

На правах рукописи

МЕСНЯНКИНА

Анна Александровна

**ДИНАМИКА СУБПОПУЛЯЦИЙ В-ЛИМФОЦИТОВ
У ПАЦИЕНТОВ С СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ
НА ФОНЕ ТЕРАПИИ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫМИ
БИОЛОГИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ**

Специальность — 14.01.22. Ревматология

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва — 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В. А. Насоновой».

Научный руководитель:

Соловьев Сергей Константинович,

доктор медицинских наук, профессор

Алексеева Екатерина Иосифовна,

доктор медицинских наук, профес-

сор, член-корреспондент РАН, заве-

дующая ревматологическим отделе-

нием ФГАУ «Национальный меди-

цинский исследовательский центр

здоровья детей» Министерства здра-

воохранения Российской Федерации.

Аршинов Андрей Владимирович,

доктор медицинских наук, профессор

кафедры пропедевтики внутренних

болезней, ФГБОУ ВО «Ярославский

государственный медицинский уни-

верситет» Министерства здравоохра-

нения Российской Федерации.

Официальные оппоненты:

ФГБОУ ВО «Российский националь-

ный исследовательский медицинский

университет имени Н. И. Пирогова»

Министерства здравоохранения

Российской Федерации.

Ведущая организация:

Защита состоится 22 февраля 2019 г. на заседании диссертационного совета Д 001.018.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В. А. Насоновой», по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, дом 34А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В. А. Насоновой» и на сайте www.rheumatolog.ru.

Автореферат разослан

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук



И. С. Дыдыкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Системная красная волчанка (СКВ) — мультисистемное аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся гиперпродукцией органоспецифических аутоантител к различным компонентам клеточного ядра с развитием иммуновоспалительного повреждения тканей и внутренних органов [Ревматология: национальное руководство].

По данным медицинской литературы, общая заболеваемость СКВ в США составляет 5,1 на 100 тыс. населения в год, распространенность — 52,2 на 100 тыс. населения, в Великобритании — 3,8 и 26,2, в Японии — 2,9 и 28,4 соответственно [Gottschalk; Lisnevskaja]. Больные СКВ имеют более высокий риск смертности (в 3 раза выше), чем среди населения в целом. Основными причинами этого являются тяжесть течения СКВ, осложнения на фоне лечения и их отсроченные последствия [Cervera; Borchers].

В основе патогенеза заболевания лежат множественные нарушения врожденного и приобретенного иммунитета, в результате которых происходит патологическая активация В-лимфоцитов с последующим синтезом аутоантител к множеству антигенов. В-лимфоциты также участвуют в синтезе цитокинов и презентации антигена Т-лимфоцитам. В результате этих взаимодействий формируется воспалительный процесс в тканях [Gottschalk], что обосновывает ведущую роль В-клеток в развитии СКВ. Эти данные предопределили создание и применение таргетных препаратов, влияющих непосредственно на В-клетки и их функцию. Подавление В-клеточного звена аутоиммунитета приводит к значительному снижению активности заболевания и длительной ремиссии [Townsend]. Однако несмотря на успешное применение генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП), нередко наблюдается недостаточная эффективность или отсутствие эффекта от терапии, что может приводить к рецидиву СКВ и даже к ухудшению течения и прогноза заболевания [Yusof].

Таким образом, актуален поиск надежных клинико-лабораторных показателей, способствующих прогнозированию течения заболевания, будущего ответа на терапию. Поскольку В-клетки играют важную роль в развитии СКВ, а современные ме-

тоды терапии ГИБП ориентированы на их подавление, определение роли отдельных субпопуляций В-лимфоцитов у больных имеет большое значение для оценки течения СКВ и прогнозирования исходов терапии [Yusof; Vital, 2011; Vallerskog, 2007]. В настоящее время очень мало данных об исходном составе субпопуляций В-лимфоцитов у пациентов с СКВ и их динамике на фоне лечения ГИБП, однако мнение исследователей и накопленный материал позволяют считать их ценным инструментом мониторинга больных СКВ, что предопределяет актуальность данной темы.

Цель исследования: оценить совокупность изменений клинических, иммунологических показателей активности и субпопуляций В-лимфоцитов у пациентов с СКВ и их динамику под влиянием анти-В-клеточной и анти-BLyS терапии.

Задачи исследования:

1. Оценить гомеостаз субпопуляций В-лимфоцитов у пациентов с СКВ при сопоставлении со здоровыми донорами.
2. Выявить взаимосвязь субпопуляций В-лимфоцитов с клиническими проявлениями СКВ, со степенью активности и длительностью заболевания.
3. Проанализировать влияние анти-В-клеточной и анти-BLyS терапии на субпопуляции В-лимфоцитов.
4. По степени деплеции и репопуляции В-лимфоцитов определить предикторы ответа на терапию при динамическом наблюдении.
5. Определить влияние анти-В-клеточной и анти-BLyS терапии на иммунологические показатели (антитела к двуспиральной ДНК, С3 и С4 компоненты комплекса, иммуноглобулины), характеризующие активность СКВ при длительном динамическом наблюдении; выявить взаимосвязь с изменением количества определенных субпопуляций В-лимфоцитов.

Научная новизна исследования. Впервые в РФ проведено динамическое исследование субпопуляций В-лимфоцитов у больных СКВ с использованием высокотехнологического метода многоцветной проточной цитофлуорометрии.

Выявлено, что процентное соотношение субпопуляций В-лимфоцитов при СКВ и у здоровых доноров различно. Существует взаимосвязь между количеством В-клеток различных субпопуляций с активностью и длительностью СКВ, предшествующей терапией, наличием волчаночного нефрита (ВН) и параметрами иммунологической активности. Оценка динамики субпопуляций В-лимфоцитов на фоне

терапии ГИБП позволяет выделить возможные предикторы эффективности проводимого лечения.

Оценка эффективности комбинированной терапии ритуксимабом (РТМ) и белимуабом (БЛМ) у больных СКВ продемонстрировала хорошую клиническую эффективность. Применение двух ГИБП позволило контролировать общую популяцию В-лимфоцитов, способствовало более медленному их восстановлению у пациентов, которые достигли полной деплеции после курса РТМ, и дальнейшему сокращению В-клеток после подключения БЛМ у больных с отсутствием деплеции. Такая терапия поддерживала в низких концентрациях плазмобласты (ПБ), плазматические клетки (ПК), общую популяцию В-клеток памяти и наивные В-лимфоциты.

