

# Динамика Т- и В-лимфоцитов у больных ревматоидным артритом, получающих терапию генно-инженерными биологическими препаратами

Мартынова А.В.<sup>1</sup>, Попкова Т.В.<sup>1</sup>, Алексанкин А.П.<sup>2</sup>, Гриднева Г.И.<sup>1</sup>, Герасимова Е.В.<sup>1</sup>, Горбунова Ю.Н.<sup>1</sup>, Лиля А.М.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына», Москва;

<sup>3</sup>кафедра ревматологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва

<sup>1</sup>Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, 34А; <sup>2</sup>Россия, 117418, Москва, ул. Цюрупы, 3;

<sup>3</sup>Россия, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

**Цель исследования** — оценка динамики субпопуляций Т- и В-лимфоцитов при ревматоидном артрите (РА) на фоне терапии синтетическими базисными противовоспалительными препаратами (сБПВП) и генно-инженерными биологическими препаратами (ГИБП): ингибиторами фактора некроза опухоли  $\alpha$  (иФНО $\alpha$ ) и ингибитором рецепторов интерлейкина 6 (иИЛ6Р).

**Пациенты и методы.** В исследование включено 77 пациентов с РА, удовлетворявших критериям ACR/EULAR 2010 г. (средний возраст 56 [44; 62] лет). В 1-ю группу вошли 30 больных (27 женщин и 3 мужчин) с ранним РА, ранее не получавших терапию. 2-ю группу составили 20 пациентов (14 женщин и 6 мужчин), находящихся на терапии сБПВП, которым впервые назначены иФНО $\alpha$ . 3-я группа представлена ретроспективными данными 27 больных (23 женщины и 4 мужчин), ранее применявших сБПВП (MT — 85%, лефлуномид — ЛЕФ — 15%), которым впервые иницирована терапия иИЛ6Р. У всех участников исследования исходно и через 6 мес проведено иммунофенотипирование Т- и В-лимфоцитов методом проточной цитофлюорометрии по стандартной методике.

**Результаты и обсуждение.** Во всех группах значимых изменений исследуемого профиля Т-лимфоцитов в течение 6 мес наблюдения не выявлено. При сравнении данных иммунограмм пациентов, получавших сБПВП и иФНО $\alpha$ , значимых различий в субпопуляциях В-лимфоцитов не установлено. Исходно больные группы иИЛ6Р имели более высокие уровни наивных В-лимфоцитов и плазмобластов и низкие концентрации «переключенных» В-клеток. При всех методах лечения количество «переключенных» В-клеток сокращалось, а плазмобластов и плазмоцитов нарастало.

**Заключение.** Из полученных данных следует, что одновременное снижение уровней В-клеток памяти и их «переключенных» форм, плазмобластов и плазмоцитов можно использовать как маркер для раннего назначения препаратов, нарушающих дифференцировку В-лимфоцитов, в частности иИЛ6Р.

**Ключевые слова:** ревматоидный артрит; иммунограмма; метотрексат; CD19+ В-клетки; В-клетки памяти; наивные В-клетки; двойные негативные В-клетки; проточная цитофлюорометрия.

**Контакты:** Александра Владимировна Мартынова: [alvmartynova@gmail.com](mailto:alvmartynova@gmail.com)

**Для ссылки:** Мартынова АВ, Попкова ТВ, Алексанкин АП и др.

Динамика Т- и В-лимфоцитов у больных ревматоидным артритом, получающих терапию генно-инженерными биологическими препаратами. Современная ревматология. 2022;16(1):38–45. DOI: 10.14412/1996-7012-2022-1-38-45

## Dynamics of T- and B-lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis, receiving biological disease-modifying antirheumatic drugs

Martynova A.V.<sup>1</sup>, Popkova T.V.<sup>1</sup>, Aleksankin A.P.<sup>2</sup>, Gridneva G.I.<sup>1</sup>, Gerasimova E.V.<sup>1</sup>, Gorbunova Yu.N.<sup>1</sup>, Lila A.M.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow; <sup>2</sup>Research Institute of Human Morphology, Moscow;

<sup>3</sup>Department of Rheumatology, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow;

<sup>1</sup>34A, Kashirskoe shosse, Moscow 115522, Russia; <sup>2</sup>3, Tsyurupy street, Moscow 117418, Russia;

<sup>3</sup>2/1, Barrikadnaya street, building 1, Moscow 125993, Russia;

**Objective:** assessment of the dynamics of T- and B-lymphocytes subpopulations in rheumatoid arthritis (RA) during therapy with synthetic disease-modifying antirheumatic drugs (sDMARDs) and biological disease-modifying antirheumatic drugs (bDMARDs): inhibitors of tumor necrosis factor  $\alpha$  (iTNF $\alpha$ ) and an inhibitor of interleukin 6 receptors (iIL6R).

**Patients and methods.** The study included 77 patients with RA who met the 2010 ACR/EULAR criteria (mean age 56 [44; 62] years). Group 1 included 30 (27 women and 3 men) patients with early RA who had not previously received therapy. Group 2 included 20 (14 women and 6 men) patients on sDMARD therapy who were prescribed *t*TNF $\alpha$  for the first time. The 3rd group is represented by retrospective data of 27 (23 women and 4 men) patients who previously used sDMARDs (MT – 85%, leflunomide – LEF – 15%), in whom *i*IL6R therapy was initiated for the first time. All study participants initially and 6 months later underwent immunophenotyping of T- and B-lymphocytes by flow cytometry according to the standard method.

**Results and discussion.** In all groups, there were no significant changes in the studied T-lymphocyte profile during 6 months of follow-up. When comparing the immunogram data of patients treated with sDMARDs and *t*TNF $\alpha$ , no significant differences in subpopulations of B-lymphocytes were found. At baseline, the *i*IL6R group had higher levels of naive B-lymphocytes and plasmablasts and low concentrations of «switched» B-cells. For all methods of treatment, the number of «switched» B-cells decreased, while plasmablasts and plasma cells increased.

