

Гомеостаз В-лимфоцитов и направления анти-В-клеточной терапии при ревматоидном артрите

Е.В. Супоницкая, Е.Н. Александрова, А.П. Алексанкин, Е.Л. Насонов

ФГБУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой» РАМН, Москва

V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Контакты: Екатерина Валерьевна Супоницкая:
ekaterina.s@mtu-net.ru

Contact: Ekaterina Valeryevna Suponitskaya
ekaterina.s@mtu-net.ru

Поступила 01.07.13

Ревматоидный артрит (РА) — аутоиммунное ревматическое заболевание (РЗ) неизвестной этиологии, характеризующееся хроническим эрозивным артритом (синовитом) и системным воспалительным поражением внутренних органов [1–3].

В последние годы значительно возрос интерес к изучению роли В-клеток в патогенезе РА. Показано, что В-клетки презентуют антигены Т-лимфоцитам, влияют на их активацию, участвуют в синтезе провоспалительных цитокинов и аутоантител [4–8].

В норме В-лимфоциты человека имеют сложный цикл развития, обеспечивающий формирование В-клеточной толерантности к собственным антигенам за счет механизмов антиген-зависимой и антиген-независимой селекции аутореактивных клонов В-клеток на отдельных этапах лимфопоэза и иммуногенеза [9, 10]. В процессе созревания от клеток-предшественников до секретирующих антитела плазматических клеток В-лимфоциты проходят несколько последовательных стадий, каждая из которых фенотипически характеризуется экспрессией на поверхности клеток молекул иммуноглобулинов различных классов и определенным набором мембранных CD-антигенов.

Основным маркером, используемым для идентификации периферических В-клеток человека, является антиген CD19. Кроме него в современной классификации В-лимфоциты характеризуются степенью экспрессии других поверхностных рецепторов: IgD, CD27, CD38 и CD24. Различают следующие субпопуляции В-клеток: транзиторные (IgD+CD27-CD24++CD38++) [11], наивные (IgD+CD27-), непереключенные (IgD+CD27+) и переключенные (IgD-CD27+) клетки памяти, двойные негативные В-клетки (IgD-CD27-) и плазмобласты (IgD-CD27++) [12–14].

Развитие РА характеризуется потерей В-клеточной толерантности, что приводит к выживанию аутореактивных клонов В-клеток и их дифференцировке в аутореактивные плазматические клетки, синтезирующие широкий спектр аутоантител, которые, активируя систему комплемента и лимфоциты (прямо или за счет образования иммунных комплексов), индуцируют воспаление и деструкцию тканей организма [15, 16].

Об участии В-клеток и аутоантител в патогенезе РА свидетельствуют работы, осно-

ванные на модели артрита у мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID; отсутствие Т- и В-клеток). В частности, показан перенос аутоиммунного артрита при имплантации SCID мышам синовиальной ткани больных РА, содержащей В-клетки, персистирующие в составе воспалительных инфильтратов, лимфоидных фолликулов и зародышевых центров [17]. Удаление CD20+ В-клеток под действием ритуксимаба (РТМ) сопровождается снижением активности воспалительного процесса в трансплантате и уменьшением количества CD4+ Т-хелперных (Th)1-клеток, продуцирующих интерферон γ (ИФН γ), который обладает способностью стимулировать синтез каскада провоспалительных цитокинов [18]. Кроме того, у SCID мышей отмечено развитие синовиального воспаления и костной деструкции после введения антител к циклическому цитруллин-ированному пептиду (АЦЦП), полученных от DBA/1 мышей с коллаген-индуцированным артритом [19].

Поликлональная активация В-клеток при РА сопровождается нарушением гомеостаза В-лимфоцитов периферической крови [12], в частности, выраженной экспансией CD27+ В-клеток памяти [20, 21]. Полагают, что увеличение количества В-клеток памяти, отражающее потерю периферической толерантности, дефект негативной селекции, усиление активации и дифференцировки наивных В-клеток, а также отсутствие чувствительности к иммуносупрессивным препаратам значительно повышают риск развития аутоиммунных реакций [10]. Характерной особенностью РА является ранний дефект селекции аутореактивных клонов В-клеток, формирующийся на стадии перехода незрелых (CD10+CD27-IgM+) В-клеток в зрелые (CD10-CD27-IgM+) наивные В-лимфоциты [16].

Наряду с патогенетическим действием В-клетки могут иметь важное протективное значение при аутоиммунных РЗ. В последние годы возрос интерес к изучению CD25^{high}CD27^{high}CD86^{high} интерлейкин (ИЛ)10^{high} трансформирующего фактора роста (ТФР) β ^{high} регуляторных В-клеток (В_{рег}), тормозящих развитие аутоиммунных реакций и воспаления [22]. В экспериментах на мышечных моделях аутоиммунных заболеваний показано, что протективный эффект В_{рег}-клеток может быть связан с продукцией ингибитор-

ных противовоспалительных цитокинов (ИЛ10, ТФРβ), подавляющих поляризацию иммунного ответа по Th1-типу, и усилением супрессорной активности CD4+CD25+FoxP3+ Т-регуляторных клеток (T_{рег}) [23–25]. При этом основными факторами активации В_{рег}-клеток служит передача сигнала от CD40 и TLR (toll-like-receptor) 2, 4, а также стимуляция BCR (B-cell receptor) [22, 25]. По данным S. Ami и соавт. [26], иммунорегуляторные CD25+ В-лимфоциты человека относятся к субпопуляции CD27+ В-клеток памяти и характеризуются высоким уровнем секреции ИЛ10. Теми же авторами выявлен значительный дефицит CD25+CD27+ В-клеток в периферической крови больных РА по сравнению с донорами. Проведенные исследования позволяют предположить, что количественная экспансия и усиление супрессорной функции В_{рег}-клеток могут использоваться в качестве нового альтернативного подхода к лечению аутоиммунных РЗ.

