

# Динамика субпопуляции В-лимфоцитов у больных системной красной волчанкой на фоне терапии генно-инженерными биологическими препаратами

Меснянкина А.А.<sup>1</sup>, Соловьев С.К.<sup>1</sup>, Александрова Е.Н.<sup>1</sup>, Алексанкин А.П.<sup>1</sup>, Супоницкая Е.В.<sup>1</sup>, Елонаков А.В.<sup>2</sup>, Асеева Е.А.<sup>1</sup>, Насонов Е.Л.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва, Россия; <sup>2</sup>ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва, Россия; <sup>3</sup>ФГАОВ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, кафедра ревматологии Института профессионального образования, Москва, Россия  
<sup>1</sup>115522 Москва, Каширское шоссе, 34А; <sup>2</sup>129110 Москва, ул. Щепкина 61/2; <sup>3</sup>119991 Москва, ул.Трубецкая, 8, стр.2

<sup>1</sup>V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia;  
<sup>2</sup>M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia;  
<sup>3</sup>Department of Rheumatology, Institute of Professional Education, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia  
<sup>1</sup>34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522; <sup>2</sup>61/2, Shchepkin St., Moscow 129110; <sup>3</sup>8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991

**Контакты:** Анна Александровна Меснянкина;  
a.a.mesnyankina@gmail.com

**Contact:**  
Anna Mesnyankina;  
a.a.mesnyankina@gmail.com

Поступила 29.03.17

**Цель исследования** – изучить исходный уровень и динамику субпопуляций В-клеток в периферической крови больных системной красной волчанкой (СКВ) в сопоставлении с клиническими проявлениями заболевания на фоне терапии ритуксимабом (РТМ) и белимумабом (БЛМ).

**Материал и методы.** Пациенты с достоверным диагнозом СКВ, с высокой и средней степенью активности заболевания по индексу SLEDAI-2K (n=49), разделены на три группы: 40 больных получали РТМ, 5 пациентам назначался БЛМ, 4 больных проводилась комбинированная терапия (двойная анти-В-клеточная терапия) РТМ + БЛМ. Определение субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови методом многоцветной проточной цитофлюориметрии с использованием панели моноклональных антител к поверхностным мембранным маркерам В-лимфоцитов и клинико-иммунологическое обследование больных проводились до начала терапии генно-инженерными биологическими препаратами и каждые 3 мес в течение года.

**Результаты и обсуждение.** Пациенты с высокой активностью СКВ (SLEDAI-2K 18±5) и поражением жизненно важных органов, как правило, имели более высокие уровни двойных негативных клеток «памяти» (r=0,52; p<0,001) при относительно низких количествах наивных В-клеток (r=-0,54; p<0,0007), по сравнению с больными без тяжелой органной патологии (SLEDAI-2K 8±2). Терапия РТМ к 3-му месяцу наблюдения приводила к заметному уменьшению количества наивных и двойных негативных В-клеток «памяти», в меньшей степени – «непереклоченных» и «переклоченных» В-клеток «памяти». Быстрое восстановление числа В-клеток «памяти» и плазмобластов после курса РТМ к 6-му месяцу от начала терапии должно оцениваться как предиктор раннего обострения СКВ. У всех 5 пациентов, получающих БЛМ на различных этапах контроля, наблюдалось уменьшение клинико-лабораторных признаков активности СКВ, а также угнетение наивных В-клеток, плазматических клеток и плазмобластов. Двойная анти-В-клеточная терапия наиболее эффективно обеспечивала снижение активности заболевания к 3-му месяцу, пролонгировала достигнутую ремиссию, способствовала достижению и сохранению низкого уровня В-лимфоцитов на последующих этапах контроля, дальнейшему сокращению количества плазмобластов и плазматических клеток, препятствовала синтезу аутоантител.

**Заключение.** Оценка динамики субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови предоставляет новые возможности в определении нарушения функции и регуляции клеточного иммунитета у больных СКВ, может быть полезным диагностическим параметром для мониторинга аутоиммунного заболевания, а также являться ценным инструментом в оценке и прогнозировании ответа.

