

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ В1- И В2-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ СЕРОНЕГАТИВНОМ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ СУСТАВНОЙ ФОРМЫ

Сизякина Л.П., Харитонова М.В.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Иммунопатогенез ревматоидного артрита (РА) характеризуется поликлональной активацией В-лимфоцитов, изменением их субпопуляционного состава, нарушением периферической толерантности, усилением активации и дифференцировки В-клеток, а также дефектом негативной селекции. Были изучены методом проточной цитометрии фенотипы В1- и В2-лимфоцитов периферической крови, их соотношение и закономерности реагирования при серонегативном варианте РА суставной формы в период реактивации заболевания, а также в зависимости от давности и степени активности.

Выявлено снижение В1-лимфоцитов с увеличением степени активности и давности течения РА. Преобладающей субпопуляцией в периферической крови оставались В2-лимфоциты. Изучаемые параметры В2-лимфоцитов при стаже заболевания до 5 лет и более были выше данных контрольной группы, однако при их сопоставительном анализе достоверных изменений в их динамике не выявлено. С увеличением степени активности снижается активационный потенциал В2-лимфоцитов и процессы передачи костимулирующего сигнала через комплекс CD40/CD40L.

Определение В1- и В2-лимфоцитов при различных вариантах РА могут быть использованы в качестве диагностических и прогностических маркеров.

Ключевые слова: серонегативный ревматоидный артрит, В1-, В2-лимфоциты, костимулирующие молекулы, проточная цитометрия

DYNAMICS OF CHANGES IN B1 AND B2 LYMPHOCYTE POPULATIONS IN ARTICULAR FORM OF SERONEGATIVE RHEUMATOID ARTHRITIS

Sizyakina L.P., Kharitonova M.V.

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) is characterized by polyclonal activation of B lymphocytes, changes in their subpopulation composition, impaired peripheral tolerance, increased activation and differentiation of B cells, as well as deficient negative selection. Peripheral blood phenotypes of B1 and B2 lymphocytes, their correlation and response patterns in seronegative variant of articular RA type

Адрес для переписки:

Харитонова Мария Владимировна
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
344022, Россия, г. Ростов-на-Дону,
пер. Нахичеванский, 29.
Тел.: 8 (863) 263-44-41.
E-mail: mari.kharitonova.80@mail.ru

Address for correspondence:

Kharitonova Maria V.
Rostov State Medical University
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don,
Nakhichevansky lane, 29.
Phone: 7 (863) 263-44-41.
E-mail: mari.kharitonova.80@mail.ru

Образец цитирования:

Л.П. Сизякина, М.В. Харитонова «Динамика изменений В1- и В2-лимфоцитов при серонегативном ревматоидном артрите суставной формы» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1073-1080.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1073-1080
© Сизякина Л.П., Харитонова М.В., 2019

For citation:

L.P. Sizyakina, M.V. Kharitonova "Dynamics of changes in B1 and B2 lymphocyte populations in articular form of seronegative rheumatoid arthritis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1073-1080.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1073-1080
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1073-1080

during the disease reactivation, as well as dependence on the age and degree of activity were studied by flow cytometry.

A decrease in B1 lymphocytes along with increased degree of clinical activity and duration of RA has been revealed. B2 lymphocytes remained the predominant subpopulation in peripheral blood. The studied parameters of B2 lymphocytes in the patients with disease duration of up to 5 years and more were higher than the data obtained in a control group. However, no significant changes in their dynamics were revealed upon comparative analysis. With increasing degree of clinical activity, the decreased activation potential of B2 lymphocytes was revealed, along with reduction of costimulatory signal transmission via the CD40/CD40L complex. Hence, detection of B1 and B2 lymphocytes in various types of RA may be used as diagnostic and prognostic markers.

Keywords: *seronegative rheumatoid arthritis, B1 cells, B2 cells, co-stimulating molecules, flow cytometry*

Введение

В настоящее время наблюдается широкое распространение и неуклонный рост числа заболеваний, в возникновении и прогрессировании которых нарушения иммунной системы играют основную патогенетическую роль. Одним из представителей данных заболеваний является ревматоидный артрит (РА) [5, 8, 12].

Иммунопатогенез ревматоидного артрита (РА) сложен и многогранен, затрагивает все звенья иммунной системы, и в частности В-лимфоциты. В-клетки являются не только продуцентами провоспалительных цитокинов, аутоантител (ревматоидный фактор, антитела к циклическому цитруллинированному пептиду, антитела к модифицированному виментину и др.), но и презентируют антигены Т-лимфоцитам, влияют на их активацию посредством корцепторных молекул [3, 7, 9, 11, 15, 17, 18, 19, 20, 21].

В настоящее время широко исследуется роль при ревматических аутоиммунных заболеваниях субпопуляций В-лимфоцитов, таких как наивные В-клетки, плазмобласты, В-клетки памяти, при этом полученные данные различны и противоречивы [2, 10, 12, 16, 20, 21].

Несмотря на достигнутые успехи в научном и клиническом изучении РА, многие вопросы остаются открытыми. В частности, практически отсутствуют данные о соотношении В1- и В2-лимфоцитов, закономерности их работы у пациентов с серонегативным вариантом течения РА суставной формы в период активации заболевания, степени активности и давности течения.

