



# Проблемы иммунопатологии и диагностики иммуновоспалительных ревматических заболеваний

*Имуновоспалительные ревматические заболевания (ИВРЗ) – большая группа патологических состояний, в основе которых лежит нарушение иммунологической толерантности к собственным тканям, что ведет к воспалению и необратимым органным повреждениям. На тематическом заседании, состоявшемся в рамках II Всероссийского конгресса с международным участием «Аутоиммунитет и аутовоспаление» 25 июня 2022 г., обсуждались вопросы клинической информативности широкого спектра иммунологических показателей у пациентов с ИВРЗ, роль аутоантител, острофазовых показателей, маркеров костно-хрящевого метаболизма, показателей цитокинового профиля, маркеров клеточного и гуморального иммунитета в оценке активности заболевания, прогнозировании эффективности терапии базисными и генно-инженерными биологическими препаратами.*

Работу заседания открыл Андрей Анатольевич БАРАНОВ, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой поликлинической терапии, клинической лабораторной диагностики и медицинской биохимии Ярославского государственного медицинского университета, выступивший с докладом «Что отражает исследование цитокинов при ревматоидном артрите – аутоиммунные или аутовоспалительные механизмы?».

Первые работы, в которых исследовались сывороточные уровни эритропоэтина при ревматоидном артрите (РА) и аутогенные и вирус-индуцированные интерфероны (ИФН) в линиях лимфобластных клеток, были опубликованы в 1969 г. Уже в них указывалось на то, что у больных РА имеет место сочетание аутовоспаления и аутоиммунитета. В 80–90-х гг. прошлого столетия вышла в свет целая серия работ, посвященных иммунопатогенезу РА. В частности, в них были подтверждены активация периферических Т-клеток, изменение различных интерлейкинов (ИЛ) у больных с недавним активным РА, а также роль цитокинов в развитии воспалительного синовита. Если проанализировать историю публикаций по отдельным интерлейкинам при РА, то она начинается в 1981 г. с представления результатов исследования ИЛ-1. Затем были изучены ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-7 и ИЛ-8, а также

ИЛ-10, ИЛ-17, ИЛ-18, ИЛ-21, ИЛ-22 и т.д. В настоящее время проведены исследования ИЛ-31 и ИЛ-33, исследуются ИЛ-36, ИЛ-37 и ИЛ-38.

Следует отметить, что большинство опубликованных исследований были посвящены изучению взаимосвязи между аутовоспалением и аутоиммунитетом при РА, особенностям патогенеза и клинических проявлений, оценке эффективности терапии.

В 2009 г. впервые было показано, что ревматоидный артрит является комплексом полигенных аутоиммунных заболеваний и имеет две клинические субгруппы, характеризующиеся присутствием или отсутствием ревматоидного фактора и антител к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП).

Позже было введено понятие континуума иммуновоспалительного заболевания. Было доказано участие врожденного иммунитета в развитии классического РА с АЦЦП, который в последующем сопровождается активацией приобретенного иммунитета. Свою лепту вносит аутовоспаление, имеющее решающее значение в избыточной продукции цитокинов.

В целом иммунопатологические нарушения при РА включают снижение функциональной активности Т-регуляторных клеток, выработку аутоантител, сенсibilизированных Т-лимфоцитов, повышение уровней острофазовых белков, цитокинов,

хемокинов, что отмечается уже на доклинической стадии и существенно нарастает после клинической манифестации заболевания.

По словам докладчика, существуют две важные задачи для изучения и валидации биомаркеров – это репрезентативная оценка риска развития РА у больного артралгиями и оценка риска прогрессирования эрозивного процесса при раннем РА.

Исследование профиля цитокинов имеет принципиальное значение для персонализированного подхода к терапии с учетом выделения моногенных и полигенных аутовоспалительных и аутоиммунных заболеваний, воздействия на конкретные точки приложения интерлейкинов.