**Conclusion.** From the data obtained, it follows that the simultaneous decrease in the levels of memory B-cells and their «switched» forms, plasmablasts and plasma cells can be used as a marker for the early administration of drugs that disrupt the differentiation of B-lymphocytes, in particular, *i*IL6R.

**Key words:** rheumatoid arthritis; immunogram; methotrexate; CD19+ B-cells; memory B-cells; naive B-cells; double negative B-cells; flow cytometry.

**Contact:** Alexandra Vladimirovna Martynova; [alvmartynova@gmail.com](mailto:alvmartynova@gmail.com)

**For reference:** Martynova AV, Popkova TV, Aleksankin AP, et al. Dynamics of T- and B-lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis, receiving biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Sovremennaya Revmatologiya*=*Modern Rheumatology Journal*. 2022;16(1):38–45. DOI: 10.14412/1996-7012-2022-1-38-45

Ревматоидный артрит (РА) – хроническое аутоиммунное ревматическое заболевание, связанное с нарушением клеточного и гуморального иммунитета и вызывающее тяжелое прогрессирующее поражение суставов и внутренних органов [1]. Иммуноглобулины и иммунные комплексы активно вырабатываются и накапливаются в синовиальной жидкости, инициируя аутоиммунный ответ. Ревматоидные факторы (РФ) – специфические антитела, высокоаффинные к Fc-фрагменту IgG, которые встречаются у 80% больных РА, а также в синовиальной жидкости у некоторых серонегативных пациентов [2]. Процессы цитруллинирования белков и возникновения патологических антител к ним, таких как антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП) и модифицированному цитруллинированному виментину, – одни из важных предвестников более тяжелого течения РА [3]. Известно, что обнаружение цитруллинированных белков у здоровых лиц значительно повышает риск развития аутоиммунных заболеваний, в частности РА, в течение жизни [4]. Ориентирование В-лимфоцитов на продукцию измененных антител не только подавляет гуморальный иммунитет, но и служит важным фактором активации Т-клеточного звена иммунной системы [5]. При раннем РА отмечается активация CD8+ Т-лимфоцитов, играющих ведущую роль в образовании эктопических пара- и интраартикулярных очагов созревания лимфоцитов [6, 7], тогда как активированные CD4+ лимфоциты являются предшественниками нескольких подтипов Т-хелперов (Th1, Th2, Th17) и регуляторных Т-лимфоцитов, продуцирующих различные цитокины, что поддерживает цитокиновый каскад [8].

«Золотым стандартом» терапии РА считается метотрексат (MT) – основной синтетический базисный противовоспалительный препарат (сБПВП). При его неэффективности или непереносимости для подавления активности заболевания применяются генно-инженерные биологические препараты (ГИБП). Их использование позволило не только контролировать клинко-лабораторную активность РА, но и в процессе длительного наблюдения за пациентами открыть новые виды лимфоцитов и взаимодействия между ними [7, 8]. Однако многие аспекты активности лимфоцитов при данном заболевании остаются малоизученными.

**Цель исследования** – оценить динамику субпопуляций Т- и В-лимфоцитов при РА на фоне терапии сБПВП и ГИБП, в частности ингибиторами фактора некроза опухоли  $\alpha$  (иФНО $\alpha$ ) и ингибитором рецепторов интерлейкина 6 (иИЛ6Р).

**Пациенты и методы.** В исследование включено 77 пациентов с РА, удовлетворявших критериям ACR (American College of Rheumatology) / EULAR (European Alliance of Associations for Rheumatology) 2010 г. Медиана возраста больных составила 56 [44; 62] лет. Пациенты были разделены на три группы. В 1-ю группу вошли 30 больных (27 женщин и 3 мужчины) с преимущественно ранней стадией и высокой активностью РА (медиана DAS28 5,3 [4,7; 5,8]), ранее не получавших терапию сБПВП. 2-ю группу составили 20 пациентов (14 женщин и 6 мужчин) с умеренной активностью РА (медиана DAS28 4,8 [4,5; 5,1]) с преимущественно развернутой (50%) или поздней (45%) стадией РА (медиана длительности заболевания 18 [13; 24] мес), находившихся на лечении сБПВП, которым впервые инициирована терапия иФНО $\alpha$ : инфликсимабом – 6, адалимумабом – 10, цертолизумаба пэголом – 2, голimumабом – еще 2 пациентам. 3-я группа представлена ретроспективными данными 27 больных (23 женщины и 4 мужчины) с высокой активностью РА (медиана DAS28 6,2 [5,4; 6,5]), ранее применявших сБПВП: MT – 85%, лефлуномид (ЛЕФ) – 15%, которым впервые был назначен иИЛ6Р тоцилизумаб (ТЦЗ). В начале исследования глюкокортикоиды (ГК) в низких дозах получали 60% пациентов. Исходно у 11% больных 3-й группы в анамнезе имелись внесуставные проявления РА (невропатия), на момент включения ни у одного участника исследования их не было.

Все пациенты подписали добровольное информированное согласие. Общая характеристика больных представлена в табл. 1.