На сегодняшний день существуют две группы препаратов, различающихся по механизму действия на гомеостаз В-клеток. К первой относятся средства, вызывающие деплецию В-клеток за счет блокады их поверхностного рецептора CD20, вторую представляют лекарства, ингибирующие функцию В-лимфоцитов за счет блокады стимулятора В-лимфоцитов – BlyS (B lymphocyte stimulator) и/или лиганда, индуцирующего пролиферацию – APRIL (a proliferation-inducing ligand; см. таблицу).

PTM – химерное МАТ к поверхностному антигену CD20, который экспрессируется на мембране В-лимфоцитов. Характерно, что CD20 выявлен только на пре- и зрелых В-лимфоцитах [30, 31]. Он не найден на стволовых, про-В-клетках, дендритных клетках и плазмочитах [32, 33]. Эта специфичность делает рецептор CD20 идеальной мишенью для терапевтического воздействия, так как его блокада не затрагивает ни восстановление В-лимфоцитов из стволовых клеток, ни продукцию иммуноглобулинов плазмочитами. Исследования пациентов с неходжкинскими лимфомами, для которых PTM был впервые разрешен к применению, показали, что он вызывает продолжительную и обратимую деплецию CD20+ В-лимфоцитов периферической крови, длящуюся 9–12 мес после проведенного курса лечения [34].

У больных РА PTM через 15 дней после инфузии индуцирует быстрое снижение числа периферических В-лимфоцитов, которое сохраняется в течение 24 нед [35–37]. Оставшиеся В-лимфоциты в период их выраженной деплеции

представляют собой преимущественно клетки памяти (CD19+IgD-CD27+) и плазматические клетки (CD19+IgD-CD38++) [38]. В начальный период восстановления В-лимфоцитов в крови преобладает смесь зрелых наивных (CD19+IgD+CD38+) и незрелых транзиторных В-клеток (CD19+IgD+CD38++CD10+CD24++) [38–40]. Количество В-клеток памяти восстанавливается более медленно и может сохраняться на низком уровне в течение нескольких лет.

Клиническая эффективность PTM зависит, по разным данным, от степени деплеции В-клеток после первой инфузии препарата, базального уровня В-клеток и динамики восстановления В-клеточных субпопуляций, особенно В-клеток памяти и плазмобластов [41].

Первые результаты назначения PTM при РА опубликованы J.C. Edwards и G. Cambridge в 2001 г. [5]. В этом небольшом открытом исследовании приняло участие всего 5 пациентов с РА. Они получали PTM в сочетании с циклофосфаном (ЦФ) и преднизолоном по схеме, используемой при лечении В-клеточных неходжкинских лимфом. К 6 мес у всех пациентов наблюдалось 50%, а у троих – 70% улучшение по критериям Американской коллегии ревматологов (ACR). Как и ожидалось, количество В-клеток в крови было крайне мало и они с трудом выявлялись методом проточной цитофлюориметрии, при этом серьезных неблагоприятных реакций, связанных с проведенным лечением, не отмечалось. У всех пациентов уровни иммуноглобулинов трех классов (IgG, IgA, IgM) сохранялись в пределах нормы [5]. Данное исследование вместе с другими ранними работами продемонстрировало возможность использования PTM для анти-В-клеточной терапии при РА [42, 43].

F. Breedveld и соавт. [44] в двойном слепом рандомизированном исследовании фазы IIa изучили влияние деплеции В-лимфоцитов на клиническую эффективность PTM. Из 161 пациента с активным РА 40 получали метотрексат (MT), 40 – MT и PTM, 41 – PTM и ЦФ и 40 – PTM. Фенотипирование В-лимфоцитов крови проводилось на 1, 3, 15-й дни и 16, 20, 24 и 48-й неделях после введения PTM. Клиническая эффективность оценивалась по критериям ACR, DAS28 и HAQ, а лабораторная – по уровню острофазовых показателей (С-реактивного белка – СРБ – и СОЭ) и ревматоидного фактора (РФ). К 24-й неделе исследования 50% улучшение по критериям ACR отмечалось у 13, 33, 41 и 43% пациентов в группах MT, PTM, PTM+ЦФ и PTM+MT соответственно. Длительность деплеции В-клеток на фоне терапии PTM была различной. В среднем В-

Анти-В-клеточные препараты

Название препарата	Механизм действия	Заболевания, при которых назначается	Стадия клинических исследований
<i>Препараты, вызывающие деплецию В-клеток</i>			
PTM	Химерное МАТ к поверхностному антигену CD20	РА и СКВ	Разрешен к применению и зарегистрирован в России
Офатумумаб	Человеческое МАТ к поверхностному антигену CD20	То же	III фаза клинических исследований [27]
Окрелизумаб	Гуманизированное МАТ к поверхностному антигену CD20	« «	III фаза клинических исследований [28]
<i>Препараты, ингибирующие функцию В-клеток</i>			
Белимумаб	Человеческое МАТ к растворимому BlyS	СКВ	Разрешен к применению и зарегистрирован в России
Атацицепт	Растворимый белок человека TACI-IgG, блокирующий BlyS и APRIL	РА	II фаза клинических исследований [29]

Примечание. МАТ – моноклональное антитело, СКВ – системная красная волчанка.

клетки восстанавливались до нижней границы нормы (НГН) у 10% пациентов через 24 нед и у 36% — через 48 нед после начала терапии РТМ. Авторы не выявили достоверной взаимосвязи между степенью деплеции В-лимфоцитов, ее продолжительностью и клинической эффективностью РТМ по критериям ACR. Возможно, такой результат являлся следствием невысокой чувствительности метода проточной цитофлюориметрии, который использовался для определения В-клеток [44]. Действительно, после применения высокочувствительного цитометрического анализа, практикующегося для оценки минимального количества злокачественных клеток в онкологии (минимальной остаточной болезни), была выявлена прямая зависимость между степенью деплеции В-лимфоцитов и ответом на лечение РТМ [45].