Практическая значимость исследования. Полученные данные могут использоваться для дальнейших исследований роли субпопуляций В-лимфоцитов при СКВ. Выявление низкого исходного количества переключенных и высокого — двойных негативных (ДН) В-клеток памяти и ПБ у пациентов с подозрением на СКВ может способствовать более ранней диагностике этого заболевания. Дополнительным критерием высокой активности СКВ может служить высокая процентная доля ДН В-клеток памяти при низком количестве наивных В-лимфоцитов.

Высокое содержание ПК ($>0,2\%$) в периферической крови у больных СКВ может быть предиктором неполной В-клеточной деплеции после курса РТМ. Дополняющие друг друга механизмы действия РТМ и БЛМ, приводящие к быстрому развитию деплеции В-лимфоцитов и поддержанию ее на низком уровне в течение длительного времени, обеспечивают высокую эффективность комбинированной терапии и обосновывают ее назначение больным СКВ с высокой и средней степенью активности заболевания.

Положения, выносимые на защиту:

1. Количественные параметры субпопуляций В-лимфоцитов при СКВ отличаются от аналогичных показателей здоровых доноров. Существует зависимость между количеством В-клеток различных субпопуляций с активностью, длительностью, клинико-лабораторными данными СКВ.

2. Терапия РТМ приводит к снижению основных субпопуляций В-лимфоцитов. Неполная деплеция В-лимфоцитов после терапии РТМ наблюдается при повышенном базальном количестве ПК.

3. Особенностью начала репопуляции В-клеток после применения РТМ является увеличение либо непереключенных, либо переключенных В-клеток памяти. Долгосрочным эффектом терапии ГИБП является сокращение и длительное сохранение малого количества общей популяции В-клеток памяти.

4. Терапия БЛМ способствует снижению клиничко-лабораторной активности СКВ с 3-го мес. наблюдения, а иммунологических показателей — с 6-го мес. после инициации ГИБП, в то же время отмечается уменьшение количества ПК и ПБ. БЛМ может оказывать влияние на общее содержание CD19+ В-лимфоцитов и количество наивных В-лимфоцитов.

5. Применение комбинированной терапии у пациентов с СКВ высокоэффективно и способствует снижению количества ПК и ПБ. По сравнению с монотерапией РТМ комбинированная терапия РТМ и БЛМ замедляет репопуляцию В-лимфоцитов и поддерживает низкие концентрации ПБ и ПК, общей популяции В-клеток памяти и наивных В-лимфоцитов.

Конкретное участие автора в получении научных результатов. Диссертантом освоена методика организации и проведения клинических исследований лекарственных средств, получен сертификат о повышении квалификации, также пройдено обучение по программе «Генно-инженерные биологические препараты в лечении ревматических заболеваний», получен сертификат о повышении квалификации. Автор освоила метод оценки активности СКВ (SLEDAI-2K и BILAG), индекса повреждения, изучила методику проведения иммунофенотипирования В-лимфоцитов периферической крови методом многоцветной проточной цитофлуориметрии.

Автором изучена и проанализирована литература по теме работы. Основные положения представлены в опубликованном литературном обзоре. На основе проведенного анализа сформулированы цели и задачи настоящего исследования, определены основные этапы контроля и объем обследований. Была разработана тематическая карта пациента для первичного и повторного визитов, а также электронная база данных. Автор осуществлял ведение пациентов с СКВ в стационаре и при динамическом наблюдении. Результаты обследования внесены в локальную электронную базу, а также в базу данных VLIPS межнационального регистра пациентов с СКВ Евразийской когорты (РЕНЕССАНС), заполнена первичная документация и тематические

карты пациентов. Диссертантом проводился статистический анализ результатов наблюдения, на основе которого сформулированы выводы исследования, определены практические рекомендации.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «НИИР им. В.А. Насоновой».

Внедрение в практику. Определение субпопуляций В-лимфоцитов внедрено и используется в клинике ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой для оценки активности и прогнозирования эффективности терапии ритуксимабом у больных с системной красной волчанкой. Материалы диссертации используются при чтении лекций, проведении круглых столов и практических занятий для врачей и ординаторов.

Публикации и апробация работы. Основные положения и выводы диссертации изложены в 10 публикациях, в том числе в 5 статьях в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикаций основных результатов диссертационных исследований.

Результаты диссертационного исследования были доложены на школе «Перспективы развития ревматологии — вклад молодых ученых» (Москва, 2015), I Междисциплинарной научной конференции «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» (Москва, 2016), научной конференции молодых ученых «Молодое поколение ревматологов в науке» (Москва, 2016), заседании ревматологической секции научного общества терапевтов (Москва, 2017), VII Съезде ревматологов России с международным участием (Москва, 2017), на XXI форуме «Национальные дни лабораторной медицины России» (Москва, 2017), XVII Всероссийской школе ревматологов им. В. А. Насоновой с конференцией молодых ученых и совещанием экспертов-ревматологов (Москва, 2018).

Первичная экспертиза диссертации проведена на заседании ученого совета ФГБНУ НИИР им. В. А. Насоновой 4 сентября 2018 г.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 112 страницах, состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, содержащего 12 отечественных и 148 зарубежных источников. Текст диссертации иллюстрирован 19 таблицами, 19 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. В исследование включены 75 больных с достоверным диагнозом СКВ, удовлетворявших диагностическим критериям SLICC 2012 г. Пациенты, вошедшие в исследование, наблюдались в ФГБНУ НИИР им. В. А. Насоновой в период с 2014 по 2017 г. Группа контроля состояла из 20 здоровых доноров, сопоставимых по возрасту и полу. Программа исследования одобрена локальным этическим комитетом, тема диссертации — ученым советом ФГБНУ НИИР им. В. А. Насоновой.

