

Особенности субпопуляций В-лимфоцитов при болезни Шегрена и системной красной волчанке

С.С. Беневоленская¹, И.В. Кудрявцев², М.К. Серебрякова², И.Н. Григорьева¹, Е.С. Кувардин¹, А.И. Будкова³, С.В. Коняхин⁴, Д.Б. Заммеева¹, Д.Б. Моторин¹, А.Ю. Зарицкий¹, И.З. Гайдукова⁵, Е.К. Гайдукова⁶, С.В. Лапин³, А.Л. Маслянский^{1,7}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова»

Минздрава России
197341, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

²ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197022, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

³ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный университет им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава России
197022, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8

⁴Центр теоретической физики сложных систем, Институт фундаментальных наук
34126, Южная Корея, Тэджон, Юсон-гу, Экспо-ро, 55

⁵ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова»
Минздрава России
198015, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

⁶Университет Сорбонна
75006, Франция, Париж, ул. Школы медицины, 21

⁷ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»
199034, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9

Актуальность. В настоящее время большое внимание уделяется изучению лимфоидных субпопуляций при аутоиммунных заболеваниях, таких как системная красная волчанка (СКВ) и болезнь Шегрена (БШ). Однако их клиническое и диагностическое значение окончательно не определено.

Цель исследования — изучить особенности и оценить диагностическую значимость субпопуляций В-клеток при системной красной волчанке и болезни Шегрена.

Материалы и методы. В исследование включено 27 пациентов с СКВ и 41 пациент с БШ; контрольную группу составили 49 здоровых добровольцев. Фенотипирование субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови проводилось методом проточной цитометрии. Общее число В-клеток определялось с помощью маркера CD19; разделение на субпопуляции выполнено путём определения экспрессии IgD, CD38 и CD27. Статистическая обработка проводилась в программе Statistica v. 12.0 (StatSoft Inc., США). Вычислялась абсолютная и относительная численность субпопуляций В-лимфоцитов с использованием трех основных классификаций: на основании ко-экспрессии маркеров IgD и CD38, IgD и CD27, а также CD38 и CD27. Для сравнения количественных признаков использовались методы Манна — Уитни и Краскела — Уоллиса. Для выявления диагностической значимости субпопуляций применён метод дискриминантного анализа. **Результаты.** Дискриминантная модель, построенная на основании относительной численности всех субпопуляций, оказалась наиболее достоверной. В этой модели относительное содержание «непереклоченных» В-клеток памяти ($\text{IgD}^{\text{dim}}\text{CD27}^{\text{dim}}$), «наивных» ($\text{IgD}^{\text{dim}}\text{CD38}^{\text{low}}$) и активированных «наивных» В-клеток ($\text{IgD}^{\text{dim}}\text{CD38}^{\text{dim}}$), В-клеток — предшественников герминативного центра ($\text{IgD}^{\text{hi}}\text{CD38}^{\text{hi}}$) и В-клеток герминативного центра ($\text{IgD}^{\text{dim}}\text{CD38}^{\text{hi}}$), а также «транзиторных» В-клеток ($\text{CD27}^{\text{low}}\text{CD38}^{\text{hi}}$) занимало наиболее значимое положение; статистическая значимость модели составила 75,2% ($p < 0,05$). При выполнении ROC-анализа для разграничения здоровых и больных данная дискриминантная модель имеет чувствительность 70,6% и специфичность 85,7%; площадь под кривой (ППК) — 0,91 ($p < 0,001$). В группе больных при дифференциальной диагностике между СКВ и БШ указанная модель имеет чувствительность 81,5% и специфичность 80,5%, ППК=0,84 ($p < 0,001$).

Выводы. Субпопуляции В-лимфоцитов периферической крови могут служить дополнительным маркером для дифференциальной диагностики СКВ и БШ.

Ключевые слова: субпопуляции лимфоидных клеток, В-лимфоциты, системная красная волчанка, болезнь Шегрена, проточная цитометрия

Для цитирования: Беневоленская СС, Кудрявцев ИВ, Серебрякова МК, Григорьева ИН, Кувардин ЕС, Будкова АИ, Коняхин СВ, Заммеева ДБ, Моторин ДБ, Зарицкий АЮ, Гайдукова ИЗ, Гайдукова ЕК, Лапин СВ, Маслянский АЛ. Особенности субпопуляций В-лимфоцитов при болезни Шегрена и системной красной волчанке. *Научно-практическая ревматология*. 2024;62(5):501–512.

FEATURES OF B CELL SUBSETS IN PRIMARY SJOGREN'S SYNDROME AND SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Stanislava S. Benevolenskaya¹, Igor V. Kudriyatshev², Maria K. Serebriakova², Irina N. Grigor'yeva¹, Evgeniy S. Kuvardin¹, Anna I. Budkova³, Sergei V. Koniakhin⁴, Darina B. Zammoeva¹, Dmitry B. Motorin¹, Andrey Yu. Zaritsky¹, Inna Z. Gaydukova⁵, Ekaterina K. Gaydukova⁶, Sergey V. Lapin³, Alexey L. Maslyanskiy^{1,7}

Background. Lymphocyte subsets in autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE) and primary Sjogren's syndrome (pSS), have been intensively studied in recent years. However, their clinical and diagnostic significance has not been finally determined.

The aim of the study — to investigate features and diagnostic utility of B cell subsets in systemic lupus erythematosus and primary Sjogren's syndrome.

Material and methods. A total of 27 SLE patients, 41 pSS patients and 49 healthy volunteers were included in the study. Phenotyping of blood B cell subpopulations was carried out by means of flow cytometry. All peripheral blood B cells were identified by using CD19 antibody, detection of subpopulations of B cells based on expression of IgD, CD38, CD27. Statistical analysis was carried out using Statistica v. 12.0 (StatSoft Inc., USA). The absolute and relative values of B lymphocyte subpopulations were evaluated using three main classifications: based on IgD and CD38 co-expression, IgD and CD27 co-expression as well as CD38 and CD27 co-expression. For comparison of quantitative traits, the Mann — Whitney U-test and Kruskal — Wallis test were used. Method of discriminant analysis was performed to evaluate diagnostic utility of B cell subsets.

Results. The most significant discriminant model was obtained using the relative values of all subpopulations. In this model the top significance was documented while assessing the percentage of «unswitched» memory B-cells ($\text{IgD}^{\text{dim}}\text{CD27}^{\text{dim}}$), «naive» ($\text{IgD}^{\text{dim}}\text{CD38}^{\text{low}}$) and activated «naive» B cells ($\text{IgD}^{\text{dim}}\text{CD38}^{\text{dim}}$), germinal center progenitor B cells ($\text{IgD}^{\text{hi}}\text{CD38}^{\text{hi}}$), germinal center B cells ($\text{IgD}^{\text{dim}}\text{CD38}^{\text{hi}}$) and «transient» B cells ($\text{CD27}^{\text{low}}\text{CD38}^{\text{hi}}$), model percent correct was 75.2% ($p < 0.05$). During ROC analysis, performed for the differential diagnosis of healthy and sick

¹Almazov National Medical Research Centre 197341, Russian Federation, Saint Petersburg, Akkuratova str., 2

²Institute of Experimental Medicine 197022, Russian Federation, Saint Petersburg, Akademika Pavlova str., 12

³Pavlov First Saint Petersburg State Medical University 197022, Russian Federation, Saint Petersburg, L'va Tolstogo str., 6-8

⁴Center for Theoretical Physics of Complex Systems, Institute for Basic Science 34126, South Korea, Daejeon, Yuseong-gu, Expo-ro, 55

⁵North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov 191015, Russian Federation, Saint-Petersburg, Kirochnaya str., 41

⁶Sorbonne University 75006, France, Paris, École-de-médecine str., 21

⁷Saint Petersburg State University 199034, Russian Federation, Saint-Petersburg, Universitetskaya Embankment, 7-9

Контакты:

Беневоленская
Станислава Сергеевна,
stsebe@mail.ru
Contacts: Stanislava
Benevolenskaya,
stsebe@mail.ru

Поступила 23.12.2021

Принята 17.09.2024

patients, this discriminant model had a sensitivity of 70.6% and a specificity of 85.7%, the area under the curve (AUC) – 0.91 ($p < 0.001$). Among the group of ill patients, distinguishing between SLE and pSS showed a sensitivity of 81.5% and a specificity of 80.5%, AUC=0.84 ($p < 0.001$).

Conclusion. B cell subsets might provide an additional diagnostic tool to differentiate between SLE and pSS.

