

УДК 577.151.45

Профилирование В-лимфоцитов пациентов с аутоиммунной пузырчаткой

В. А. Абрикосова¹, Ю. А. Мокрушина^{1,2}, Л. А. Овчинникова¹, Е. Н. Ларина¹, С. С. Терехов¹, М. Н. Баранова¹, Я. А. Ломакин¹, Д. С. Балабашин¹, Т. В. Бобик¹, Е. Н. Калиберда¹, В. Д. Кнорре¹, М. В. Шпилева³, Т. К. Алиев^{1,2}, Д. Г. Дерябин³, А. Э. Карамова³, А. А. Кубанов³, М. П. Кирпичников^{1,4}, И. В. Смирнов^{1,5*}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

³Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии Минздрава России, Москва, 107076 Россия

⁴Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

⁵Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии Минздрава России, Москва, 117292 Россия

*E-mail: smirnov.mx.ibch@gmail.com

Поступила в редакцию 20.12.2022

Принята к печати 10.03.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11890

РЕФЕРАТ Аутоиммунная пузырчатка – тяжелое социально значимое заболевание, обусловленное появлением антител к десмоглеину 3-го типа. Пузырчатка встречается преимущественно у пациентов старше 18 лет, а летальность при этом заболевании может достигать 50% в зависимости от возраста пациента и ряда других факторов. На сегодняшний день отсутствует высокоселективная или персонализированная терапия пузырчатки. Одним из известных средств терапии пузырчатки является ритуксимаб – анти-CD20-антитело, которое приводит к истощению В-лимфоцитов в периферической крови. Для селективной элиминации В-лимфоцитов у пациентов с пузырчаткой целесообразно использовать специфические иммунолиганды, выбор которых основан на определении уровня аутоантител к различным фрагментам десмоглеина. В представленной работе установлено, что доля аутореактивных В-клеток у пациентов с диагностированной пузырчаткой составляет 0.09–0.16%, обнаружена положительная корреляция между уровнем антител к различным фрагментам десмоглеина и количеством аутореактивных В-клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА десмоглеин, пузырчатка, таргетная терапия, иммунолиганды.

ВВЕДЕНИЕ

Вульгарная пузырчатка – наиболее распространенная форма буллезных дерматозов, при которой на видимо неизменной коже и/или слизистых оболочках возникают пузыри с серозным содержимым и тонкой вялой покрывкой, которые после вскрытия образуют длительно незаживающие болезненные эрозии.

По данным официального государственного статистического наблюдения ежегодно в Российской Федерации выявляют 1.9–2.4 новых случая пузырчатки на 100000 взрослого населения (18 лет и старше), а распространенность этого заболева-

ния варьирует от 4.8 до 6.3 случая на 100000 населения [1].

Ключевую патогенетическую роль в развитии пузырчатки играют аутоантитела класса IgG, направленные против основного структурного белка десмосом многослойного плоского эпителия – десмоглеина 3 типа (Dsg3) [2]. В результате взаимодействия аутоантител с внеклеточными доменами десмоглеина происходит разрушение десмосом с последующим развитием акантолиза (дегенеративного изменения шиповатого слоя эпидермиса, проявляющегося разрушением межклеточных мостиков и приводящего к образованию интраэпидермальных пузырей) [3].

Основной метод терапии пузырчатки в настоящее время состоит в длительном применении системных кортикостероидов в виде монотерапии или в комбинации с другими иммуносупрессивными препаратами, что вызывает ряд серьезных нежелательных эффектов и неэффективно при резистентных к системной терапии глюкокортикостероидами (ГКС) формах заболевания [4].