Иммунограмма оценивалась исходно и через 6 мес. Для исследования В- и Т-лимфоцитов использовали цельную кровь из локтевой вены. Иммунофенотипирование В-лимфоцитов периферической крови проводилось методом многоцветной проточной цитофлюорометрии. Этим же методом выполняли иммунофенотипирование субпопуляций Т-лимфоцитов. Изотипический (негативный) контроль осуществ-

Таблица 1. Общая характеристика пациентов с РА  
Table 1. General characteristics of patients with RA

Показатель	1-я группа (n=30)	2-я группа (n=20)	3-я группа (n=27)
Возраст, годы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	56,8 [48; 62]	56 [43,5; 62,5]	57 [53; 64]
Длительность заболевания, мес, Ме [25-й; 75-й перцентили]	6 [4; 15]	18 [13; 24]*	96 [60; 192]*,**
Стадия РА, n (%): ранняя/развернутая/поздняя	20/5/5	1/10/9	1/7/19
DAS28, Ме [25-й; 75-й перцентили]	5,3 [4,7; 5,8]	4,8 [4,5; 5,1]	6,2 [5,44; 6,7]**
СРБ, мг/л, Ме [25-й; 75-й перцентили]	26 [10,1; 77]	21 [8,0; 62]	40 [15,5; 72,9]**
Серопозитивность по РФ, n (%)	18 (60)	15 (75)	23 (85)
Серопозитивность по АЦЦП, n (%)	6 (20)	5 (25)	23 (85)*
Прием ГК, n (%)	11 (37)	7 (35)	15 (56)*

**Примечание.** ГК – глюкокортикоиды. Здесь и в табл. 2, 3: \* – значимые различия с 1-й группой ( $p < 0,05$ ); \*\* – значимые различия со 2-й группой ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2. Характеристика пациентов трех групп через 6 мес наблюдения  
Table 2. Characteristics of patients in three groups after 6 months of follow-up

Показатель	1-я группа (n=30)	2-я группа (n=20)	3-я группа (n=27)
Достигнутый DAS28, Ме [25-й; 75-й перцентили]	3,5 [2,6; 3,8]#	3,1 [2,5; 3,3]#	3,2 [2,7; 3,8]#
Достигнутая степень активности, n (%): низкая/умеренная/высокая	17 (56)/10 (33)/3 (10)	14 (70)/8(30)	18 (66)/9 (33)
СРБ, мг/л, Ме [25-й; 75-й перцентили]	3,2 [2,4; 5,1]#	3,6 [1,7; 5,3]#	0,3 [0,2; 0,6]**, #
Прием ГК, n (%)	5 (17)#	1 (5)#	9 (33)**,#
Побочные эффекты и непереносимость терапии, n (%)	10 (33)	7 (35)	0
Применение МТ/ЛЕФ, n (%)	19 (63)/11 (37)	5 (25)/1 (5)	11 (41)/3 (11)

**Примечание.** Здесь и в табл. 3: # – значимые различия по сравнению с исходной точкой ( $p < 0,05$ ).

лялся для определения границ неспецифического связывания рецепторов В-лимфоцитов с моноклональными антителами с помощью набора реагентов Simultest IMK PlusKit. Для каждого анализа было подсчитано 50 000 событий. Клеточные популяции идентифицировали с помощью программного обеспечения СХР (BeckmanCoulter, США).

Уровень СРБ и IgM РФ в сыворотке крови определялся иммунонефелометрическим методом, АЦЦП – методом иммуноферментного анализа. Границей нормы для СРБ являлось значение  $< 5$  мг/л, для АЦЦП –  $< 20$  Ед/мл, для РФ –  $< 10$  ед/мл.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США). Для параметров, распределение которых отличалось от нормального, при сравнении двух групп использовали U-критерий Манна–Уитни. Результаты представлены в виде медианы (Ме) с интерквартильным размахом [25-й; 75-й перцентили]. Корреляционный анализ выполнен методом Пирсона. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** На фоне проводимой терапии во всех группах наблюдалось статистически значимое снижение активности РА по индексу DAS28: в 1-й группе на 1,8, во 2-й группе – на 1,7 и 3-й группе – на 3. Отмечены уменьшение дозы или отмена ГК более чем у 20% пациентов. У 33 и 35% больных 1-й

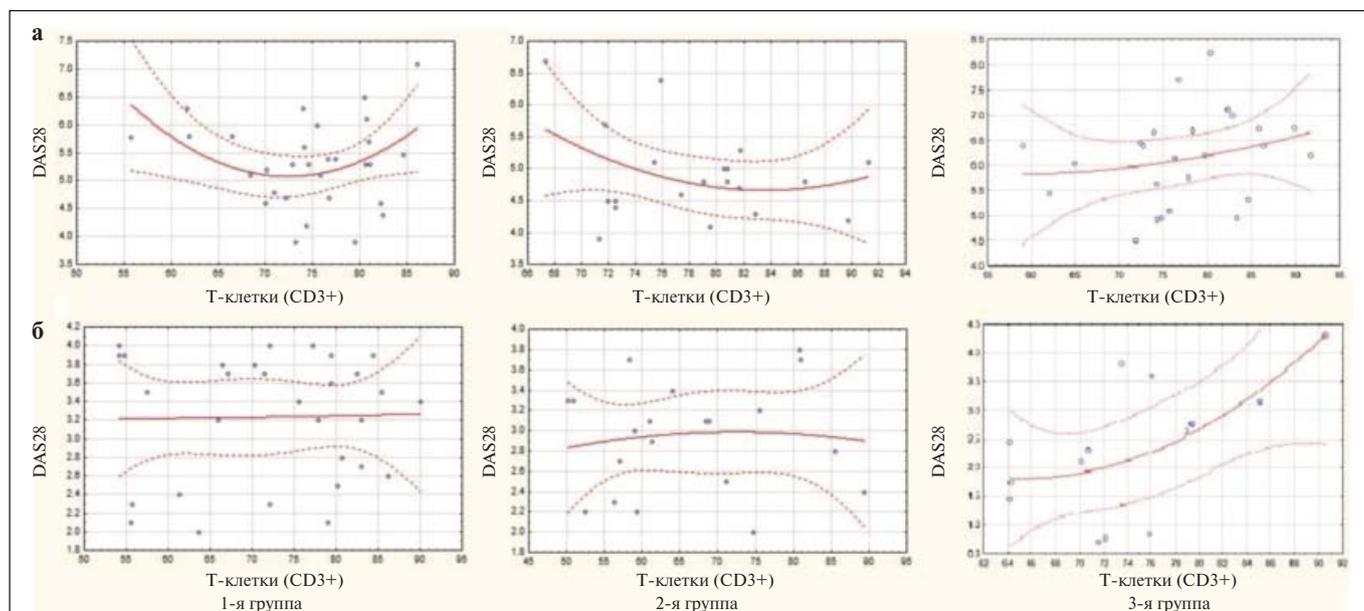
и 2-й групп соответственно на момент контрольного визита выявлена непереносимость либо неэффективность проводимой терапии. Как показал ретроспективный анализ, все пациенты 3-й группы продолжили лечение ТЦЗ. Характеристика пациентов трех групп приведена в табл. 2.