**Ключевые слова:** В-лимфоциты; системная красная волчанка; лечение; ритуксимаб; белимуаб.

**Для ссылки:** Меснянкина АА, Соловьев СК, Александрова ЕН и др. Динамика субпопуляции В-лимфоцитов у больных системной красной волчанкой на фоне терапии генно-инженерными биологическими препаратами. Научно-практическая ревматология. 2017;55(3):252–260.

## THE TIME COURSE OF CHANGES IN B LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS DURING THERAPY WITH BIOLOGICAL AGENTS

Mesnyankina A.A.<sup>1</sup>, Solovyev S.K.<sup>1</sup>, Aleksandrova E.N.<sup>1</sup>, Aleksankin A.P.<sup>1</sup>, Suponitskaya E.V.<sup>1</sup>, Elonakov A.V.<sup>2</sup>, Aseeva E.A.<sup>1</sup>, Nasonov E.L.<sup>1,3</sup>

**Objective:** to study the baseline level and time course of changes in peripheral blood B cell subpopulations in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) versus the clinical manifestations of the disease during therapy with rituximab (RTM) and belimumab (BLM).

**Subjects and methods.** 49 patients with a documented diagnosis of SLE and high and moderate SLEDAI-2K values were divided into three groups: 1) 40 patients received RTM, 2) 5 patients took BLM; 3) 4 patients had combination therapy (dual anti-B-cell therapy) with RTM + BLM. Peripheral blood B lymphocyte subpopulations were measured by multicolor flow cytometry using a panel of monoclonal antibodies against surface membrane markers of B lymphocytes; the patients underwent clinical immunological examination before therapy with biological agents and every 3 months during a year.

**Results and discussion.** Patients with high SLE activity (SLEDAI-2K 18±5) and involvement of vital organs had generally higher levels of double negative memory cells (r = 0.52; p < 0.001) with relatively low counts of naive B cells (r=-0.54; p < 0.0007) than those without severe organ pathology (SLEDAI-2K 8±2). RTM therapy at 3 month of follow-up resulted in a noticeable decrease in the number of naive and double negative memory B cells and to a lesser extent in that of non-switched and switched memory B cell. A rapid recovery of the count of memory B cells and plasmablasts after a RTM cycle at 6 months after therapy initiation should be evaluated as a predictor of early exacerbation of SLE. There was a reduction in the clinical and laboratory signs of SLE activity, as well as inhibition of naive B cells, plasma cells, and plasmablasts in all the 5 patients receiving BLM at various stages of follow-up. Dual anti-B cell therapy most effectively reduced disease activity at 3 months, prolonged the achieved remission, contributed to the achievement and maintenance of a low B lymphocyte level at later stages of control, to the further decline in the number of plasmablasts and plasma cells, and prevented the synthesis of autoantibodies.

**Conclusion.** Assessment of the time course of changes in peripheral blood B lymphocyte subpopulations provides new opportunities to identify impaired function and regulation of cellular immunity in patients with SLE, it may be a useful diagnostic parameter to monitor an autoimmune disease and a valuable tool to assess and predict a response.

**Key words:** B lymphocytes; systemic lupus erythematosus; treatment; rituximab; belimumab.

**For reference:** Mesnyankina AA, Solov'ev SK, Aleksandrova EN, et al. The time course of changes in B lymphocyte subpopulations in patients with systemic lupus erythematosus during therapy with biological agents. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2017;55(3):252-260 (In Russ.).

**doi:** <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2017-252-260>

Системная красная волчанка (СКВ) — аутоиммунное ревматическое заболевание неизвестной этиологии, патогенез которого заключается в нарушении активации Т- и В-лимфоцитов, гиперреактивности В-клеток с неконтролируемым синтезом широкого спектра аутоантител к ядерным антигенам и формированием иммунных комплексов, вызывающих иммуновоспалительное повреждение внутренних органов [1].