Key words: lymphocyte subsets, B cells, systemic lupus erythematosus, primary Sjogren's syndrome, flow cytometry

For citation: Benevolenskaya SS, Kudriavtsev IV, Serebriakova MK, Grigor'yeva IN, Kuvardin ES, Budkova AI, Koniakhin SV, Zammoeva DB, Motorin DB, Zaritskey AY, Gaydukova IZ, Gaydukova EK, Lapin SV, Maslyanskiy AL. Features of B cell subsets in primary Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologia = Rheumatology Science and Practice*. 2024;62(5):501–512 (In Russ.).

doi: 10.47360/1995-4484-2024-501-512

Введение

Системная красная волчанка (СКВ) и болезнь Шегрена (БШ) – это диффузные заболевания соединительной ткани, которые характеризуются системным типом воспаления, продукцией широкого спектра антинуклеарных антител и поражением различных органов и тканей [1]. Известно, что СКВ и БШ имеют общие эпидемиологические, патогенетические и иммунологические характеристики, а также схожие клинические проявления. СКВ и БШ чаще всего поражают женщин, при этом пик заболеваемости БШ приходится на 40–60 лет, тогда как СКВ болеют чаще всего женщины детородного возраста. К сходным клиническим проявлениям заболеваний относят лихорадку, фотосенсибилизацию, пальпируемую пурпуру, неэрозивный артрит, синдром Рейно, интерстициальный пневмонит, васкулит, гемолитическую анемию, тромбоцитопению, лейкопению, периферическую полинейропатию. Данные клинические признаки встречаются при СКВ и БШ с различной частотой. Характерной чертой СКВ является гломерулонефрит («люпус-нефрит»), отличительной же особенностью БШ – поражение желез внешней секреции, чаще всего слюнных и слезных, с формированием сухого синдрома. Для этих заболеваний характерно наличие повышенного титра антинуклеарного фактора, а также обнаружение антиядерных антител. Выявление антител к двуспиральной ДНК и Sm-антигену наиболее характерно для СКВ, в то время как повышение уровня антител к SS-A, SS-B и ревматоидного фактора чаще встречается при БШ. Дифференциальный диагноз между заболеваниями затрудняется также существованием вторичного синдрома Шегрена (СШ), который развивается у пациентов с СКВ, ревматоидным артритом, системной склеродермией. Например, 15–30% пациентов с СКВ имеют вторичный СШ [2].

СКВ и БШ имеют комплексный патогенез. Продукция аутоантител, активация системы комплемента, формирование иммунных комплексов, связывание с рецептором Fc и инфильтрация лимфоцитами пораженных тканей – это основные иммунопатологические события при СКВ. Необходимо помнить, что В-лимфоциты важны

в патогенезе СКВ не только в роли плазматических клеток (клеток-продуцентов аутоантител), но и как антиген-презентирующие и регуляторные клетки. Присутствие антител, инфильтрация ткани пораженных органов В-лимфоцитами, формирование дополнительных герминативных центров в ткани слюнных желез вместе с более высокой частотой В-клеточных лимфом при БШ указывают на важную роль В-клеток в ее патогенезе [3]. Следствием гиперреактивности В-клеток при БШ является повышение уровня В-клеточного активирующего фактора (BAFF, B cell activating factor) в сыворотке крови [4], а также повышенная экспрессия CXCL13 – важнейшего фактора миграции В-клеток и фолликулярных Т-хелперов – клетками слюнных желез [5]. Также известна высокая эффективность анти-В-клеточной терапии при СКВ и БШ [1, 4].

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с аутоиммунными заболеваниями в настоящее время активно изучается. Выявлены паттерны изменений субпопуляционного состава В-лимфоцитов периферической крови при СКВ и БШ, однако клиническое и диагностическое значение субпопуляций окончательно не определено [6].

Материалы и методы

В исследование включено 27 пациентов с СКВ и 41 пациент с БШ; группу контроля (ГК) составили 49 здоровых добровольцев. Диагноз СКВ соответствовал классификационным критериям Европейского альянса ревматологических ассоциаций/Американской коллегии ревматологов (EULAR/ACR, European Alliance of Associations for Rheumatology/American College of Rheumatology) 2019 г. [7], диагноз БШ – критериям EULAR/ACR 2016 г. [8]. Критериями исключения были наличие текущего онкологического, воспалительного или инфекционного заболевания, беременность, а также проведение терапии основного заболевания высокими дозами глюкокортикоидов, алкилирующими препаратами (циклофосфамид) или генно-инженерными биологическими препаратами (ритуксимаб, белимумаб) в течение года перед включением в исследование.

В группе пациентов с СКВ медиана возраста составила 39 [32; 50] лет, в группе БШ — 55 [45; 64] лет, в ГК — 44 [42; 49] года. Есть статистически значимые различия по возрасту между группами ($p < 0,001$). Однако не было выявлено статистически значимой корреляционной взаимосвязи между возрастом и значениями дискриминантных функций. Активность СКВ оценивалась по индексу SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) в модификации SELENA (Safety of Estrogens in Lupus National Assessment) [9], активность БШ — согласно индексам ESSDAI (EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index) [10] и ESSPRI (EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index) [11]. Клиническая характеристика больных представлена в таблице 1.

Для выявления популяции В-лимфоцитов периферической крови использовали антитела против CD45-KromeOrange (клон J33, кат. № A96416) и CD19-APC-AF750 (клон J3-119, кат. № A94681). Для анализа распределения В-лимфоцитов по основным субпопуляциям применяли антитела против поверхностных IgD (клон IA6-2, кат. № B30652), CD38 (клон LS198-4-3, кат. № A07779) и CD27 (клон IA4CD27, кат. № A54823). В работе использовали антитела производства Beckman Coulter (США).

Удаление эритроцитов из образцов проводили с помощью лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США), к 975 мкл которого ex tempore добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOTest 3 Fixative Solution (Beckman Coulter, США). После разрушения эритроцитов образцы однократно отмывали избытком физиологиче-

ского раствора при 330 г в течение 7 мин, после чего надосадов удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе с pH=7,2–7,4, содержащем 2% параформальдегида (Sigma-Aldrich, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенный тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v. 1.2 и Kaluza™ v. 1.3 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Software, США).

Субпопуляции В-лимфоцитов определялись с использованием трех основных классификаций: на основании коэкспрессии IgD/CD38 («Bm1-Bm5» классификация), IgD/CD27 и CD38/CD27 [12].

Результаты выражали в виде процента позитивных клеток от общего числа В-лимфоцитов и в виде абсолютных значений (количество клеток на 10^6 /л), приводили в виде медианы и интерквартильного размаха [25-й; 75-й перцентили].

Нормальность распределения проверяли по критерию согласия Пирсона χ^2 . Для оценки статистической значимости различий использовали непараметрический U-критерий Манна – Уитни и критерий Краскела – Уоллиса, для исследования силы взаимосвязи показателей вычисляли коэффициент ранговой корреляции по Спирмену. Дискриминантный анализ проводили по методу Forward Stepwise в программе Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США).

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов

Показатели	СКВ (n=27)	БШ (n=41)
Возраст (лет), Me [25-й; 75-й перцентили]	39 [32; 50]	55 [45; 64]
Пол: мужчины/женщины, n	4/23	1/40
Активность, n (%)	низкая	13 (48,1)
	умеренная	21 (51,2)
	высокая	2 (4,9)
SLEDAI, Me [25-й; 75-й перцентили]	6 [4; 9]	–
ESSDAI, Me [25-й; 75-й перцентили]	–	4 [2; 6]
ESSPRI, Me [25-й; 75-й перцентили]	–	5,3 [3,3; 7]
Терапия, n (%)	26 (96,3)	33 (80,5)
ПЗ, n	23	17
ПЗ, доза (мг/сут.), Me [25-й; 75-й перцентили]	10 [5; 10]	1 [0; 10]
ПЗ ≤ 7,5 мг/сут., n	5	8
ПЗ > 7,5 мг/сут., n	17	9
Гидроксихлорохин, n	18	11
Метотрексат, n	1	3
Лефлуномид, n	1	3
Азатиоприн, n	5	1
Мофетила микофенолат, n	3	0
Циклоспорин, n	0	1

Примечание: SLEDAI – Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; ESSDAI – EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index; ESSPRI – EULAR Sjögren's Syndrome Patient Reported Index; ПЗ – преднизолон

Результаты

При сравнении числа лейкоцитов и общего числа лимфоцитов статистически значимых различий между группами не было обнаружено. Абсолютное число CD19⁺ В-лимфоцитов статистически значимо снижено в группе СКВ по сравнению с ГК, в остальном различий в общем содержании В-лимфоцитов не обнаружено. При СКВ медиана данного показателя составляла $142,9 [67,6; 251] \times 10^6$ /л, при БШ – $219,3 [117,1; 267] \times 10^6$ /л; в ГК – $212,3 [141,4; 277,2] \times 10^6$ /л (рис. 1)

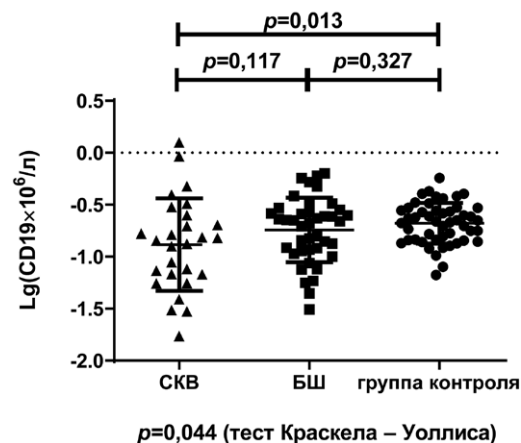


Рис. 1. Абсолютное количество В-лимфоцитов (CD19⁺) у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), болезнью Шегрена (БШ) и в группе контроля

При использовании анти-IgD/CD38 окрашивания все В-лимфоциты были разделены на основании классификации «V_m1-V_m5», вычислена относительная и абсолютная численность субпопуляций. Число «наивных» V_m1-лимфоцитов статистически значимо снижено в группе СКВ и БШ (медиана – 10,4 [2,5; 25,2] × 10⁶/л и 9,7 [6,6; 19,6] × 10⁶/л соответственно) по сравнению с группой контроля (24,9 [15,8; 34,9] × 10⁶/л) (рис. 2А).

Активированных В-клеток (V_m2) в группе СКВ меньше, чем у пациентов с БШ в ГК, при этом в двух последних группах статистически значимых различий не обнаружено (медиана абсолютного числа – 67,7 [23,7; 134,2] × 10⁶/л, 106,9 [53,6; 199,2] × 10⁶/л и 118,6 [85,7; 171,6] × 10⁶/л соответственно; рис. 2Б).