Критериями включения в исследование являлись:

1. Достоверный диагноз СКВ согласно критериям SLICC (2012 г.).
2. Активность заболевания не менее II степени (В. А. Насонова), по критериям SLEDAI-2K — не менее 6 баллов.
3. Исследование базального уровня В-лимфоцитов и иммунологических показателей крови до проведения терапии ГИБП.
4. Показания для назначения терапии ГИБП.
5. Информированное согласие пациента

Критериями исключения являлись:

1. Заболевание, соответствующее I степени активности по В. А. Насоновой и критериям SLEDAI-2K (менее 6 баллов) или ремиссия СКВ.
2. Беременность или лактация.
3. Низкие базальные уровни В-лимфоцитов (<1%).
4. Противопоказания для назначения ГИБП.
5. Некомплаентность пациента.
6. Отсутствие подписанного информированного согласия.

Клинико-лабораторная характеристика больных. Группа больных СКВ состояла из 75 больных, 70 женщин (93%) и 5 мужчин (7%). Медиана возраста всей группы составляла Me 33 [25–40] лет, длительность заболевания — от 2 месяцев до 38 лет (таблица 1).

Таблица 1. Общая характеристика пациентов, включенных в наблюдение ($n=75$)

Параметры	Количество больных
Длительность заболевания:	
- от 0 до 11 месяцев	10 (13%)
- от 1 года до 5 лет	32 (43%)
- более 5 лет	33 (44%)
Степень активности по В. А. Насоновой:	
- II	17 (22%)
- III	58 (78%)
SLICC индекс повреждения ≥ 1 балла	29 (40%)
Степень активности SLEDAI-2K, баллы Me [25-й; 75-й перцентили]	14 [10; 18]
BILAG, баллы Me [25-й; 75-й перцентили]	17 [13; 22]

Чаще всего наблюдались такие клинические проявления СКВ, как поражение суставов ($n=33$ (44%)), кожи ($n=29$ (39%)), почек ($n=27$ (36%)), реже — центральной нервной системы ($n=6$ (8%)) и явления васкулита ($n=7$ (9%)). Среди пациентов с ВН протеинурия с изменением мочевого осадка отмечалась у 14 (19%) (от 0,6 до 4,2 г в сут., Me 0,9 г в сут.), у 12 (16%) человек выявлялось только изменение мочевого осадка. Снижение скорости клубочковой фильтрации (ниже 70 мл/мин) зарегистрировано у 5 (7%) больных (от 21 до 66 мл/мин, Me 45,3). Высокая иммунологическая активность наблюдалась у большинства пациентов. Положительный антинуклеарный фактор (АНФ her-2) определялся у 99%, а высокий титр антител к двуспиральной ДНК — у 91% (Me 258 [92; 300] Ед/мл). Снижение С3 (71%) и С4 (60%) компонентов комплемента отмечалось у значительного количества пациентов, медиана значений составила 0,61 [0,48–0,73] г/л и 0,06 [0,037; 0,075] г/л соответственно.

В анамнезе 13 пациентов не получали терапию по основному заболеванию. К моменту включения в исследование всем пациентам назначались глюкокортикоиды *per os*: 80% больных — средние и низкие дозы (Me 10 [7,5; 16]) и 20% — высокие дозы (Me 42 [32; 50] мг в сут.). Половина больных получала иммуносупрессивную терапию. По показаниям 18 пациентам проводилась трехдневная пульс-терапия метилпреднизолоном (от 0,25 до 3 г), у 12 больных такая терапия сопровождалась синхронным введением циклофосфана. Оценка исходных данных была осуществлена у 75 пациентов с СКВ, в динамике прослежены 64 пациента. Из них РТМ получали 47

пациентов в дозе от 500 до 2000 мг. При повторных визитах 21 пациенту повторно вводили РТМ в дозе от 500 до 1000 мг. 10 больным назначался БЛМ в дозе 10 мг/кг массы тела. 7 пациентов получали комбинированную терапию РТМ и БЛМ. Им вводился РТМ в дозе 500 (2 больных) или 1000 мг (5 больных), а через 3 мес. назначался БЛМ по схеме 10 мг/кг 1 раз в мес. в течение 8 мес. (таблица 2).

Таблица 2. Исходные и повторные визиты, количество пациентов

Визит	РТМ	БЛМ	РТМ+БЛМ	Всего
Исходно	47	10	7	64
3 мес.	47	10	7	64
6 мес.	42	7	7	56
9 мес.	31	5	7	43
12 мес.	34	5	5	44

Методы исследования. Длительность наблюдения составляла 12 мес., в течение которых осуществлено 4 контрольных визита на 3-м, 6-м, 9-м и 12-м мес. Исходно и при каждом визите проводилась оценка активности заболевания, стандартное обследование, принятое при ведении пациентов с СКВ: клинический, биохимический анализ крови, анализы мочи и иммунологический анализ крови (антитела к двуспиральной ДНК, С3, С4 компоненты комплемента, АНФ, IgG, IgA, IgM). До введения ГИБП и при каждом визите осуществлялся забор крови для определения процентного и абсолютного содержания субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови. Активность заболевания определялась с применением индекса активности SLEDAI2K и BILAG-2004. Клинический анализ крови и мочи, биохимический и иммунологический анализ крови выполнены унифицированными методами. Субпопуляции В-лимфоцитов определялись в периферической крови методом многоцветной проточной цитофлуорометрии с использованием панели моноклональных антител к поверхностным мембранным маркерам В-лимфоцитов. В-клеточная деплеция CD19+ В-лимфоцитов оценивалась следующим образом: 0% — полная деплеция, от 0,1 до 0,5% — частичная деплеция, >0,5% — отсутствие деплеции. Репопуляцией В-лимфоцитов считалось их восстановление более 1% у больных с полной или частичной деплецией. В таблице 3 представлены субпопуляции В-лимфоцитов.

Таблица 3. Субпопуляции В-лимфоцитов

В-лимфоциты	В-лимфоциты
Общая популяция В-лимфоцитов	CD19+В-клетки
Наивные В-клетки	CD19+CD27-IgD+
В-клетки памяти (общая популяция)	CD19+CD27+
Непереключенные В-клетки памяти	CD19+CD27+IgD+
Переключенные В-клетки памяти	CD19+CD27+IgD-
ПБ	CD19+CD38+++ CD27+ IgD-CD20-
ПК	CD19+CD38+
ДН В-клетки памяти	CD19+CD27-IgD-

При необходимости проводилась рентгенография органов грудной клетки, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, эхокардиографическое исследование сердца.