В проспективном исследовании S. Dass и соавт. [45] участвовало 60 пациентов с серопозитивным (по РФ и АЦЦП) активным РА и неэффективным предшествующим лечением ингибиторами фактора некроза опухоли α (ФНО α). Всем пациентам был назначен РТМ в дозе 1000 мг дважды с интервалом в 2 нед. Клинический ответ оценивался по критериям Европейской антиревматической лиги (EULAR) каждые 3 мес. Количество и фенотип В-клеток определяли с помощью высокочувствительной проточной цитофлюориметрии до и после каждой инфузии РТМ, а затем каждые 3 мес. Полной деплецией считалось уменьшение количества В-клеток ниже уровня $0,0001 \cdot 10^9/\text{л}$ (при обычной цитофлюориметрии полная деплеция регистрируется при уменьшении числа В-клеток менее $0,005 \cdot 10^9/\text{л}$). До лечения РТМ количество В-клеток периферической крови у больных РА составляло (медиана [25-й; 75-й перцентили]) $0,03 [0,013; 0,33] \cdot 10^9/\text{л}$. 3% этих В-клеток имели фенотип предшественников плазмочитов. После первой инфузии РТМ В-клетки были выявлены у 6% пациентов с помощью обычной цитофлюориметрии и у 63% при использовании высокочувствительного метода ($0,0009 [<0,0001; 0,0015] \cdot 10^9/\text{л}$). При этом значительная часть В-клеток относилась к предшественникам плазмочитов (70 [0; 100]%). Больные РА с неполной деплецией В-клеток после первой инфузии РТМ в течение всего периода наблюдения хуже отвечали на данный препарат, чем пациенты с полной деплецией. Так, у пациентов с полной и неполной деплецией В-клеток удовлетворительный или хороший эффект по критериям EULAR через 3 мес после введения РТМ отмечался в 87 и 59% ($p=0,03$), к 6-му месяцу — в 96 и 74% ($p=0,02$), к 9-му месяцу — в 82 и 43% ($p=0,01$) и к 12-му месяцу — в 59 и 21% ($p=0,01$) случаев соответственно. Пациенты, у которых полная деплеция В-клеток была достигнута только после второй инфузии РТМ, имели худший клинический ответ, чем пациенты с полной деплецией после первого введения РТМ. После второй инфузии РТМ В-клетки определялись в 18% случаев, причем обычная цитофлюориметрия определяла В-клетки только в 6%. Достоверных различий в исходном количестве В-клеток между пациентами с полной и неполной деплецией на фоне терапии РТМ не обнаружено. К 6-му месяцу В-клетки определялись у 82,3% пациентов с полной деплецией и у 89,5% — с неполной ($p=0,14$). Тем не менее, несмотря на сопоставимое количество В-клеток к 6-му месяцу у пациентов с полной и неполной деплецией, у последних было больше В-клеток памяти и предшественников плазмочитов [45]. Судя по этим результатам, содержание В-клеток периферической крови через 2 нед после первой инфузии РТМ является хорошим индикатором ответа на терапию.

Сообщение E.M. Vital и соавт. [46] подтверждает эти наблюдения. Из 60 пациентов, включенных в предыдущее исследование [45], выбрано 25 не ответивших на РТМ, которым назначен повторный курс РТМ в той же дозировке с двухнедельным интервалом между инфузиями. До проведения повторного курса РТМ циркулирующие В-клетки еще не вернулись к исходному уровню, их количество было меньше, чем до лечения РТМ и сразу же после первой его инфузии ($p<0,0001$). Подсчет В-клеток проводился с помощью высокочувствительной цитофлюориметрии [46]. Показано, что полная деплеция В-клеток является предиктором хорошего ответа по критериям EULAR в течение первых 6 мес после введения РТМ. Среди не ответивших на первый цикл лечения РТМ полная деплеция В-клеток отмечалась у 9% пациентов, а в группе ответивших — у 37%. После первой инфузии второго курса РТМ полная деплеция В-клеток была достигнута у 38% больных с отсутствием ответа на первый курс РТМ. Количество В-клеток после второго курса РТМ в течение всего периода наблюдения было ниже, чем после первого, а количество предшественников плазмочитов и клеток памяти существенно снизилось к 26-й неделе после второго курса РТМ. Через 6 мес после второго курса РТМ клинический ответ на препарат выявлялся у 72% пациентов, причем в 32% случаев отмечался хороший ответ, в 16% — ремиссия.

Таким образом, у больных РА с неудовлетворительным эффектом РТМ повышен исходный уровень преплазмочитов. Повторное введение РТМ пациентам с неполной В-клеточной деплецией после первого курса лечения способствует развитию более выраженной деплеции В-лимфоцитов и увеличению клинической эффективности препарата [46].

В другом исследовании E.M. Vital и соавт. [47] показано, что именно степень В-клеточной деплеции, а не дозировка РТМ является решающей в достижении хорошего клинического ответа на терапию. По данным этих авторов, кроме полной деплеции В-клеток, определявшейся на 2-й неделе терапии, важным прогностическим фактором эффективности РТМ в дозе 500 мг служит базальный уровень предшественников плазмочитов в крови ($p=0,047$). Сходные результаты получены J. Sellam и соавт. [48] в группе больных РА ($n=208$), у которых низкий базальный уровень общего количества В-клеток памяти (включая переключенные и непереключенные В-лимфоциты), а также плазмобластов являлся предиктором хорошего эффекта РТМ.