Абсолютное количество клеток-предшественников герминативного центра (V_m2') статистически значимо

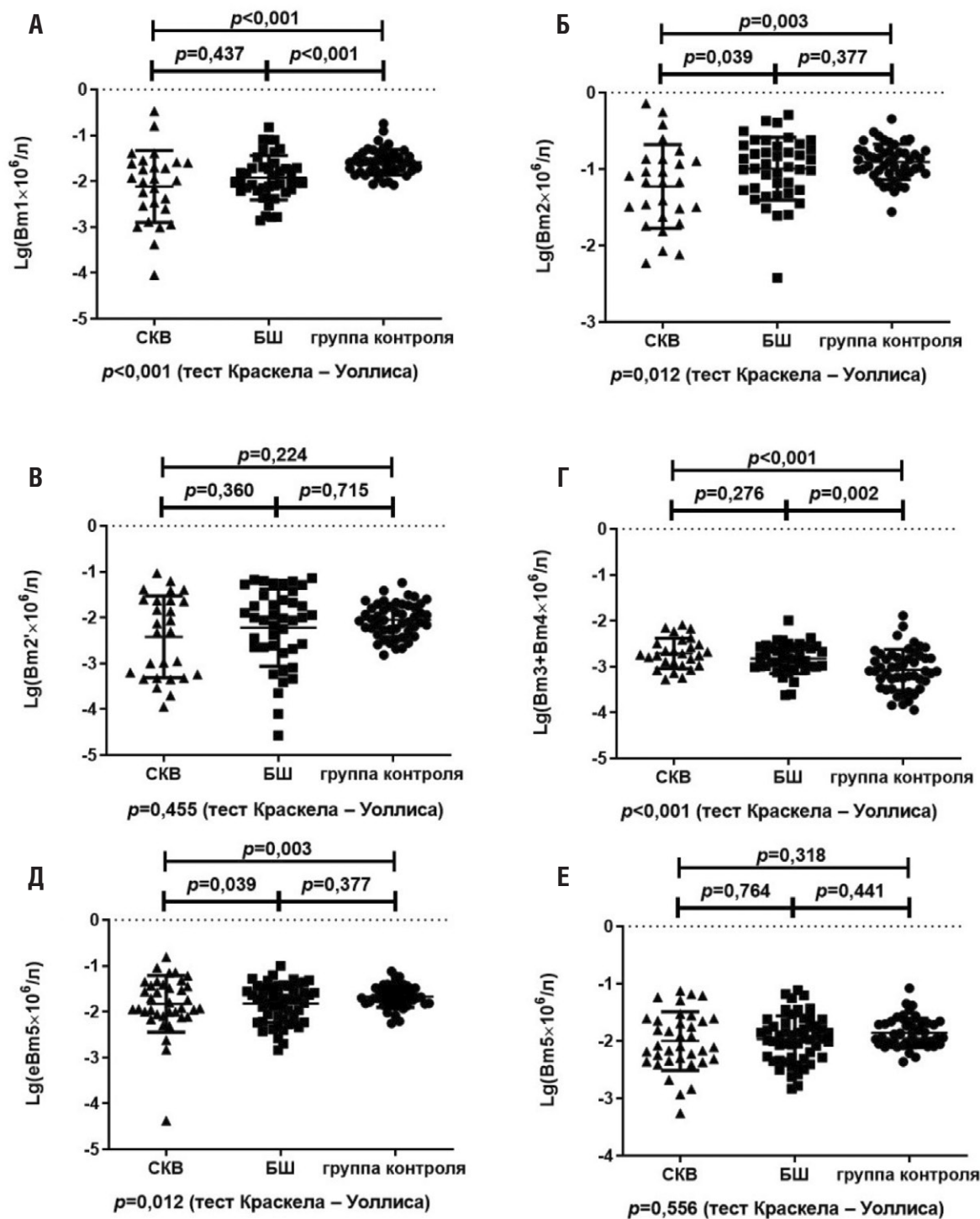


Рис. 2. Абсолютная численность субпопуляций В-лимфоцитов по классификации «V_m1-V_m5» у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), болезнью Шегрена (БШ) и в группе контроля: А – «наивные» V_m1-клетки ($IgD^{dim}CD38^{low}$); Б – активированные V_m2-клетки ($IgD^{dim}CD38^{dim}$); В – V_m2' клетки-предшественники герминативного центра ($IgD^{hi}CD38^{hi}$); Г – клетки герминативного центра V_m3+ V_m4 ($IgD^{low}CD38^{hi}$); Д – ранние eV_m5-клетки памяти ($IgD^{low}CD38^{dim}$); Е – поздние V_m5-клетки памяти ($IgD^{low}CD38^{low}$)

не различалось во всех трех группах, его медиана при СКВ составляла $4,9 [0,4; 23,7] \times 10^6/\text{л}$, при БШ — $9,7 [2,2; 24,3] \times 10^6/\text{л}$, в ГК — $8,2 [4,1; 17] \times 10^6/\text{л}$ (рис. 2В). Популяция клеток герминативного центра ($\text{Bm3}^+ \text{Bm4}$) статистически значимо не различается при СКВ и БШ, но в этих двух группах её численность выше, чем в ГК (медиана — $1,8 [1,1; 3,2] \times 10^6/\text{л}$, $1,5 [1; 2,5] \times 10^6/\text{л}$ и $0,8 [0,3; 1,6] \times 10^6/\text{л}$ соответственно; рис. 2Г). Содержание как ранних, так и поздних клеток памяти (eBm5 и Bm5) статистически значимо не различается во всех трех группах (рис. 2Д, Е).

При проведении корреляционного анализа выявлена умеренная обратная корреляция абсолютного количества В-лимфоцитов ($r=-0,474$; $p=0,002$), Bm1 -лимфоцитов ($r=-0,339$; $p=0,029$), Bm2 -лимфоцитов ($r=-0,459$; $p=0,003$) и eBm5 -лимфоцитов ($r=-0,311$; $p=0,048$) с индексом активности БШ ESSDAI. Не было обнаружено связи субпопуляций « Bm1-Bm5 » с индексом активности СКВ SLEDAI. Однако в группе пациентов с СКВ выявлена умеренная отрицательная корреляция относительного количества Bm1 -лимфоцитов ($r=-0,462$; $p=0,017$) и eBm5 -лимфоцитов ($r=-0,473$; $p=0,015$) с уровнем С4-компонента комплемента, а также с абсолютным числом Bm1 -лимфоцитов ($r=-0,418$; $p=0,034$). Выявлена умеренная положительная корреляция относительного ($r=0,428$; $p=0,033$) и абсолютного количества Bm2^+ ($r=0,445$; $p=0,026$) с уровнем антинуклеарного фактора (АНФ). Для группы пациентов с БШ выявлена отрицательная корреляция относительного содержания клеток герминативного центра с уровнем С-реактивного белка (СРБ; $r=-0,365$; $p=0,025$) и С4-компонента комплемента ($r=-0,357$; $p=0,044$), а также прямая связь относительного числа Bm2 -лимфоцитов и скорости оседания эритроцитов (СОЭ; $r=0,386$; $p=0,024$).

CD27 — это универсальный маркер В-клеток памяти человека. В классификации, основанной на коэкспрессии IgD и CD27 , выделяют «наивные» клетки ($\text{IgD}^{\text{dim}}\text{CD27}^{\text{low}}$) В-клетки памяти, которые еще не переключили класс синтезируемых антител («непереключенные», $\text{IgD}^{\text{dim}}\text{CD27}^{\text{dim}}$) и уже переключившие («переключенные», $\text{IgD}^{\text{low}}\text{CD27}^{\text{dim}}$), а также плазмобласты ($\text{IgD}^{\text{low}}\text{CD27}^{\text{hi}}$) и «двойные негативные» клетки ($\text{IgD}^{\text{low}}\text{CD27}^{\text{low}}$).

Абсолютное число «наивных» В-клеток ($\text{IgD}^{\text{dim}}\text{CD27}^{\text{low}}$) при СКВ статистически значимо ниже, чем при БШ и в ГК (медиана — $77,9 [19,4; 144,5] \times 10^6/\text{л}$, $132,1 [64,7; 230] \times 10^6/\text{л}$ и $133,1 [85,4; 187,2] \times 10^6/\text{л}$ соответственно; рис. 3А).

Общее число В-клеток памяти у пациентов с БШ статистически значимо ниже, чем в ГК (у пациентов с СКВ — $52,6 [21,6; 98,2] \times 10^6/\text{л}$, у пациентов с БШ — $39,5 [23,9; 89,9] \times 10^6/\text{л}$, в ГК — $65,3 [47,6; 96,9] \times 10^6/\text{л}$).

Количество «непереключенных» клеток памяти с фенотипом $\text{IgD}^{\text{dim}}\text{CD27}^{\text{dim}}$ в группах пациентов с СКВ и БШ статистически значимо ниже, чем в ГК ($15,2 [4,8; 32,4] \times 10^6/\text{л}$, $9,4 [4,7; 23,3] \times 10^6/\text{л}$ и $30,2 [14,9; 42,8] \times 10^6/\text{л}$ соответственно; рис. 3Б).