С целью снижения курсовых доз ГКС разрабатываются препараты моноклональных антител, позволяющие проводить таргетную терапию пузырчатки и других аутоиммунных заболеваний, воздействуя на клетки-продуценты аутоантител (В-лимфоциты). Первый и пока единственный подобный препарат, рекомендованный к применению в клинической практике при пузырчатке – ритуксимаб, действующим началом которого являются химерные моноклональные антитела к CD20-антигену В-лимфоцитов [5]. Однако серьезную проблему при использовании ритуксимаба представляет системное подавление как патологических (аутореактивных), так и нормальных В-лимфоцитов, что ведет к формированию системного иммунодефицита, связанного с недостатком циркулирующих иммуноглобулинов. Описан ряд случаев использования специфических иммуноактивных агентов для направленной элиминации патологических лимфоцитов [6, 7]. Специфичность терапии определяется эффективностью взаимодействия иммуноактивного препарата с целевой популяцией аутореактивных В-клеток. Существуют данные о различиях в уровне специфических антител к разным доменам десмоглеина у пациентов с диагностированной пузырчаткой [8, 9]. Этот факт может быть использован для увеличения специфичности иммунотерапии при адресной доставке иммуноактивных агентов, имеющих в своем составе заданный вариант фрагмента десмоглеина. В качестве одного из вариантов терапии предложен метод иммуносорбции, основанный на элиминации из крови больных пузырчаткой аутореактивных антител с помощью высоко-селективных иммуносорбентов [10]. Таким образом, возникает необходимость в определении корреляции уровня антител и количества аутореактивных В-клеток к фрагментам десмоглеина и определении профиля специфичности аутореактивных В-клеток у пациентов с пузырчаткой.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Рекомбинантный полноразмерный внеклеточный фрагмент Dsg3 (EC1-EC5) человека и одиночные домены EC1, EC2, EC3-EC4, слитые с Fc-фрагментом IgG1 человека, были получены в системе экспрессии клеток линии CHO с использованием генетических

конструкций на основе вектора pcDNA3.4 (Thermo Scientific, США). Рекомбинантные белки очищали из культуральной среды на колонке MabSelect SuRe (GE Healthcare, США). Чистоту белков подтверждали методами эксклюзионной хроматографии и электрофореза.

Суммарный уровень антител к Dsg3 в сыворотках пациентов был охарактеризован с использованием тест-системы «Набор реагентов для определения антител IgG к десмоглеину 3» (оригинальное название – Anti-Desmoglein 3 ELISA IgG; Euroimmun; Германия) и выражен в относительных единицах активности (RU/мл) по значениям оптического поглощения референсной сыворотки из комплектации набора. Полученные рекомбинантные белки использовали для оценки иммунореактивности сывороток больных обычной пузырчаткой двухэтапным конкурентным иммуноферментным анализом (ИФА) [11]. Dsg3, а также его фрагменты EC1, EC2, EC3-EC4, слитые с Fc-фрагментом IgG1 человека, в концентрации 1 мкг/мл, а также бычий сывороточный альбумин (БСА) в той же концентрации для контроля неспецифического связывания сорбировали в лунках полистиролового планшета (Greiner Bio-One GmbH, Германия) в течение ночи при +4°C. После удаления сорбционных объемов лунки отмывали 1 раз фосфатно-солевым буфером (PBS) и блокировали 0.1% раствором казеина. После блокировки лунки однократно отмывали фосфатно-солевым буфером, содержащим 0.005% Tween-20 (PBST). Исследуемые сыворотки крови разводили в соотношении 1 : 100 в PBS, содержащем 1% БСА и инкубировали в течение 18 ч в термостатируемом шейкере при +24°C и скорости 200 об/мин. После завершения инкубации образцы исследуемых сывороток в полном объеме переносили в лунки планшета из комплекта референсной тест-системы для повторной оценки непрореагировавших антител в отношении полноразмерного Dsg3. В дополнительные лунки вносили калибровочные образцы с активностями 20 и 200 RU/мл и инкубировали в том же режиме как описано выше (18 ч, +24°C, 200 об/мин). После инкубации планшет промывали 3 раза раствором PBST и вносили антитела к каппа и лямбда легким цепям антител человека, конъюгированных с пероксидазой хрена. В планшет из комплекта референсной тест-системы вносили входящий в набор конъюгат кроличьих антител к полноразмерному IgG человека. После 60 мин инкубации (+24°C, 200 об/мин) лунки планшета промывали 3 раза, добавляли субстратный раствор (тетраметилбензидин, ТМБ) и инкубировали в темноте в течение 30 мин. Реакцию останавливали, добавляя 4 н раствор фосфорной кислоты, оптическое поглощение (ОП) в лунках