Статистическая обработка результатов проводилась с применением программы Statistica 7.0 (StatSoft, США), включая методы непараметрического анализа. Для параметров, распределение которых отличалось от нормального, при сравнении 2 групп использовался U критерий Манна — Уитни, при сравнении 3 групп — критерии Краскела — Уоллиса, результаты представлены в виде медианы [Me] [25–75 перцентиль]. Применялись методы описательной статистики. Корреляционный анализ проводился с использованием рангового коэффициента корреляции Спирмена. Статистическая значимость определялась как $p < 0,05$.

Результаты собственных исследований

Базальная оценка субпопуляций В-лимфоцитов. При оценке гомеостаза субпопуляций В-лимфоцитов 75 пациентов СКВ были разделены на группы в зависимости от предшествующей терапии, длительности заболевания, активности СКВ и другим параметрам. В связи с тем, что лечение ГИБП (РТМ) отдаленно могло влиять на определенные субпопуляции В-лимфоцитов, 10 из 75 пациентов, ранее получавших РТМ, отнесены в отдельную группу, которая потом была сопоставлена со здоровыми донорами и 65 больными СКВ, получавшими стандартную терапию.

По результатам анализа, проведенного среди 65 пациентов с СКВ, отмечено высокое процентное и абсолютное содержание ДН В-клеток памяти, ПБ и низкое — переключенных В-клеток памяти по сравнению со здоровыми донорами (таблица 4). Показатели последних не зависели от степени активности и длительности заболевания.

Таблица 4. Субпопуляции В-лимфоцитов у 65 пациентов с СКВ без ранее проводимой терапии ГИБП

В-лимфоциты	Относительное (%) / абсолютное ($\times 10^9/\text{л}$) количество В-клеток, Ме [25; 75 перцентиль]		<i>p</i>
	СКВ	здоровые доноры	
Переключенные В-клетки памяти	4,2 [2,1; 9] / 0,008 [0,003; 0,02]	12,8 [9,3; 17,0] / 0,02 [0,01; 0,04]	$p < 0,00003$, $p < 0,0006$
ПБ	0,2 [0,1; 0,4] / 0,0003 [0,00017; 0,0008]	0,1 [0,1; 0,2] / 0,0002 [0,0001; 0,0004]	$p < 0,004$, $p < 0,04$
ДН В-клетки памяти	18 [12; 27,6] / 0,03 [0,01; 0,05]	13,3 [7,1; 19,3] / 0,02 [0,01; 0,02]	$p < 0,01$, $p < 0,04$

Существует взаимосвязь между количеством В-клеток различных субпопуляций и активностью СКВ. У 53 больных с высокой степенью активности заболевания (SLEDAI 2K > 10 баллов) при сравнении с 12 больными, имеющими среднюю степень, выявлена высокая процентная доля ДН (20,8 [14; 29]% и 13,5 [9,8; 16,5]%, $p < 0,015$), в то время как количество наивных В-лимфоцитов было низким (66 [49; 72]% и 78 [74; 83]%, $p < 0,0018$, $r = -0,48$). Выявлена положительная корреляция между высокой активностью СКВ и высоким процентным количеством ДН В-клеток ($r = 0,52$, $p < 0,05$) (рисунок 1).

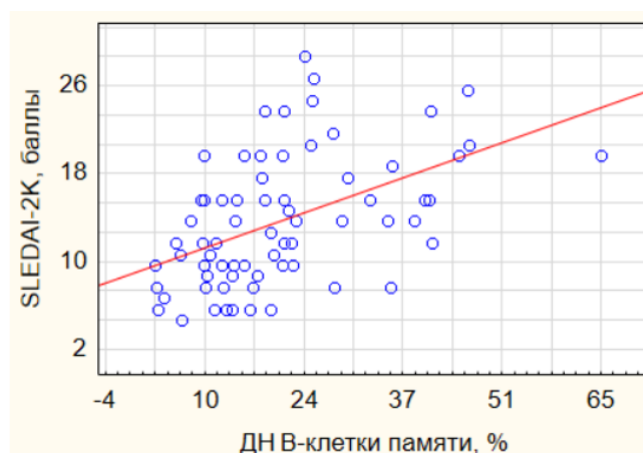


Рисунок 1. Корреляция ДН В-лимфоцитов памяти с активностью СКВ по SLEDAI-2K ($r = 0,52$, $p < 0,05$), $n = 65$

Пациенты с более высоким содержанием ДН В-клеток чаще имели поражение почек. Наличие протеинурии, связанной с активным ВН, чаще регистрировалось у больных, имевших более высокое процентное содержание ДН В-лимфоцитов памяти, что подтверждено при проведении корреляционного анализа зависимости количества ДН В-клеток памяти и уровня протеинурии у 20 пациентов с активным ВН без признаков нарушения концентрационно-фильтрационной функции почек и ранее не получавших ГИБП терапию ($r=0,72$, $p<0,05$). Процентная доля ПК у них тоже была выше ($r=0,52$, $p<0,05$), а процентное и абсолютное количество наивных В-лимфоцитов ($r=-0,71$, $p<0,05$) и общей популяции CD19+В-лимфоцитов — ниже ($r=-0,61$ и $r=-0,52$, $p<0,05$ для процентного и абсолютного количества соответственно).

У 10 больных, получавших ранее РТМ, отмечалось более низкое процентное количество общей популяции В-лимфоцитов памяти по сравнению со здоровыми донорами и 65 пациентами без предшествующей ГИБП терапии ($p<0,04$).

При сравнительном анализе групп больных с высокой и низкой иммунологической активностью получены достоверные различия. Оценка субпопуляций В-лимфоцитов среди 26 больных с высоким ($>1:1280$) и 15 пациентов с низким АНФ ($<1:320$) выявила малую процентную долю непереключенных В-лимфоцитов памяти среди пациентов, вошедших во 2-ю группу ($p<0,02$). Сравнительный анализ 33 больных с высокой (более 200 Ед/мл) и 32 пациентов с низкой (менее 199 Ед/мл) концентрацией антител к двуспиральной ДНК выявил высокое процентное содержание переключенных В-клеток памяти ($p<0,014$) у последних. Концентрация С4 компонента комплемента зависела от количества ПБ. Ввиду того, что средняя концентрация ПБ в периферической крови у здоровых доноров соответствовала $0,0002 \times 10^9/\text{л}$, пациенты с СКВ были разделены на больных, обладавших высоким ($>0,0002 \times 10^9/\text{л}$, $n=33$) и низким их содержанием ($\leq 0,0002 \times 10^9/\text{л}$, $n=27$). Таким образом, пациенты с большим количеством ПБ имели более низкие уровни С4 компонента комплемента ($p<0,00087$) (рисунок 2).

