4+ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С РАННЕЙ СТАДИЕЙ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКИ

¹ФГБНУ Научно-исследовательский институт ревматологии им В.А. Насоновой, 115522, Москва, Россия;

²Научно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», 117418, Москва, Россия

Цель: изучить особенности субпопуляций В-лимфоцитов и уровень CD4+ Т-лимфоцитов у пациентов с ранней стадией системной красной волчанки (СКВ).

Материал и методы. В исследование включены 139 пациентов (123 женщины (88%) и 16 мужчин (12%)), с достоверным диагнозом системной красной волчанки (СКВ); медиана длительности СКВ составила 3,0 [0,3;12,0] года - 84 были с длительностью СКВ более 18 месяцев, 50 пациентов с ранней СКВ (длительностью заболевания менее 18 месяцев); активность заболевания соответствовала средней - SLEDAI-2K 7 [4;11] баллов, индекс повреждения – низкому: SDI 0 [0;1] баллов. Субпопуляции В-лимфоцитов - включая определение В-клеток (CD19+), общей популяции В-клеток памяти (CD19+CD27+), не переключенных (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 плазматических клеток (CD19+CD38+) и уровень CD4+ Т-лимфоцитов оценивались методом многоцветной проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Для каждого анализа было подсчитано 50 000 событий.

Результаты. Число CD3+CD4+ Т-лимфоцитов у пациентов с СКВ составило (ПК 42,0(35,9-49,6) абс 0,78 (0,46-0,96) и было ниже, чем у здоровых доноров (ПК 52,3 (48,4-56,2), абс 0,9 (0,7-1,2), соответственно, $p < 0,05$). Пациенты с меньшей длительностью заболевания имели более высокое содержание В-лимфоцитов, абсолютное содержание В-клеток памяти (переключенных и не переключенных), плазматических, транзиторных и двойных негативных клеток, а также более низкий уровень плазмобластов. Отмечалась позитивная корреляция SLICC с числом двойных негативных В-лимфоцитов ($r=0,3$), отрицательная корреляция с числом транзиторных клеток ($r=-0,33$). Среди пациентов с нефритом был выявлен более высокий уровень В-клеток памяти (0,04 (0,02-0,09) и 0,02 (0,01-0,03)); переключенных В-клеток памяти (17,8 (9,6-29,0) 0,04 (0,01-0,08) и 10,17 (5,87-16,11) 0,01 (0,007-0,02)), $p < 0,05$ во всех случаях.

Заключение. Была установлена взаимосвязь между субпопуляциями В-лимфоцитов, активностью и тяжестью СКВ. Уровень общей популяции клеток памяти, «переключенных» клеток памяти, двойных негативных клеток коррелирует с содержанием аутоантител, развитием нефрита и индексом повреждения SLICC.

Ключевые слова: системная красная волчанка; субпопуляции В-лимфоцитов; аутоантитела; активность заболевания

Для цитирования: Авдеева А.С., Алексанкин А.П., Горбунова Ю.Н., Панафидина Т.А., Попкова Т.В. Изучение особенностей субпопуляции В-лимфоцитов и уровня CD4+ Т-лимфоцитов у пациентов с ранней стадией системной красной волчанки. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (11): 610-616.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-610-616>

Для корреспонденции: Авдеева Анастасия Сергеевна, д-р мед. наук, зав. лаб. иммунологии и молекулярной биологии ревматических заболеваний; e-mail: 9056249400@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках фундаментальной темы № 1021051402790-6 «Изучение иммунопатологии, диагностики и терапии на ранних стадиях системных ревматических заболеваний».

Поступила 03.05.2024

Принята к печати 04.10.2024

Опубликовано 25.10.2024

Avdeeva A.S., Aleksankin A.P., Gorbunova Y.N., Panafidina T.A., Popkova T.V.

STUDYING B-LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS AND CD4+ T-LYMPHOCYTE LEVEL IN PATIENTS WITH EARLY STAGE OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

¹V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia;

²Avtsyn research institute of human morphology of federal state budgetary scientific institution "Petrovsky national research centre of surgery" Moscow, Russia

Objective: to study the characteristics of B lymphocyte subpopulations and the level of CD4+ T lymphocytes in patients with early stage systemic lupus erythematosus (SLE).

Material and methods. The study included 139 patients (123 women (88%) and 16 men (12%)) with a definite diagnosis of SLE; the median duration of SLE was 3.0 [0.3; 12.0] years - 84 patients had a disease duration of more than 18 months, 50 patients had early SLE (disease duration of less than 18 months); medium disease activity - SLEDAI-2K 7 [4;11] points, damage index - low: SDI 0 [0;1] points. Subpopulations of B lymphocytes - including determination of B cells (CD19+), general population of memory B cells (CD19+CD27+), non-switched (CD19+IGD+CD27+) and switched (CD19+IGD-CD27+) memory B cells, naive (CD19+IGD+CD27-), transient (CD19+IGD+CD10+CD38++CD27-) B cells, plasmablasts (CD19+CD38+++IGD-CD27+CD20-) and plasma cells (CD19+CD38+) and the level of CD4+ T-lymphocytes was assessed by multicolor flow cytometry using a Navios flow cytometer (Beckman Coulter, USA). For each analysis, 50,000 events were counted.