Исследования последних лет свидетельствуют о важной роли в развитии и течении заболевания антителопродуцирующих клеток и их предшественников — В-лимфоцитов. В норме В-клетки человека имеют сложный цикл развития, обеспечивающий формирование В-клеточной толерантности к собственным антигенам [2]. Нарушение этих механизмов приводит к формированию аутореактивных клонов В-клеток, синтезирующих антитела к множеству аутоантигенов, среди которых при СКВ доминируют антитела к нативной ДНК (нДНК). Помимо этого, В-лимфоциты участвуют в синтезе цитокинов, а также презентации антигена Т-лимфоцитам [3]. В результате активированные лимфоциты, иммунные комплексы индуцируют воспалительный процесс в тканях. Эти данные обосновывают ведущее значение В-клеток в патогенезе СКВ.

К настоящему времени разработаны и активно применяются в клинической практике генно-инженерные биологические препараты (ГИБП) ритуксимаб (РТМ) и белимуаб (БЛМ), механизм действия которых тем или иным образом направлен на подавление В-лимфоцитов. РТМ и БЛМ неоднократно доказывали свою эффективность у пациентов с тяжелой, рефрактерной к стандартной терапии СКВ [4–7]. Маркерами эффективности такой терапии, как правило, служили степень деплеции В-клеток, динамика клинических и лабораторных признаков активности заболевания, а предиктором обострения являлась репопуляция или сохранение остаточных В-лимфоцитов после курса ГИБП [4–10]. Тем не менее при использовании одинаковых схем лечения у, казалось бы, схожих по клиническому течению больных не всегда удается достигнуть эффекта от терапии и ремиссии заболевания, равно как и восстановление пула CD19+ В-лимфоцитов не всегда означает рецидив СКВ.

Вполне закономерно нарастает интерес к изучению конкретных участников патогенеза заболевания, а поскольку В-клетки играют огромную роль в развитии СКВ, определение роли отдельных субпопуляций В-лимфоцитов, а также влияния на них анти-В-клеточных препаратов может иметь большое значение в оценке эффективности терапии и прогнозе. В нескольких клинических исследованиях при изучении развернутой формулы В-клеток у больных с активной формой СКВ был обнаружен ряд закономерных особенностей в базальной характеристике субпопуляций В-лимфоцитов и их динамики после

применения терапии. Так, отмечалось значительное увеличение содержания двойных негативных В-лимфоцитов «памяти», что коррелировало с развитием СКВ, высокой активностью волчаночного нефрита и наличием аутоантител (к нДНК, Sm, рибонуклеопротеину) [11, 12]. Высокие уровни плазматических клеток выявлены у пациентов, позитивных по антителам к Ro, La и Sm, а количество короткоживущих плазматических клеток коррелировало с активностью заболевания. Уровень циркулирующих субпопуляций В-лимфоцитов (наивные В-клетки, В-клетки «памяти» и плазматические клетки) не зависел от возраста или пола больных, однако некоторые авторы считают, что он может зависеть от продолжительности заболевания [8].

РТМ и БЛМ по-разному влияют на В-лимфоциты. Лечение РТМ, направленное на подавление CD20+ В-лимфоцитов, приводило к быстрому исчезновению наивных и двойных негативных В-лимфоцитов «памяти», резидуальными клетками оставались преимущественно В-клетки «памяти» и плазматические клетки [13]. Долгосрочный ответ был связан с неполным и медленным восстановлением числа В-лимфоцитов «памяти» и плазмобластов, а их ранняя репопуляция ассоциировалась с обострением [9, 10]. Лечение БЛМ приводило к снижению числа наивных и переходных В-клеток с умеренным уменьшением количества плазматических клеток и ассоциировалось со снижением активности заболевания [14].

Дискуссионным вопросом является схема применения комбинированной терапии ГИБП, заключающаяся в использовании РТМ для получения быстрого эффекта с последующим назначением БЛМ с целью поддержания низкой активности и достижения ремиссии. Перекрывающие друг друга механизмы действия препаратов должны способствовать подавлению большой группы субпопуляций В-лимфоцитов, уменьшению их активности, В-клеточной гиперреактивности и как следствие снижению содержания широкого спектра аутоантител [15–17].

Таким образом, на основании полученных данных были выдвинуты предположения о возможных предикторах эффективности терапии и обострения СКВ на основании подробного анализа клеточных субпопуляций, что в будущем позволит прогнозировать и предупреждать рецидив заболевания.