Целью работы является изучение соотношения В1- и В2-лимфоцитов и особенности их фенотипов у пациентов с серонегативным вариантом РА суставной формы в период реактивации заболевания, а также в зависимости от длительности течения и степени активности РА.

Материалы и методы

В рамках выполненной работы обследован 41 пациент с серонегативным РА суставной формы: 36 женщин (87,8%) и 5 мужчин (12,2%). Средний возраст обследуемых составил 50 ± 20 лет, при этом лиц до 50 лет — 12 человек (29,27%), старше

50 — 29 (70,73%). В зависимости от давности течения заболевания обследуемые распределились следующим образом: до 5 лет — 20 (48,78%) пациентов, более 5 лет — 21 (51,22%). В зависимости от прогрессии аутоиммунного процесса пациенты были разделены: со II степенью активности — 20 пациентов (48,78%), с III — 21 (51,22%).

Пациенты находились на стационарном лечении в терапевтическом отделении № 2 ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, ревматологическом отделении ГБУ ОКБ № 2 г. Ростова-на-Дону. Иммунологические исследования проводились на базе НУПК «Клиническая иммунология». В качестве контрольной группы были обследованы 20 практически здоровых доноров крови. Диагноз устанавливался на основании диагностических критериев, разработанных в 2010 г. Американской коллегией ревматологов (American College of Rheumatology — ACR) и Европейской антиревматической лигой (European League Against Rheumatism — EULAR) [4].

Для изучения иммунофенотипа В-лимфоцитов, а также процессов их межклеточного взаимодействия с Т-лимфоцитами был использован комплекс иммунологических методов исследования.

Изучение субпопуляционного состава В-лимфоцитов периферической крови проводили с помощью проточной цитофлуориметрии по экспрессии мембранных и внутриклеточных антигенов, с учетом результатов на проточном лазерном цитофлуориметре FC 500 (Beckman Coulter, США) [1, 13, 15].

Выделяли следующие субпопуляции В-клеток:

В1-лимфоциты ($CD19^+CD5^+CD45^+$), зрелые В2-лимфоциты ($CD19^+CD5^+CD45^+$), наивные В2-клетки ($CD19^+CD45RA^+CD27^+CD45^+$), В2-клетки памяти ($CD19^+CD45RA^+CD27^+CD45^+$), маркеры презентации антигена ($CD19^+HLA-DR^+CD45^+$), маркеры ранней активации ($CD19^+CD23^+CD45^+$, $CD19^+CD25^+CD45^+$), костимулирующие молекулы ($CD19^+CD40^+CD45^+$, $CD19^+CD86^+CD45^+$), готовность В-лимфоцитов к апоптозу ($CD19^+CD95^+CD45^+$), маркеры апоптоза В-клеток ($CD19^+Ap^+CD45^+$), а также лиганд для взаимодействия Т-лимфоцитов с В-клетками ($CD3^+CD4^+CD40L^+CD45^+$).

Функциональную активность В-лимфоцитов оценивали по количественному содержанию сыровороточных иммуноглобулинов классов А, М, G с использованием метода радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини. Антигенсвязывающую функцию сыровороточных иммуноглобулинов оценивали по количеству циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) методом преципитации в полиэтиленгликоле 6000.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием статистического пакета Statistica 6.2 (StatSoft Inc., США) и электронных таблиц Excel 2007. Достоверность различий в группах оценивалась с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни и Вилкоксона. Достоверными считались результаты при $p \leq 0,05$.

Результаты

Анализ содержания в периферической крови В1-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD19⁺CD5⁺ у пациентов с серонегативным РА суставной формы в стадию обострения выявил их почти четырехкратный рост по отношению к контрольной группе ($p < 0,001$) (табл. 1). При этом также выявлено, что В2-лимфоциты, негативные по экспрессии мембранного антигена CD5⁺, увеличены по отношению к референтным данным в 1,5 раза (табл. 1). Распределение субпопуляций В1- и В2-лимфоцитов к общей популяции В-клеток периферической крови составило: В1 — 7,6%, а В2 — 92,4% соответственно. Таким образом, несмотря на значительное увеличение содержания В1-лимфоцитов, все же преобладающей субпопуляцией в периферической крови являются В2-лимфоциты. Учитывая полученные данные, представляло интерес проанализировать фенотип В2-лимфоцитов по экспрессии мембранных и внутриклеточных маркеров, характеризующих

презентацию антигена, процессы межклеточной кооперации, активацию, пролиферацию, дифференцировку и апоптоз.