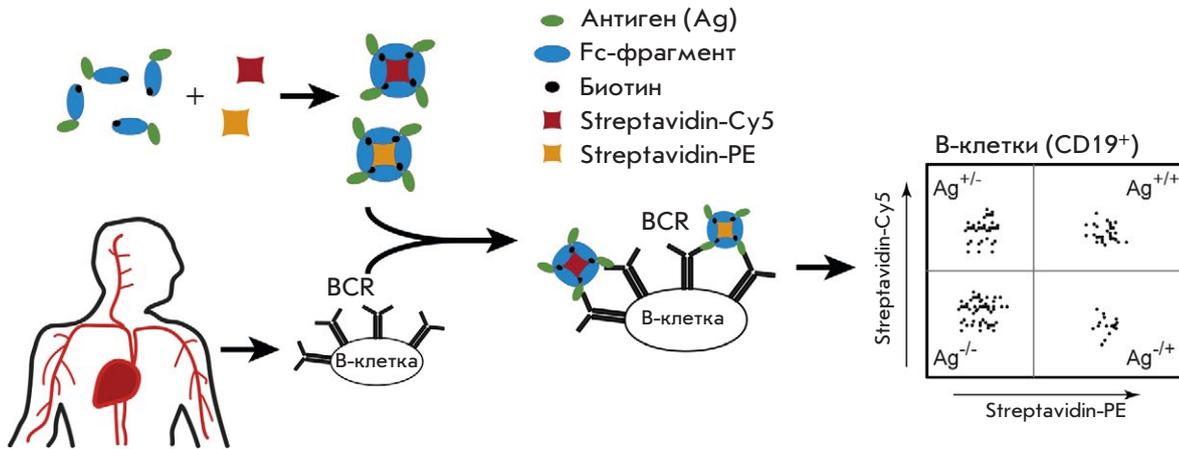


Рис. 1. Схема анализа профиля антигенспецифичности В-клеток с использованием метода «двойной положительной» окраски

регистрировали при длине волны 450 нм (OP_{450}) на планшетном спектрофотометре. На основе ОП калибровочных образцов с активностями 20 и 200 RU/мл референсного планшета строили калибровочную кривую, позволяющую определить активность каждой исследуемой сыворотки в относительных единицах активности (RU/мл). Полученные результаты использовали для расчета доли (%) аутореактивных антител, специфически взаимодействующих с отдельными эпитопами молекулы Dsg3 и выявляемых при постановке конкурентного ИФА:

$$[1 - (A_{Pos} - A_R) / (A_{Pos} - A_{Neg})] \times 100,$$

где A_R – активность сыворотки после преинкубации в планшете с иммобилизированным белком-эпитопом; A_{Pos} – активность сыворотки после преинкубации с Dsg3 в референсной тест-системе; A_{Neg} – активность после преинкубации с БСА.

В данном исследовании использовали образцы венозной крови, полученные от трех пациентов с клинически и лабораторно верифицированным диагнозом "L10.0 Пузырчатка обыкновенная". Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследованиях, работа проведена с соблюдением действующих правовых и этических норм.

Количество аутореактивных В-клеток оценивали методом проточной цитометрии с использованием биотинилированных рекомбинантных белков – субдоменов EC1, EC2, EC3 и EC4, слитых с константным доменом иммуноглобулина человека.

Мононуклеарные клетки периферической крови больных и здоровых доноров выделяли в градиенте плотности фиколла (Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare)). Клетки отмывали, подсчитывали, ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере с добавлением агента, блокирующего Fc-рецепторы

(Human Seroblock, Bio-Rad, США), 0.5% БСА и 2 mM EDTA (2 миллиона клеток в 100 мкл раствора) и инкубировали в течение 30 мин во льду. Для формирования тетрамерного комплекса очищенные и химически биотинилированные с использованием Sulfo-NHS-LC-Biotin реагента (Thermo Fisher Scientific, США) препараты антигенов EC1-Fc, EC2-Fc, EC3-4-Fc и Dsg3-Fc смешивали со Streptavidin-PE (Invitrogen, США) и Streptavidin-Cy5 (Abcam, Великобритания) в молярном соотношении 4 : 1 и инкубировали в течение 30 мин при +4°C в темноте. Тетрамерный иммунокомплекс со Streptavidin-PE добавляли к окрашиваемым клеткам до концентрации 4 нМ, тетрамерный иммунокомплекс со Streptavidin-Cy5 – до концентрации 10 нМ, инкубировали в течение 15 мин при +4°C и постоянном помешивании. Далее к анализируемым пробам добавляли флуоресцентные антитела анти-CD45-APC-Cy7 (в разведении 1 : 300 (Sony, США)), антитела анти-CD19-PE-Cy7 (в разведении 1 : 1000 (Biolegend, США)) и флуоресцентный маркер мертвых клеток SYTOX™Green (в разведении 1 : 1000 (Biolegend, США)). Инкубировали дополнительно в течение 30 мин при +4°C в темноте. Далее образцы отмывали 0.5 мл PBS с 2 mM EDTA. Интенсивность флуоресценции оценивали с помощью проточного флуориметра ACEA Novocyte (ACEA Biosciences, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Количество аутореактивных к десмоглеину 3 В-клеток определяли в венозной крови пациентов с диагностированной пузырчаткой (П1–П3), в качестве контрольного образца использовали кровь здорового донора (ЗД). Из всех образцов выделяли мононуклеарные клетки для последующего окрашивания и цитометрического анализа (рис. 1).