**Целью** исследования является изучение исходных уровней и динамики субпопуляций В-клеток периферической крови у больных СКВ в сопоставлении с клиническими проявлениями заболевания на фоне терапии РТМ и БЛМ.

#### Материал и методы

В исследование включено 49 пациентов с достоверным диагнозом СКВ высокой и средней степени активно-

сти заболевания, а также 20 здоровых доноров (табл. 1). Девять пациентов с дебютом СКВ ранее не получали терапию по основному заболеванию. Назначение ГИБП было обусловлено высокой активностью заболевания, неэффективностью высоких доз ГК и цитотоксических препаратов, а также наличием сопутствующих заболеваний, ограничивающих возможность применения стандартной терапии.

После проведенного обследования пациенты были разделены на три группы. В первую вошли 40 пациентов, получавших РТМ в дозе 500–2000 мг. Пяти больным второй группы назначался БЛМ в дозе 10 мг/кг массы тела. Четырем больным третьей группы проводилась комбинированная терапия: им вводился РТМ в дозе 1000 мг, а через 3 мес назначался БЛМ по стандартной схеме – 10 мг/кг 1 раз в месяц в течение 8 мес (табл. 2). Во время повторных визитов (через 3, 6, 9 мес) 11 пациентам из первой группы осуществлено плановое введение РТМ в дозе 500–1000 мг.

До введения ГИБП, а затем каждые 3 мес в течение года проводилось клинико-иммунологическое обследование больных и определение субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови. Оценка результатов осуществля-

лась при помощи индексов SLEDAI-2K, BILAG, индекса обострения SFI (умеренное, тяжелое обострение), индекса ответа на терапию SRI.

Исследовали абсолютное количество CD19+ В-клеток, В-клеток «памяти» (CD19+CD27+), «непереключенных» (CD19+IgD+CD27+) и «переключенных» (CD19+IgD-CD27+) В-клеток «памяти», наивных (CD19+IgD+CD27-), транзиторных (CD19+IgD+CD10+CD38++CD27-) В-клеток, плазмобластов (CD19+CD38+++IgD-CD27+CD20-), плазматических клеток (CD19+CD38+), двойных негативных В-клеток (CD19+CD27-IgD-). Все субпопуляции В-клеток определялись в периферической крови методом многоцветной проточной цитофлюориметрии с использованием панели моноклональных антител к поверхностным мембранным маркерам В-лимфоцитов. Оценку результатов четырехцветного окрашивания В-лимфоцитов проводили на проточном цитофлюориметре Beckman Coulter NAVIOS (Beckman Coulter, США). Для каждого анализа подсчитано 50 тыс. событий. В-клеточные популяции идентифицировали с помощью программного обеспечения СХР (Beckman Coulter, США). При гейтировании по горизонтальной и вертикальной осям определяли процентное содержание лимфоцитов (CD45+) и В-клеток (CD19+), а на основании экспрессии поверхностных мембранных маркеров IgD, CD20, CD27, CD38, CD10 и CD138 проводили количественное определение субпопуляций В-клеток (см. табл. 1) [18].

Деплецией CD19+ В-лимфоцитов после курса РТМ считалось снижение их количества ниже 0,5%: 0% – полная деплеция, 0,1–0,5% – частичная деплеция, >0,5% – отсутствие деплеции.

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 двух групп использовался U-критерий Манна–Уитни, результаты представлены в виде медианы (Ме) [25-го; 75-го перцентилей]. Применялись также методы описательной статистики. Корреляционный анализ проводился с использованием рангового коэффициента корреляции Спирмена. Статистическая значимость определялась как  $p < 0,05$ .

### Результаты

**Исходная характеристика субпопуляций В-лимфоцитов.** При подсчете базального количества субпопуляций В-клеток у больных СКВ выявлено высокое процентное и абсолютное содержание наивных, двойных негативных, «переключенных» В-клеток «памяти». В сравнении со здоровыми донорами, обращал на себя внимание более высокий уровень двойных негативных В-клеток и плазматических клеток (табл. 3).