Активационный потенциал В2-лимфоцитов у пациентов с серонегативным РА суставной формы в период реактивации проявлялся увеличением экспрессии мембранных маркеров ранней активации CD25⁺, CD23⁺ по сравнению с группой контроля. Процесс пролиферации и дифференцировки В2-лимфоцитов характеризовался увеличением количества наивных CD3⁺CD19⁺CD27⁺ и зрелых клеток CD3⁺CD19⁺CD5⁺ по отношению к группе контроля и отсутствием статистически значимых изменений в количестве клеток иммунологической памяти CD19⁺CD45RA⁺CD27⁺ (табл. 1). Уровень В2-лимфоцитов с фенотипом CD19⁺CD95⁺, готовых к восприятию апоптотического сигнала, и клеток, ушедших в апоптоз (CD19⁺An⁺), документируется выше контрольных значений (табл. 1). Процесс презентации антигена и межклеточная кооперация В- и Т-лимфоцитов проявлялся в увеличении экспрессии мембранной молекулы HLA-DR, костимуляторных молекул CD40, CD86 на В2-лимфоцитах (табл. 1), а также CD40L-лиганда ($0,73 \pm 0,16\%$ и $0,3 \pm 0,005\%$) на Т-хелперах, обеспечивающих взаимодействие с CD40-молекулой по сравнению с группой контроля.

Анализ гуморальных компонентов иммунного ответа показал, что суммарная интеграция работы В1- и В2-клеток привела к повышению синтеза сыровороточных иммуноглобулинов классов IgA ($2,24 \pm 0,1$ и $1,42 \pm 0,05$ г/л), IgM ($1,41 \pm 0,06$ и $1,10 \pm 0,02$ г/л), IgG ($11,4 \pm 0,24$ и $10,2 \pm 0,22$ г/л), а также ЦИК ($98,8 \pm 8,04$ и $63,9 \pm 0,6$ у. е.) по отношению к группе контроля.

Таким образом, в стадию активности патологического процесса мы выявили существенные изменения функциональных потенциалов различных фенотипов В-лимфоцитов. Однако, учи-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ В-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ СЕРОНЕГАТИВНОМ ВАРИАНТЕ СУСТАВНОЙ ФОРМЫ РА (M±m)

TABLE 1. PARAMETERS OF B LYMPHOCYTES UNDER THE SERONEGATIVE VARIANT OF THE ARTICULAR FORM RA (M±m)

Показатели Indicators	Серонегативный вариант суставной формы РА Seronegative variant of articular form of RA	Контроль Control group
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD45 ⁺ , %	$0,90 \pm 0,20^*$	$0,19 \pm 0,03$
CD19 ⁺ CD45RA ⁺ CD27 ⁺ CD45 ⁺ , %	$8,90 \pm 0,74^*$	$5,65 \pm 0,46$
CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD45 ⁺ , %	$11,80 \pm 0,71^*$	$7,93 \pm 0,45$
CD19 ⁺ CD45RA ⁺ CD27 ⁺ CD45 ⁺ , %	$2,67 \pm 0,33$	$2,27 \pm 0,34$
CD19 ⁺ CD23 ⁺ CD45 ⁺ , %	$3,35 \pm 0,46^*$	$0,90 \pm 0,14$
CD19 ⁺ CD25 ⁺ CD45 ⁺ , %	$0,35 \pm 0,04^*$	$0,050 \pm 0,013$
CD19 ⁺ CD95 ⁺ CD45 ⁺ , %	$1,20 \pm 0,20^*$	$0,33 \pm 0,03$
CD19 ⁺ An ⁺ CD45 ⁺ , %	$1,55 \pm 0,13^*$	$0,50 \pm 0,03$
CD19 ⁺ CD40 ⁺ CD45 ⁺ , %	$10,10 \pm 0,72^*$	$7,02 \pm 0,42$
CD19 ⁺ CD86 ⁺ CD45 ⁺ , %	$0,90 \pm 0,10^*$	$0,13 \pm 0,01$
CD19 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺ , %	$10,10 \pm 0,75^*$	$7,4 \pm 0,4$

Примечание. Отмечены статистически достоверные различия между контрольной группой при * $p < 0,05$.

Note. There were statistically significant differences between the control group at * $p < 0.05$.

тывая, что РА — хронический воспалительный процесс, протекающий годами, определенный интерес представлял анализ функциональных свойств фенотипов В-лимфоцитов в стадии реактивации в зависимости от длительности течения патологического процесса.

Количественный анализ общего пула В-лимфоцитов у пациентов при длительности течения заболевания до 5 лет показал статистически значимое увеличение количества как В1-лимфоцитов ($1,40 \pm 0,49$ и $0,19 \pm 0,03\%$), так и В2-клеток ($13,0 \pm 1,09$ и $7,93 \pm 0,45\%$) по отношению к контролю. При этом их процентное соотношение к общей популяции В-лимфоцитов периферической крови составило: В1-лимфоцитов — 10,8%, а В2 — 89,2% соответственно. При стаже заболевания более 5 лет выявлено увеличение В1-лимфоцитов в 3 раза ($0,6 \pm 0,11$ и $0,19 \pm 0,03\%$), а В2-лимфоцитов — в 1,4 раза ($11,1 \pm 0,91$ и $7,93 \pm 0,45\%$) по отношению к группе контроля. Соотношение В1- и В2-лимфоцитов составило 5,4 и 94,6% соответственно. Однако сопоставительный анализ в зависимости от длительности течения РА показал, что с увеличением стажа заболевания более 5 лет наблюдается статистически значимое снижение количества В1-лимфоцитов почти в 4 раза, при этом количество В2-лимфоцитов не зависит от длительности течения РА (табл. 2).