Данные иммунограммы в динамике представлены в табл. 3. В ходе наблюдения изменения в субпопуляциях Т- и В-лимфоцитов отмечены во всех группах. В группе, получавшей иФНО $\alpha$ , выявлено увеличение процентного количества В-лимфоцитов при отсутствии значимого увеличения их абсолютных значений. В 1-й и 2-й группах через 6 мес терапии определялось статистически значимое снижение абсолютного числа В-клеток памяти (CD19+CD27+), особенно «переключенных» (CD19+IgD-CD27+) В-лимфоцитов. Данная субпопуляция уменьшилась во всех группах, но самые низкие концентрации получены на фоне лечения ТЦЗ. В динамике уровень дубль-негативных В-клеток (JgD19-CD27-) несколько увеличился в 1-й и 2-й группах, тогда как в 3-й группе, наоборот, снизился. Исходно концентрация наивных В-лимфоцитов (CD19+IgD+CD27-) была значимо выше в 3-й группе, в динамике она несколько увеличилась, как и во 2-й группе, тогда как в 1-й группе снизилась, но статистически незначимо. У всех больных имелось повышение числа плазматических (CD19+CD38+) как в процентном отношении, так и

Таблица 3. Динамика субпопуляций Т- и В-лимфоцитов у пациентов трех групп через 6 мес наблюдения  
Table 3. Dynamics of T- and B-lymphocytes subpopulations in patients of three groups after 6 months of observation

Субпопуляция лимфоцитов	1-я группа (n=30)		2-я группа (n=20)		3-я группа (n=27)	
	исходно	через 6 мес	исходно	через 6 мес	исходно	через 6 мес
Т-лимфоциты (CD3+)	1,1 [0,9; 1,6] / 75,0 [70,9; 80,6]	1,3 [0,9; 1,9] / 73,8 [63,6; 80,7]	1,4 [1,0; 1,9] / 79,3 [72,5; 81,7]	1,6 [1,2; 1,8] / 71,2 [62,5; 79,7]	1,3 [0,8; 1,7] / 76,7 [72,6; 82,8]	1,1 [0,7; 1,4] / 74,7 [70,1; 79,4]
Тх (CD3+CD4+)	0,7 [0,5; 1,1] / 54,0 [45,3; 59,7]	0,8 [0,7; 1,1] / 55,4 [51,0; 59,4]	1,0 [0,6; 1,1] / 56,3 [49,5; 62,0]	1,2 [0,9; 1,3] / 57,9 [52,2; 64,2]	0,8 [0,7; 1,1] / 52,8 [45,4; 58,4]	0,75 [0,5; 1,1] / 50,45 [43,7; 58,7]
Тн (CD3+CD8+)	0,3 [0,2; 0,4] / 20,8 [16,5; 29,9]	0,3 [0,3; 0,6] / 23,9 [16,6; 33,2]	0,3 [0,1; 0,5] / 22,8 [18,1; 26,7]	0,5 [0,4; 0,7] / 25,7 [14,6; 31,0]	0,4 [0,2; 0,6] / 22,5 [19,9; 32,1]	0,4 [0,2; 0,5] / 23,15 [19,8; 25,4]
Индекс Тх/Тн	2,6 [1,6; 3,2]	2,3 [1,6; 2,9]	2,3 [2,0; 3,2]	2,1 [1,7; 3,3]	2,3 [1,4; 3]	2,3 [1,7; 2,7]
NK-клетки (CD3-CD56+)	0,2 [0,1; 0,2] / 10,5 [8,3; 15,0]	0,1 [0,09; 0,3] / 8,6 [5,3; 14,2]	0,2 [0,1; 0,3] / 14,8 [7,8; 16,6]	0,2 [0,1; 0,3] / 9,7 [3,1; 17,9]	0,2 [0,1; 0,2] / 11,3 [6,9; 16,3]	0,15 [0,1; 0,3] / 10,2 [8,1; 12,9]
В-лимфоциты (CD19+)	0,2 [0,1; 0,2] / 8,9 [7,5; 10,9]	0,2 [0,1; 0,3] / 9,1 [6,0; 13,3]	0,1 [0,1; 0,2] / 7,5 [5,3; 9,4]	0,2 [0,1; 0,4] / 11,6 [6,8; 13,3]#	0,105 [0,1; 0,2] / 8,35 [6; 10,2]	0,2 [0,2; 0,2] / 9,5 [8,4; 12]
В-клетки памяти (CD19+CD27+)	0,004 [0,002; 0,038] / 2,3 [1,6; 3,1]	0,0029 [0,0013; 0,0039] / 1,6 [1,4; 2,0]	0,002 [0,001; 0,013] / 2,05 [1,5; 2,6]	0,0022 [0,0012; 0,0045] / 1,65 [1,15; 2,4]#	0,0015 [0,001; 0,003] / 1,25 [0,9; 1,7]***	0,002 [0,002; 0,003] / 1,15 [1; 1,4]
«Переключенные» В-клетки памяти (CD19+IgD-CD27+)	0,025 [0,015; 0,212] / 16,8 [11,7; 20,4]	0,021 [0,087; 0,019] / 14,7 [9,3; 19,1]#	0,026 [0,011; 0,042] / 17,0 [10,2; 28,6]	0,024 [0,015; 0,04] / 14,2 [8,5; 21,0]#	0,01 [0,005; 0,02]*** / 6,8 [3,6; 11,6]***	0,0065 [0,004; 0,02]#*** / 4,3 [1,5; 9,1]#***
«Непереключенные» В-клетки памяти (CD19+IgD+CD27+)	0,012 [0,006; 0,065] / 8,1 [4,7; 11,9]	0,2 [0,101; 0,336] / 11,5 [6,8; 14,9]#	0,013 [0,006; 0,068] / 8,6 [5,7; 13,1]	0,221 [0,159; 0,387] / 11,6 [8,7; 15,3]#	0,009 [0,006; 0,01] / 7,45 [5,1; 11,4]	0,01 [0,01; 0,02] / 8,15 [5,7; 11,9]
Дубль-негативные В-клетки (CD19+IgD-CD27-)	0,024 [0,015; 0,027] / 14,6 [9,4; 21,1]	0,029 [0,017; 0,044] / 16,6 [10,9; 21]	0,016 [0,01; 0,03] / 12,1 [10,2; 17,1]	0,03 [0,025; 0,045]# / 16,6 [11,6; 20,5]	0,02 [0,01; 0,03] / 15,05 [11,9; 18,1]	0,02 [0,01; 0,03] / 12,85 [10,7; 17]***
Наивные В-клетки (CD19+IgD+CD27-)	0,1 [0,1; 0,2] / 65,2 [54,0; 72,8]	0,1 [0,1; 0,2] / 63,2 [58,7; 71,6]	0,076 [0,037; 0,146] / 62,0 [57,1; 71,1]	0,134 [0,094; 0,207]# / 69,5 [55,8; 76,3]#	0,095 [0,07; 0,1] / 70,85 [62,5; 75,6]**	0,1 [0,1; 0,2] / 71,95 [66,5; 77,8]
Транзиторные В-клетки (CD19+IgD+CD10+CD38++CD27-)	0,001 [0,00; 0,001] / 0,26 [0,2; 0,5]	0,002 [0,001; 0,003] / 0,6 [0,2; 0,9]	0,000 [0,000; 0,001] / 0,3 [0,2; 0,6]	0,002 [0,001; 0,003] / 0,9 [0,4; 1,1]#	0 [0; 0,0001] / 0 [0; 0,1]	0 [0; 0,0002] / 0 [0; 0,1]
Плазмобласты (CD19+CD38++++IgD-CD27+CD20-)	0,001 [0,000; 0,004] / 0,4 [0,3; 0,7]	0,003 [0,002; 0,0008] / 0,2 [0,2; 0,5]#	0,001 [0,000; 0,005] / 0,7 [0,5; 0,9]	0,003 [0,001; 0,005] / 0,1 [0,1; 0,3]#	0,0003 [0,00007; 0,0004] / 0,15 [0,1; 0,3]	0,00035 [0,0001; 0,0006] / 0,2 [0,1; 0,2]
Плазмоциты (CD19+CD38+)	0,000 [0,000; 0,001] / 0,1 [0,1; 0,2]	0,005 [0,002; 0,008] / 0,2 [0,1; 0,5]#	0,00038 [0,00008; 0,0019] / 0,2 [0,1; 0,3]	0,0046 [0,0011; 0,016] / 0,4 [0,2; 0,55]#	0,0001 [0; 0,0002] / 0,1 [0; 0,1]*	0,0002 [0,0001; 0,0003] / 0,1 [0,1; 0,1]#***