Молекулярным и клеточным биомаркерам при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях было посвящено выступление Анастасии Сергеевны АВДЕЕВОЙ, д.м.н., заведующей лабораторией иммунологии и молекулярной биологии ревматических заболеваний Научно-исследовательского института ревматологии им. В.А. Насоновой (НИИР). В настоящее время для диагностики иммуновоспалительных ревматических заболеваний (ИВРЗ), оценки их активности и прогноза анализируется широкий спектр лабораторных показателей, таких как аутоантитела, маркеры воспаления, цитокины, субпопуляции лимфоцитов, иммуногло-



## II Всероссийский конгресс с международным участием «Аутоиммунитет и аутовоспаление»

булины (Ig) и иммунные комплексы, компоненты комплемента, генетические маркеры и маркеры костного метаболизма.

Аутоантитела являются диагностическим критерием ряда иммуновоспалительных ревматических заболеваний. Они помогают охарактеризовать клинико-лабораторный субтип ИВРЗ, оценить активность патологического процесса и прогноз заболевания, имеют предиктивное значение при ИВРЗ. Следует помнить, что при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях тестирование аутоантител в первую очередь проводится с целью подтвердить диагноз при недостаточном числе клинических проявлений. Обнаружение аутоантител в отсутствие клинических признаков не является достаточным для постановки диагноза ИВРЗ.

Отмечено нарастание частоты случаев выявления аутоантител у лиц пожилого и старческого возраста при приеме препаратов, вирусных и бактериальных инфекциях, злокачественных новообразованиях.

Согласно современным данным, выявление аутоантител служит дополнительным медиатором воспаления и деструкции костной ткани. Докладчик привела собственные данные о роли оценки аутоантител при ревматоидном артрите. Была выявлена связь между содержанием IgM и IgA ревматоидного фактора, а также антител к модифицированному цитруллинированному виментину (АМЦВ) с индексом активности и уровнем острофазовых показателей. Кроме того, было показано, что у высокопозитивных по АМЦВ пациентов выраженность деструктивных изменений в суставах и уровень матриксной металлопротеиназы 3 (ММП-3) были выше, чем у негативных или низкопозитивных по АМЦВ больных.

А.С. Авдеева также привела несколько примеров, продемонстрировавших, что оценка уровня аутоантител помогает прогнозировать эффективность терапии биологическими и генно-инженерными биологическими препаратами (ГИБП).

Последнее время широко обсуждается проблема серонегативного рев-

матоидного артрита, в связи с этим особый интерес представляют три биомаркера: антитела к карбамилированным белкам, антитела к пептидиларгининдеимидазе 4 и белок 14-3-3 $\eta$ . В перспективе они могут быть внедрены в клиническую практику для диагностики РА у АЦЦЦ-негативных пациентов.

При диагностике ИВРЗ необходимо также определять антинуклеарные антитела (АНА). Это гетерогенная группа аутоантител, реагирующих с различными компонентами ядра и цитоплазмы. В настоящее время описано около 200 разновидностей АНА.

Золотым стандартом и первичным скрининговым методом определения АНА в сыворотке крови является тестирование антинуклеарных факторов (АНФ) с помощью непрямой реакции иммунофлуоресценции. При положительных результатах рекомендуется проводить подтверждающие тесты на специфические АНА к отдельным ядерным антигенам. Для этого используют методы иммуноферментного анализа, иммуноблота, мультиплексного иммунного анализа и др.

Установлено, что от 6 до 20% здоровых лиц могут быть позитивными по АНФ, что может быть обусловлено наличием антител к ядерному белку массой 70 кДа, известному как DFS70. Выявление моноспецифических антител к DFS70 может рассматриваться в качестве потенциального критерия для исключения ИВРЗ.

Следующая большая группа лабораторных показателей – маркеры костно-хрящевого метаболизма. Более детально докладчик остановилась на матриксных металлопротеиназах. Матриксные металлопротеиназы – группа более чем из 20 протеолитических ферментов, которые ответственны за расщепление белковых компонентов экстрацеллюлярного матрикса. Среди матриксных металлопротеиназ особого внимания заслуживает ММП-3, которая рассматривается в качестве одного из ключевых медиаторов суставной деструкции при РА. Концентрация ММП-3 у больных РА достоверно снижается на фоне терапии как ба-

зисными противовоспалительными препаратами (БПВП), например метотрексатом, так и ГИБП. Поэтому оценка уровня ММП-3 может быть полезна для прогнозирования эффективности терапии.