При этом содержание «переключенных» В-клеток памяти статистически значимо не различается во всех трех группах ($22,5 [12,5; 50,6] \times 10^6/\text{л}$, $22,6 [11,7; 39,1] \times 10^6/\text{л}$ и $26,7 [20,3; 42,3] \times 10^6/\text{л}$ в группах пациентов с СКВ, БШ и в ГК соответственно; рис. 3В), так же, как и число двойных негативных В-лимфоцитов ($5,4 [4,1; 10,4] \times 10^6/\text{л}$, $8,3 [5,4; 12,1] \times 10^6/\text{л}$ и $7 [4,1; 9,3] \times 10^6/\text{л}$ соответственно; рис. 3Г). Абсолютное число предшественников плазматических клеток (фенотип

$\text{IgD}^{\text{low}}\text{CD27}^{\text{hi}}$) статистически значимо выше в группах СКВ и БШ, чем в ГК ($0,8 [0,6; 1,7] \times 10^6/\text{л}$, $0,9 [0,3; 1,2] \times 10^6/\text{л}$ и $0,3 [0,1; 0,8] \times 10^6/\text{л}$ соответственно; рис. 3Д).

При проведении корреляционного анализа выявлена умеренная отрицательная корреляция абсолютного числа наивных В-клеток ($r=-0,413$; $p=0,007$) и «непереключенных» В-клеток памяти ($r=-0,345$; $p=0,027$) с индексом активности БШ ESSDAI. Не было выявлено связи между субпопуляциями В-лимфоцитов по классификации $\text{IgD}/\text{CD27}$ и индексом SLEDAI.

При подробном анализе связи субпопуляций и маркеров активности заболевания в группе БШ была выявлена умеренная корреляционная связь относительного ($r=-0,659$; $p<0,001$) и абсолютного ($r=-0,564$; $p<0,001$) количества плазмобластов с уровнем С3-компонента комплемента, а также корреляция относительного числа плазмобластов с титром АНФ ($r=-0,525$; $p=0,006$) и относительного содержания наивных В-лимфоцитов с СОЭ ($r=0,392$; $p=0,022$). Также выявлена умеренная корреляционная взаимосвязь между относительным ($r=-0,536$; $p<0,001$) и абсолютным ($r=-0,410$; $p=0,009$) содержанием плазмобластов и уровнем СРБ.

В группе пациентов с СКВ относительное ($r=-0,627$; $p=0,006$) и абсолютное ($r=-0,525$; $p=0,006$) число «непереключенных» В-клеток имело умеренную обратную корреляцию с уровнем С4-компонента комплемента; относительное ($r=-0,614$; $p<0,001$) и абсолютное ($r=-0,528$; $p=0,006$) содержание «двойных негативных» В-лимфоцитов имело умеренную отрицательную корреляционную связь с уровнем СРБ. Также относительное количество «двойных негативных» В-клеток имело умеренную обратную корреляцию с уровнем С4-компонента комплемента ($r=-0,547$; $p=0,004$).

В рамках классификации В-лимфоцитов, основанной на коэкспрессии CD27 и CD38 , выделяют шесть субпопуляций: активированные «наивные» В-лимфоциты ($\text{CD27}^{\text{dim}}\text{CD38}^{\text{low}}$); «транзиторные» (переходные) В-лимфоциты ($\text{CD27}^{\text{low}}\text{CD38}^{\text{hi}}$); активированные клетки памяти ($\text{CD27}^{\text{dim}}\text{CD38}^{\text{dim}}$); покоящиеся клетки памяти ($\text{CD27}^{\text{dim}}\text{CD38}^{\text{low}}$); плазмобласты ($\text{CD27}^{\text{hi}}\text{CD38}^{\text{hi}}$); «двойные негативные» В-клетки ($\text{CD27}^{\text{low}}\text{CD38}^{\text{low}}$).

Число активированных «наивных» В-лимфоцитов при СКВ статистически значимо ниже, чем при БШ и в ГК (медиана — $53,7 [20,4; 125,6] \times 10^6/\text{л}$, $104,5 [57,4; 189,6] \times 10^6/\text{л}$ и $104,3 [70,5; 161,1] \times 10^6/\text{л}$ соответственно; рис. 4А).

Число «транзиторных» В-клеток при СКВ также статистически значимо снижено по сравнению с БШ и ГК ($2,8 [0,9; 13,6] \times 10^6/\text{л}$, $9,3 [2,4; 24,3] \times 10^6/\text{л}$ и $8,4 [4,1; 15,9] \times 10^6/\text{л}$ соответственно; рис. 4Б).

Число клеток памяти, как активированных (фенотип $\text{CD27}^{\text{dim}}\text{CD38}^{\text{dim}}$), так и покоящихся (утративших экспрессию CD38 , фенотип $\text{CD27}^{\text{dim}}\text{CD38}^{\text{low}}$), снижено при СКВ и БШ по сравнению с ГК (активированные — $22,1 [11,7; 55,1] \times 10^6/\text{л}$, $20,3 [8,9; 40,6] \times 10^6/\text{л}$ и $31 [24,5; 46,7] \times 10^6/\text{л}$ соответственно; покоящиеся — $15,4 [4,9; 35,7] \times 10^6/\text{л}$, $13,1 [6,0; 30,8] \times 10^6/\text{л}$ и $25,8 [14,4; 34,8] \times 10^6/\text{л}$ соответственно; рис. 4В, Г).

Абсолютное количество «двойных негативных» клеток (фенотип $\text{CD27}^{\text{low}}\text{CD38}^{\text{low}}$) статистически значимо снижено при СКВ по сравнению с ГК ($7,5 [3,7; 13,7] \times 10^6/\text{л}$, $11,7 [6,1; 17,3] \times 10^6/\text{л}$ и $11,3 [8,1; 18,2] \times 10^6/\text{л}$ соответственно; рис. 4Д).

Число предшественников плазматических клеток ($\text{CD27}^{\text{hi}}\text{CD38}^{\text{hi}}$) статистически значимо выше при СКВ,

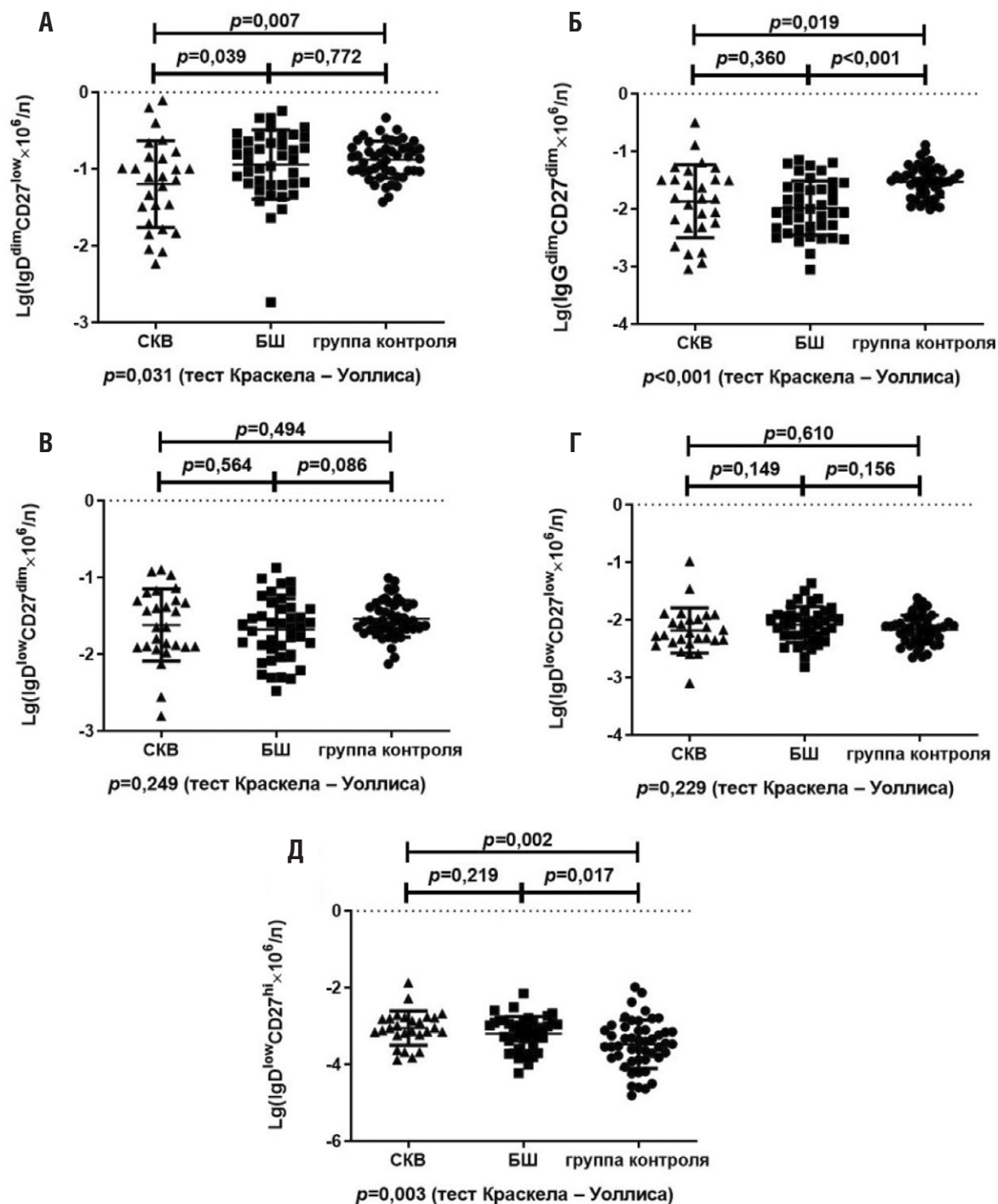


Рис. 3. Абсолютная численность субпопуляций В-лимфоцитов по классификации IgD/CD27 у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), болезнью Шегрена (БШ) и в группе контроля: А – «наивные» В-лимфоциты ($IgD^{dim}CD27^{low}$); Б – «непереключенные» В-лимфоциты ($IgD^{dim}CD27^{dim}$); В – «переключенные» В-лимфоциты ($IgD^{low}CD27^{dim}$); Г – «двойные негативные» В-лимфоциты ($IgD^{low}CD27^{low}$); Д – плазмобласты ($IgD^{low}CD27^{hi}$)

чем при БШ, а при БШ – выше, чем в ГК ($0,9 [0,5; 2,1] \times 10^6/l$, $0,5 [0,3; 0,9] \times 10^6/l$ и $0,2 [0,1; 0,7] \times 10^6/l$ соответственно; рис. 5Е).