Таблица 1. Результаты иммуноферментного анализа сывороток пациентов с пузырчаткой с использованием полноразмерного десмоглеина и его фрагментов в качестве антигена, выраженные в RU/мл

Антиген	П1	П2	П3
Dsg3	700	20	1500
EC1	588	-	300
EC2	203	-	450
EC3-4	98	-	750

Отдельно отбирали сыворотку крови для определения уровня антител к Dsg3 и его фрагментам (табл. 1).

Как видно из представленных в табл. 1 данных, пациенты имели различный профиль антителного ответа на полноразмерный белок и домены десмоглеина 3. При этом у пациента П2 был констатирован только слабый иммунный ответ на полноразмерный Dsg3, равный диагностически значимому пороговому значению 20 RU/мл, а пациенты П1 и П3 характеризовались выраженным иммунным ответом, по-разному распространяющимся на дистальные (EC1, EC2) или проксимальные (EC3-4) внеклеточные домены этого белка.

Для поиска корреляции между уровнями антител к различным вариантам десмоглеина и количеством антигенспецифических аутореактивных В-клеток проведено окрашивание фракции мононуклеаров иммуноактивными лигандами и специфическими антителами к поверхностным антигенам В-клеток – CD19. Ранее было показано, что количество антигенспецифических В-клеток находится в пределах 0.05–0.5% от всего пула В-лимфоцитов [12]. В ходе исследования применяли методику создания тетрамерной формы иммуолиганда с использованием молекулы стрептавидина, конъюгированного с флуоресцентным красителем (рис. 1). При этом одна молекула комплекса взаимодействует с несколькими молекулами В-клеточного рецептора, повышая avidность лиганда и, как следствие, увеличивая эффективность окрашивания. Другой ключевой особенностью было использование подхода «двойной положительной» окраски. В этом случае использовали два стрептавидин-антигенных комплекса, содержащих различные флуоресцентные метки: фикоэритрин (PE) и цианиновый краситель Cy5. Такой подход позволил существенно снизить степень неспецифического окрашивания В-клеток. Представленный в данной работе принцип окрашивания может применяться для эффективного вы-