Results. The number of CD3+CD4+ T lymphocytes in patients with SLE was (% 42.0 (35.9-49.6) abs 0.78 (0.46-0.96) and was lower than in healthy donors (% 52.3 (48.4-56.2), abs 0.9 (0.7-1.2), respectively, $p < 0.05$. Patients with early SLE had a higher content of B lymphocytes, absolute content of B cells. memory (switched and not switched), plasma, transient and double negative cells, as well as a lower level of plasmablasts. There was a positive correlation of SLICC with the number of double negative B lymphocytes ($r = 0.3$), a negative correlation with the number of transient cells ($r = -0.33$). Among patients with nephritis, a higher level of memory B cells was detected (0.04 (0.02-0.09) and 0.02 (0.01-0.03)); (17.8 (9.6-29.0) 0.04 (0.01-0.08) and 10.17 (5.87-16.11) 0.01 (0.007-0.02)), $p < 0.05$ in all cases.

Conclusion. A relationship was established between B lymphocyte subsets and SLE activity and severity. The level of total memory cell population, switched memory cells, and double negative cells correlates with the level of autoantibodies, the development of nephritis, and the SLICC damage index.

Key words: systemic lupus erythematosus; subpopulations of B-lymphocytes; autoantibodies; disease activity

For citation: Avdeeva A.S., Aleksankin A.P., Gorbunova Y.N., Panafidina T.A., Popkova T.V. Studying B-lymphocyte subpopulations and CD4+ T-lymphocyte level in patients with early stage of systemic lupus erythematosus. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (11): 610-616 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-610-616>

For correspondence: Avdeeva Anastasia Sergeevna, Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Immunology and Molecular Biology of Rheumatic Diseases; e-mail: 9056249400@mail.ru

Information about authors:

Avdeeva A.S., <https://orcid.org/0000-0003-3057-9175>;

Aleksankin A.P., <https://orcid.org/0000-0001-6686-0896>;

Gorbunova Y.N., <https://orcid.org/0000-0002-2024-6927>;

Panafidina T.A., <https://orcid.org/0000-0003-1053-6952>;

Popkova T.V., <https://orcid.org/0000-0001-5793-4689>.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The article was prepared under the program no. 1021051402790-6 "Study of Immunopathology, Diagnosis and Therapy in the Early Stages of Systemic Rheumatic Diseases".

Received 03.05.2024

Accepted 04.10.2024

Published 25.10.2024

Системная красная волчанка (СКВ) – системное аутоиммунное ревматическое заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся гиперпродукцией органонеспецифических аутоантител к различным компонентам клеточного ядра и развитием иммуновоспалительного повреждения внутренних органов [1]. Ключевую роль в развитии и прогрессировании СКВ играют В-лимфоциты, активация и дифференцировка которых регулируется Т-лимфоцитами. В то же время, В-лимфоциты нельзя рассматривать как исключительно эффекторные клетки, синтезирующие антитела, они способны презентировать антигены Т-лимфоцитам, продуцировать широкий спектр цитокинов и костимуляторных молекул, рекрутировать субпопуляции Т- лимфоцитов и дендритных клеток [1,2]. Несмотря на успехи в изучении роли В лимфоцитов и подробной характеристики отдельных субпопуляций, по-прежнему остается целый ряд нерешенных вопросов. Это связано с тем, что часть данных о роли В- лимфоцитов получена при изучении животных моделей и не дает полного представления о В- лимфоцитах человека; постоянное совершенствование методов лабораторной диагностики позволяет выявлять новые субпопуляции клеток, требующих изучения; существуют определенные сложности с выделением отдельных фенотипов В-лимфоцитов, связанные с наличием общих поверхностных маркеров, а также остается ряд вопросов дифференцировки В- лимфоцитов и связи субпопуляций между собой. Известно, что фенотип лимфоцитов периферической крови значительно отличается от лимфоцитов, находящихся в очаге воспаления,

однако, учитывая технические сложности, связанные с забором биоматериала, изучение именно иммунофенотипа клеток периферической крови позволяет получить важную информация о патологических процессах, уточнив стадию дифференцировки лимфоцитов, функциональные различия клеток, статус активации и участие в клеточном сигналинге. [3].

Метод многоцветной проточной цитометрии является наиболее информативным инструментом для изучения иммунофенотипа клеток периферической крови. Основными поверхностными маркерами, используемыми для классификации периферических В клеток человека являются мембранные антигены CD19, IgD, CD38, CD27. CD27 – универсальный маркер клеток памяти, позволяющий отличить их от наивных В -лимфоцитов (CD27-/IgD+). CD27+ клетки памяти подразделяются на IgD+/IgM+ - клетки памяти до переключения и IgD-/IgG+, IgA+ - клетки памяти после переключения [4].

Особенности субпопуляций В- и Т-лимфоцитов широко изучаются у пациентов с СКВ. Большинство авторов указывают на снижение содержания не переключенных клеток памяти и повышение числа переключенных клеток памяти, а также эффекторных клеток памяти (двойных негативных) при СКВ по сравнению со здоровыми донорами [5-8]. Что касается Т-клеточного звена иммунитета, для пациентов с СКВ, в отличие от здоровых доноров, характерно повышение содержания эффекторных CD3+CD4+CCR7-CD45RA-Т-клеток памяти и уменьшение доли CCR7+ CD45RA-CD4+ Т-клеток центральной памяти [9-11].