При проведении корреляционного анализа выявлены отрицательные связи абсолютного числа «наивных» активированных клеток ($r=-0,449$; $p=0,003$) и активированных клеток памяти ($r=-0,348$; $p=0,026$) с индексом ESSDAI. В рамках данной классификации корреляции субпопуляций с индексом SLEDAI выявлено не было.

При подробном анализе связи субпопуляций и маркеров активности в группе БШ была выявлена умеренная прямая корреляция относительного числа активированных «наивных» клеток с СОЭ ($r=0,416$; $p=0,014$), положительная корреляционная связь относительного содержания плазмобластов с титром АНФ ($r=0,332$; $p=0,048$), отрицательная корреляционная связь относительного ($r=-0,402$; $p=0,025$) и абсолютного ($r=-0,463$; $p=0,008$) количества плазмобластов с уровнем С3-компонента комплемента.

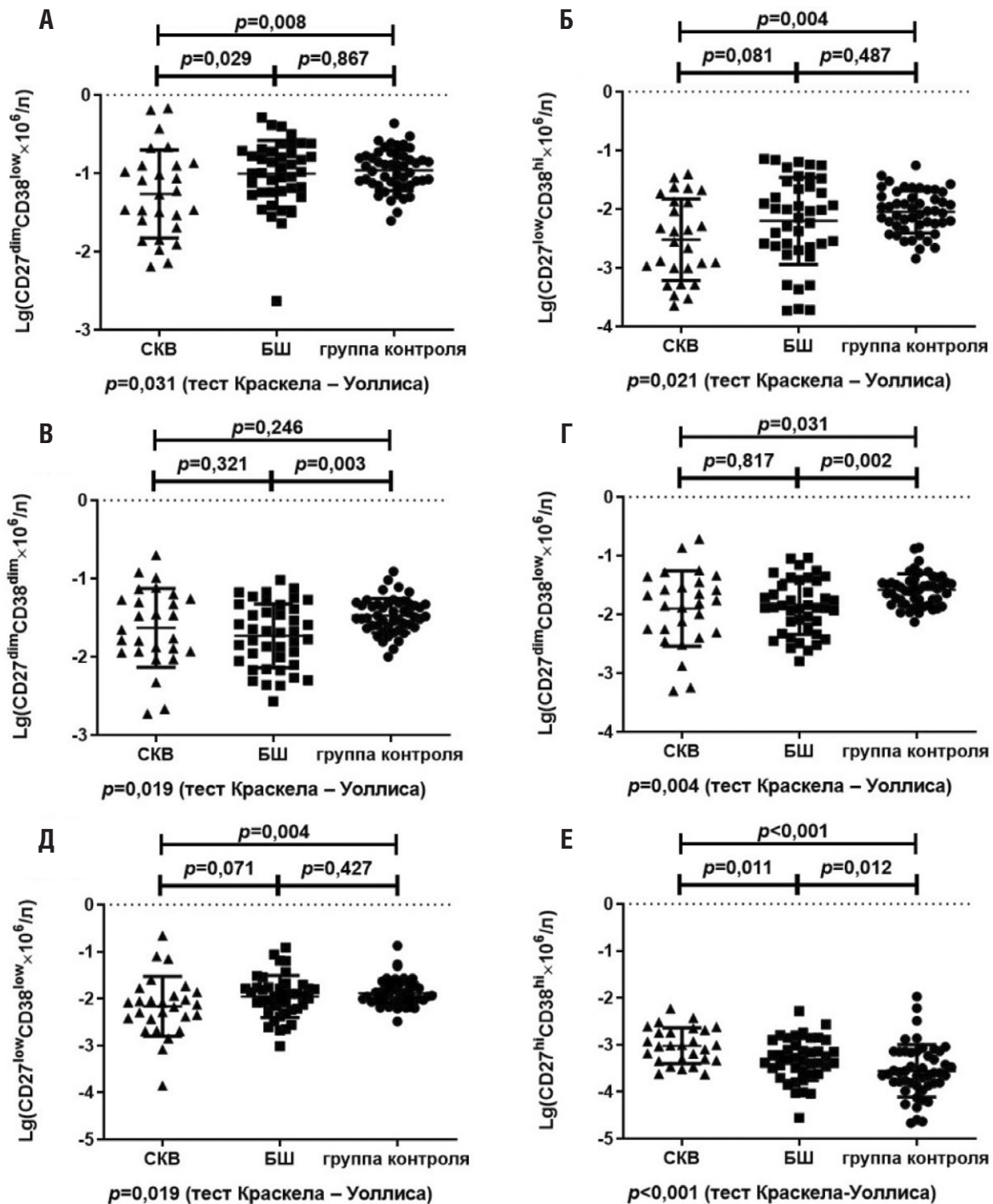


Рис. 4. Абсолютная численность субпопуляций В-лимфоцитов по классификации CD27/CD38 при системной красной волчанке (СКВ), болезни Шегрена (БШ) и в группе контроля: А – активированные «наивные» В-лимфоциты ($CD27^{dim}CD38^{low}$); Б – «транзиторные» В-лимфоциты ($CD27^{low}CD38^{hi}$); В – активированные клетки памяти ($CD27^{dim}CD38^{dim}$); Г – покоящиеся клетки памяти ($CD27^{dim}CD38^{low}$); Д – «двойные негативные» В-клетки ($CD27^{low}CD38^{low}$); Е – плазмобласты ($CD27^{hi}CD38^{hi}$)

Также выявлена умеренная отрицательная корреляционная взаимосвязь между относительным и абсолютным содержанием плазмобластов и уровнем СРБ ($r=-0,341$; $p=0,034$).

Для группы пациентов с СКВ выявлена умеренная обратная корреляция относительного количества «двойных негативных» В-лимфоцитов ($CD27^{low}CD38^{low}$) с уровнем С4-компонента комплемента ($r=-0,397$; $p=0,045$). Относительное ($r=-0,577$; $p=0,002$) и абсолютное ($r=-0,485$;

$p=0,012$) содержание активированных В-клеток памяти имело умеренную отрицательную корреляционную связь с уровнем С4-компонента комплемента; относительное ($r=-0,389$; $p=0,049$) и абсолютное ($r=-0,389$; $p=0,050$) количество активированных «наивных» В-лимфоцитов обратно коррелировало с уровнем СРБ.

Проанализирована взаимосвязь клеточных популяций с характером и дозовыми режимами фармакотерапии. Отмечалась корреляционная связь средней дозы преднизолона

(ПЗ) с относительным числом $Bm2'$ ($r=-0,432$; $p<0,001$), абсолютным количеством $eBm5$ ($r=0,341$; $p=0,005$), $Bm5$ ($r=0,292$; $p=0,017$) и плазмобластов $IgG^{low}CD27^{hi}$ ($r=0,321$; $p=0,009$). Выявлена отрицательная связь относительно числа транзиторных клеток ($CD27^{low}CD38^{hi}$; $r=-0,521$; $p<0,001$), а также положительная связь абсолютного количества активированных клеток памяти ($r=0,331$; $p=0,007$) и покоящихся клеток памяти ($r=0,286$; $p=0,021$) с дозой ПЗ.

Необходимо учитывать, что между дозой ПЗ и индексом ESSDAI также есть статистически значимая корреляционная связь ($r=0,406$; $p=0,010$).

Влияние остальных иммуномодулирующих и иммуносупрессивных препаратов оценить не удалось в связи с малым объемом выборки.

Все данные по абсолютной и относительной численности субпопуляций суммированы в таблице 2.