Увеличение количества наивных и зрелых В2-лимфоцитов определяется вне зависимости от длительности течения заболевания. Содер-

жание В-клеток памяти при стаже заболевания как до 5 лет, так и более находилось в пределах референтных значений (табл. 2).

Способность воспринимать активационный потенциал В2-лимфоцитов проявлялась в увеличении экспрессии мембранных молекул CD23, CD25 выше контрольных значений при длительности заболевания до 5 лет и более, однако сопоставительный анализ статистически значимых различий не выявил (табл. 2).

При течении РА до 5 лет и более процесс апоптоза В2-лимфоцитов характеризовался увеличением экспрессии мембранного антигена CD95⁺ и внутриклеточного рецептора к аннексину (An) по отношению к данным контрольной группы (табл. 2).

Уровень В2-лимфоцитов с фенотипом CD19⁺HLA-DR⁺, CD19⁺CD40⁺CD19⁺CD86⁺, а также CD40L на активированных CD4-лимфоцитах при стаже заболевания до 5 лет и более оказался достоверно выше по сравнению с контролем (табл. 2).

Сравнительный анализ маркеров межклеточного взаимодействия Т- и В-лимфоцитов выявил снижение готовности Т-хелперов к межклеточной кооперации, что документируется тенденцией к снижению на них экспрессии CD40L к молекуле при длительности заболевания более 5 лет, однако экспрессия на В2-лимфоцитах костимулирующей молекулы CD40 не зависела от давности заболевания (табл. 2). При этом костимулирующая молекула CD86 имеет тенденцию

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ В-ЛИМФОЦИТОВ СЕРОНЕГАТИВНОГО ВАРИАНТА СУСТАВНОЙ ФОРМЫ РА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ТЕЧЕНИЯ (M±m)

TABLE 2. PARAMETERS OF B LYMPHOCYTES OF THE SERONEGATIVE VARIANT OF THE ARTICULAR FORM RA DEPENDING ON THE DURATION OF THE DISEASE (M±m)

Показатели Indicators	Длительность заболевания до 5 лет Duration of disease up to 5 years	Длительность заболевания более 5 лет Duration of disease more than 5 years	Контроль Control group
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD45 ⁺ , %	$1,40 \pm 0,49^*$	$0,60 \pm 0,11^{**}$	$0,19 \pm 0,03$
CD19 ⁺ CD45RA ⁺ CD27 ⁺ CD45 ⁺ , %	$10,20 \pm 0,85^*$	$8,12 \pm 1,05^*$	$5,65 \pm 0,46$
CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD45 ⁺ , %	$13,00 \pm 1,09^*$	$11,10 \pm 0,91^*$	$7,93 \pm 0,45$
CD19 ⁺ CD45RA ⁺ CD27 ⁺ CD45 ⁺ , %	$2,98 \pm 0,52$	$2,47 \pm 0,42$	$2,27 \pm 0,34$
CD19 ⁺ CD23 ⁺ CD45 ⁺ , %	$3,74 \pm 0,76^*$	$3,12 \pm 0,60^*$	$0,90 \pm 0,14$
CD19 ⁺ CD25 ⁺ CD45 ⁺ , %	$0,36 \pm 0,06^*$	$0,35 \pm 0,05^*$	$0,050 \pm 0,013$
CD19 ⁺ CD95 ⁺ CD45 ⁺ , %	$1,00 \pm 0,31^*$	$1,33 \pm 0,26^*$	$0,33 \pm 0,03$
CD19 ⁺ An ⁺ CD45 ⁺ , %	$1,55 \pm 0,19^*$	$1,55 \pm 0,18^*$	$0,50 \pm 0,03$
CD19 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺ , %	$12,00 \pm 1,01^*$	$9,30 \pm 1,00^*$	$7,4 \pm 0,4$
CD19 ⁺ CD40 ⁺ CD45 ⁺ , %	$11,50 \pm 1,17^*$	$9,24 \pm 0,90^*$	$7,02 \pm 0,42$
CD19 ⁺ CD86 ⁺ CD45 ⁺ , %	$0,764 \pm 0,090^*$	$1,0 \pm 0,2^*$	$0,13 \pm 0,01$
CD4 ⁺ CD40L ⁺ CD45 ⁺ , %	$1,00 \pm 0,39$	$0,60 \pm 0,12$	$0,300 \pm 0,005$

Примечание. Отмечены статистически достоверные различия между контрольной группой при * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$ — отмечены статистически достоверные различия между длительностью течения РА.

Note. There were statistically significant differences between the control group at * $p < 0.05$; ** $p < 0.05$, statistically significant differences between the duration of the course of RA.

к увеличению экспрессии на В2-клетках, компенсаторно усиливая сигнал от пары CD40/CD40L на Т-хелперы с последующей их активацией при длительности течения РА более 5 лет. Антигенпредставляющая функция В-лимфоцитов имела тенденцию к снижению при длительности заболевания более 5 лет (табл. 2).