Примечание. Данные представлены как абс., ·10<sup>9</sup>/л / %; Me [25-й; 75-й перцентили]. Тх – Т-хелперы; Тн – цитотоксические Т-лимфоциты.



Связь между концентрацией Т-лимфоцитов (в %) и активностью РА исходно (а) и через 6 мес терапии (б)  
 The relationship between the concentration of T-lymphocytes (in%) and RA activity in dynamics

в абсолютных цифрах. Во 2-й группе на фоне терапии иФНО $\alpha$  через 6 мес наблюдения отмечены изменения абсолютных значений всех субпопуляций В-клеток памяти.

В 1-й и 3-й группах обнаружена обратная связь между длительностью РА и уровнем Т-лимфоцитов ( $r=-0,22$  и  $r=-0,32$  соответственно;  $p<0,05$ ). Также в 1-й группе имелась обратная связь между индексом DAS28 и уровнем Т-лимфоцитов ( $r=-0,25$ ,  $p<0,05$ ), в частности Тх ( $r=-0,3$ ,  $p<0,05$ ; см. рисунок). Исходно отношение процентной концентрации Т-лимфоцитов к индексу DAS28 во всех трех группах было схожим. При корреляционном анализе связи между активностью РА и уровнем Т-лимфоцитов в динамике ни в одной из групп не выявлено.

Получена статистически значимая обратная корреляция между DAS28 и концентрациями плазмобластов и плазмочитов в 1-й и 2-й группах ( $r=-0,2$  и  $r=-0,24$  соответственно;  $p<0,05$ ).

Следует отметить отсутствие динамики абсолютных значений общего числа как В-, так и Т-лимфоцитов, а также иных субпопуляций В-лимфоцитов. При анализе иммунограммы значимых различий в абсолютном уровне Т-лимфоцитов между группами не обнаружено.

**Обсуждение.** Активность РА связана с многокомпонентным ответом иммунной системы на аутовоспаление. Местный ответ суставной и околосуставной ткани в виде выработки провоспалительных интерлейкинов (ИЛ) приводит к активации Т-лимфоцитов и клеточного иммунитета. Последующая массивная миграция Т-лимфоцитов в очаг повреждения сопровождается нарастанием локального воспаления, включением гуморального звена иммунитета, активацией и миграцией В-лимфоцитов. Последние продуцируют антитела и презентуют антигены воспаления Т-клеткам, замыкая «порочный круг» аутовоспаления [9].