Таблица 2. Абсолютная и относительная численность субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови, Ме [25-й; 75-й перцентили]

Тип клеток	Фенотип	Системная красная волчанка (n=27)		Болезнь Шегрена (n=41)		Группа контроля (n=49)	
		абс., $\times 10^6/\text{л}$	% от числа В-лимфоцитов	абс., $\times 10^6/\text{л}$	% от числа В-лимфоцитов	абс., $\times 10^6/\text{л}$	% от числа В-лимфоцитов
Лейкоциты		6 [4,7; 7,4]	—	5,6 [3,9; 7,4]	—	—	—
Лимфоциты		1900 [1500; 2150]	—	1790 [1180; 2400]	—	1730 [1500; 2090]	—
В-лимфоциты	CD19 ⁺	142,861 [67,62; 251,0]	100	219,284 [117,09; 267,014]	100	212,31 [141,379; 277,192]	100
Субпопуляции В-лимфоцитов по классификации IgD/CD38							
«Наивные» Вm1-клетки	$IgD^{dim}CD38^{low}$	10,388 [2,511; 25,154]	5,979 [3,332; 14,131]	9,66 [6,576; 19,548]	7,648 [3,15; 12,731]	24,861 [15,755; 34,97]	13,179 [7,688; 18,177]
Активированные Вm2-клетки	$IgD^{dim}CD38^{dim}$	67,728 [23,683; 134,225]	51,087 [34,327; 60,748]	106,998 [53,613; 199,187]	63,429 [51,477; 71,869]	118,634 [85,714; 171,571]	62,579 [49,735; 68,909]
Вm2'-клетки предшественники герминативного центра	$IgD^{hi}CD38^{hi}$	4,921 [0,48; 23,699]	5,192 [0,662; 16,076]	9,660 [2,24; 24,255]	6,683 [1,148; 15,279]	8,209 [4,071; 17,011]	4,734 [2,839; 6,36468]
Клетки герминативного центра Вm3 ⁺ Вm4	$IgD^{low}CD38^{hi}$	1,827 [1,0535; 3,22]	1,439 [0,452; 4,103]	1,494 [1,008; 2,541]	0,84 [0,441; 1,342]	0,799 [0,337; 1,549]	0,446 [0,178; 0,653]
Ранние eВm5-клетки памяти	$IgD^{low}CD38^{dim}$	18,039 [9,828; 39,24]	17,725 [7,02; 25,363]	19,138 [8,14; 34,780]	9,376 [5,832; 16,652]	20,041 [14,175; 30,812]	9,812 [7,734; 14,01]
Поздние Вm5-клетки памяти	$IgD^{low}CD38^{low}$	12,188 [4,521; 24,852]	8,187 [4,927; 15,307]	12,506 [5,34; 17,875]	6,048 [3,944; 12,037]	11,473 [8,752; 20,308]	7,185 [4,544; 9,783]
Субпопуляции В-лимфоцитов по классификации IgD/CD27							
«Наивные» В-лимфоциты	$IgD^{dim}CD27^{low}$	77,994 [19,422; 144,475]	0,718 [0,276; 2,259]	132,066 [64,7; 230,0]	0,407 [0,1614 0,781]	133,099 [85,4; 87,199]	0,169 [0,061; 0,404]
В-клетки памяти	$IgD^{dim}CD27^{dim} + IgD^{low}CD27^{dim} + IgD^{low}CD27^{low}$	52,6 [21,6; 98,2]	44,123 [20,335; 64,133]	39,466 [23,9; 89,92]	23,565 [13,6; 37,3]	65,334 [47,627; 96,888]	36,234 [24,109; 42,84]
«Непереключенные» В-лимфоциты	$IgD^{dim}CD27^{dim}$	15,158 [4,838; 32,4]	55,536 [33,996; 79,545]	9,408 [4,665; 23,265]	76,479 [61,466; 86,147]	30,229 [14,936; 42,781]	63,740 [55,969; 75,744]
«Переключенные» В-лимфоциты	$IgD^{low}CD27^{dim}$	22,533 [12,51; 50,604]	12,799 [6,0264 21,0333]	22,655 [11,68; 39,075]	5,754 [3,125; 9,914]	26,471 [20,342; 42,291]	14,695 [9,062; 21,446]
«Двойные негативные» В-лимфоциты	$IgD^{low}CD27^{low}$	5,453 [4,089; 10,362]	21,016 [9,924; 33,323]	8,316 [5,355; 12,075]	11,567 [6,66; 19,901]	7,034 [4,076; 9,323]	13,684 [10,608; 19,762]
Плазмобласты	$IgD^{low}CD27^{hi}$	0,882 [0,6; 1,674]	6,147 [2,855; 9,394]	0,86 [0,308; 1,218]	4,36 [2,846; 7,519]	0,321 [0,133; 0,784]	3,406 [2,458; 4,132]
Субпопуляции В-лимфоцитов по классификации CD27/CD38							
Активированные «наивные» В-лимфоциты	$CD27^{dim}CD38^{low}$	53,728 [20,412; 125,594]	50,248 [37,417; 63,457]	104,516 [57,431; 189,625]	64,658 [56,131; 70,847]	104,313 [70,058; 161,097]	55,397 [43,569; 65,217]
«Транзиторные» В-лимфоциты	$CD27^{low}CD38^{hi}$	2,794 [0,990; 13,572]	23,507 [10,503; 31,103]	9,297 [2,352; 24,339]	11,678 [6,111; 16,665]	8,398 [4,102; 15,970]	16,974 [11,848; 22,306]
Активированные В-клетки памяти	$CD27^{dim}CD38^{dim}$	22,145 [11,655; 55,05]	5,209 [3,665; 8,278]	20,328 [8,848; 40,551]	6,131 [3,478; 11,101]	31,035 [22,494; 46,648]	6,533 [3,827; 9,186]
Покоящиеся В-клетки памяти	$CD27^{dim}CD38^{low}$	15,372 [4,968; 35,668]	11,864 [5,651; 18,839]	13,078 [6,0; 30,784]	8,419 [3,616; 12,229]	25,784 [14,421; 34,769]	13,409 [7,432; 19,11]
«Двойные негативные» В-лимфоциты	$CD27^{low}CD38^{low}$	7,489 [3,654; 13,738]	0,600 [0,199; 2,443]	11,7 [6,076; 17,270]	0,288 [0,136; 0,546]	11,329 [8,101; 18,177]	0,142 [0,067; 0,242]
Плазмобласты	$CD27^{hi}CD38^{hi}$	0,954 [0,462; 2,058]	2,783 [0,5184 9,393]	0,48 [0,279; 0,960]	6,424 [1,732; 14,888]	0,245 [0,136; 0,715]	4,508 [2,832; 6,27]

Для абсолютных и относительных значений всех субпопуляций лимфоцитов были вычислены десятичные логарифмы, а затем для всех классификаций поочередно и совместно применен метод дискриминантного анализа. Модель, построенная на основании относительной численности всех субпопуляций, позволяла наиболее эффективно разделить группы пациентов с СКВ, БШ и здоровых добровольцев. В этой дискриминантной модели относительное содержание «непереключенных» клеток памяти ($IgD^{dim}CD27^{dim}$), «наивных» ($Bm1$, $IgD^{dim}CD38^{low}$), активированных «наивных» ($Bm2$, $IgD^{dim}CD38^{dim}$), клеток-предшественников герминативного центра ($Bm2^+$, $IgD^{hi}CD38^{hi}$) и клеток герминативного центра ($Bm3^+$, $Bm4$, $IgD^{low}CD38^{hi}$), а также «транзиторных» В-клеток ($CD27^{low}CD38^{hi}$) занимало наиболее значимое положение, статистическая значимость модели составила 75,2% ($p<0,05$). Графические результаты дискриминантного анализа, а также F-уровень и статистическая значимость представлены на рисунке 5 и в таблице 3.

При выполнении ROC-анализа для разграничения здоровых и больных людей данная дискриминантная модель имеет чувствительность 70,6% и специфичность 85,7%, площадь под кривой (ППК) – 0,91 ($p<0,001$) (рис. 6А). В группе больных при проведении дифференциальной диагностики между СКВ и БШ модель имеет чувствительность 81,5% и специфичность 80,5%, ППК=0,84 ($p<0,001$) (рис. 6Б).

Таблица 3. Результаты дискриминантного анализа для относительной численности субпопуляций В-лимфоцитов по классификациям $IgD/CD38$, $IgD/CD27$ и $CD27/CD38$

Субпопуляции В-лимфоцитов	Фенотип субпопуляции	F-уровень	p
«Непереключенные» В-лимфоциты	$IgD^{dim}CD27^{dim}$	15,573	<0,001
«Наивные» Вm1-клетки	$IgD^{dim}CD38^{low}$	11,596	<0,001
«Транзиторные» В-лимфоциты	$CD27^{low}CD38^{hi}$	12,091	<0,001
Клетки герминативного центра Вm3 ⁺ Вm4	$IgD^{low}CD38^{hi}$	10,165	<0,001
Вm2 ⁺ клетки-предшественники герминативного центра	$IgD^{hi}CD38^{hi}$	5,433	0,006
Активированные Вm2-клетки	$IgD^{dim}CD38^{dim}$	4,25	0,017
Плазмобласты	$IgD^{low}CD27^{hi}$	0,981	0,378
«Наивные» В-лимфоциты	$IgD^{dim}CD27^{low}$	1,165	0,316
Поздние Вm5-клетки памяти	$IgD^{low}CD38^{low}$	1,191	0,308
«Переключенные» В-лимфоциты	$IgD^{low}CD27^{dim}$	0,029	0,971
«Двойные-негативные» В-лимфоциты	$IgD^{low}CD27^{low}$	1,292	0,279
Активированные «наивные» В-лимфоциты	$CD27^{dim}CD38^{low}$	1,390	0,253
Активированные В-клетки памяти	$CD27^{dim}CD38^{dim}$	0,786	0,458
«Двойные негативные» В-лимфоциты	$CD27^{low}CD38^{low}$	1,436	0,24
Покоящиеся В-клетки памяти	$CD27^{dim}CD38^{low}$	0,613	0,544
Плазмобласты	$CD27^{hi}CD38^{hi}$	1,149	0,321
Ранние eВm5-клетки памяти	$IgD^{low}CD38^{dim}$	0,121	0,89