В последнее время в литературе широко обсуждается регуляторная роль В- лимфоцитов. Интерес

ученых сосредоточен на В –регуляторных клетках (Vreg) [12,13]. Однако учитывая низкий уровень Vreg в периферическом кровотоке, сложность их детекции, интерес исследователей сосредоточен на сходной по функциям клеточной субпопуляции – транзиторных В-лимфоцитах. Транзиторные В-клетки (TrB-клетки) представляют собой незрелые В-клетки костномозгового происхождения, которые могут быть предшественниками зрелых В-лимфоцитов [14]. TrB лимфоциты составляют примерно 4% всех CD19+ В-лимфоциты у здоровых людей [14]. TrB лимфоциты имеют фенотип CD24^{hi}CD38^{hi} и функционально и физиологически тесно связаны с регуляторными В-клетками, продуцирующими ИЛ-10. TrB лимфоциты также способны продуцировать ИЛ-10 и регулировать пролиферацию и дифференцировку CD4+ Т-лимфоцитов в Т-хелперные или эффекторные клетки [15]. Таким образом, целью работы стало изучение особенностей субпопуляций В лимфоцитов и CD4+ Т-лимфоцитов у пациентов с ранней стадией СКВ

Материал и методы. В наблюдательное проспективное исследование включены 139 пациентов: 123 женщины (88%) и 16 мужчин (12%), с достоверным диагнозом СКВ, соответствующим классификационным критериям Международного объединения клиник по СКВ (Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) 2012г [16]. Медиана возраста на момент включения составила 34 (26;41) года. Все пациенты наблюдались в клинике ФГБНУ НИИР им. В.А.Насоновой и подписали информированное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом. Критерии не-включения: возраст моложе 18 лет или старше 70 лет, применение любых генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП) в течение последних 2-х лет, наличие беременности/лактации, тяжелой сопутствующей патологии (острые инфекции и обострение хронических инфекционных заболеваний, тяжелое поражение центральной нервной системы (ЦНС) (судороги, психоз, делирий, галлюцинации, кома), любые злокачественные новообразования или предраковые состояния на момент обследования и в анамнезе за последние 5 лет, алкогольная и наркотическая зависимости, параллельное участие в клинических исследованиях различных препаратов.

При включении в исследование медиана длительности СКВ составила 3,0 (0,3;12,0) года, активность заболевания соответствовала средней - SLEDAI-2K 7 (4;11) баллов, индекс повреждения – низкому: SDI 0 (0;1) баллов. Среди включенных в исследование пациентов 84 были с длительностью СКВ более 18 месяцев, 50 пациентов с ранней СКВ (длительностью заболевания менее 18 месяцев). На момент включения в исследование основными клиническими проявлениями СКВ являлись: гематологические нарушения (57%) с преобладанием лейкопении (37%), поражение суставов (артриты/артралгии) (40%), волчаночный нефрит (27%) с преобладанием IV (35%) и V (31%) классов по данным нефробиопсии, нерубцовая алопеция (25%), livedo reticularis (19%) и интерстициальное поражение легких (16%). Подавляющее большинство пациентов (94%) имели положительные антинуклеарный фактор (АНФ), антитела к двуспиральной ДНК (анти-дс-ДНК) (70%)

и гипокомплементемии по С3 и/или С4 компонентам комплемента (64%). Из лекарственных препаратов наибольшее число пациентов, включенных в исследование, принимали преднизолон (84%) в низких дозах (Ме 10,0 [6,25; 20,0] мг/сут) в сочетании с гидроксихлорохином (ГХ) (81%) в дозе 200 мг/сут. Кроме того, 19/139 (14%) пациентов не получали терапию — это были как впервые заболевшие, так и длительно болеющие СКВ, но самостоятельно отменившие лечение.

Всем пациентам проводилось общепринятое клиническое, лабораторное и инструментальное обследование с использованием стандартных методов. Активность СКВ определили с помощью индекса Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index в модификации 2К (SLEDAI-2K) [17]. Для оценки необратимых органических повреждений применяли индекс Systemic Lupus International Collaborating Clinics Damage Index (SDI) [18]. Уровень антинуклеарного фактора (АНФ) определялся методом непрямой реакции иммунофлюоресценции (НРИФ) с использованием коммерческого набора реагентов «IMMCO Diagnostics», США. Специфические АНА к отдельным ядерным антигенам определялись с использованием коммерческих наборов реагентов («ORGENTEC Diagnostika», Германия). По рекомендации фирмы-изготовителя нормальные значения составляли: анти-дс ДНК – 0,0-20,0 МЕ/мл, анти-Sm – 0,0-25,0 Ед/мл, анти-Ro/SS-A – 0,0-25,0 Ед/мл, анти-La/SS-B – 0,0-25,0 Ед/мл, aКЛ-IgG – 0,0-10,0 GPL, aКЛ-IgM – 0,0-7,0 MPL, aβ2-ГП I IgG – 0,0-8,0 Ед/мл, aβ2-ГП I IgM – 0,0-8,0 Ед/мл.

Имунофенотипирование лимфоцитов периферической крови, включая определение процентного и абсолютного количества общей популяции Т-клеток (CD3+), Т-хелперов (CD3+CD4+), В-клеток (CD19+), проводилось методом многоцветной проточной цитофлуорометрии на анализаторе Navios (“Beckman Coulter”, США). Использовались коммерческие наборы моноклональных антител: CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 (“Beckman Coulter”, США) и CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (“Beckman Coulter”, США). Для подсчета абсолютного количества (абс) Т, В-лимфоцитов использовался набор реагентов для прямого определения лимфоцитов Flow-Count™ Fluorospheres (“Beckman Coulter”, США) которые являются измеряемой суспензией флуоресцирующих микросфер.