На современном этапе в патогенезе ИВРЗ обсуждается роль Т-регуляторных клеток, которые поддерживают периферическую толерантность к собственным антигенам. В норме Т-регуляторные клетки негативно влияют на аутореактивные клоны Т-лимфоцитов, поэтому органы-мишени не поражаются. При аутоиммунной патологии в результате ряда причин (снижение уровня функциональной активности Т-регуляторных клеток, повышение конверсии в эффекторные клетки, развитие резистентности эффекторных клеток к супрессорному влиянию Т-регуляторных клеток) их функции реализуются не в полном объеме. Так, при раннем и развернутом РА имеет место снижение уровня и нарушение функциональной активности FOXP3 регуляторных Т-лимфоцитов. Был также проведен анализ уровня Т-регуляторных клеток у пациентов в зависимости от серопозитивности по IgM ревматоидному фактору, который показал, что у серонегативных пациентов достоверно более высокие уровни Т-регуляторных клеток и их функциональная активность.

Далее А.С. Авдеева кратко рассмотрела роль цитокинов в патогенезе ИВРЗ. В настоящее время цитокины подразделяют на ряд функциональных классов. В частности, выделяют провоспалительные и противовоспалительные, Т-хелперы 1, Т-хелперы 2, Т-хелперы 17, Т-регуляторные цитокины, колониестимулирующий фактор, стромальный и ангиогенный факторы, хемокины.

При РА регистрируется повышение уровня интерфероном  $\gamma$  индуцируемого белка 10 (IP-10), что коррелирует с активностью заболевания и уровнем острофазовых показателей. Он имеет важное значение в мониторинге активности заболевания и развитии деструктивных изменений в суставах. Плейотропный цитокин ИЛ-18, относящийся к семейству ИЛ-1, может



рассматриваться в качестве маркера активности процесса при ювенильном идиопатическом артрите и болезни Стилла. Кроме того, ИЛ-18 принимает участие в патогенезе системной красной волчанки (СКВ), коррелируя с тяжестью заболевания и риском развития волчаночного нефрита.

Согласно результатам собственных исследований, терапия БПВП и ГИБП у пациентов с ранним и развернутым РА приводит к снижению уровня провоспалительных (ИЛ-6, ИЛ-17, фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ )) и противовоспалительных (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-9, ИЛ-13) цитокинов, хемокинов (IP-10) и факторов роста.

Интерфероны оказывают плеiotропное воздействие на иммунную систему и осуществляют связь между врожденными и приобретенными иммунными реакциями. В последнее время обсуждается роль нарушения продукции ИФН-1 в патогенезе СКВ и других ИВРЗ.

Согласно собственным данным спикера, уровень экспрессии интерферон-стимулированных генов (интерфероновый автограф) был достоверно выше у больных РА по сравнению со здоровыми донорами. У 15% больных интерфероновый автограф отсутствовал. Важно, что именно у таких пациентов отмечалось более выраженное снижение активности заболевания через 24 недели от начала анти-В-клеточной терапии.

Кальпротектин – серологический маркер для оценки активности заболевания, прогрессирования костной деструкции, сердечно-сосудистого риска и эффективности фармакотерапии при ревматоидном артрите. Роль кальпротектина важна и при мониторинге эффективности терапии различными ГИБП, а также при прогнозировании ее результатов.

Завершая выступление, А.С. Авдева констатировала, что в настоящее время выделен ряд потенциальных лабораторных биомаркеров, которые позволяют осуществлять персонализированный мониторинг и прогнозирование эффективности терапии ряда ИВРЗ, что создает реальные предпосылки для оптимизации и снижения стоимости лечения.

Об особенностях субпопуляций В-лимфоцитов у пациентов с ревматическими заболеваниями рассказал Андрей Павлович АЛЕКСАНКИН, к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунологии и молекулярной биологии НИИР. В настоящее время активно изучается роль В-клеток в патогенезе различных аутоиммунных ревматических заболеваний, что во многом связано с положительным опытом применения при широком спектре аутоиммунных заболеваний анти-В-клеточных ГИБП, вызывающих деплецию различных субпопуляций В-лимфоцитов.

Основная функция В-лимфоцитов заключается в экспрессии иммуноглобулинового рецептора для распознавания антигенов. Образование В-лимфоцитов начинается во время эмбрионального развития и продолжается в течение всей жизни организма. В эмбриональный период этот процесс локализуется в печени и костном мозге, у взрослых – только в костном мозге.