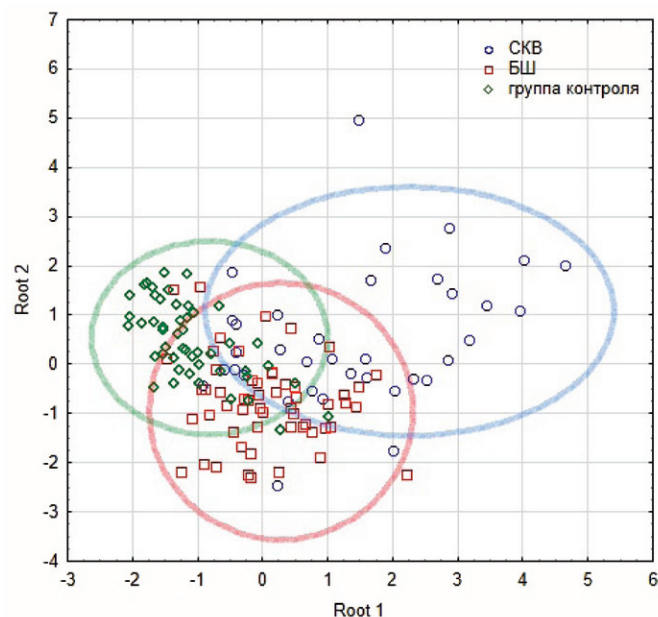


Рис. 5. Дискриминантный анализ для относительной численности субпопуляций В-лимфоцитов по классификациям $IgD/CD38$, $IgD/CD27$ и $CD27/CD38$: голубые круги – пациенты с системной красной волчанкой (СКВ); красные квадраты – пациенты с болезнью Шегрена (БШ); зеленые ромбы – лица группы контроля (каждый символ обозначает одного человека)

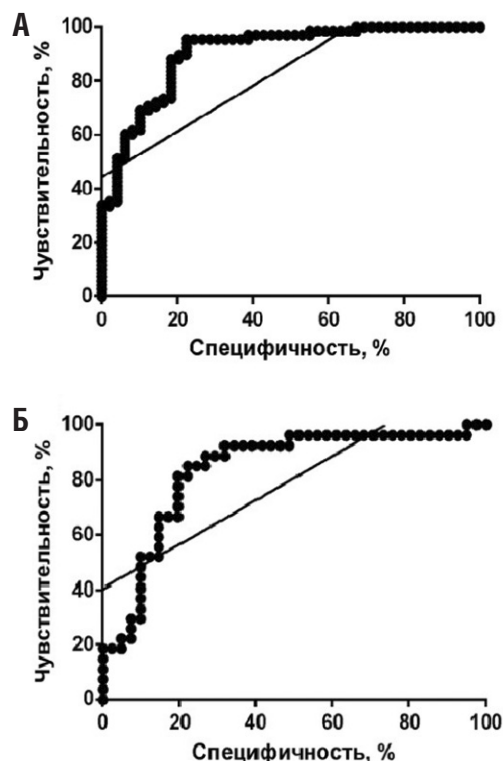


Рис. 6. ROC-анализ диагностической значимости расчетных значений дискриминантной модели для определения больных и здоровых людей (А) и дифференциальной диагностики системной красной волчанки и болезни Шегрена (Б). $Root1>0$ соответствует контролю; $Root1<0$ – болезни: системной красной волчанке или болезни Шегрена. Если $Root1<0$ – болезнь есть, и применяем $Root2$; если $Root2>0$, то классифицируем болезнь как системную красную волчанку, если $Root2<0$ – как болезнь Шегрена

Обсуждение

По данным нашей работы были установлены статистически значимые различия содержания некоторых субпопуляций в исследуемых группах пациентов. Содержание «наивных» В-клеток как с фенотипом $\text{IgD}^{\text{dim}}\text{CD38}^{\text{low}}$ (по классификации Bm1-5), так и с фенотипами $\text{IgD}^{\text{dim}}\text{CD27}^{\text{low}}$ («вторая» классификация) и $\text{CD27}^{\text{dim}}\text{CD38}^{\text{low}}$ («третья» классификация) оказалось наиболее низким в группе пациентов с СКВ по сравнению с БШ, где содержание «наивных» В-клеток в свою очередь ниже, чем в группе контроля. Данные результаты согласуются с исследованиями, проведенными ранее [13, 14]. Можно предположить, что число «наивных» В-клеток снижается в пользу трансформации их в более зрелые субпопуляции.

Активированных Bm2 В-клеток, способных покидать циркулирующую кровь и проникать в лимфоидную ткань, при СКВ меньше, чем при БШ и в контрольной группе; в то же время не выявлено статистически значимых различий между группами по численности активированных клеток, клеток-предшественников герминативного центра, ранних и поздних клеток памяти. По данным D. Cornes и соавт. [15], значение коэффициента $(\text{Bm2}+\text{Bm2}')/(\text{eBm5}+\text{Bm5}) \geq 5$ позволяет различить пациентов с БШ с чувствительностью 52,1% и специфичностью 83,2%, однако не увеличивает точность классификационных критериев American European Consensus Group 2012 г. Позднее F. Barcelos и соавт. [16] не выявили статистически значимых различий между группами пациентов с БШ, СШ и ГК по численности субпопуляций Bm2, Bm2', eBm5 и Bm5. Такое расхождение результатов может быть связано с различиями в активности болезни пациентов в выборке. По данным E. Ishioka-Takei и соавт. [17], относительное количество клеток с фенотипом $\text{CD38}^{\text{hi}}\text{IgD}^+$ (Bm2'-клетки) положительно коррелировало с индексом активности ESSDAI ($r=0,596$; $p=0,0002$). В настоящем исследовании абсолютное число Bm2-клеток отрицательно коррелировало с активностью БШ по ESSDAI ($r=-0,459$; $p=0,003$).

Снижение числа не переключивших класс синтезируемых антител В-клеток памяти при СКВ и БШ, обнаруженное в нашей работе, подтверждается литературными данными [13, 18]. Также в настоящем исследовании выявлено статистически значимое снижение количества как активированных, так и покоящихся В-клеток памяти (фенотипы $\text{CD27}^{\text{dim}}\text{CD38}^{\text{dim}}$ и $\text{CD27}^{\text{dim}}\text{CD38}^{\text{low}}$ соответственно). Имеет место статистически значимое увеличение числа плазмобластов (как с фенотипом $\text{IgD}^{\text{low}}\text{CD27}^{\text{hi}}$, так и $\text{CD27}^{\text{hi}}\text{CD38}^{\text{hi}}$) в группах пациентов с аутоиммунными заболеваниями, что было показано и в других работах [13, 14, 19].

При БШ, по предположению A. Hansen и соавт. [20], снижение числа CD27^+ В-клеток памяти в периферической крови объясняется их миграцией в воспаленные слюнные железы, в паренхиме которых на примере 1 пациента было обнаружено повышенное содержание $\text{CD19}^+\text{CD27}^+$ -клеток.

Позднее L.A. Aqrawi и соавт. [21] при проведении двойного иммуногистохимического окрашивания тканей малых слюнных желез у 10 пациентов с БШ не выявили повышения содержания клеток памяти с фенотипом $\text{CD27}^+\text{CD20}^+$, однако обнаружили повышенное число $\text{CD27}^{++}\text{CD20}^-$ плазмобластов. Вероятно, снижение числа клеток памяти в периферической крови и паренхиме слюнных желез обусловлено их активацией и пролиферацией в плазмобласты в местах локализации воспалительного процесса. M. Mingueneau и соавт. [22] проводили масс-спектрометрию

образцов периферической крови и биоптатов слюнных желез у пациентов с БШ и в ГК. Была выявлена отрицательная корреляция между числом В-клеток памяти периферической крови и активностью болезни и в то же время — положительная корреляция числа плазмобластов в паренхиме слюнных желез с активностью заболевания.

Снижение числа непереключенных В-клеток памяти при СКВ не связано с активностью болезни, однако статистически значимо коррелирует с наличием аутоантител, которые сохраняются у пациентов даже в период ремиссии заболевания [19]. Число плазмобластов также не коррелирует с активностью СКВ, что, учитывая их роль в синтезе аутоантител, объясняет персистенцию аутоантител даже при самой агрессивной иммуносупрессивной терапии, а также повторные рецидивы заболевания [14, 23].

У пациентов с СКВ наблюдается повышение числа «двойных негативных» В-лимфоцитов ($\text{IgD}^{\text{low}}\text{CD27}^{\text{low}}$), а также позитивная корреляция данной субпопуляции с маркерами активности заболевания, что может свидетельствовать о важной роли этих клеток в патогенезе СКВ [24]. В настоящей работе не выявлено статистически значимых различий в содержании «двойных негативных» В-лимфоцитов с фенотипом $\text{IgD}^{\text{low}}\text{CD27}^{\text{low}}$ между группами, однако отмечалась обратная корреляционная связь между ним и уровнем С4-компонента комплемента. Также выявлены статистически значимое снижение числа «двойных негативных» В-лимфоцитов с фенотипом $\text{CD27}^{\text{low}}\text{CD38}^{\text{low}}$ и их обратная взаимосвязь с уровнем С4-компонента комплемента в группе пациентов с СКВ.

Обращает на себя внимание отрицательная корреляционная взаимосвязь числа плазмобластов с уровнем СРБ при БШ, а «двойных негативных» В-лимфоцитов ($\text{IgD}^{\text{low}}\text{CD27}^{\text{low}}$) — с уровнем СРБ при СКВ. СРБ — острофазовый белок, который вырабатывается в гепатоцитах под влиянием интерлейкина (ИЛ) 6 в ответ на воспаление или разрушение клеток. Известно, что СКВ и БШ относятся к тем болезням, при которых уровень СРБ статистически значимо не повышается и не коррелирует с активностью основного заболевания [25]. При некоторых аутоиммунных болезнях, таких как, например, СКВ и БШ, повышается синтез интерферонов 1-го типа, в том числе интерферона α . По данным H. Epocsson и соавт. [25], низкий уровень СРБ при СКВ можно объяснить высокой продукцией интерферона α , который оказывает ингибирующий эффект на индуцированную ИЛ-6 продукцию СРБ гепатоцитами.