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 плазматических клеток (CD19+CD38+), проводилось методом многоцветной проточной цитофлуорометрии. Использовались конъюгированные моноклональные антитела (mAT): CD19-ECD (r phycoerythrin-Texas red®-X, IgG1, фикоэритрин тexasский 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 (Beckman Coulter, США); CD10-PE (IgG1, hi10a), 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).

Оценку результатов проводили на проточном цитофлуориметре Navios (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 процентная концентрация (ПК) лимфоцитов (CD45+) и В-клеток (CD19+), а на основании экспрессии поверхностных мембранных маркеров IgD, CD20, CD27, CD38, CD10 проводили количественное измерение субпопуляций В-клеток.

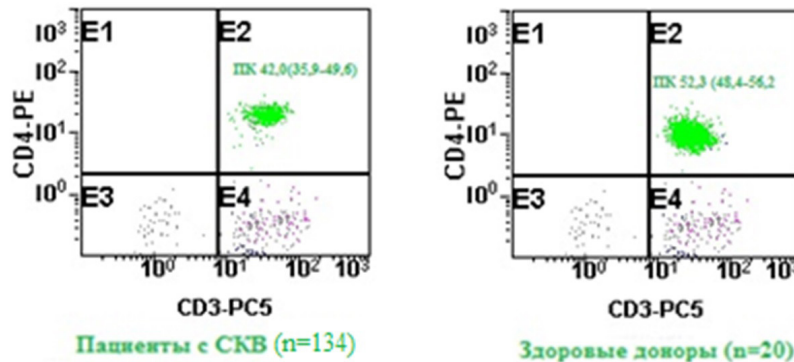
Контрольную группу составили 20 здоровых доно-

ров, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft, США), включая общепринятые методы параметрического и непараметрического анализа. Для параметров, распределение которых отличалось от нормального, при сравнении двух групп использовали критерий Манна–Уитни, а при сравнении трех и более групп – критерий Краскела–Уоллеса, результаты представлены в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом [25–75-й процентиля]. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Субпопуляции лимфоцитов были проанализированы в группе из 134 пациентов, у 5 пациентов их определить не удалось по техническим причинам. Число CD3+CD4+ Т-лимфоцитов у пациентов с СКВ составило (ПК 42,0(35,9-49,6) абс 0,78 (0,46-0,96) у здоровых доноров (ПК 52,3 (48,4-56,2), абс 0,9 (0,7-1,2), что было достоверно выше по сравнению с пациентами с СКВ, $p < 0,05$ (см. рисунок).

Т хелперы CD3+CD4+



Относительное содержание CD3+CD4+ Т-лимфоцитов у пациентов с СКВ и здоровых доноров.

Таблица 1

Содержание В-лимфоцитов у пациентов с СКВ и здоровых доноров, Me (25-75 перцентиль)

Параметры		Пациенты с СКВ, (n=134)	Доноры (n=20)
CD19+В-лимфоциты	ПК	9,5 (4,1- 12,5)	8,7 (7,2- 11,0)
	абс	0,2 (0,1- 0,2)	0,2 (0,1- 0,2)
В-клетки памяти CD19+CD27+	ПК	22,9 (12,1- 26,9)	2,2 (1,1- 3,0)*
	абс	0,03 (0,01- 0,03)	0,004 (0,001- 0,007)*
Не переключенные В-клетки памяти CD19+CD27+IgD+	ПК	15,8 (7,1- 20,7)	8,4 (3,7- 11,1)*
	абс	0,02 (0,004- 0,03)	0,002 (0,005- 0,02)
Переключенные В-клетки памяти CD19+CD27+IgD-	ПК	15,7 (6,5- 21,5)	13,6 (9,3- 17,0)
	абс	0,03 (0,006- 0,03)	0,02 (0,01- 0,04)*
Плазматические клетки CD19+CD38+	ПК	72,4 (67,3- 82,5)	0,08 (0,05- 0,1)*
	абс	0,1 (0,04- 0,2)	0,0001 (0,0- 0,004)*
Наивные клетки CD19+CD27-IgD+	ПК	55,1 (44,4- 69,0)	64,5 (57,6- 72,4)*
	абс	0,05 (0,02- 0,1)	0,1 (0,06- 0,1)*
Плазмобласты CD19+CD38+++CD27+IgD-CD20-	ПК	3,4 (0,9-4,6)	0,2 (0,1- 0,2)*
	абс	0,003 (0,001- 0,004)	0,0003 (0,0001- 0,0004)*
Транзиторные клетки CD19+CD38++CD10+IgD+CD27-	ПК	16,2 (6,0- 19,7)	0,08 (0,0- 0,1)*
	абс	0,03 (0,01- 0,03)	0,0001 (0,0- 0,0003)*
Двойные негативные В-клетки CD19+CD27-IgD-	ПК	13,3 (7,4- 15,3)	13,7 (7,1- 19,3)
	абс	0,02 (0,01- 0,02)	0,02 (0,01- 0,02)

Примечание. Здесь и в табл.2: * - $p < 0,05$ между группами.

Была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь ПК CD3+CD4+ Т- лимфоцитов с анти-дс-ДНК ($r=-0,59$, $p=0,02$) и абс. уровня CD3+CD4+ Т-лимфоцитов с активностью заболевания по SLEDAI-2K ($r=-0,61$, $p=0,009$). Достоверных различий в уровне CD3+CD4+ Т-лимфоцитов в зависимости от активности заболевания и наличия органических поражений получено не было.