Вместе с тем в недавней работе H.-P. Brezinschek и соавт. [49] установлено, что ни исходное количество В-лимфоцитов, ни степень их деплеции после введения РТМ не являются предиктором хорошего ответа на лечение данным препаратом. В исследование было включено 52 пациента с активным РА и неэффективным предшествующим лечением ингибиторами ФНО α . Всем пациентам назначался РТМ в дозе 1000 мг дважды с интервалом в 2 нед. Оценка ответа на лечение проводилась по критериям EULAR через 2 и 24 нед после инфузий РТМ. С помощью высокочувствительной проточной цитофлюориметрии В-лимфоциты типировались по поверхностным маркерам IgD, CD27, CD38 и CD24, а также по экспрессии костимуляторного рецептора CD80 и маркера активации В-клеток CD95. Через 2 нед с момента первой инфузии РТМ произошло существенное снижение количества В-лимфоцитов у всех больных РА независимо от ответа на препарат. До назначения РТМ различий в субпопуляциях В-лимфо-

цитов между ответившими и не ответившими не наблюдалось. Базальные уровни экспрессии CD95, CD80 у пациентов РА были в пределах нормы. Основные различия наблюдались при сравнении субпопуляций В-клеток ответивших и не ответивших до лечения с соответствующими показателями у здоровых лиц. Так, у ответивших было выявлено достоверно большее количество двойных негативных В-клеток (CD27-IgD-) и меньшее количество плазмобластов (CD27++IgD-), чем в контрольной группе. У всех больных РА наблюдалось снижение количества CD38++ В-клеток в субпопуляции переключенных В-клеток памяти ($p < 0,0001$), а среди ответивших — уменьшение частоты обнаружения CD38++ В-клеток в субпопуляции плазмобластов по сравнению с донорами. У пациентов с отсутствием ответа на РТМ частота выявления непереключенных CD95+ клеток до лечения была достоверно выше, чем в контрольной группе. Экспрессия CD95+ на двойных негативных В-клетках памяти не коррелировала с активностью РА. Таким образом, часть выводов этой работы совпадает с данными Е.М. Vital и соавт. [46] и свидетельствует о том, что исходно низкое число плазмобластов может являться предиктором хорошего ответа на лечение РТМ. Высокая частота активированных В-лимфоцитов, а именно CD95+ непереключенных клеток памяти, ассоциируется с худшим ответом на РТМ. Тем не менее даже при использовании высокочувствительной цитофлуориметрии не было выявлено корреляции между степенью деплеции и клиническим эффектом РТМ, что противоречит данным, полученным Е.М. Vital и соавт. [46], и, возможно, связано с биологическим различием между когортами пациентов, включенными в эти исследования.

Несколько авторов демонстрируют определенную закономерность в регенерации В-клеток после деплеции РТМ [39, 40, 51]. Обнаружено, что в прямой зависимости от выраженности степени деплеции В-клеток памяти и скорости их последующего восстановления находится и клиническое улучшение.

Так, Р. Roll и соавт. [39] проанализировали фенотип В-клеток и клинический ответ на РТМ у 17 пациентов с рефрактерным к стандартной терапии РА. Фенотипический анализ выявил определенную тенденцию в регенерации В-клеток. Первая волна репопуляции В-клеток представляла собой незрелые В-клетки (CD38+++IgD+CD10+CD24+++). Параллельно отмечалась рециркуляция плазматических клеток (CD38+++IgD-CD27+++). Позже увеличилось количество наивных В-клеток (CD38+IgD+), и они преобладали среди В-лимфоцитов периферической крови. Клетки памяти (CD19+CD27+) показали замедленную и отсроченную репопуляцию, их уровень сохранялся достоверно сниженным (<50%) по сравнению с исходным в течение 2 лет и более. В своей следующей работе Р. Roll и соавт. [40] выявили, что при отсутствии ответа на лечение РТМ был повышен базальный уровень непереключенных В-клеток памяти (IgD+CD27+) ($p=0,019$). Пациенты, у которых до лечения выявлялось большое количество В-клеток памяти (CD19+CD27+) имели ранний рецидив заболевания (на 24–40-й неделе после инфузии РТМ).

По данным В. Mölleg и соавт. [50], низкое содержание переключенных клеток памяти (CD27+IgD-) после лечения коррелирует с хорошим клиническим ответом на РТМ. У пациентов с рецидивом РА в процессе репопуляции В-лимфоцитов преобладали переключенные клетки памяти.

В это проспективное исследование было включено 35 пациентов с активным РА, которые ранее получали неэффективную терапию базисными противовоспалительными препаратами (БПВП) и/или ингибиторами ФНО α . Всем пациентам назначался РТМ в дозе 1000 мг с интервалом в 2 нед. Клинический ответ оценивался каждые 3 мес по критериям EULAR. После первой инфузии РТМ отмечалось достоверное снижение уровня всех субпопуляций В-лимфоцитов ($p < 0,001$), однако относительные значения переключенных В-клеток памяти (CD27+IgD-) и двойных негативных В-клеток (CD27-IgD-) сохранялись повышенными. Авторы не нашли связи между снижением общего количества В-клеток или их субпопуляций и клиническим ответом на РТМ. Восстановление субпопуляций В-клеток проходило в течение 3–12 мес, причем у пациентов с удовлетворительным ответом или его отсутствием репопуляция возникала раньше, однако достоверного различия между ответившими и не ответившими не выявлено. При репопуляции преобладали наивные В-лимфоциты (CD27-IgD+). Абсолютное количество переключенных В-клеток памяти (CD27+IgD-) к 6, 9 и 12 мес у пациентов с отсутствием эффекта или удовлетворительным ответом было достоверно выше, чем у больных с хорошим ответом. Относительное и абсолютное число непереключенных В-клеток памяти (CD27+IgD+), двойных негативных (CD27-IgD-) и наивных В-клеток (CD27-IgD+) не коррелировало с клиническим ответом на РТМ [50].