Для более детального анализа наличия взаимосвязи между изменением фенотипа В2-лимфоцитов и длительностью течения РА был проведен корреляционный анализ, который выявил, что с увеличением длительности заболевания более 5 лет наблюдается умеренная отрицательная связь с экспрессией корцепторной молекулы CD40⁺ ($r = -0,44$; $p = 0,02$) на В2-клетках, количеством наивных В-клеток ($r = -0,49$; $p = 0,007$), а также антигенпредставляющей функцией В2-лимфоцитов ($r = -0,42$; $p = 0,022$).

Течение РА до 5 лет и более сопровождалось достоверным увеличением количества содержания сывороточных иммуноглобулинов классов IgA (до 5 лет — $2,39 \pm 0,13$ г/л, более 5 лет — $2,14 \pm 0,12$ г/л, контроль — $1,42 \pm 0,05$ г/л), IgM (до 5 лет — $1,52 \pm 0,07$ г/л, более 5 лет — $1,34 \pm 0,07$ г/л, контроль — $1,10 \pm 0,02$ г/л) IgG (до 5 лет — $11,4 \pm 0,4$ г/л, более 5 лет — $11,4 \pm 0,33$ г/л, контроль — $10,2 \pm 0,22$ г/л) и ЦИК (до 5 лет — $101 \pm 12,5$ у. е., более 5 лет — $97,7 \pm 10,7$ у. е., контроль — $63,9 \pm 0,57$ у. е.) по отношению к контрольной группе.

Сопоставительный анализ суммарной работы В1- и В2-лимфоцитов выявил тенденцию к снижению содержания иммуноглобулина класса IgA ($2,39 \pm 0,13$ г/л и $2,14 \pm 0,12$ г/л) при манифестации

заболевания более 5 лет, тогда как иммуноглобулины классов IgM, IgG и ЦИК статистически значимо не различались, вне зависимости от длительности течения серонегативного РА суставной формы.

Отмеченные особенности, связанные давностью заболевания, послужили основанием для дальнейшего поиска и выявления различий в реакциях В-звена иммунной системы в зависимости от степени активности ревматоидного артрита.

Так, при II степени активности РА выявлено увеличение в 5,8 раза количества В1-лимфоцитов и в 1,3 раза В2-лимфоцитов по отношению к контрольной группе (табл. 3). Их соотношение к общему пулу В-клеток составило: В1 — 10,4%, а В2 — 89,6% соответственно. В1-лимфоциты при III степени активности характеризовались увеличением в 2,6 раза, а В2-клетки — в 1,8 раза по отношению к данным контрольной группы (табл. 3). Соотношение субпопуляций В1- и В2-лимфоцитов составило 3,6 и 96,4% соответственно. Сопоставительный анализ в зависимости от степени активности патологического процесса показал, что количество В1-лимфоцитов достоверно снижается от II степени активности к III ($1,1 \pm 0,33$ и $0,5 \pm 0,1$ %) практически в 3,2 раза, а количество В2-лимфоцитов увеличивается ($10,6 \pm 1,0$ и $14,0 \pm 0,9$ %) в 1,3 раза.

Количество наивных В-клеток с фенотипом CD19⁺CD27⁻ и зрелых В2-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺) при II и III степени активности было выше референтных значений (табл. 3). Количество В-клеток памяти с фенотипом CD19⁺CD27⁺ при II степени активности было

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ В-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ АКТИВНОСТИ СЕРОНЕГАТИВНОГО ВАРИАНТА СУСТАВНОЙ ФОРМЫ РА (M±m)

TABLE 3. PARAMETERS OF B LYMPHOCYTES WITH DIFFERENT DEGREES OF ACTIVITY OF THE SERONEGATIVE VARIANT OF ARTICULAR FORM RA (M±m)

Показатели Indicators	II степень активности II degree of activity	III степень активности III degree of activity	Контроль Control group
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD45 ⁺ , %	1,10±0,33*	0,5±0,1**	0,19±0,03
CD19 ⁺ CD45RA ⁺ CD27 ⁻ CD45 ⁺ , %	8,13±0,81*	10,60±1,12*	5,65±0,46
CD3 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD45 ⁺ , %	10,6±1,0*	14,0±0,9**	7,93±0,45
CD19 ⁺ CD45RA ⁺ CD27 ⁺ CD45 ⁺ , %	2,16±0,30	3,56±0,90*	2,27±0,34
CD19 ⁺ CD23 ⁺ CD45 ⁺ , %	3,61±0,66*	2,89±0,78*	0,90±0,14
CD19 ⁺ CD25 ⁺ CD45 ⁺ , %	0,40±0,08*	0,21±0,03**	0,050±0,013
CD19 ⁺ CD95 ⁺ CD45 ⁺ , %	1,20±0,30*	1,20±0,33*	0,33±0,03
CD19 ⁺ An ⁺ CD45 ⁺ , %	1,55±0,15*	1,30±0,10*	0,50±0,03
CD19 ⁺ CD40 ⁺ CD45 ⁺ , %	9,31±1,00*	11,70±1,67*	7,02±0,42
CD19 ⁺ CD86 ⁺ CD45 ⁺ , %	0,95±0,16*	0,90±0,09*	0,13±0,01
CD19 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺ , %	9,11±1,45*	11,40±1,49*	7,4±0,4

Примечание. Отмечены статистически достоверные различия между контрольной группой при * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$ — отмечены статистически достоверные различия между II и III степенью активности.