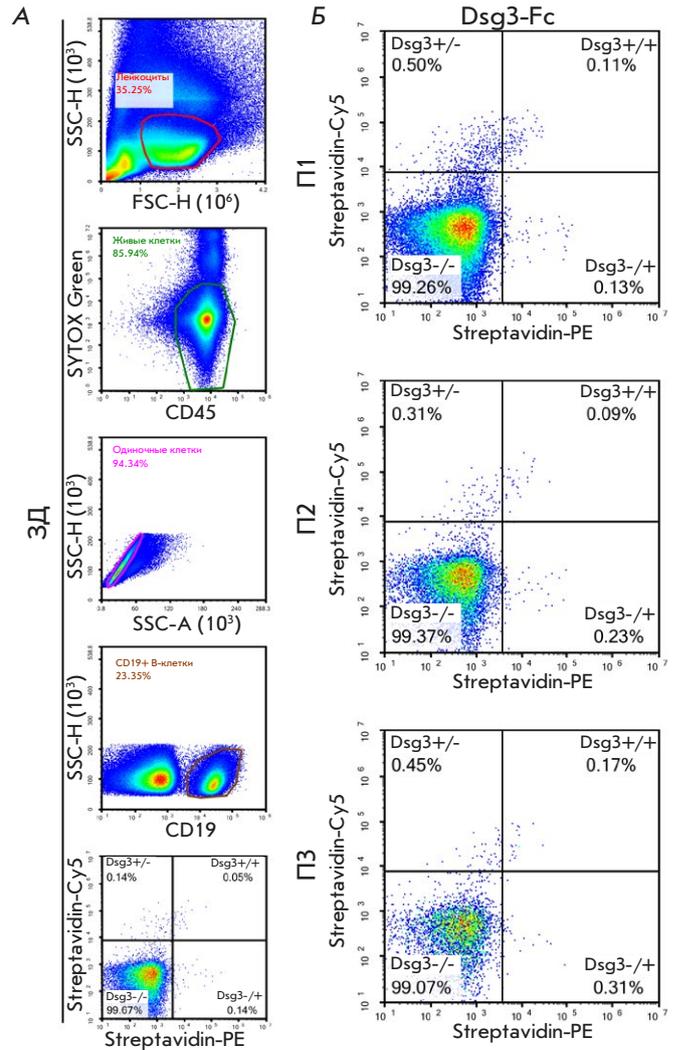
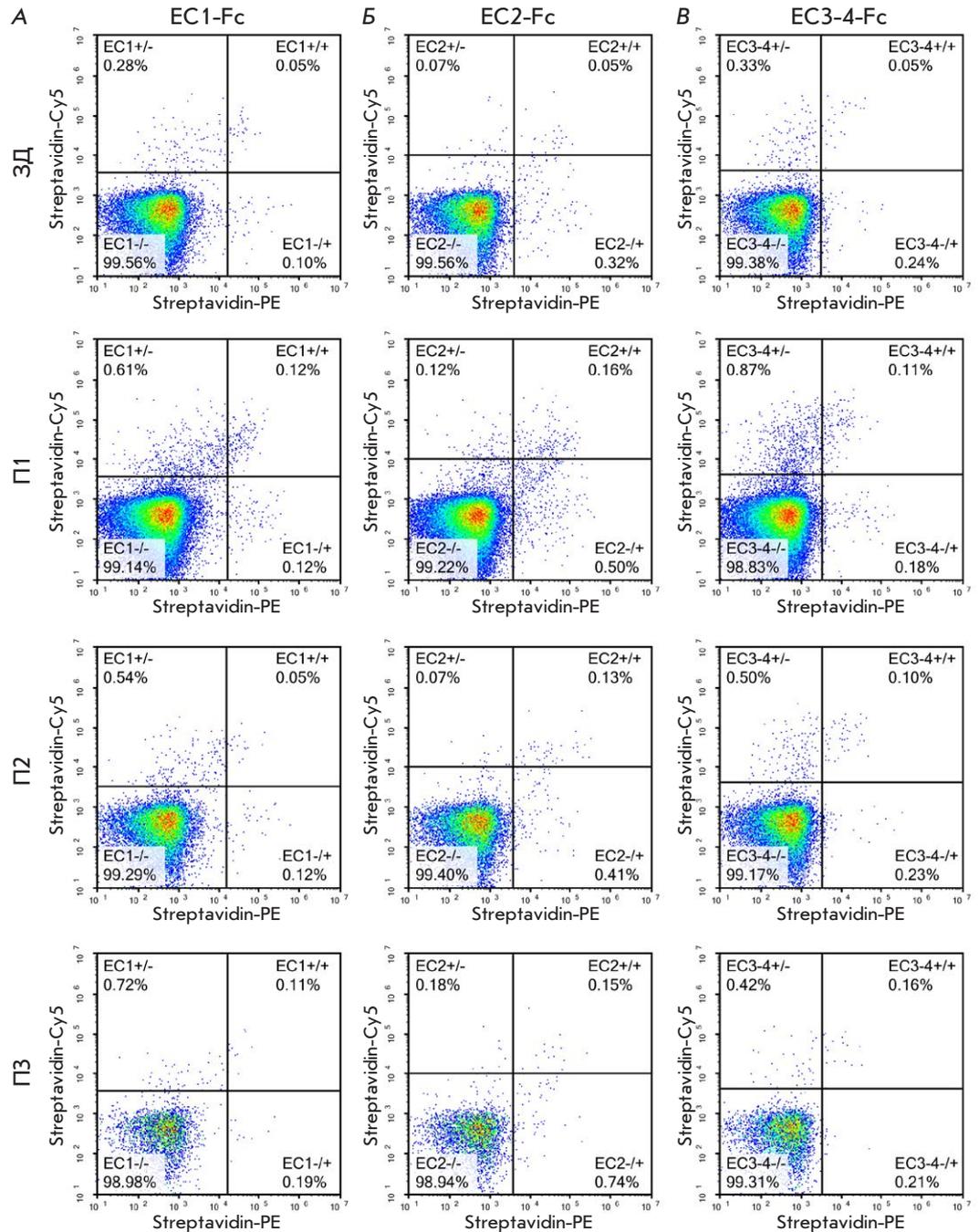