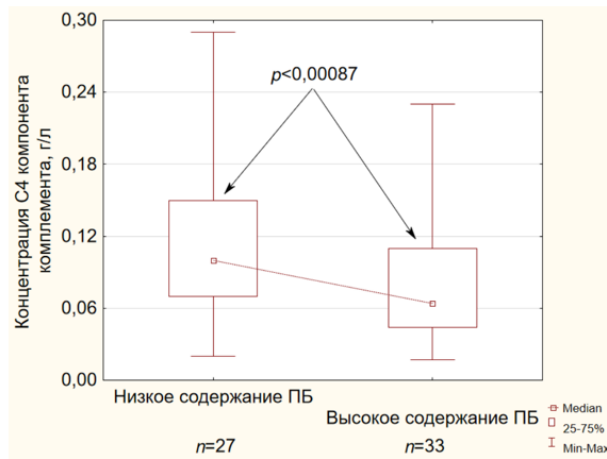


Рисунок 2. Концентрация С4 компонента комплемента у больных с высокой и низкой концентрацией ПБ в периферической крови

При оценке субпопуляций В-клеток в зависимости от длительности заболевания пациенты без предшествующей ранее терапии ГИБП были разделены на 2 группы. В 1-ю вошли 10 пациентов с длительностью заболевания от 0 до 11 мес., во вторую — 32 больных с длительностью заболевания от 1 года до 5 лет. Группы не отличались по степени активности заболевания. 10 больных с длительностью СКВ менее 11 мес. имели, как правило, более высокое процентное содержание CD19+ В-лимфоцитов по сравнению с больными, длительность заболевания которых составляла более 1 года ($p < 0,048$). Отличительной особенностью являлось более высокое процентное содержание общей популяции В-клеток памяти ($p < 0,04$) и непереключенных В-клеток памяти ($p < 0,01$).

Ритуксимаб. Оценка динамики В-лимфоцитов к 3-му мес. на фоне терапии РТМ была проведена у 54 пациентов, которые получали РТМ ($n=47$) и комбинированную терапию РТМ и БЛМ ($n=7$). Степень деплеции В-клеток к 3-му мес. не зависела от базальной активности СКВ (SLEDAI-2K) и длительности заболевания. К 3-му мес. полной деплеции достигли 50% пациентов, частичная деплеция наблюдалась у 26% и отсутствие деплеции — у 24% больных. Активность заболевания по SLEDAI-2K/BILAG исходно соответствовала 14 [10; 18] / 17 [13; 22] баллам. К 3-му мес. наблюдения активность заболевания снизилась до 4 [2; 10] / 8 [1; 10] баллов у пациентов с полной, до 5 [4; 8] / 8 [1; 9] баллов — с частичной и 8 [5; 10] / 9 [2; 16] баллов у больных с отсутствием деплеции ($p < 0,00000$).

У 14 пациентов с частичной деплецией, ответивших на лечение, к 3-му мес. после курса РТМ отмечалось снижение уровней всех субпопуляций В-клеток. Такая терапия приводила к быстрому истощению наивных и ДН В-клеток памяти. Остаточными клетками являлись преимущественно наивные, непереключенные, переключенные, ДН В-клетки памяти.

Среди пациентов, обладающих более высоким базальным процентным количеством ПК, чаще отмечалась неполная деплеция общей популяции CD19+ В-лимфоцитов через 3 мес. после инициации терапии ГИБП ($p < 0,006$) (рисунок 3). Так, среди 27 больных с частичной деплецией и отсутствием деплеции В-лимфоцитов у 17 (62%) больных уровень ПК был равен или превышал 0,2% (с максимальным значением до 0,7%). Среди 27 пациентов с полной деплецией у 22 (81%) количество ПК соответствовал 0–0,1% ($p < 0,006$). Таким образом, неполная деплеция В-лимфоцитов связана с наличием высокого базального процентного количества ПК (более 0,2%).

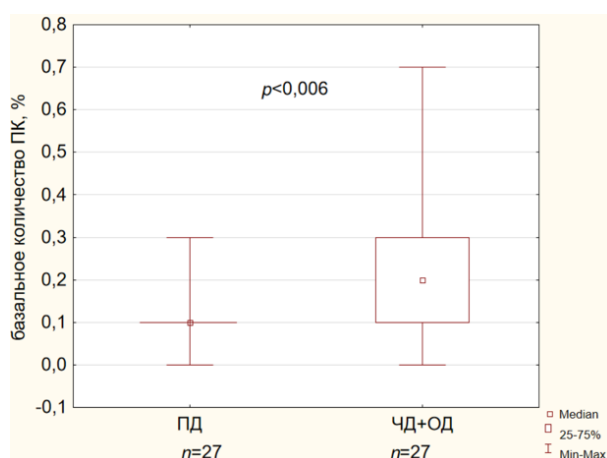


Рисунок 3. Базальное процентное содержание ПК: ПД — пациенты с полной деплецией к 3-му мес. после курса РТМ ($n=27$); ЧД+ОД — пациенты с частичной деплецией и отсутствием деплеции после курса РТМ ($n=27$)

Репопуляция к 6-му мес. наблюдения отмечалась у 38 больных (78%) больше за счет наивных, ДН, непереключенных, переключенных В-клеток памяти.

Среди 16 больных с полной деплецией после курса РТМ и последующим восстановлением CD19+В-лимфоцитов к 6-му мес. отмечена более медленная репопуляция общей группы В-клеток памяти (0,1 [0,1; 0,2]%) и наивных В-клеток (32

[17;68]%). Следует отметить нарастание у этих больных процентного количества либо непереключенных (от 17 до 83%), либо переключенных (от 14 до 87%) В-клеток памяти.