**Т-лимфоциты.** В настоящем исследовании обнаружена тенденция к увеличению объема Тц в периферической крови в динамике, сопровождавшаяся повышением концентрации

Тх, что привело к некоторому снижению индекса Тх/Тц у пациентов 1-й и 2-й групп, получавших СБПВП и иФНО $\alpha$  соответственно. Отсутствие динамики на фоне терапии ТЦЗ, возможно, связано с продолжительностью РА и длительной down-регуляцией Т-регуляторных (Т-reg) лимфоцитов, что вызывает нарушение дифференциации Т- и В-лимфоцитов. В условиях снижения активности РА восстанавливается иммуносупрессивная активность Т-reg, и это может дать ключ к пониманию полученных нами различий в субпопуляциях В-лимфоцитов.

Высокая активность НК-клеток является одной из причин активности РА, поэтому закономерно снижение их содержания при уменьшении воспаления, что продемонстрировано в нашей работе. Представленные данные указывают на снижение относительного (во всех группах) и абсолютного (кроме группы, получавшей иФНО $\alpha$ ) числа НК-клеток.

**В-лимфоциты.** Наиболее значимые изменения выявлены в субпопуляциях В-лимфоцитов. На продукции РФ и АЦЦП основана диагностика серопозитивных, более агрессивных фенотипов РА. В то же время В-лимфоциты являются источниками антител для таргетирования действия НК-клеток и несут на себе комплексы гистосовместимости для активации Т-лимфоцитов [10–12]. Плейотропное влияние В-лимфоцитов на РА можно объяснить широким спектром субпопуляций В-клеток и их функций.

Известно, что презентация CD27 на поверхности лимфоцита связана с его созреванием в герминативном центре и провоцируется секрецией ИЛ10 активированными Т-лимфоцитами, что характерно для периартикулярной зоны воспаленного сустава [13, 14]. Отсутствие CD27 на мембране лимфоцита долгое время считалось транзитной особенностью раннего этапа его развития, сочетавшейся с экспрессией IgD только в популяции «непереклоченных» В-клеток памяти. Однако впоследствии было продемонстрировано существование двойных негативных (дубль-негативных, IgD-CD27-) В-лимфоцитов. Вероятно, эти лим-

фоциты обладают способностью к down-регуляции CD27+ клеток памяти [15].

В нашем исследовании во всех группах пациентов отмечено увеличение общего количества В-лимфоцитов, наиболее выраженное на фоне применения иФНО $\alpha$  (с 7,5 [5,3; 9,4] до 11,6 [6,8; 13,3] %;  $p < 0,005$ ). Снижение общего числа клеток памяти (CD27+) выявлено во всех группах, но статистически значимое – на фоне терапии ФНО $\alpha$ , что согласуется с ранее опубликованными нами данными, полученными в ходе 12-месячного наблюдения за больными, леченными иИЛ6Р [16]. Известно, что В-клетки памяти продуцируют лиганд к ядерному фактору  $\kappa$ B (RANKL), рецептор которого отвечает за активацию дифференциации остеокластов и костную резорбцию и что концентрация RANKL выше у пациентов с РА, чем у здоровых лиц [17]. Снижение объема В-клеток памяти может свидетельствовать об уменьшении деструкции кости под действием всех видов терапии. Стоит отметить, что на фоне лечения ТЦЗ исходный уровень и снижение числа В-клеток памяти в динамике были менее выраженными, что можно объяснить хронической гиперактивностью системы RANK/RANKL.

В то же время увеличение числа «непереключенных» В-лимфоцитов (IgD+CD27+) согласуется с данными о высокой встречаемости данного субтипа В-клеток в печени плода и у иммунокомпрометированных пациентов, что в большинстве случаев расценивается как недостаточность дифференцировки В-лимфоцитов в селезенке или иных герминативных центрах [18, 19]. Активность околосоуставных эктопических герминативных центров в таком случае привела бы к патологической дифференциации лимфоцитов.

Примером такой дисфункции может служить исходное увеличение популяции дубль-негативных В-лимфоцитов (IgD-CD27-) по сравнению с таковым в контроле у здоровых лиц [20]. В нашем исследовании через 6 мес увеличение содержания данного субтипа В-клеток определялось в 1-й и 2-й группах, тогда как в 3-й группе, наоборот, отмечалось его снижение. Ранее при наблюдении когорты больных, находившихся на терапии иИЛ6Р, мы отмечали прогрессирующее снижение количества дубль-негативных В-клеток. Аналогичные данные опубликованы Z. Mahmood и соавт. [21]: уровень IgD-CD27-лимфоцитов прямо коррелировал с эффективностью терапии иИЛ6Р. Возможно, это объясняется механизмом действия ГИБП при РА: ИЛ6 является прямым активатором пролиферации и дифференцировки некоторых видов В-лимфоцитов, в отличие от опосредованного ответа при применении иФНО $\alpha$ . Полученные данные свидетельствуют скорее о влиянии иИЛ6Р на дифференцировку дубль-негативных В-лимфоцитов, чем о связи с активностью заболевания.

Транзиторные В-лимфоциты (CD19+IgD+CD10+CD38++CD27-), как и дубль-негативные В-лимфоциты, представляют собой малоизученную субпопуляцию В-клеток. Однако известно, что транзиторные В-клетки обладают способностью к продукции ИЛ10, что приводит к подавлению трансформации наивных Т-лимфоцитов в Th и активации дифференциации CD4+CD25-Т-лимфоцитов в T-reg, которые способны сдерживать аутоиммунные реакции [22–24]. Увеличение числа транзиторных В-клеток, преимущественно в 1-й и 2-й группах, позволяет предположить, что снижение активности РА было частично связано с ИЛ10-индуцированным Т-клеточным ответом. Можно думать, что

незначительное увеличение содержания транзиторных В-клеток на фоне терапии ТЦЗ, свидетельствует о таргетированном В-клеточном действии иИЛ6Р.