Далее спикер представил субпопуляции В-лимфоцитов. Первую строчку в списке занимают В-лимфоциты и В-клетки (маркер CD19+). Это функциональный тип лимфоцитов, играющих важную роль в обеспечении гуморального иммунитета. В-клетки памяти (маркеры CD19+CD27+) – активированные В-лимфоциты, вновь вошедшие в стадию малых лимфоцитов в результате кооперации с Т-клетками. Они являются долгоживущим клоном В-клеток, обеспечивают быстрый иммунный ответ, выработку большого количества иммуноглобулинов при повторном введении антигена. В-клетки памяти в свою очередь делятся на переключенные и непереключенные. Непереключенные В-клетки памяти (CD19+CD27+IgD+) служат для обеспечения перекрестного связывания родственных видов патогенов. Переключенные В-клетки памяти (CD19+CD27+IgD-) необходимы для борьбы с инфекцией при вторичном заражении конкретным видом возбудителя. Далее следуют наивные клетки – неактивированные В-лимфоциты, не контактировавшие с антигеном,

плазмобласты, являющиеся предшественниками плазматических клеток. Они способны к делению и перемещению с помощью крови в органы иммунной системы, где окончательно дифференцируются в плазматические клетки. Сами плазматические клетки (CD19+CD38+) являются последним этапом дифференцировки активированных антигеном В-клеток, несут мало мембранных антител и способны секретировать только растворимые антитела. Транзиторные клетки (CD19+CD38+, CD10+IgD+ и CD27-) подвергаются антиген-независимой положительной селекции, в ходе которой умеренные, тонические сигналы через BCR обеспечивают выживание клонов. Завершают список изученной субпопуляции дубль-негативные клетки (CD19+CD27- и IgD-), которые характеризуются ослабленной способностью дифференцироваться в плазматические клетки.

А.П. Алексанкин представил участникам заседания результаты исследования различных субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови у пациентов с ревматическими заболеваниями. В исследование были включены 45 лиц с достоверным диагнозом раннего РА и 64 пациента с достоверным диагнозом СКВ. Контрольную группу составили 20 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными пациентами. Полученные в ходе исследования данные позволили сформулировать следующие выводы: В-лимфоциты участвуют в патогенезе ИВРЗ не только в качестве эффекторных клеток, но и в качестве иммунорегуляторных клеток, при РА и СКВ наблюдается повышение относительного и абсолютного уровней плазматических клеток и двойных негативных В-лимфоцитов, что приводит к снижению уровня переключенных В-клеток памяти, содержание наивных В-лимфоцитов и непереключенных В-клеток памяти положительно коррелирует с активностью раннего РА, а уровень клеток памяти и плазматических клеток – с содержанием аутоантител, что подчеркивает существенный вклад нарушения В-клеточной толерантности в патогенез РА.



## II Всероссийский конгресс с международным участием «Аутоиммунитет и аутовоспаление»

Жанна Григорьевна ВЕРИЖНИКОВА, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и молекулярной биологии НИИР, сфокусировала свое выступление на роли моноспецифичных антител к DFS70 и разрывов ДНК при ревматических заболеваниях. Впервые паттерн DFS70 и аутоантитела были описаны в 1994 г. Первоначально анти-DFS70 были выявлены у пациентов с интерстициальным циститом. Однако позднее их обнаружили при широком спектре клинических состояний, включая хроническое воспаление, атопический дерматит, очаговую алопецию, аутоиммунный тиреозит, астму, синдром хронической усталости у детей, различные аутоиммунные и воспалительные заболевания, не относящиеся к ИВРЗ, заболевания глаз, рак простаты, а также у практически здоровых людей. Высокая распространенность аутоантител к DFS70 в здоровой популяции, отсутствие связи с конкретной группой заболеваний и общая отрицательная связь с ИВРЗ требовали подтверждения в виде свечения DFS70. Согласно результатам исследований, отмечена негативная ассоциация моноспецифических антител к DFS70 с СКВ и другими ИВРЗ, при которых данные аутоантитела встречаются менее чем у 1%.