Для демонстрации влияния РТМ на субпопуляции В-лимфоцитов при длительном наблюдении были выделены 16 пациентов, которым РТМ вводился однократно, т. е. в период наблюдения повторных курсов ГИБП они не получали. У этих пациентов зарегистрировано восстановление всех субпопуляций В-лимфоцитов к 12-му мес. Процентное соотношение субпопуляций клеток через год наблюдения не отличалось от исходного, однако при сопоставлении с базальным распределением указанных лимфоцитов у этих больных выявлено значимо более низкое процентное количество общей популяции В-клеток памяти ($p < 0,000012$) и переключенных В-клеток памяти ($p < 0,035$).

Белимуаб. БЛМ получали 10 пациентов, средний возраст которых составлял 32,5 [26; 34], длительность заболевания — от 3 до 16 лет. На фоне терапии БЛМ был получен клиничко-иммунологический ответ у 9 пациентов. Замечено постепенное уменьшение активности СКВ, которое регистрировалось уже к 3-му мес. (SLEDAI-2K/BILAG исходно — 10 [8; 11] / 16,5 [12; 17] баллов, через 12 мес. — 4 [2; 4] / 1 [1; 5] баллов). В иммунологическом анализе крови зарегистрировано снижение титра антител к двуспиральной ДНК (исходно — 113 [73; 300] Ед/мл, через 12 мес. — 73 [27; 206] Ед/мл), нарастание С3 (исходно — 0,7 [0,57; 0,9] г/л, через 12 мес. — 0,9 [0,7; 0,94] г/л) и С4 (исходно — 0,09 [0,06; 0,12] г/л, через 12 мес. — 0,15 [0,12; 0,2] г/л) компонентов комплемента, динамика которых была наиболее выражена с 6-го мес. после инициации ГИБП.

За 12 мес. снизилась общая популяция CD19+ В-лимфоцитов (с 7,5 [6,4; 11,6]% до 2,9 [1,5; 6,5]% к 12-му мес.), однако полной или частичной деплеции В-лимфоцитов не было. Также выявлено снижение количества наивных В-лимфоцитов и увеличение непереключенных ($p < 0,008$) В-клеток памяти. На популяцию общей группы В-клеток памяти препарат не оказывал выраженного влияния. Отмечалось снижение абсолютных показателей ПК и ПБ, выявляемое к 6–9-

му мес. после инициации БЛМ. К 6-му мес. наблюдения у 4 из 7 пациентов в периферической крови не определялись ПБ, у 3 из 7 — ПК (рисунок 4).

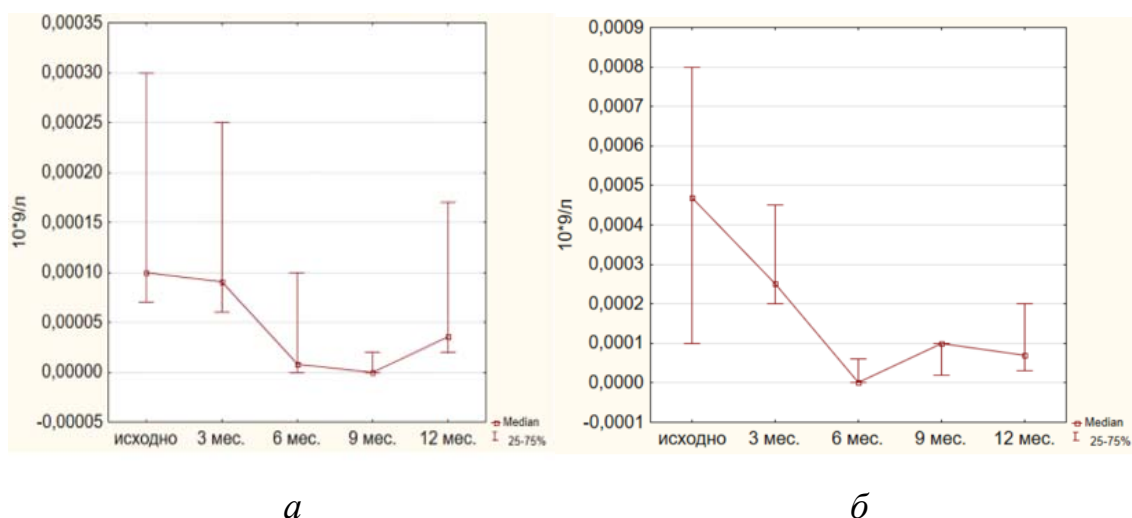


Рисунок 4. Динамика субпопуляций В-лимфоцитов на фоне терапии БЛМ за 12 мес. наблюдения: *а* — плазматические клетки ($\times 10^9/l$); *б* — плазмобласты, ($\times 10^9/l$)

Комбинированная терапия. Комбинированную терапию получали 7 пациентов с различными симптомами СКВ, преимущественно с высокой степенью активности заболевания. Каждому пациенту этой группы был присвоен порядковый номер. Медиана возраста больных составляла 20 [20; 38] лет, длительность заболевания — от 1 года до 16 лет. На терапию не ответила одна больная. У остальных отмечалось прогрессирующее снижение активности заболевания (по SLEDAI-2K/BILAG с 10 [9; 16] / 17 [10; 18] до 3 [2; 6] / 1 [1; 2] баллов к 12-му мес.). Титр антител к двуспиральной ДНК снижался (174 [36; 300] Ед/мл и 12 [6; 34] Ед/мл), одновременно зарегистрировано увеличение С3 (0,4 [0,37; 0,44] и 0,85 [0,81; 0,88] г/л) и С4 компонентов комплемента ([0,038 [0,03; 0,054] и 0,17 [0,15; 0,26] г/л исходно и на 12 мес.). В целом средний уровень IgG, IgA, IgM оставался в пределах референсных значений. Признаки тяжелой инфекции не зарегистрированы.