Note. There were statistically significant differences between the control group at * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$, statistically significant differences between II and III degree of activity.

в пределах референтных значений, однако при III степени активности отмечен их рост по отношению к группе контроля. Сопоставительный анализ в зависимости от степени активности выявил увеличение количества зрелых В2-лимфоцитов от средней к высокой степени активности, тогда как наивные и В-клетки памяти достоверно не изменялись от клинической манифестации РА (табл. 3).

Экспрессия маркера ранней активации CD23 статистически значимо не изменялась от II к III степени активности, но была выше данных контрольной группы (табл. 3). Рецептор к интерлейкину-2 (CD25) характеризовался достоверным снижением от II к III степени активности на В2-лимфоцитах (табл. 3).

Сохранение баланса между активированными и пролиферирующими В-клетками обеспечивается с помощью процесса апоптоза. Так, у пациентов со средней и высокой степенью активности выявлено увеличение экспрессии мембранного маркера готовности к апоптозу CD95 и количества апоптозирующих В2-лимфоцитов в реакции с аннексином по отношению к группе контроля (табл. 3). Однако сопоставительный анализ данных маркеров с ростом степени активности патологического процесса не выявил достоверных различий в их экспрессии (табл. 3).

Изучение экспрессии костимулирующих молекул и их влияния на процессы межклеточного контакта В- и Т-лимфоцитов выявило увеличение экспрессии молекулы CD40 на В2-лимфоцитах с одновременным увеличением экспрессии лиганда CD40L на Т-хелперах как при средней, так и при высокой степени активности РА по отношению к группе контроля (табл. 3). Сигналом к индукции или усилению экспрессии костимулирующей молекулы CD86 служит взаимодействие пары молекул CD40 и CD40L. Активационный сигнал, возникающий при их взаимодействии, носит двунаправленный характер, активирует как В-, так и Т-лимфоциты, а также повышает экспрессию молекул, участвующих в презентации антигена [17]. Данный факт в работе иллюстрируется статистически значимым увеличением экспрессии молекулы CD86 и HLA-DR на В2-лимфоцитах при II и III степени активности по отношению к контролю (табл. 3).

При сравнительном анализе процессов контактного взаимодействия Т- и В-лимфоцитов выявлено отсутствие значимых изменений в экспрессии костимулирующих молекул CD86, CD40 и мембранного антигена HLA-DR на В2-клетках от II степени активности к III. При этом наблюдается статистически значимое снижение относительного количества активированных Т-хелперов, экспрессирующих CD40L к молекуле CD40 на В2-лимфоцитах по мере роста степени активности патологического процесса ($0,90 \pm 0,3$ и $0,33 \pm 0,08\%$).

При анализе эффекторной фазы гуморального иммунного ответа при II и III степени активности выявлено статистически значимое увеличение содержания иммуноглобулинов классов IgA, IgM и ЦИК по отношению к контролю. Количественное содержание иммуноглобулина класса Ig G при II степени активности находилось в пределах референтных значений ($11,4 \pm 0,3$ и $10,2 \pm 0,22$ г/л), однако при III степени активности наблюдается увеличение по отношению к группе контроля ($11,8 \pm 0,6$ и $10,2 \pm 0,22$ г/л).

При сопоставительном анализе функциональной активности В-лимфоцитов не выявлено достоверных различий в содержании иммуноглобулинов классов IgA, IgM, IgG и ЦИК от II к III степени активности.

Обсуждение

В зависимости от наличия мембранного CD5-антигена все В-лимфоциты подразделяются на две субпопуляции: CD5⁺ (В1-клетки) и CD5⁻ (В2-клетки) [3, 6, 10, 14].

В1-лимфоциты являются самовозобновляющимися долгоживущими клетками. Играют важную роль в осуществлении первой линии защиты от инкапсулированных бактерий, принимают участие в формировании мукозального иммунитета, обеспечивают защиту слизистых оболочек респираторного и пищеварительного тракта. В1-лимфоциты не формируют клеток памяти. Помимо защитной роли, В1-лимфоциты могут быть причиной развития лимфопролиферативной и аутоиммунной патологии, так как данные клетки потенциально аутореактивны и могут перекрестно реагировать со многими сходными антигенными детерминантами [15].

В2-лимфоциты являются основной популяцией В-клеток, циркулирующих в периферической крови. Являются эффекторными клетками, принимающими участие в развитии и поддержании адаптивного иммунитета и аутоиммунных нарушений. Обладают свойствами иммунорегуляторных клеток, способны презентировать антигены Т-лимфоцитам, индуцировать активацию Т-клеток, синтезировать провоспалительные цитокины (TNF, IL-6, IL-1 β) [15].

Таким образом, процесс анализа субпопуляций В1- и В2-лимфоцитов показал, что количество В1-лимфоцитов снижается с увеличением длительности течения и степени активности серонегативного РА суставной формы, но все же данная субпопуляция остается выше данных контрольной группы. При этом доминирующей популяцией являются В2-лимфоциты.