Выявленные в данной работе особенности субпопуляционного состава В-лимфоцитов у пациентов с СКВ, БШ и ГК легли в основу построения дискриминантной модели, которая имеет высокую чувствительность и специфичность как в разделении больных и ГК, так и в дифференциальной диагностике между СКВ и БШ. Требуются дальнейшие исследования для уточнения диагностической значимости субпопуляций В-лимфоцитов у пациентов с СКВ и БШ.

Выводы

В работе выявлены паттерны изменений субпопуляционного состава В-лимфоцитов периферической крови, характерные для СКВ и БШ.

Общим для СКВ и БШ является снижение числа «наивных» В-лимфоцитов и В-клеток памяти, в том числе «непереключенных» В-клеток памяти (в большей степени для СКВ), а также увеличение количества плазмобластов (в большей степени при СКВ). Для группы пациентов

с СКВ характерно снижение числа «транзиторных» В-клеток (CD27^{low}CD38^{hi}) и «двойных негативных» В-клеток (CD27^{low}CD38^{low}) по сравнению с БШ и ГК.

Результаты ROC-анализа, полученные в данной работе, могут служить основанием для разработки дополнительного диагностического маркера СКВ и БШ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022)

Прозрачность исследования

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Насонов ЕЛ (ред.). Ревматология. Российские клинические рекомендации. М.:ГЭОТАР-Медиа;2017. [Nasonov EL (ed.). Rheumatology. Russian clinical recommendations. Moscow:GEOTAR-Media;2017 (In Russ.)].
- Pasoto SG, Adriano de Oliveira Martins V, Bonfa E. Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus: Links and risks. *Open Access Rheumatol*. 2019;11:33-45. doi: 10.2147/OARRR.S167783
- Ambrus JL, Suresh L, Peck A. Multiple roles for B-lymphocytes in Sjögren's syndrome. *J Clin Med*. 2016;5(10):87. doi: 10.3390/jcm5100087
- Groom J, Kalled SL, Cutler AH, Olson C, Woodcock SA, Schneider P, et al. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest*. 2002;109(1):59-68. doi: 10.1172/JCI14121
- Nocturne G, Seror R, Fogel O, Belkhir R, Boudaoud S, Saraux A, et al. CXCL13 and CCL11 serum levels and lymphoma and disease activity in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(12):3226-3233. doi: 10.1002/art.39315
- Carvajal Alegria G, Gazeau P, Hillion S, Daïen CI, Cornec DYK. Could lymphocyte profiling be useful to diagnose systemic autoimmune diseases? *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;53(2):219-236. doi: 10.1007/s12016-017-8608-5
- Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, Smolen JS, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(9):1400-1412. doi: 10.1002/art.40930
- Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, Criswell LA, Labetoulle M, Lietman TM, et al.; International Sjögren's Syndrome Criteria Working Group. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69(1):35-45. doi: 10.1002/art.39859
- Petri M, Kim MY, Kalunian KC, Grossman J, Hahn BH, Sammaritano LR, et al.; OC-SELENA Trial. Combined oral contraceptives in women with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2005;353(24):2550-2558. doi: 10.1056/NEJMoa051135
- Seror R, Bowman SJ, Brito-Zeron P, Theander E, Bootsma H, Tzioufas A, et al. EULAR Sjögren's syndrome disease activity index (ESSDAI): A user guide. *RMD Open*. 2015;1(1):e000022. doi: 10.1136/rmdopen-2014-000022
- Seror R, Ravaud P, Mariette X, Bootsma H, Theander E, Hansen A, et al.; EULAR Sjögren's Task Force. EULAR Sjögren's syndrome patient reported index (ESSPRI): Development of a consensus patient index for primary Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(6):968-972. doi: 10.1136/ard.2010.143743
- Зурочка АВ, Хайдуков СВ, Кудрявцев ИВ, Чернышев ВА. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. Екатеринбург:УрО РАН;2018. [Zurochka AV, Khaydukov SV, Kudryavtsev IV, Chernyshev VA. Flow cytometry in biomedical research. Ekaterinburg:UrO RAN;2018 (In Russ.)].
- Будкова АИ, Лапин СВ, Серебрякова МК, Кудрявцев ИВ, Тришина ИН, Маслянский АЛ, и др. Субпопуляционный состав В-клеток периферической крови у больных системной красной волчанкой. *Медицинская иммунология*. 2017;19(2):175-184. [Budkova AI, Lapin SV, Serebriakova MK, Kudryavtsev IV, Trishina IN, Maslyansky AL, et al. B-cell subpopulations of peripheral blood in systemic lupus erythematosus. *Medical Immunology (Russia)*. 2017;19(2):175-184 (In Russ.)]. doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-175-184
- Меснянкина АА, Соловьев СК, Александрова ЕН, Александркин АП, Супоницкая ЕВ, Елонаков АВ, и др. Динамика субпопуляции В-лимфоцитов у больных системной красной волчанкой на фоне терапии генно-инженерными биологическими препаратами. *Научно-практическая ревматология*. 2017;55(3):252-260. [Mesnyankina AA, Solovyev SK, Aleksandrova EN, Aleksankin AP, Suponitskaya EV, Elonakov AV, et al. The time course of changes in B lymphocyte subpopulations in patients with systemic lupus erythematosus during therapy with biological agents. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologia = Rheumatology Science and Practice*. 2017;55(3):252-260 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2017-252-260
- Cornec D, Saraux A, Pers JO, Jousse-Joulin S, Marhadour T, Roguedas-Contios AM, et al. Diagnostic accuracy of blood B-cell subset profiling and autoimmunity markers in Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(1):R15. doi: 10.1186/ar4442
- Barcelos F, Martins C, Papoila A, Galdes C, Cardigos J, Nunes G, et al. Association between memory B-cells and clinical and immunological features of primary Sjögren's syndrome and Sicca patients. *Rheumatol Int*. 2018;38(6):1063-1073. doi: 10.1007/s00296-018-4018-0
- Ishioka-Takei E, Yoshimoto K, Suzuki K, Nishikawa A, Yasuoka H, Yamaoka K, et al. Increased proportion of a CD38highIgD+ B cell subset in peripheral blood is associated with clinical and immunological features in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Immunol*. 2018;187:85-91. doi: 10.1016/j.clim.2017.10.008
- Roberts ME, Kaminski D, Jenks SA, Maguire C, Ching K, Burbe- lo PD, et al. Primary Sjögren's syndrome is characterized by distinct phenotypic and transcriptional profiles of IgD+ unswitched memory B cells. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(9):2558-2569. doi: 10.1002/art.38734
- Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, et al. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2000;165(10):5970-5979. doi: 10.4049/jimmunol.165.10.5970
- Hansen A, Odendahl M, Reiter K, Jacobi AM, Feist E, Scholze J, et al. Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2002;46(8):2160-2171. doi: 10.1002/art.10445
- Aqrabi LA, Brokstad KA, Jakobsen K, Jonsson R, Skarstein K. Low number of memory B cells in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Autoimmunity*. 2012;45(7):547-555. doi: 10.3109/08916934.2012.712170
- Mingueneau M, Boudaoud S, Haskett S, Reynolds TL, Nocturne G, Norton E, et al. Cytometry by time-of-flight immunophenotyping identifies a blood Sjögren's signature correlating

- with disease activity and glandular inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(6):1809-1821.e12. doi: 10.1016/j.jaci.2016.01.024
23. Wardowska A, Komorniczak M, Skoniecka A, Bułto-Piontecka B, Lisowska KA, Dębska-Słizień MA, et al. Alterations in peripheral blood B cells in systemic lupus erythematosus patients with renal insufficiency. *Int Immunopharmacol.* 2020;83:106451. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106451
 24. Супоницкая ЕВ, Алексанкин АП, Меснянкина АА, Александрова ЕН, Панафидина ТА, Соловьев СК. Характеристика субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови у больных активной системной красной волчанкой. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017;62(7):418-422. [Suponitskaya EV, Aleksankin AP, Mesnyankina AA, Alexandrova EN, Panafidina TA, Soloviev SK. The characteristic of sub-populations of B-lymphocytes of peripheral blood in patients with systemic lupus erythematosus. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2017;62(7):418-422 (In Russ.)]. doi: 10.18821/0869-2084-2017-62-7-418-422
 25. Enocsson H, Karlsson J, Li HY, Wu Y, Kushner I, Wetterö J, et al. The complex role of C-reactive protein in systemic lupus erythematosus. *J Clin Med.* 2021;10(24):5837. doi: 10.3390/jcm10245837
- Беневоленская С.С.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9817-1750>
Кудрявцев И.В. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7204-7850>
Серебрякова М.К. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2596-4220>
Григорьева И.Н. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9619-1048>
Кувардин Е.С. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8598-0391>
Будкова А.И. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6203-4498>
Коняхин С.В. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5323-8192>
Заммеева Д.Б. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0284-8895>
Моторин Д.Б. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5189-6722>
Зарицкий А.Ю. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7682-440X>
Гайдукова И.З. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3500-7256>
Гайдукова Е.К. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9025-1214>
Лапин С.В. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4998-3699>
Маслянский А.Л. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2427-4148>