Выявление антител к DFS70 у АНФ-ассоциированных пациентов без клинических и/или серологических маркеров, характерных для определенного заболевания из группы ИВРЗ, может рассматриваться как потенциальный маркер для исключения данного диагноза, особенно в раннем доклиническом периоде. Именно поэтому определение на раннем этапе как предикторов высокого риска развития определенного ИВРЗ, так и исключающих его маркеров представляется актуальной задачей для практикующего врача.

Специалистами лаборатории иммунологии и молекулярной биологии НИИР была оценена частота обнаружения антител к DFS70 у здоровых лиц, пациентов с СКВ и недифференцированными ИВРЗ. На основании полученных данных были сделаны следующие выводы: выявление моноспецифических антител к DFS70 может рассматриваться

в качестве перспективного маркера и потенциального критерия для исключения ИВРЗ, рутинное определение анти-DFS70 может уменьшить количество избыточных последующих тестов у бессимптомных пациентов, однако следует учитывать только моноспецифические анти-DFS70, а не простое их присутствие.

Далее Ж.Г. Верижникова рассмотрела особенности двунитевых разрывов ДНК, которые могут наблюдаться после терапии ионизирующим излучением или мутагенными веществами, а также вследствие излишней травматизации у спортсменов.

Патогенез и возможность устранения двунитевых разрывов ДНК является важной предпосылкой для предотвращения патологических изменений и оптимального применения ионизирующего излучения в медицинской практике. Запатентованный метод диагностики позволяет проводить автоматическое количественное определение двунитевых разрывов ДНК путем обнаружения так называемых флуоресцентных очагов с помощью цифровой иммунофлуоресценции, например в лимфоцитах человека (моноклеарных клетках) из периферической крови. Специальные антитела с флуоресцентной меткой позволяют обнаружить отдельные двунитевые разрывы ДНК на белках  $\gamma$ -H2AX и 53BP1.

Специалистами лаборатории иммунологии и молекулярной биологии НИИР было проведено исследование двунитевых разрывов ДНК у пациентов с ИВРЗ путем оценки фосфорилирования  $\gamma$ H2AX и 53BP1 в месте повреждения. В исследование были включены 25 пациентов с РА, СКВ и болезнью Шегрена, а также 14 здоровых доноров. Результаты исследования позволили сделать следующие выводы: исследование двунитевых разрывов ДНК может быть полезно для дополнительной оценки активности заболевания у пациентов с РА, необходимо дальнейшее исследование двунитевых разрывов ДНК у пациентов с различными ИВРЗ для оценки не только активности заболевания, но и эффективности терапии.

Работа тематического заседания завершилась выступлением Валерии

Владимировны РЫБАКОВОЙ, младшего научного сотрудника лаборатории иммунологии и молекулярной биологии РА НИИР, которое было посвящено роли оценки цитокинового профиля в прогнозировании отдельных результатов терапии раннего РА. Как известно, современная концепция лечения РА предусматривает раннее начало терапии метотрексатом с быстрой эскалацией дозы, при ее недостаточной эффективности – назначение первого ГИБП, при недостаточном ответе на терапию – назначение второго ГИБП. Это позволяет достичь ремиссии заболевания.

В настоящее время для определения активности воспаления при РА используют клинические индексы (DAS 28, SDAI, CDAI, RAPID 3). Однако они не всегда дают объективную оценку состояния больного, поэтому также следует анализировать биомаркеры сыворотки и рассчитывать мультибиомаркерный индекс активности РА.

Согласно данным литературы, показатели цитокинового профиля особенно актуальны при выборе эффективного терапевтического подхода. Наиболее информативными считаются ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-17, цитокины ИЛ-10, ИЛ-4, ИЛ-13, хемокин IP-10.

В.В. Рыбакова представила результаты исследования связи между динамикой уровня цитокинов в ранний период (первые 12 и 24 недели) фармакотерапии РА и отдаленными его исходами. В анализ были включены 93 пациента с ранним РА. В течение первого года наблюдения все больные получали терапию согласно стратегии «лечение до достижения цели». Далее пациенты наблюдались в условиях реальной клинической практики. Повторно клиническое обследование больных проводилось через шесть лет. Концентрацию 27 цитокинов измеряли с помощью мультиплексной технологии xMAP.

На основании полученных результатов был сделан вывод, что оценка уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-17) и иммунорегуляторного цитокина ИЛ-9 позволяет более полно определить активность заболевания и выявить нуждающихся в интенсификации терапии. 🌟