Анализ экспрессии мембранных и внутриклеточных маркеров В2-клеток, вне зависимости от длительности течения РА, выявил однонаправленность реакций иммунной системы, а именно усиление презентации антигена, активации, апоптоза и процессов межклеточной

кооперации. При этом корреляционный анализ показывает, что чем больше стаж РА, тем меньше способность В2-лимфоцитов представлять антиген, взаимодействовать с Т-лимфоцитами и активировать не только их, но активироваться самим от двунаправленного костимулирующего сигнала, возникающего при взаимодействии костимулирующей молекулы CD40⁺ и соответствующего лиганда CD40L на Т-хелперах, а также снижении количества наивных В2-клеток.

Увеличение степени активности РА сопровождается снижением активационного потенциала В2-лимфоцитов за счет экспрессии рецептора к интерлейкину-2 (CD25), обеспечивающему поддержание пролиферации и выживания активированных антигеном В-клеток.

Процесс межклеточной кооперации сопровождается нарушением передачи активационного сигнала через комплекс CD40\CD40L, что приводило к анергии Т-хелперов и иллюстрировалось количественным их снижением. Ко-

стимуляторное взаимодействие CD40\CD40L служит мощным индуктором для пролиферации В-лимфоцитов, которая существенно усиливается под действием CD25. Из полученных данных следует, что при серонегативном РА суставной формы с увеличением степени активности происходит снижение экспрессии CD25, CD40L и снижение эффекторной функции В2-лимфоцитов, проявляющейся в отсутствии достоверного нарастания иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG в сыворотке крови.

Таким образом, выявленные изменения в иммунной системе у пациентов с серонегативным РА суставной формы свидетельствуют о важной роли В-лимфоцитов и процессов межклеточной кооперации в прогнозе течения заболевания. Становится очевидным, что по мере развития знаний о взаимосвязях и отличительных признаках фенотипов В-лимфоцитов при различных вариантах течения РА появятся новые биомаркеры в диагностике и прогнозе.

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" (project). *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268.
2. Будкова А.И., Лапин С.В., Серебрякова М.К., Кудрявцев И.В., Тришина И.Н., Маслянский А.Л., Тотолян Арег А. Субпопуляционный состав В-клеток периферической крови у больных системной красной волчанкой // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 175-184. [Budkova A.I., Lapin S.V., Serebryakova M.K., Kudryavtsev I.V., Trishina I.N., Maslyansky A.L., Totolyan Areg A. Subpopulation composition of peripheral blood B cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 175-184. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-175-184.
3. Дьяков И.Н., Сидорова Е.В. Субпопуляции В-лимфоцитов и влияние микроокружения на их функциональную активность // Пульмонология, 2010. № 5. С. 116-123. [Dyakov I.N., Sidorova E.V. Subpopulations of B lymphocytes and the effect of the microenvironment on their functional activity. *Pulmonologiya = Pulmonology*, 2010, no. 5, pp. 116-123. (In Russ.)]
4. Каратеев Д.Е., Олюнин Ю.А., Лучихина Е.Л. Новые классификационные критерии ревматоидного артрита ACR/EULAR 2010 шаг вперед к ранней диагностике // Научно-практическая ревматология, 2011. Т. 49, № 1. С. 10-15. [Karateev D.E., Olyunin Yu.A., Luchikhina E.L. New classification criteria for rheumatoid arthritis ACR/EULAR 2010 a step forward to early diagnosis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2011, Vol. 49, no. 1, pp. 10-15. (In Russ.)]
5. Козлов В.А. Клетки-супрессоры – основа иммунопатогенеза аутоиммунных заболеваний // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 1. С. 7-14. [Kozlov V.A. Suppressor cells are the basis of the immunopathogenesis of autoimmune diseases. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 1, pp. 7-14. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-7-14.
6. Кудрявцев И. В., Ильвес А.Г., Кробинец И. И., Минеев К. К., Серебрякова М.К., Петров А.М., Столярков И.Д. Изменения в субпопуляционном составе В-лимфоцитов периферической крови при рассеянном склерозе // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 2. С. 150-154. [Kudryavtsev I.V., Ilves A.G., Krobinec I. I., Mineev K.K., Serebryakova M.K., Petrov A.M., Stolyarov I.D. Changes in the subpopulation composition of peripheral blood B lymphocytes in multiple sclerosis. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 2, pp. 150-154. (In Russ.)]
7. 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.)]
8. Насонов Е.Л. Ингибция иммунных контрольных точек и аутоиммунитет: ревматологические проблемы // Научно-практическая ревматология, 2018. Т. 56, № 1. С. 5-9. [Nasonov E.L. Inhibition of immune control points and autoimmunity: rheumatological problems. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2018, Vol. 56, no. 1, pp. 5-9. (In Russ.)]