К 3-му мес. полной деплеции достигли 2 пациента (№ 58, 59), частичной — 1 (№ 63), отсутствие деплеции замечено у 4 пациентов, что соответствует 57%. Для определения влияния различных схем терапии на В-лимфоциты проведена количественная оценка общей популяции В-клеток у 16 пациентов с СКВ, которым однократно вводился РТМ, и 7 больных, получавших комбинированную терапию (рисунок 5). У 16 пациентов с монотерапией РТМ после достижения частичной и пол-

ной деплеции отмечалось заметное нарастание В-лимфоцитов ($p < 0,003$). Среди пациентов, получавших комбинированное лечение ГИБП, количество В-лимфоцитов продолжало сокращаться, а у больных с полной и частичной деплецией наблюдалась более медленная их репопуляция. Комбинированный метод терапии способствовал поддержанию ПК и ПБ в низком количестве среди больных с полной и частичной деплецией (№ 58, 59, 63) или дальнейшему их сокращению у больных, у которых деплеция после курса РТМ не была достигнута (рисунок 6).

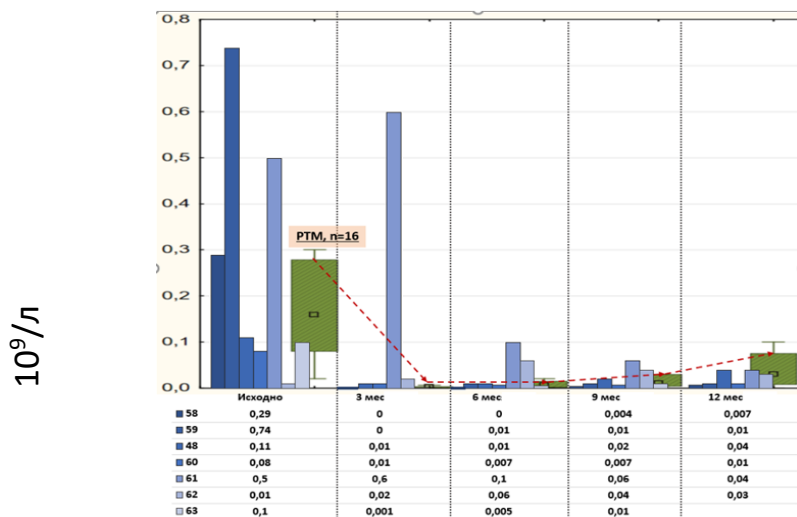


Рисунок 5. Динамика абсолютного количества CD19+ лимфоцитов на фоне комбинированной терапии и лечения РТМ, абсолютные значения $\times 10^9/\text{л}^*$

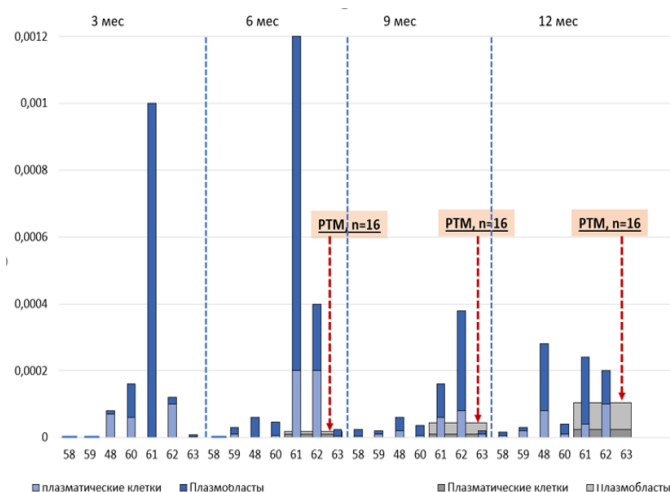


Рисунок 6. Количество ПБ и ПК у 7 пациентов, находящихся на комбинированной терапии в динамике на 3-й, 6-й, 9-й, 12-й мес., абсолютные значения $\times 10^9/\text{л}^*$

* Синяя шкала — количество В-лимфоцитов у 7 пациентов, получавших РТМ и БЛМ; зеленая шкала — количество В-лимфоцитов у 16 пациентов, находящихся на терапии РТМ.

К 12-му мес. отмечена более высокая доля непереключенных В-клеток памяти (3,7 [2,7; 14,5]% и 23,6 [10,5; 39,4]%) и сокращение наивных В-клеток (69 [21;83]% и 34 [10;43]%), общей популяции В-клеток памяти (1,2 [0,8;1,4]% и 0,5 [0,2;0,9]% исходно и через 12 мес. соответственно) по сравнению с исходным составом.

ВЫВОДЫ

1. Изучение гомеостаза субпопуляций В-лимфоцитов у больных СКВ позволило установить, что количественное распределение различных популяций В-клеток отличается от здоровых доноров, а также зависит от активности, длительности, клинико-иммунологических параметров СКВ. Оценка динамики субпопуляций

В-лимфоцитов на фоне терапии ГИБП способствовала выявлению возможных предикторов эффективности проводимого лечения.

2. У больных СКВ выявляется низкое количество переключенных ($p < 0,0006$) и высокое количество ДН В-клеток памяти ($p < 0,04$) и ПБ ($p < 0,04$) по сравнению со здоровыми донорами. В дебюте СКВ преобладают непереключенные клетки памяти ($p < 0,01$) и общая популяция В-лимфоцитов памяти ($p < 0,04$).

3. При высокой активности СКВ (SLEDAI-2K > 10 баллов) определяется повышенная процентная доля ДН В-клеток ($p < 0,015$) и низкое значение наивных В-лимфоцитов ($p < 0,0018$) по сравнению со средней степенью активности. Выявлена ассоциация между наличием активного ВН и количеством ДН В-клеток памяти ($r = 0,72$, $p < 0,05$), ПК ($r = 0,52$, $p < 0,05$) и наивных В-лимфоцитов ($r = -0,71$, $p < 0,05$).

4. Выявлено достоверно более низкое процентное содержание непереключенных В-лимфоцитов памяти у пациентов с низким титром АНФ ($p < 0,02$). Повышенное содержание переключенных В-клеток памяти определяется при низких значениях антител к дсДНК ($p < 0,014$), а низкий уровень С4 компонента комплекса выявляется при высоком количестве ПБ ($> 0,0002 \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,00087$).

5. К 3-му мес. после терапии РТМ достижение полной деплеции В-лимфоцитов соответствует низкой активности СКВ по SLEDAI-2K/BILAG 4 — [2; 10] / 8 [1; 10], при отсутствии полной В-клеточной деплеции резидуальными клетками являются наивные В-клетки и различные субпопуляции В-клеток памяти. Неполная деплеция В-лимфоцитов отмечается при повышенном базальном количестве ПК (более 0,2%).