Сравнение субпопуляций В-лимфоцитов у пациентов с СКВ и здоровых доноров представлено в табл.1.

Как видно из табл.1, у пациентов с СКВ отмечалась более высокая ПК и абс. уровень В-клеток памяти; ПК не переключенных клеток памяти, абс уровень пере-

ключенных В- клеток памяти, ПК и абсолютного уровня плазматических клеток, плазмобластов и транзиторных В-лимфоцитов, а также более низкая ПК и абс. наивных В- лимфоцитов ($p<0,05$).

Среди включенных в исследование пациентов 84 больных был с длительностью СКВ более 18 месяцев, 50 пациентов с ранней СКВ (длительностью заболевания менее 18 месяцев). В этих двух группах были оценены субпопуляции В-лимфоцитов (табл.2). Учитывая меньшую длительность иммуносупрессивной терапии в группе ранней СКВ, а также включенные в нее 19 пациентов не получавших терапию, дальнейший анализ данной группы представляется крайне интересным.

Таблица 2

Содержание субпопуляций В- лимфоцитов у пациентов с СКВ в зависимости от длительности заболевания, Ме (25-75 перцентиль)

Параметры		Пациенты с СКВ с длительностью более 18 мес (n=84)	Пациенты с СКВ с длительностью менее 18 мес (n=50)
		Значение	Значение
CD19+В-лимфоциты	ПК	6,24 (3,6-10,02)	12,455 (8,09-19,4)*
	абс	0,075 (0,05-0,15)	0,152 (0,06-0,33)*
В-клетки памяти CD19+CD27+	ПК	17,94 (12,2-26,9)	15,9 (11,98-25,8)
	абс	0,015 (0,07-0,03)	0,03 (0,01-0,06)*
Не переключенные В-клетки памяти CD19+CD27+IgD+	ПК	14,46 (7,89-20,7)	12,27 (6,73-20,1)
	абс	0,009 (0,004-0,02)	0,016 (0,008-0,03)*
Переключенные В-клетки памяти CD19+CD27+IgD-	ПК	14,4 (6,21-21,9)	11,19 (8,03-19,9)
	абс	0,01 (0,004-0,02)	0,0145 (0,009-0,04)*
Плазматические клетки CD19+CD38+	ПК	77,26 (66,0-82,6)	77,465 (72,2-82,2)
	абс	0,067 (0,03-0,014)	0,1345 (0,07-0,25)*
Наивные клетки CD19+CD27-IgD+	ПК	57,2 (14,5-68,9)	59,025 (49,2-69,7)
	абс	0,035 (0,02-0,09)	0,09 (0,03-0,2)*
Плазмобласты CD19+CD38+++CD27+IgD-CD20-	ПК	2,92 (1,15-4,96)	1,65 (0,53-2,9)*
	абс	0,002 (0,001-0,004)	0,002 (0,001-0,004)
Транзиторные клетки CD19+CD38++CD10+IgD+CD27-	ПК	9,97 (6,02-21,2)	11,645 (5,9-16,8)
	абс	0,009 (0,004-0,02)	0,0165 (0,008-0,04)*
Двойные негативные В-клетки CD19+CD27-IgD-	ПК	11,6 (7,45-15,6)	10,145 (7,1-14,9)
	абс	0,008 (0,005-0,016)	0,015 (0,009-0,03)*
CD4+ Т-клетки	П.К.	44,88 (35,7-51,2)	45,96 (33,9-51,2)
CD4+	абс	0,77443 (0,46-0,93)	0,69375 (0,36-0,83)

Как видно из табл. 2, пациенты с меньшей длительностью заболевания имели более высокое содержание В-лимфоцитов, абсолютное содержание В- памяти (переключенных и не переключенных), плазматических, транзиторных и двойных негативных клеток, а также более низкий уровень плазмобластов.

Среди пациентов с ранней СКВ выявлено достоверное отличие уровня транзиторных В-лимфоцитов в зависимости от активности болезни: в группе с низкой активностью - 13,02 (7,6-21,5) и 0,02 (0,009-0,05) у пациентов с высокой активностью - 10,2 (4,2-13,9) и 0,01 (0,005-0,02).

Был выявлен ряд корреляций: позитивная корреляция SLICC с числом двойных негативных В-лимфоцитов ($r=0,3$), отрицательная корреляция в числом транзиторных клеток ($r=-0,33$); положительная корреляция анти-Ro/SS-A с числом клеток памяти ($r=0,38$), позитивная корреляция протеинурии с числом В-лимфоцитов ($r=0,35$), В-клеток памяти ($r=0,38$), переключенных В-клеток памяти ($r=0,42$), плазматиче-

ских клеток ($r=0,35$), двойных негативных лимфоцитов ($r=0,42$), $p<0,05$ во всех случаях.

Среди пациентов с нефритом был выявлен более высокий уровень В-клеток памяти (0,04 (0,02-0,09) и 0,02 (0,01-0,03)); переключенных В-клеток памяти (17,8 (9,6-29,0) 0,04 (0,01-0,08) и 10,17 (5,87-16,11) 0,01 (0,007-0,02)) и более низкий уровень наивных В-лимфоцитов (53,9 (41,4-65,4) и 61,5 (56,1-73,9), $p<0,05$ во всех случаях.