9. Насонов Е.Л. Проблемы иммунопатологии ревматоидного артрита: эволюция болезни // Научно-практическая ревматология, 2017. Т. 55, № 3. С. 277-294. [Nasonov E.L. Problems of immunopathology of rheumatoid arthritis: the evolution of the disease. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2017, Vol. 55, no. 3, pp. 277-294. (In Russ.)]
10. Сидорова Е.В. Долгоживущие В-клетки // Успехи современной биологии, 2013. Т. 133, № 4. С. 333-348. [Sidorova E.V. Long-lived B cells. *Uspekhi sovremennoy biologii = Successes of Modern Biology*, 2013, Vol. 133, no. 4, pp. 333-348. (In Russ.)]
11. Сизякина Л.П., Харитонов М.В. Характеристика В2-лимфоцитов у пациентов с серопозитивным ревматоидным артритом суставной формы // Иммунология, 2017. № 4. С. 226-228. [Sizyakina L.P., Kharitonova M.V. Characteristics of B2 lymphocytes in patients with seropositive rheumatoid arthritis of the articular form. *Immunologiya = Immunology*, 2017, no. 4, pp. 226-228. (In Russ.)]
12. Сизякина Л.П., Харитонов М.В. Характеристика В2-лимфоцитов у пациентов с серонегативным ревматоидным артритом суставной формы // Иммунология, 2018. Т. 39, № 2-3. С. 134-136. [Sizyakina L.P., Kharitonova M.V. Characteristics of B2 lymphocytes in patients with seronegative rheumatoid arthritis of the articular form. *Immunologiya = Immunology*, 2018, Vol. 39, no. 2-3, pp. 134-136. (In Russ.)]
13. Сизякина Л.П., Харитонов М.В. Особенности фенотипов В-лимфоцитов в зависимости от длительности течения серопозитивного варианта суставной формы ревматоидного артрита // Российский аллергологический журнал, 2019. Т. 16, № 1, ч. 2. С. 141-143. [Sizyakina L.P., Kharitonova M.V. Features of B lymphocyte phenotypes depending on the duration of the seropositive variant of the articular form of rheumatoid arthritis. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2019, Vol. 16, no. 1, Pt 2, pp. 141-143. (In Russ.)]
14. Супоницкая Е.В., Александрова Е.Н., Алексанкин А.П., Насонов Е.Л. Влияние терапии генно-инженерными биологическими препаратами на субпопуляции В-лимфоцитов при ревматических заболеваниях: новые данные // Научно-практическая ревматология, 2015. Т. 53, № 1. С. 78-83. [Suponitskaya E.V., Aleksandrova E.N., Aleksankin A.P., Nasonov E.L. The effect of therapy with genetically engineered biological preparations on subpopulations of B-lymphocytes in rheumatic diseases: new data. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2015, Vol. 53, no. 1, pp. 78-83. (In Russ.)]
15. Супоницкая Е.В., Алексанкин А.П., Александрова Е.Н., Авдеева А.С., Панафидина Т.А., Верижникова Ж.Г., Насонов Е.Л. Определение субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови методом проточной цитофлуорометрии у здоровых лиц и больных ревматическими заболеваниями // Клиническая лабораторная диагностика, 2015. Т. 60, № 6. С. 30-33. [Suponitskaya E.V., Aleksankin A.P., Aleksandrova E.N., Avdeeva A.S., Panafidina T.A., Verizhnikova Zh.G., Nasonov E.L. Determination of subpopulations of peripheral blood B lymphocytes using flow cytometry in healthy individuals and patients with rheumatic diseases. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, Vol. 60, no. 6, pp. 30-33. (In Russ.)]
16. Супрун Е.Н. Гуморальный иммунный ответ // Аллергология и иммунология в педиатрии, 2014. № 4 (39). С. 44-48. [Suprun E.N. Humoral immune response. *Allergologiya i immunologiya v pediatrii = Allergology and Immunology in Pediatrics*, 2014, no. 4 (39), pp. 44-48. (In Russ.)]
17. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
18. Adlowitz D.G., Barnard J., Biear J.N., Cistrone C., Owen T., Wang W., Palanichamy A., Ezealah E., Campbell D., Wei C., Looney R.J., Sanz I., Anolik J.H. Expansion of activated peripheral blood memory B cells in rheumatoid arthritis, impact of B cell depletion therapy, and biomarkers of response. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 6, e0128269. doi: 10.1371/journal.pone.0128269.
19. Bugatti S., Bogliolo L., Montecucco C., Manzo A. B cell autoimmunity and bone damage in rheumatoid arthritis. *Reumatismo*, 2016. Vol. 68, no. 3, pp. 117-125.
20. Bugatti S., Vitolo B., Caporali R., Montecucco C., Manzo A. B cells in rheumatoid arthritis: from pathogenic players to disease biomarkers. *BioMed. Res. Int.*, 2014, Vol. 2014, 681678. doi: 10.1155/2014/681678.
21. Vale A.M., Kearney J.F., Nobrega A., Schroeder H.W. Molecular biology of B cells. 3rd ed. 2015, pp. 99-119.

Авторы:

Сизякина Л.П. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФПК и ППС, директор Научно-исследовательского института клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Харитонов М.В. — заведующая лабораторией клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Sizyakina L.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Immunology and Allergology, Director, Research Institute of Clinical Immunology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Kharitonova M.V., Head, Laboratory of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 08.07.2019

Отправлена на доработку 13.09.2019

Принята к печати 22.10.2019

Received 08.07.2019

Revision received 13.09.2019

Accepted 22.10.2019