Рис. 2. Выбор параметров (А) и цитометрический анализ В-клеток, специфичных к полноразмерному Dsg3 (Б). Параметры граничных условий для графика в координатах Streptavidin-Cy5 и Streptavidin-PE выбирали таким образом, чтобы количество положительных событий в сегменте с «двойным положительным» сигналом (+/+) составляло 0.05% в контрольном образце (здоровый донор, ЗД)

явления В-клеток к любым идентифицированным антигенам, в том числе при поиске антител к возбудителям вирусных инфекций. Финальная схема окрашивания/анализа каждого образца включала: (i) выделение области по размеру клеток; (ii) выделение области, соответствующей живым лейкоцитам, после совместного окрашивания красителем SYTOX™Green и анти-CD45-APC-Cy7; (iii) выделение области одиночных клеток; (iv) выделение области CD19⁺ В-клеток; (v) оценку двойных положительных антигенспецифических В-клеток (рис. 2).

Рис. 3. Цитометрический анализ В-клеток, специфичных к субдомам десмоглеина 3 EC1 (А), EC2 (Б) и EC3-4 (В). Параметры граничных условий для графика в координатах Streptavidin-Cy5 и Streptavidin-PE выбирали таким образом, чтобы количество положительных событий в сегменте с «двойным положительным» сигналом (+/+) составляло 0.05% в контрольном образце (здоровый донор, ЗД)



Согласно результатам, представленным на рис. 2Б, наибольшая доля В-клеток, специфичных к полноразмерному десмоглеину, обнаружена у пациента П3, наименьшая – у пациента П2, что в целом соотносится с результатами ИФА (табл. 1). Доля В-клеток, специфичных к различным домам десмоглеина, у всех пациентов также различалась (рис. 3).

У пациента П1 выявлено наибольшее количество В-клеток, специфичных к домену EC2

(0.16%), при этом количество клеток к домам EC1 и EC3-4 ниже – 0.12 и 0.11% соответственно. У пациента П2 отсутствовали EC1-специфичные клетки (на уровне контроля), при этом доля клеток к домам EC2 и EC3-4 составила 0.13 и 0.10%. У пациента П3 доля В-клеток, специфичных ко всем домам, была сравнимой с долей у пациента П1, однако наибольшей была доля В-клеток, специфичных к домену EC2 (0.15 и 0.16%).

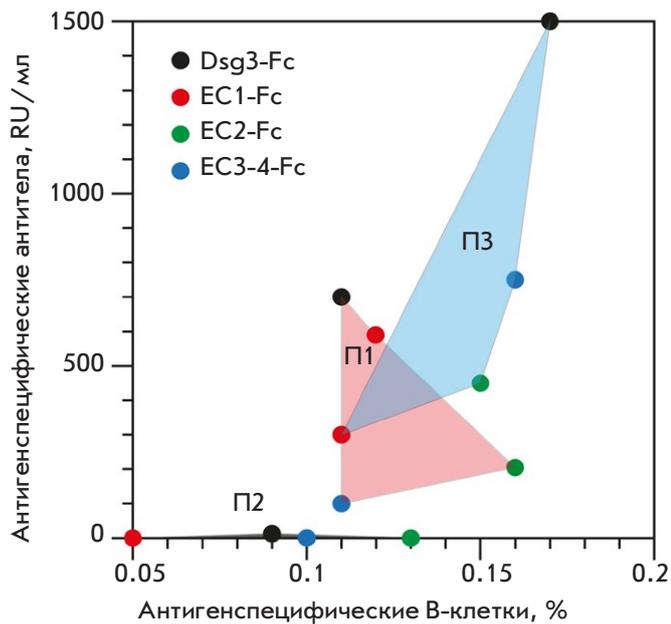


Рис. 4. Анализ профиля специфичности антител и В-клеток. Образцы, проанализированные на полном-размерный десмоглеин 3 и его домены, отмечены цветом. Линиями соединены значения, относящиеся к одному и тому же пациенту

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ профиля специфичности антител и В-клеток показал в целом положительную корреляцию между титром специфических антител

в крови и долей антигенспецифических В-клеток (рис. 4).