Обсуждение. Был проведен анализ содержания ряда субпопуляций В- лимфоцитов, а также уровня CD4+ Т-лимфоцитов в периферическом кровотоке пациентов с СКВ в зависимости от длительности заболевания. Особый интерес представляет группа ранней СКВ, учитывая меньшую продолжительность иммуносупрессивной терапии в данной группе пациентов. Среди пациентов с ранней СКВ, по сравнению с больными с большей длительностью заболевания отмечалось более высокое содержание В- лимфоцитов, абсолютное содержание В-клеток памяти (переключенных и не пе-

реключенных), плазматических, транзиторных и двойных негативных клеток, а также более низкий уровень плазмобластов. Полученные нами данные согласуются с литературными. Большинство авторов указывает на повышение уровня переключенных клеток памяти [5,19-22]. Уровень не переключенных клеток памяти в меньшей степени коррелирует с активностью заболевания, содержанием аутоантител; их уровень как правило не изменяется в зависимости от стадии заболевания [22]. Содержание переключенных клеток памяти, напротив, значительно повышено у пациентов с СКВ, для них характерна гиперэкспрессия CXCR3 и более низкая экспрессия CXCR5 по сравнению со здоровыми донорами, что может объяснить их меньшую чувствительность к терапии [11].

Еще одна субпопуляция В-клеток памяти – это двойные негативные В-лимфоциты. Уровень данных В-лимфоцитов как правило повышен у пациентов с СКВ по сравнению со здоровыми донорами [23]; коррелирует с поражением почек, активностью заболевания, и наличием аутоантител. [24] Для этих клеток характерна более высокая экспрессия маркеров активации (CD86, HLA-DR), хемокиновых рецепторов (CXCR3 и CD71) [25], что указывает на связь с aberrантной экстрафолликулярной дифференцировкой. В нашей работе уровень двойных негативных В-лимфоцитов в целом по группе не отличался у пациентов с СКВ и здоровых доноров, однако в подгруппе пациентов с меньшей длительностью заболевания, было выявлено их более высокое содержание, а также позитивная корреляция со SLICC и степенью протеинурии.

Отдельно следует остановиться на роли ТгВ лимфоцитов. ТгВ-клетки представляют собой незрелые В-клетки костномозгового происхождения, которые могут быть предшественниками зрелых В-лимфоцитов [14,15]. ТгВ-лимфоциты способны продуцировать ИЛ-10 и регулировать пролиферацию и дифференцировку CD4⁺ Т-лимфоцитов в Т-хелперные или эффекторные клетки [26-28]. Содержание CD24^{hi}CD38^{hi} ТгВ-клеток повышено у больных СКВ, болезнью и синдромом Шегрена, системной склеродермией и дерматомиозитом [27-29]. В литературе широко обсуждается выделение различных подтипов ТгВ-лимфоцитов на основании экспрессии ряда поверхностных маркеров, таких как CD27, IgM, IgD, CD10, CD21 и CD32; некоторые исследования показали, что клетки CD27⁺ ТгВ служат своего рода типом Врег и могут быть не просто транзиторными В-клетками [30-32]. Основные функции ТгВ-лимфоцитов заключаются в продукции ИЛ-10, данные клетки способны ограничивать пролиферацию CD4⁺ Т-лимфоцитов и Th17, снижая таким образом уровень провоспалительных цитокинов (ИФН- γ , ФНО α , ИЛ-17), Транзиторные В-лимфоциты способны сдвигать дифференцировку CD4⁺ Т-лимфоцитов с сторону Трег клеток, также ТгВ-клетки влияют на CD8⁺Т-лимфоциты [33,34]. Помимо синтеза противовоспалительных факторов, ТгВ-клетки также могут секретировать провоспалительные цитокины, такие как ИЛ-6 и ФНО- α . Данные ряда исследований показали, что частота ИЛ-6-продуцирующих ТгВ-клеток повышена при СКВ, ССД и других аутоиммунных заболеваниях [35-37]. ИЛ-6 ограничивает дифференцировку CD4⁺Т-клеток в Трег и индуцирует аутореактивные

Т-клеточные ответы Т1/Т17 типа [38]. Таким образом, про- и противовоспалительные цитокины, вырабатываемые ТгВ-клетками могут влиять на их функциональную стабильность. Следует отметить, что ТгВ-клетки состоят из ряда подмножеств с различными фенотипическими и регуляторными функциями. В нашей группе пациентов с ранней СКВ выявлено достоверно более высокое содержание данной клеточной субпопуляции в группе пациентов с низкой активностью по SLEDAI-2K, а также отрицательная корреляция со SLICC, что позволяет говорить о регуляторной роли данной клеточной субпопуляции.

Заключение. Была установлена взаимосвязь между субпопуляциями В-лимфоцитов, активностью и тяжестью СКВ. У пациентов с ранней стадией СКВ наблюдается значимое повышение практически всех анализируемых субпопуляций В-лимфоцитов и снижение содержания CD3⁺CD4⁺ Т-лимфоцитов. Уровень клеток памяти, «переключенных» клеток памяти, двойных негативных клеток коррелирует с содержанием аутоантител, развитием нефрита и индексом повреждения SLICC. Транзиторные В-лимфоциты можно рассматривать как регуляторные клетки, их содержание обратно коррелирует со SLICC и ассоциируется с более низкой активностью по SLEDAI-2K.