6. Начало репопуляции В-клеток после терапии РТМ характеризуется нарастанием непереключенных и переключенных В-клеток памяти. Через год наблюдения отмечается более низкое процентное количество переключенных В-клеток памяти ($p < 0,035$) и общей популяции В-клеток памяти ($p < 0,000012$) при сравнении с базальными данными.

7. Терапия БЛМ способствует снижению клинико-лабораторной активности заболевания к 3-му мес. наблюдения. Снижение иммунологических показателей выявляется с 6-го мес. после инициации ГИБП, в то же время отмечается уменьшение количества ПК и ПБ. БЛМ может оказывать влияние на общее содержание CD19+ В-лимфоцитов и количество наивных В-лимфоцитов.

8. Применение комбинированной терапии приводило к более медленной репопуляции В-лимфоцитов, способствовало торможению роста числа ПК и ПБ, поддержанию низких концентраций общей популяции В-клеток памяти и наивных В-лимфоцитов. Наблюдалась тенденция к снижению клинико-лабораторной активности СКВ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Низкое количество переключенных и высокое содержание ДН В-клеток памяти и ПБ может служить маркером для ранней диагностики СКВ.

2. Дополнительным показателем высокой активности СКВ является повышенное количество ДН В-клеток при одновременном низком содержании наивных В-лимфоцитов.

3. Учитывая выявленную зависимость между высоким базальным содержанием ПК и неполной В-клеточной деплецией после применения РТМ, оценка количества ПК до введения ГИБП может способствовать подбору дозы препарата с целью достижения полной В-клеточной деплеции и, соответственно, ожидаемого клинического ответа.

4. Комбинированный метод терапии РТМ и БЛМ у больных со средней и высокой степенью активности СКВ обеспечивает снижение активности заболевания, достижение и поддержание ремиссии, возможность ведения пациентов на средних и низких дозах ГК.

По теме диссертации автором опубликованы следующие работы:

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, указанных в перечне ВАК при Минобрнауки России

1. Двойная терапия генно-инженерными биологическими препаратами у пациентов с системной красной волчанкой / *А. А. Меснянкина, С. К. Соловьев, Е. Н. Александрова, А. П. Алексанкин, Е. А. Асеева, Е. Л. Насонов* // Научно-практическая ревматология. — 2016. — Т. 54. — № 3. — С. 281–288.

2. Динамика субпопуляции В-лимфоцитов у больных системной красной волчанкой на фоне терапии генно-инженерными биологическими препаратами / *А. А. Меснянкина, С. К. Соловьев, Е. Н. Александрова, А. П. Алексанкин, Е. В. Супоницкая, А. В. Елонаков, Е. А. Асеева, Е. Л. Насонов* // Научно-практическая ревматология. — 2017. — Т. 55. — № 3. — С. 252–260.

3. Клеточные и молекулярные биомаркеры и потенциальные терапевтические мишени при системной красной волчанке / *А. А. Меснянкина* // Научно-практическая ревматология. — 2016. — Т. 54. — № 2. — С. 206–218.

4. Результаты наблюдательного проспективного исследования эффективности и безопасности белимумаба (Бенлисты®) при системной красной волчанке в реальной клинической практике / *А. Е. Асеева, С. К. Соловьев, А. А. Меснянкина, Т. М. Решетняк, Н. Е. Лопатина, С. И. Глухова, Е. Л. Насонов* // Научно-практическая ревматология. — 2016. — Т. 54. — № 1. — С. 31–37.

5. Эффективность генно-инженерной биологической терапии и особенности гуморального иммунитета у больных системной красной волчанкой / *А. А. Меснянкина, С. К. Соловьев, Е. А. Асеева, Е. Л. Насонов* // Научно-практическая ревматология. — 2018. — Т. 56. — № 3. — С. 302–309.

Другие публикации

6. Взаимосвязь между повышенным уровнем субпопуляций двойных негативных В-лимфоцитов и активностью системной красной волчанки / *Е. В. Супоницкая, А. П. Алексанкин, А. А. Меснянкина, Т. А. Панафидина, С. К. Соловьев, Е. Н. Александрова, Е. Л. Насонов* // Вопросы организации и информатизации здравоохранения. — Прил. Материалы III Евраз. конгресса ревматологов. — 2016. — С. 344–345.

7. Влияние генно-инженерной биологической терапии на субпопуляции В-лимфоцитов больных системной красной волчанкой / А. А. Меснянкина, Е. Н. Александрова, С. К. Соловьев, А. П. Алексанкин, Е. А. Асеева, Е. Л. Насонов // Медицинский алфавит. — 2017. — № 26. — С. 43-44.

8. A rituximab and belimumab combination therapy in SLE patients / A. A. Mesnyankina, S. K. Soloviev, E. N. Aleksandrova, A. P. Aleksankin, A. A. Novikov, E. A. Aseeva, E. L. Nasonov. — *Annals of the Rheumatic Diseases*. — 2018. — Vol. 77. — Suppl. — P. A693.

9. B-cell subpopulation dynamics in SLE patients following rituximab therapy / A. Mesnyankina, E. Aleksandrova, S. Soloviev, E. Suponitskaya, A. Aleksankin, A. Novikov, E. Aseeva, E. Nasonov // *Annals of the Rheumatic Diseases*. — 2017. — Vol. 76. — Suppl. 2. — P. 861.

10. Dynamics of B lymphocyte subsets in SLE patients treated with rituximab / A. Mesnyankina, E. Aleksandrova, S. Soloviev, A. Aleksankin, S. Glukhova, A. Novikov, E. Suponitskaya, E. Aseeva, E. Nasonov // *Annals of the Rheumatic Diseases*. — 2016. — Vol. 75. — Suppl. 2. — P. 289.

МЕСНЯНКИНА

Анна Александровна

ДИНАМИКА СУБПОПУЛЯЦИЙ В-ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ
С СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ НА ФОНЕ ТЕРАПИИ
ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Подписано в печать _____ . _____ .2018.

Формат 60 x 90 1/16.

Усл. печ. л. 1,5. Тираж 100 экз.