При этом доля аутореактивных В-клеток у пациентов с пузырчаткой составила 0.09–0.16%. Также обнаружен заметный уровень неспецифического окрашивания у здорового донора (0.05%), однако использование «двойного положительного» подхода к окрашиванию клеток позволило детерминировать профиль антигенспецифичности В-клеток у пациентов с пузырчаткой. Полученные результаты важны для разработки стратегии персонализированной терапии пузырчатки цитотоксическими иммунолигандами на основе рекомбинантных доменов десмоглеина, слитых с константным доменом иммуноглобулина человека. Вероятно, что пациент П2 будет нечувствителен к терапии EC1-Fc, в то же время можно ожидать элиминацию аутореактивных В-клеток при использовании EC2-Fc и EC3-4-Fc у пациентов П1 и П3 соответственно. Применение профилирования В-лимфоцитов у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, в частности обыкновенной пузырчаткой, открывает широкие перспективы в выборе стратегии персонализированной терапии. ●

Исследование выполнено в рамках Соглашения № 05.607.21.0325 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60719X0325). Результаты исследований по дифференциальному окрашиванию и анализу количества аутореактивных В-клеток к фрагментам десмоглеина 3 получены за счет средств гранта РФФИ (проект № 20-04-60468).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александрова Г.А., Кубанов А.А., Мелехина Л.Е., Богданова Е.В., Поликарпов А.В., Огрызко Е.В., Голубев Н.А., Пронина Т.В., Гладких Т.Е., Гринчева А.В. Ресурсы и деятельность медицинских организаций дерматовенерологического профиля. Заболеваемость инфекциями, передаваемыми половым путем, заразными кожными заболеваниями и болезнями кожи: статистические материалы. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015. 212 с.
- Satyam A., Khandpur S., Sharma V.K., Sharma A. // Immunol. Invest. 2009. V. 38. № 6. P. 498–509.
- Herrero-González J.E., Iranzo P., Benítez D., Lozano F., Herrero C., Mascaró J.M., Jr. // Acta Derm. Venereol. 2010. V. 90. № 4. P. 401–405.
- Leventhal J.S., Sanchez M.R. // J. Drugs Dermatol. 2012. V. 11. № 10. P. 1200–1206.
- Sorce M., Aricò M., Bongiorno M.R. // Dermatol. Ther. 2008. V. 21. № S1. P. S6–S9.
- Stepanov A.V., Belogurov A.A., Jr., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S., et al. // PLoS One. 2011. V. 6. № 6. P. e20991.
- Stepanov A.V., Belogurov A.A., Kothapalli P., Шамборант О.Г., Кнорре В.Д., Телегин Г.Б., Овсепян А.А., Пономаренко Н.А., Деев С.М., Kaveri S.V. и др. // Acta Naturae. 2015. T. 7. № 2. С. 79–85.
- Cho A., Caldara A.L., Ran N.A., Menne Z., Kauffman R.C., Affer M., Llovet A., Norwood C., Scanlan A., Mantus G., et al. // Cell Rep. 2019. V. 28. № 4. P. 909–922. e1–e6.
- Müller R., Svoboda V., Wenzel E., Gebert S., Hunzelmann N., Müller H.-H., Hertl M. // Exp. Dermatol. 2006. V. 15. № 8. P. 606–614.
- Абрамова Т.В., Шпилева М.В., Кубанов А.А. // Acta Naturae. 2020. T. 12. № 2. С. 63–69.
- Кубанов А.А., Дерябин Д.Г., Шпилева М.В., Карамова А.Э., Никоноров А.А., Ларина Е.Н., Алиев Т.К., Долгих Д.А., Бобик Т.В., Смирнов И.В. и др. // Бюл. эксп. биол. мед. 2021. T. 171. № 4. С. 490–495.
- Franz B., May K.F., Jr., Dranoff G., Wucherpennig K. // Blood. 2011. V. 118. № 2. P. 348–357.