ЛИТЕРАТУРА (П. П. 2-5, 9-38 СМ. REFERENCES)

1. Насонов Е.Л., Соловьев С.К., Аршинов А.В. Системная красная волчанка: история и современность. *Научно-практическая ревматология*. 2022; 60(4): 397–412. DOI: 10.47360/1995-4484-2022-397-412.
6. Супоницкая Е.В., Алексанкин А.П., Меснянкина А.А., Александрова Е.Н., Панафидина Т.А., Соловьев С.К. Характеристика субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови у больных активной системной красной волчанкой. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017;62: 418-22. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-7-418-422.
7. Супоницкая Е.В., Алексанкин А.П., Меснянкина А.А., Панафидина Т.А., Соловьев С.К., Александрова Е.Н., Насонов Е.Л. Корреляция высокого уровня двойных негативных в-лимфоцитов периферической крови с активностью системной красной волчанки. *Медицинский алфавит*. 2016; 19: 27-8.
8. Меснянкина А.А., Соловьев С.К., Александрова Е.Н. Динамика субпопуляции В-лимфоцитов у больных системной красной волчанкой на фоне терапии генно-инженерными биологическими препаратами. *Научно-практическая ревматология*. 2017; 55(3): 252-60. DOI: 10.14412/1995-4484-2017-252-260.

REFERENCES

1. Nasonov E.L., Soloviev S.K., Arshinov A.V. Systemic lupus erythematosus: history and modernity. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya*. 2022; 60(4): 397–412. DOI: 10.47360/1995-4484-2022-397-412. (in Russian)
2. Dörner T, Giesecke C., Lipsky P. Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE. *Arthritis Res. Ther.* 2011;13(5): 243. DOI: 10.1186/ar3433.
3. Tanaka Y, Kubo S, Iwata S, Yoshikawa M., Nakayama S. B cell phenotypes, signaling and their roles in secretion of antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* 2018;186: 21-5. DOI: 10.1016/j.clim.2017.07.010.
4. Kaminski D.A., Wei C., Rosenberg A.F., Lee F., Sanz I. Multiparameter flow cytometry and bioanalytics for B cell profiling in systemic lupus erythematosus. *Methods Mol. Biol.* 2012;900: 109-34. DOI: 10.1007/978-1-60761-720-4_6.
5. Kubo N.S., Yoshikawa M., Miyazaki Y., Sakata K., Nakano K., Iwata