Похожие результаты получили Y.K. Teng и соавт. [51]. На 24-й неделе терапии РТМ хороший клинический эффект и низкая активность РА ассоциировались с выраженным уменьшением общего количества В-клеток памяти (CD19+CD27+IgD+), как непереключенных (0,044 [0,002; 0,66]%), так и переключенных В-лимфоцитов (CD19+CD27+IgD-) (0,17; [0,04; 0,39]%), по сравнению с соответствующими показателями у больных РА с высокой активностью заболевания (0,45; [0,07; 9,47] и 0,67 [0,08; 2,05]%; $p=0,006$ и $p=0,005$ соответственно).

В работе М. J. Leandro и соавт. [38] изучены фенотипы субпопуляций В-клеток у 24 пациентов с активным РА, получавших РТМ. Авторы обнаружили, что относительное и абсолютное количество CD19+ клеток периферической крови уменьшилось в среднем на 97% после 3 мес введения РТМ у всех, кроме одного пациента. Все субпопуляции В-клеток подверглись деплеции, а более 80% оставшихся В-клеток имели фенотип клеток памяти (CD19+CD27+) или плазматических клеток (CD38+++IgD-). Репопуляция В-клеток возникла в среднем в течение 8 мес после лечения и зависела от формирования наивных В-клеток, экспрессировавших CD38 и CD5. Во время репопуляции отмечалось увеличенное количество циркулирующих незрелых В-клеток с фенотипом CD19+IgG+CD38++CD10-CD24+++. У пациентов с рецидивом РА отмечалось несколько большее количество В-клеток, среди которых преобладали В-клетки памяти (CD19+CD27+).

Таким образом, по данным литературы, терапия РТМ может индуцировать полную деплецию В-лимфоцитов периферической крови у больных РА. Репопуляция возникает в первую очередь за счет наивных зрелых и незрелых В-лимфоцитов. Пациенты с рецидивом РА имеют восстановленную популяцию В-лимфоцитов, в основном состоящую из В-клеток памяти (CD19+CD27+).

М. Nakou и соавт. [52] подтверждают эти данные в своем исследовании небольшой когорты больных РА, у которых предыдущее лечение БПВП и/или ингибитора-

ми ФНО α было неэффективным. Периферическая кровь и образцы костного мозга были получены у 11 пациентов с активным РА. РТМ назначался по стандартной схеме: 1000 мг дважды с интервалом в 2 нед. Анализ В-лимфоцитов проводили до и через 12 нед после лечения. В группу сравнения вошли 7 пациентов с РА, получавших ингибиторы ФНО α . Фенотипирование лимфоцитов проводилось по CD19, CD27 и HLA-DR, который является маркером активации и выполняет антиген-презентирующую функцию. Оценивались клетки памяти (CD19+CD27+), наивные (CD19+CD27-) и активированные В-лимфоциты (CD19+HLA-DR+). К 4 и 6 мес у 45% пациентов отмечалось снижение активности заболевания с хорошим и удовлетворительным ответом на РТМ по критериям EULAR. В периферической крови больных РА относительное количество CD19+ В-лимфоцитов снизилось с $2,2 \pm 0,7$ до $0,8 \pm 0,3\%$ ($p=0,022$). У 7 из 11 пациентов отмечалась полная деплеция с уменьшением абсолютного числа В-клеток с 58 до 17 в 1 мкл ($p=0,03$). В костном мозге деплеция не была настолько выраженной: снижение количества В-клеток отмечено у 5 пациентов, в то время как средний уровень В-клеток достоверно не уменьшился. Наряду с этим на фоне терапии РТМ существенно снизился процент HLA-DR+ клеток во фракции CD19+ В-лимфоцитов периферической крови и костного мозга ($p=0,05$ и $p=0,007$ соответственно). Корреляции между клиническим ответом на РТМ и степенью деплеции В-клеток периферической крови и костного мозга не обнаружено. Процент В-клеток памяти CD19+CD27+ у пациентов РА через 3 мес после начала лечения РТМ не изменился. Однако у больных с хорошим и удовлетворительным ответом по критериям EULAR отмечалась достоверная деплеция В-клеток памяти уже через 12 нед после начала терапии ($p=0,022$). У не ответивших на терапию количество В-клеток памяти не изменилось или незначительно увеличилось. В группе больных РА, получавших ингибиторы ФНО α , достоверного снижения числа В-лимфоцитов и их субпопуляций не обнаружено. Таким образом, авторы показали, что лечение РТМ приводит к деплеции общей популяции CD19+ В-лимфоцитов преимущественно в периферической крови, в то время как деплеция активированных В-лимфоцитов происходит в периферической крови и в костном мозге. Выраженность клинического ответа на РТМ коррелирует с деплецией CD19+CD27+ В-клеток памяти, что совпадает с данными вышеуказанных исследований [39, 40, 51].

М. Rehnberg и соавт. [53] показали, что через 3 мес после начала терапии РТМ вызывает уменьшение количества наивных В-лимфоцитов и непереключенных (CD27+IgD+) В-клеток памяти, а на 22-й неделе — переключенных В-клеток памяти (CD27+IgD-) в крови и костном мозге.

По данным А. Vancsa и соавт. [54], на фоне терапии РТМ у пациентов с РА отмечались достоверное снижение активности заболевания (по DAS28) и уменьшение абсолютного числа В-лимфоцитов сразу после первого курса РТМ, которое сохранялось на протяжении двухлетнего периода наблюдения. Отмечалась положительная корреляция абсолютного числа CD19+ В-лимфоцитов с изменениями DAS28 ($r=0,963$, $p=0,008$) и РФ ($r=0,859$, $p=0,028$), но не с продукцией АЦЦП.