Нами выявлена разнонаправленная динамика в субтипе наивных В-лимфоцитов (CD19+IgD+CD27-): повышение численности субпопуляции во 2-й и 3-й группах, а также статистически незначимое ее снижение в 1-й группе. Подобная динамика характерна для восстановления пула лейкоцитов при системной красной волчанке на фоне В-клеточной деплеции и достижения ремиссии [25]. Однако при РА была обнаружена взаимосвязь увеличения числа наивных В-лимфоцитов с активностью РА. Так, Y. Wang и соавт. [26] установили гетерогенный характер наивных В-лимфоцитов по отношению к продуцируемым ими иммуноглобулинам (IgM, IgG, IgA) и хемокиновым рецепторам мембраны (CXCR3–5, CCR6) со специфическим увеличением активности в некоторых популяциях только у АЦЦП-положительных пациентов. Авторы связали активность РА со сдвигами в данной субпопуляции В-лимфоцитов. По мнению E. Meffre и K.C. O'Connor [27], увеличение пула наивных В-лимфоцитов приводит к учащению антиген-презентирующих контактов с Т-клетками, что могло бы объяснить значимо более высокий исходный уровень наивных В-клеток у пациентов, получавших иИЛ6Р, однако данное предположение требует подтверждения.

Статистически значимое увеличение уровня плазмочитов (плазматические клетки, CD19+CD38+) в 1-й и 2-й группах сопровождалось снижением числа плазмобластов (CD19+CD38+++IgD-CD27+CD20-). Тенденция к увеличению уровня плазмобластов на фоне терапии ТЦЗ свидетельствует о резистентности к предшествующему лечению РА. Однако больший интерес представляет различие в исходных уровнях плазмобластов: при ранней и развернутой стадиях РА отмечено трехкратное увеличение их содержания по сравнению с поздней стадией. Полученные данные могут указывать на нарушение естественной дифференцировки В-лимфоцитов в герминативных центрах и их прохождении через эктопические патологические очаги околосоуставной и интрасуставной областей. Ограничение влияния иИЛ6Р на поздние стадии дифференцировки лимфоцитов можно объяснить длительным анамнезом РА и трансформацией плазмобластов, их «ускользанием» от терапии [28].

Плазмочиты, в отличие от плазмобластов, преимущественно теряют CD20-рецепторы, но формируют большое количество доменов для взаимодействия с Т-лимфоцитами и антигенами, позволяющих им продуцировать специфические антитела [29]. Однако в нашем исследовании определено статистически значимое повышение численности этой субпопуляции во всех группах наблюдения, при этом связь между активностью РА и уровнем плазмочитов не обнаружено.

**Заключение.** Таким образом, значимых изменений профиля Т-лимфоцитов в течение 6 мес наблюдения не выявлено. При сравнении иммунограмм пациентов с РА, получавших СБВП и иФНО $\alpha$ , статистически значимых различий в уровне субпопуляций В-лимфоцитов не отмечено, что, вероятно, связано с отсутствием прямого действия препаратов на лимфоциты и небольшой длительностью заболевания. На фоне терапии иИЛ6Р обнаружены значимо более низкий уровень «переключенных» В-клеток памяти и высокая концентрация наивных В-лимфоцитов.

Как свидетельствуют полученные данные, одновременное снижение содержания В-клеток памяти и их «переключенных» форм, а также увеличение числа дубль-негативных