- S. et al. Peripheral immunophenotyping identifies three subgroups based on T cell heterogeneity in lupus patients. *Arthritis Rheumatol.* 2017; 69(10): 2029-37. DOI: 10.1002/art.40180.
6. Suponitskaya E.V., Aleksankin A.P., Mesnyankina A.A., Alexandrova E.N., Panafidina T.A., Soloviev S.K. The characteristic of sub-populations of B-lymphocytes of peripheral blood in patients with systemic lupus erythematosus. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2017; 62 (7): 418-22. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-7-418-422. (in Russian)
 7. Suponitskaya E.V., Aleksankin A.P., Mesnyankina A.A., Panafidina T.A., Soloviev S.K., Alexandrova E.N., Nasonov E.L. Association of increased frequencies of peripheral blood double-negative (IgD-CD27-) B-cell subset with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Meditsinskiy alfavit.* 2016; 19: 27-8. (in Russian)
 8. Mesnyankina A.A., Solovyev S.K., Aleksandrova E.N. The time course of changes in B lymphocyte subpopulations in patients with systemic lupus erythematosus during therapy with biological agents. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya.* 2017; 55(3): 252-60. DOI: 10.14412/1995-4484-2017-252-260. (in Russian)
 9. Becker A.M., Dao K.H., Han B.K. SLE peripheral blood B cell, T cell and myeloid cell transcriptomes display unique profiles and each subset contributes to the interferon signature. *PLoS One.* 2013; 24;8(6): e67003. DOI: 10.1371/journal.pone.0067003.
 10. Nakayamada S., Takahashi H., Kanno Y., O'Shea J.J. Helper T-cell diversity and plasticity. *Curr. Opin. Immunol.* 2012; 24(3): 297-302. DOI: 10.1016/j.coi.2012.01.014.24.
 11. Nakayamada S., Iwata S., Tanaka Y. Relevance of lymphocyte subsets to B-cell targeted therapy in systemic lupus erythematosus. *Int. J. Rheum. Dis.* 2015;18(2): 208-18. DOI: 10.1111/1756-185X.12534.18.
 12. Catalán D., Mansilla M.A., Ferrier A., Soto L., Oleinika K. Immunosuppressive mechanisms of regulatory B-cells. *Front. Immunol.* 2021; 29:12: 611795. DOI: 10.3389/fimmu.2021.611795.
 13. Jansen K., Cevhertas L., Ma S., Satitsuksanoa P., Akdis M., van de Veen W. Regulatory B cells, A to Z. *Allergy.* 2021; 76(9): 2699-2715. DOI: 10.1111/all.14763.
 14. Marie-Cardine A., Divay F., Dutot I., Green A., Perdrix A., Boyer O. et al. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Immunol.* 2008; 127(1): 14-25. DOI: 10.1016/j.clim.2007.11.013.
 15. Simon Q., Pers J.O., Cornec D., Pottier L., Mageed R.A., Hillion S. In-depth characterization of CD24(high)CD38(high) transitional human B cells reveals different regulatory profiles. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016;137(5): 1577-1584.e10. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.09.014.
 16. Petri M., Orbai A.M., Alarcón 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 Rheum.* 2012;64(8): 2677-86. DOI: 10.1002/art.34473.
 17. Gladman D.D., Ibanez D., Urowitz M.B. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J. Rheumatol.* 2002; 29: 288-91.
 18. Gladman D.D., Ginzler E., Goldsmith C., Fortin P., Liang M., Urowitz M. et al. The development and initial validation of the systemic lupus international collaborating clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthr. Rheum.* 1996; 39(3): 363-9. DOI: 10.1002/art.1780390303
 19. Tipton C.M., Fucile C.F., Darce J., Chida A., Ichikawa T. Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus. *Nat. Immunol.* 2015; 16(7): 755-65. DOI: 10.1038/ni.3175.
 20. Kosalka J., Jakiela B., Musial J. Changes of memory B- and T-cell subsets in lupus nephritis patients. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2016; 54(1): 32-41. DOI: 10.5603/FHC.a2016.0005.
 21. Rodríguez-Bayona B., Ramos-Amaya A., Pérez-Venegas J.J., Rodríguez C., Brieva J.A. Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD IgM B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res. Ther.* 2010; 12(3): R108. DOI: 10.1186/ar3042.
 22. Iwata S., Tanaka Y. B-cell subsets, signaling and their roles in secretion of autoantibodies. *Lupus.* 2016; 25(8): 850-6. DOI: 10.1177/0961203316643172.
 23. Wehr C., Eibel H., Masilamani M., Illges H., Schlesier M. A new CD21low B cell population in the peripheral blood of patients with SLE. *Clin. Immunol.* 2004; 113(2): 161-71. DOI: 10.1016/j.clim.2004.05.010.
 24. Wei C., Anolik J., Cappione A., Zheng B., Pugh-Bernard A. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 2007; 178(10): 6624-33. DOI: 10.4049/jimmunol.178.10.6624.
 25. Korganow A.S., Knapp A.M., Nehme-Schuster H., Soulas-Sprauel P., Poindron V. Peripheral B cell abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus in quiescent phase: decreased memory B cells and membrane CD19 expression. *J. Autoimmun.* 2010; 34(4): 426-34. DOI: 10.1016/j.jaut.2009.11.002.
 26. Blair P.A., Norena L.Y., Flores-Borja F., Rawlings D.J., Isenberg D.A., Ehrenstein M.R. et al. CD19(+)/CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity.* 2010; 32(1): 129-40. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.11.009.
 27. Carvajal Alegria G., Gazeau P., Hillion S., Daïen C.I., Cornec D. Could lymphocyte profiling be useful to diagnose systemic autoimmune diseases? *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2017; 53(2): 219-36. DOI: 10.1007/s12016-017-8608-5.
 28. Taher T.E., Ong V.H., Bystrom J., Hillion S., Simon Q., Denton C.P. et al. Association of defective regulation of autoreactive interleukin-6-producing transitional B lymphocytes with disease in patients with systemic sclerosis. *Arthr. Rheumatol.* 2018; 70(3): 450-61. DOI: 10.1002/art.40390.
 29. Piper C.M., Wilkinson M.L., Deakin C.T., Otto G.W., Dowle S., Durland C.L. et al. CD19(+)/CD24(hi)CD38(hi) B cells are expanded in juvenile dermatomyositis and exhibit a proinflammatory phenotype after activation through toll-like receptor 7 and interferon-alpha. *Front. Immunol.* 2018; 9: 1372. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01372.
 30. Pieper K., Grimbacher B., Eibel H. B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 131(4): 959-71. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.01.046.
 31. Suryani S., Tangye S.G. Therapeutic implications of advances in our understanding of transitional B-cell development in humans. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2010; 6(5): 765-75. DOI: 10.1586/eci.10.55.
 32. Suryani S., Fulcher D.A., Santner-Nanan B., Nanan R., Wong M., Shaw P.J. et al. Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood.* 2010;115(3): 519-29. DOI: 10.1182/blood-2009-07-234799.
 33. Nova-Lamperti E., Fanelli G., Becker P.D., Chana P., Elgueta R., Dodd P.C. et al. IL-10-produced by human transitional B-cells down-regulates CD86 expression on B-cells leading to inhibition of CD4+ T-cell responses. *Sci. Rep.* 2016;6: 20044. DOI: 10.1038/srep20044.
 34. Flores-borja F., Bosma A., Ng D., Reddy V., Ehrenstein M.R., Isenberg D.A. et al. CD19+ CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5(173): 173ra23. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005407.
 35. Liu M., Guo Q., Wu C., Sterlin D., Goswami S., Zhang Y. et al. Type I interferons promote the survival and proinflammatory properties of transitional B cells in systemic lupus erythematosus patients. *Cell Mol. Immunol.* 2019; 16(4): 367-79. DOI: 10.1038/s41423-018-0010-6.
 36. Lino A.C., Dorner T., Bar-Or A., Fillatreau S. Cytokine-producing B cells: a translational view on their roles in human and mouse autoimmune diseases. *Immunol. Rev.* 2016; 269(1): 130-44. DOI: 10.1111/imr.12374.
 37. Dieudonne Y., Gies V., Gufroy A., Keime C., Bird A.K., Liesveld J. et al. Transitional B cells in quiescent SLE: An early checkpoint imprinted by IFN. *J. Autoimmun.* 2019; 102: 150-8. DOI: 10.1016/j.jaut.2019.05.002.
 38. Zhou Y., Zhang Y., Han J., Yang M., Zhu J., Jin T. Transitional B cells involved in autoimmunity and their impact on neuroimmunological diseases. *J. Transl. Med.* 2020; 18(1): 131. DOI: 10.1186/s12967-020-02289-w.