Перечисленные работы, анализирующие взаимосвязь изменений субпопуляций В-клеток при РА с эффективностью терапии РТМ, имеют неоднозначные результа-

ты. Это может быть связано с различной длительностью заболевания и небольшим числом пациентов, участвовавших в исследованиях. Тем не менее большинство авторов приходят к выводу, что неполная деплеция В-лимфоцитов и преобладание В-клеток памяти после первой инфузии РТМ, а также быстрая репопуляция В-лимфоцитов могут коррелировать с отсутствием клинического ответа на РТМ.

Еще одной терапевтической возможностью уменьшить хроническое воспаление при РА является блокада рецепторов к ИЛ6 (ИЛ6Р). ИЛ6 — это плеiotропный цитокин, который продуцируется разными типами клеток, включая фибробласты, остеобласты, кератиноциты, эндотелиальные клетки, моноциты и некоторые клетки опухолей [55]. В местах воспаления ИЛ6 экспрессируется в особенно высоких концентрациях. Под его действием происходят поликлональная активация В-клеток, плазмцитоз и В-клеточная неоплазия. ИЛ6 также влияет на дифференцировку и выживание плазматических клеток в костном мозге.

Доказано, что у пациентов с РА увеличенное содержание ИЛ6 и его рецептора в сыворотке коррелирует с активностью болезни [56, 57] и деструкцией суставов [58]. ИЛ6 способствует дисрегуляции остеокластов и остеобластов, что приводит к усиленной резорбции костной ткани и уменьшению ее формирования [59]. Кроме того, ИЛ6 стимулирует продукцию сосудистого эндотелиального фактора роста в синовии при РА, за счет которого происходит образование паннуса [60].

Тоцилизумаб (ТЦЗ) — рекомбинантный гуманизированный МАТ к человеческому ИЛ6Р. ТЦЗ селективно связывается и блокирует растворимые и мембранные ИЛ6Р, препятствуя эффектам ИЛ6. Недавние исследования ТЦЗ показали, что ингибирование ИЛ6Р может давать хорошие результаты при РА и других аутоиммунных заболеваниях [61].

Работа Р. Roll и соавт. [62] посвящена изучению влияния ТЦЗ на состав В-клеток периферической крови и сывороточный уровень иммуноглобулинов у больных РА. В это проспективное исследование вошли больные РА со средней продолжительностью заболевания 11,7 года, ранее получавшие стандартную терапию МТ, лефлуномидом и/или ингибитором ФНО α с недостаточным эффектом. ТЦЗ в дозе 8 мг/кг назначался каждые 4 нед. На 4, 12 и 24-й неделях лечения оценивали активность заболевания по DAS28, показатели воспаления (СРБ и СОЭ), уровни IgG, IgM и IgA, а также РФ и АЦЦП. Субпопуляции В-клеток анализировались до назначения ТЦЗ, а также на 12-й и 24-й неделях терапии. Популяция В-клеток оценивалась по экспрессии CD19, CD27 и IgD у 21 здорового донора и у 16 пациентов, включенных в исследование. До лечения ТЦЗ у больных РА была обнаружена абсолютная В-клеточная лимфопения ($p<0,0001$), поэтому и абсолютное количество переключенных (CD27+IgD-) и непереключенных (CD27+IgD+) В-клеток памяти и наивных клеток (CD27-IgD+) было более низким, чем у здоровых доноров. При анализе относительного количества В-клеток в группе больных РА отмечено увеличение доли переключенных (CD27+IgD-) и непереключенных (CD19+CD27+) В-клеток памяти ($p=0,03$ и $p=0,06$), а также уменьшение процентного содержания наивных В-клеток (CD27-IgD+) ($p=0,04$) по сравнению с донорами. К 24-й неделе лечения ТЦЗ относительное количество CD19+ В-клеток оставалось стабильным, однако их абсолютное число увеличилось по сравнению с исходным уровнем с $86,4$ [26; 261] до $122,1$ [38; 5; 409; 7] кл/мкл. Абсолютное число переключен-

ных (CD27+IgD-) и непереключенных (CD27+IgD+) В-клеток в ходе терапии ТЦЗ не менялось; вероятно, это связано с увеличением общего количества В-лимфоцитов на фоне лечения. Существенное снижение относительного количества непереключенных (CD27+IgD+) и переключенных (CD27+IgD-) В-клеток памяти отмечалось через 24 нед после начала лечения ТЦЗ. Количество непереключенных В-клеток памяти уменьшилось с 19,6 до 13,3% к 12-й неделе ($p=0,02$) и сохранялось на сниженном уровне (12,3%) к 24-й неделе. Количество переключенных В-клеток уменьшилось с 18,6 до 17,0% к 12-й неделе и составляло 15% к 24-й неделе ($p=0,03$). Снижение относительного количества непереключенных В-клеток памяти коррелировало с уменьшением DAS28 ($p=0,03$). У 10 пациентов было проведено фенотипирование IgA+ и IgG+ В-клеток, которое выявило достоверное снижение их относительно и абсолютного количества через 24 нед. Также обнаружено достоверное уменьшение уровней IgA и IgG плазмы крови к 12-й и 24-й неделям наблюдения. Несмотря на снижение по сравнению с исходными значениями, уровни всех иммуноглобулинов плазмы крови сохранялись в пределах нормы. Была выявлена достоверная корреляция между абсолютным и относительным уровнями IgA+ В-клеток и IgA плазмы крови к 24-й неделе ($p=0,0016$ и $p=0,03$ соответственно).