лимфоцитов можно использовать как маркер для раннего назначения препаратов, нарушающих дифференцировку В-лимфоцитов, в частности иИЛ6Р.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Насонов ЕЛ. Проблемы иммунопатологии ревматоидного артрита: эволюция болезни. Научно-практическая ревматология. 2017;55(3):277-94. [Nasonov EL. Problems of immunopathology of rheumatoid arthritis: the evolution of the disease. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2017;55(3):277-94. (In Russ.)].
- Silverman GJ, Carson DA. Roles of B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2003;5 Suppl 4(Suppl 4):S1-6. doi: 10.1186/ar1010. Epub 2003 Dec 2.
- Krishnamurthy A, Joshua V, Haj Hensvold A, et al. Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. *Ann Rheum Dis*. 2016 Apr;75(4):721-9. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208093.
- Ford JA, Liu X, Marshall AA, et al. Impact of Cyclic Citrullinated Peptide Antibody Level on Progression to Rheumatoid Arthritis in Clinically Tested Cyclic Citrullinated Peptide Antibody-Positive Patients Without Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2019 Dec;71(12):1583-92.
- Mellado M, Martinez-Munoz L, Cascio G, et al. T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2015 Jul 27;6:384. doi: 10.3389/fimmu.2015.00384. eCollection 2015.
- Petrelli A, van Wijk F. CD8(+) T cells in human autoimmune arthritis: the unusual suspects. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Jul;12(7):421-8. doi: 10.1038/nrrheum.2016.74. Epub 2016 Jun 3.
- Kang YM, Zhang X, Wagner UG, et al. CD8 T cells are required for the formation of ectopic germinal centers in rheumatoid synovitis. *J Exp Med*. 2002 May 20;195(10):1325-36. doi: 10.1084/jem.20011565.
- Furst DE, Emery P. Rheumatoid arthritis pathophysiology: update on emerging cytokine and cytokine-associated cell targets. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Sep;53(9):1560-9. doi: 10.1093/rheumatology/ket414. Epub 2014 Jan 8.
- Wong P, Quinn J, Sims N, et al. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum*. 2006 Jan;54(1):158-68. doi: 10.1002/art.21537.
- Yamin R, Berhani O, Peleg H, et al. High percentages and activity of synovial fluid NK cells present in patients with advanced stage active Rheumatoid Arthritis. *Sci Rep*. 2019 Feb 4;9(1):1351. doi: 10.1038/s41598-018-37448-z.
- Shegarfi H, Naddafi F, Irshafiy A. Natural Killer Cells and Their Role in Rheumatoid Arthritis: Friend or Foe? *Scientific World Journal*. 2012;2012:491974. doi: 10.1100/2012/491974. Epub 2012 Apr 1.
- Ahern DJ, Brennan FM. The role of Natural Killer cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: Major contributors or essential homeostatic modulators? *Immunol Lett*. 2011 May;136(2):115-21. doi: 10.1016/j.imlet.2010.11.001. Epub 2010 Nov 10.
- Qu CH, Hou Y, Bi YF, et al. Values of serum IL-10 and IL-17 in rheumatoid arthritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019 Mar;23(5):1899-1906. doi: 10.26355/eurrev\_201903\_17227.
- Jung J, Choe J, Li L, Choi YS. Regulation of CD27 expression in the course of germinal center B cell differentiation: the pivotal role of IL-10. *Eur J Immunol*. 2000 Aug;30(8):2437-43. doi: 10.1002/1521-4141(2000)30:8<2437::AID-IMMU2437>3.0.CO;2-M.
- Li Y, Li Z, Hu F. Double negative (DN) B cells: an under recognized effector memory B cell subset in autoimmunity. *Clin Exp Immunol*. 2021 Aug;205(2):119-127. doi: 10.1111/cei.13615. Epub 2021 Jun 6.
- Герасимова ЕВ, Попкова ТВ, Алексанкин АП и др. Субпопуляции В-лимфоцитов у больных ревматоидным артритом и влияние на них ингибитора рецепторов интерлейкина 6. Научно-практическая ревматология. 2018;56(6):731-8. [Gerasimova EV, Popkova TV, Aleksankin AP, et al. B-lymphocyte subpopulations in patients with rheumatoid arthritis and the effect of an interleukin-6 receptor inhibitor on them. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2018;56(6):731-8. (In Russ.)].
- Cope AP, Schulze-Koops H, Aringer M. The central role of T cells in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. Sep-Oct 2007;25(5 Suppl 46):S4-11.
- Scheeren FA, Nagasawa M, Weijer K, et al. T cell-independent development and induction of somatic hypermutation in human IgM+ IgD+ CD27+ B cells. *J Exp Med*. 2008 Sep 1;205(9):2033-42. doi: 10.1084/jem.20070447. Epub 2008 Aug 11.
- Weller S, Faili A, Garcia C, et al. CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 30;98(3):1166-70. doi: 10.1073/pnas.98.3.1166.
- Sanz I, Wei C, Lee FE, Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin Immunol*. 2008;20(1):67-82. doi:10.1016/j.smim.2007.12.006
- Mahmood Z, Muhammad K, Schmalzing M, et al. CD27-IgD- memory B cells are modulated by in vivo interleukin-6 receptor (IL-6R) blockade in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015 Mar 14;17(1):61. doi: 10.1186/s13075-015-0580-y.
- Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun*. 2011 May;36(3-4):228-38. doi: 10.1016/j.jaut.2011.01.005. Epub 2011 Feb 12.
- Blair PA, Noreca LY, Flores-Borja F, et al. CD19+CD24hi CD38 hi B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. *Immunity*. 2010 Jan 29;32(1):129-40. doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.009. Epub 2010 Jan 14.
- Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med*. 2013 Feb 20;5(173):173ra23. doi: 10.1126/scitranslmed.3005407.
- Palanichamy A, Barnard J, Zheng B, et al. Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J Immunol*. 2009 May 15;182(10):5982-93. doi: 10.4049/jimmunol.0801859.
- Wang Y, Lloyd KA, Melas I, et al. Rheumatoid arthritis patients display B-cell dysregulation already in the naive repertoire consistent with defects in B-cell tolerance. *Sci Rep*. 2019 Dec 27;9(1):19995. doi: 10.1038/s41598-019-56279-0.
- Meffre E, O'Connor KC. Impaired B-cell tolerance checkpoints promote the development of autoimmune diseases and pathogenic autoantibodies. *Immunol Rev*. 2019 Nov;292(1):90-101. doi: 10.1111/imr.12821. Epub 2019 Nov 12.
- Vital EM, Dass S, Rawstron AC, et al. Management of nonresponse to rituximab in rheumatoid arthritis: predictors and outcome of re-treatment. *Arthritis Rheum*. 2010 May;62(5):1273-9. doi: 10.1002/art.27359.
- Hofmann K, Clauder AK, Manz RA. Targeting B Cells and Plasma Cells in Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2018 Apr 23;9:835. doi: 10.3389/fimmu.2018.00835. eCollection 2018.

Поступила/отрецензирована/принята к печати

Received/Reviewed/Accepted

21.10.2021/12.12.2021/15.12.2022

#### **Заявление о конфликте интересов / Conflict of Interest Statement**

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-315-90090.

Исследование не имело спонсорской поддержки. Конфликт интересов отсутствует. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

The work was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (project no. № 19-315-90090).

The investigation has not been sponsored. There are no conflicts of interest. The authors are solely responsible for submitting the final version of the manuscript for publication. All the authors have participated in developing the concept of the article and in writing the manuscript. The final version of the manuscript has been approved by all the authors.

Мартынова А.В. <https://orcid.org/0000-0001-6840-4552>

Попкова Т.В. <https://orcid.org/0000-0001-5793-4689>

Алексанкин А.П. <https://orcid.org/0000-0001-6686-0896>

Гриднева Г.И. <https://orcid.org/0000-0002-0928-3911>

Герасимова Е.В. <https://orcid.org/0000-0001-5815-561X>

Горбунова Ю.Н. <https://orcid.org/0000-0002-2024-6927>

Лиля А.М. <https://orcid.org/0000-0002-6068-3080>