В исследовании Z. Mahmood и соавт. [63] проводился фенотипический анализ двойных негативных В-клеток памяти (CD19+CD27-IgG-) у больных РА ($n=33$) до лечения ТЦЗ и через 12, 24, 48 нед после его введения. Показано, что до начала терапии двойные негативные В-лимфоциты

преобладали у пациентов с РА ($p=0,034$) по сравнению с группой здоровых доноров ($n=22$) и являлись гетерогенной смесью клеток, экспрессировавших IgA, IgM и IgG, с четким преобладанием IgG+ клеток. Назначение ТЦЗ сопровождалось существенным уменьшением количества мутировавших иммуноглобулиновых рецепторов на двойных негативных В-лимфоцитах к 12-й ($p<0,0001$), 24-й ($p=0,0147$) и 48-й ($p=0,0017$) неделям наблюдения. Следовательно, дифференцировка двойных негативных В-клеток памяти (CD19+CD27-IgG-) *in vivo* зависит от системы ИЛ6/ИЛ6Р и может быть модулирована при назначении антагониста ИЛ6Р.

Таким образом, на фоне лечения ТЦЗ наблюдается снижение количества В-клеток памяти и изменение их дифференцировки, ассоциирующиеся с уменьшением активности РА. Это позволяет рассматривать ТЦЗ как потенциальный анти-В-клеточный препарат. Однако, учитывая малое число включенных в исследование пациентов, необходимо продолжить изучение влияния ТЦЗ на фенотипический состав В-лимфоцитов для оценки возможности прогнозирования эффективности данного ГИБП при лечении РА.

На сегодняшний день анти-В-клеточная терапия является одним из перспективных видов лечения РА, резистентного к ингибиторам ФНО α . Неоднозначные результаты приведенных выше работ указывают на целесообразность дальнейшего исследования динамики субпопуляций В-лимфоцитов на фоне назначения анти-В-клеточных препаратов, что может не только внести вклад в уточнение патогенеза РА, но и оказать помощь в выборе оптимальной стратегии лечения.

ЛИТЕРАТУРА

- Насонов Е.Л., Каратеев Д.Е., Балабанова Р.М. Ревматоидный артрит. В кн.: Ревматология: Национальное руководство. Под ред. Е.Л. Насонова, В.А. Насоновой. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008; 290–331.
- Klareskog L., Catrina A.I., Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2009;373:659–72.
- Scott D.L., Wolfe F., Huizinga T.W. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010;376:1094–108.
- Carson D.A., Chen P.P., Kipps T.J. New roles for rheumatoid factor. *J Clin Invest* 1991;87:379–83.
- Edwards J.C., Cambridge G. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology* 2001;40:205–11.
- Kim H.J., Berek C. B cells in rheumatoid arthritis. *Arthr Res* 2000;2:126–31.
- Metlay J.P., Pure E., Steinman R.M. Control of the immune response at the level of antigen-presenting cells: a comparison of the function of dendritic cells and B lymphocytes. *Adv Immunol* 1989;47:45–116.
- Takemura S., Klimiuk P.A., Braun A. et al. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* 2001;167:4710–8.
- Dörner T., Lipsky P.E. B-cell targeting: a novel approach to immune intervention today and tomorrow. *Expert Opin Biol Ther* 2007;7:1287–99.
- Dörner T., Jacobi A.M., Lipsky P.E. B cells in autoimmunity. *Arthr Res Ther* 2009;11:247.
- Sims G.P., Ettinger R., Shirota Y. et al. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 2005;105:4390–8.
- Anolik J.H., Looney R.J., Lund F.E. et al. Insights into the heterogeneity of human B cells: diverse functions, roles in autoimmunity, and use as therapeutic targets. *Immunol Res* 2009;45:144–58.
- Sanz I., Wei C., Lee F.E., Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin Immunol* 2008;20:67–82.
- Jacobi A.M., Reiter K., Mackay M. et al. Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthr Rheum* 2008;58:1762–73.
- Насонов Е.Л. Применение ритуксимаба при ревматоидном артрите. *Науч-практич ревматол* 2009;1(Прил.):3–22.
- Samuels J., Ng Y.S., Coupillaud C. et al. Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2005;201:1659–67.
- Takemura S., Klimiuk P.A., Braun A. et al. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* 2001;167:4710–8.
- Mauri C., Ehrenstein M.R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. B cells. *Arthr Res Ther* 2007;9:205.
- Kuhn K.A., Kulik L., Tomooka B. et al. Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J Clin Invest* 2006;116:961–73.
- Lindenau S., Scholze S., Odendahl M. et al. Aberrant activation of B cells in patients with rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci* 2003;987:246–8.
- Henneken M., Dörner T., Burmester G.R., Berek C. Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthr Res Ther* 2005;7:R1001–R1013.
- Kessel A., Snir A., Toubi E. The role of B cells in immunoregulation. In: Conrad K., Chan E.K.L., Fritzler M.J. et al. From pathogenesis to therapy of autoimmune diseases. Report on the 9th Dresden symposium on autoantibodies held in Dresden on September 2–5, 2009. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity. Vol.6. 2009. Lengerich–Berlin–Bremen–Miami–Riga–Viernheim–Wien–Zagreb: Past Science Publishers, 2009;523–30.
- Wolf S.D., Dittel B.N., Hardardottir F., Janeway C.A.Jr.

- Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med* 1996;184:2271–8.
24. Mizoguchi A., Bhan A.K. A case for regulatory B cells. *J Immunol* 2006;176:705–10.
 25. Jamin C., Morva A., Lemoine S. et al. Regulatory B lymphocytes in humans: a potential role in autoimmunity. *Arthr Rheum* 2008;58:1900–6.
 26. Amu S., Tarkowski A., Dörner T. et al. The human immunomodulatory CD25⁺ B cell population belongs to the memory B cell pool. *Scand J Immunol* 2007;66:77–86.
 27. Taylor P.C., Quattrocchi E., Mallett S. et al. Ofatumumab, a fully human anti-CD20 monoclonal antibody, in biological-naïve, rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Ann Rheum Dis* 2011;70:2119–25.
 28. Rigby W., Tony H.P., Oelke K. et al. Safety and efficacy of ocrelizumab in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: results of a forty-eight-week randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase III trial. *Arthr Rheum* 2012;64:350–9.
 29. Van Vollenhoven R.F., Kinnman N., Vincent E. et al. Atacicept in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: results of a phase II, randomized, placebo-controlled trial. *Arthr Rheum* 2011;63:1782–92.
 30. Einfeld D.A., Brown J.P., Valentine M.A. et al. Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains. *EMBO J* 1988;7:711–7.
 31. Valentine M.A., Meier K.E., Rossie S. et al. Phosphorylation of the CD20 phosphoprotein in resting B lymphocytes. Regulation by protein kinase C. *J Biol Chem* 1989;264:11282–7.
 32. Stashenko P., Nadler L.M., Hardy R. et al. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol* 1980;125:1678–85.
 33. Tedder T.F., Boyd A.W., Freedman A.S. et al. The B cell surface molecule B1 is functionally linked with B cell activation and differentiation. *J Immunol* 1985;135:973–9.
 34. Leget G.A., Czuczman M.S. Use of rituximab, the new FDA-approved antibody. *Curr Opin Oncol* 1998;10:548–51.
 35. Edwards J.C., Szczepanski L., Szechinski J. et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004;350:2572–81.
 36. Emery P., Fleischmann R., Filipowicz-Sosnowska A. et al. The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthr Rheum* 2006;54:1390–400.
 37. Cohen S.B., Emery P., Greenwald M.W. et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy. Results of multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthr Rheum* 2006;54:2793–806.
 38. Leandro M.J., Cambridge G., Ehrenstein M.R., Edwards J.C.W. Reconstitution of peripheral blood B cell after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 2006;54:613–20.
 39. Roll P., Palanichamy A., Kneitz C. et al. Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 2006;54:2377–86.
 40. Roll P., Dörner T., Tony H.-P. Anti-CD20 therapy in patients with rheumatoid arthritis: predictors of response and B cell subset regeneration after repeated treatment. *Arthr Rheum* 2008;58:1566–75.
 41. Looney R.J. Update on the use of rituximab for intractable rheumatoid arthritis. *Open Access Rheumatol Res Rev* 2009;1:83–94.
 42. De Vita S., Zaja F., Sacco S. et al. Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells. *Arthr Rheum* 2002;46:2029–33.
 43. Leandro M.J., Edwards J.C., Cambridge G. Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion. *Ann Rheum Dis* 2002;61:883–8.
 44. Breedveld F., Agarwal S., Yin M. et al. Rituximab pharmacokinetics in patients with rheumatoid arthritis: B-cell levels do not correlate with clinical response. *J Clin Pharmacol* 2007;47:1119–28.
 45. Dass S., Rawstron A.C., Vital E.M. et al. Highly sensitive B cell analysis predicts response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 2008;58:2993–9.
 46. Vital E.M., Dass S., Rawstron A.C. et al. Management of non-response to rituximab in rheumatoid arthritis: predictors and outcome of re-treatment. *Arthr Rheum* 2010;62:1273–9.
 47. Vital E.M., Rawstron A.C., Dass S. et al. Reduced-dose rituximab in rheumatoid arthritis: efficacy depends on degree of B cell depletion. *Arthr Rheum* 2011;63:603–8.
 48. Sellam J., Rouanet S., Hendl-Chavez H. et al. Blood memory B cells are disturbed and predict the response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 2011;63:3692–701.
 49. Brezinschek H.-P., Rainer F., Brickmann K., Graninger W.B. B lymphocyte-typing for prediction of clinical response to rituximab. *Arthr Res Ther* 2012;14:R161.
 50. Möller B., Aeberli D., Egli S. et al. Class-switched B cells display response to therapeutic B-cell depletion in rheumatoid arthritis. *Arthr Res Ther* 2009;11:R62.
 51. Teng Y.K., Levarht E.W., Toes R.E. et al. Residual inflammation after rituximab treatment is associated with sustained synovial plasma cell infiltration and enhanced B cell repopulation. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1011–6.
 52. Nakou M., Katsikas G., Sidiropoulos P. et al. Rituximab therapy reduced activated B cell in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory B cell correlates with clinical response. *Arthr Res Therapy* 2009;11:R131.
 53. Rehnberg M., Amu S., Tarkowski A. et al. Short- and long-term effects of anti-CD20 treatment on B cell ontogeny in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis. *Arthr Res Ther* 2009;11:R123.
 54. Vancsa A., Szabo Z., Szamosi S. et al. Longterm effects of rituximab on B cell counts and autoantibody production in rheumatoid arthritis: use of high-sensitivity flow cytometry for more sensitive assessment of B cell depletion. *J Rheumatol* 2013;40:565–71.
 55. Fonseca J.E., Santos M.J., Canha H., Choy E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun Rev* 2009;8:538–42.
 56. Madhok R., Crilly A., Watson J., Capell H.A. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis* 1993;52:232–4.
 57. Houssiau F.A., Devogelaer J.P., van Damme J. et al. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthr Rheum* 1988;31:784–8.
 58. Kotake S., Sato K., Kim K.J. et al. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *J Bone Miner Res* 1996;11:88–95.
 59. Dayer J.M., Choy E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:15–24.
 60. Ballara S., Taylor P.C., Reusch P. et al. Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis. *Arthr Rheum* 2001;44:2055–64.
 61. Emery P., Keystone E., Tony H.P. et al. IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologics: results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial [published erratum appears in *Ann Rheum Dis* 2009;68:296]. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1516–23.
 62. Roll P., Muhammad K., Schumann M. et al. In vivo effects of the anti-interleukin-6 receptor inhibitor tocilizumab on the B cell compartment. *Arthr Rheum* 2011;63:1255–64.
 63. Mahmood Z., Muhammad Kh., Roll P. et al. IL-6 receptor inhibition by Tocilizumab modulates double negative (CD19IgD-CD27) B Cells in RA [abstract]. *Arthr Rheum* 2012;64(Suppl 10):1762.