В последующем до начала статистической обработки с целью предоставления точных результатов базального количества В-лимфоцитов у пациентов с СКВ из таблицы исходных данных были исключены 5 больных с предшествующей терапией РТМ, а также 5 пациентов с исходно низким содержанием В-лимфоцитов (CD19+ <3%). Последние имели высокую активность заболевания (трое – с проявлениями васкулита, дигитальных оскольчатых капилляритов, феноменом Рейно; у двоих было поражение кожи, слизистых оболочек, суставов,

**Таблица 1** Характеристика пациентов, включенных в наблюдение

Показатель	Значение
Возраст, годы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	36 [28; 43]
Пол, женщины/мужчины, n	45/4
Длительность заболевания, n	
0–1 год	24
2–9 лет	13
>10 лет	12
SLEDAI-2K, баллы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	15 [10; 18]
SLEDAI-2K, n:	
активность 2-й степени	14
активность 3-й степени	35
BILAG total, Ме [25-й; 75-й перцентили]	17,5 [13; 22]
SLICC/ИП $\geq 1$ , n (%)	20 (40,8)
Поражение органов и систем, n (%):	
люпус-нефрит	18 (36,7)
нейролюпус	5 (10,2)
васкулит	11 (22,4)
поражение кожи	22 (45,9)
поражение слизистых оболочек	17 (34,7)
артрит	23 (47)
серозит	16 (32,6)
гематологические нарушения	25 (51)
Тяжелое поражение внутренних органов и систем (нейролюпус, люпус-нефрит, васкулит), n (%)	29 (59,2)
Предшествующая терапия, n (%):	
не проводилась	9 (18,4)
ГК <30 мг/сут	8 (16,3)
ГК $\geq 30$ мг/сут	32 (65,3)
ПТ ГК	26 (53)
ПТ ЦФ	16 (32,6)
ММФ	6 (12,2)
противомаларийные препараты	28 (57,1)
ВВИГ	8 (16,3)
ГИБП	5 (10,2)

**Примечание.** ПТ – пульс-терапия, ВВИГ – внутривенный иммуноглобулин, ЦФ – циклофосфан, ММФ – микофенолата мофетил, ГК – глюкокортикоиды.

Таблица 2 Проводимая терапия, n

Визит	Всего	РТМ	БЛМ	РТМ+БЛМ	Повторные инфузии РТМ	
					500 мг	1000 мг
Исходно	49	40	5	4		
3 мес	39	30	5	4	1	–
6 мес	33	24	5	4	3	4
9 мес	25	19	3	3	1	2
12 мес	23	19	1	3	–	–

Таблица 3 Базальные уровни субпопуляций В-лимфоцитов у пациентов с СКВ, Me [25-й; 75-й перцентили]

В-лимфоциты	Молекулярные маркеры	Больные СКВ (n=49), процентное соотношение (%) / абсолютные значения (• 10 <sup>9</sup> /л)	Здоровые добровольцы (n=20), процентное соотношение (%) / абсолютные значения (• 10 <sup>9</sup> /л)
Общая популяция В-лимфоцитов	CD19+	9,6 [5,9; 14,6] / 0,13 [0,07; 0,29]	8,5 [7,2; 11,0] / 0,2 [0,1; 0,2]
Наивные (зрелые) В-лимфоциты	CD19+CD27-IgD+	66,4 [52,5; 75,9] / 0,1 [0,04; 0,2]	64,7 [57,6; 72,4] / 0,1 [0,06; 0,1]
В-клетки «памяти»	CD19+CD27+	1,2 [0,8; 1,8] / 0,001 [0,0008; 0,004]	2,2 [1,1; 3,0] / 0,003 [0,001; 0,007]
«Непереключенные» В-клетки «памяти»	CD19+CD27-IgD+	3,4 [1,9; 7,9] / 0,005 [0,002; 0,015]	7,4 [3,7; 11,1] / 0,01 [0,005; 0,02]
«Переключенные» В-клетки «памяти»	CD19+CD27-IgD-	5,9 [2,2; 11,3] / 0,01 [0,004; 0,02]	12,8 [9,3; 17,0] / 0,02 [0,01; 0,04]
Плазматические клетки	CD19+CD38+	0,55 [0,1; 6,3] / 0,0015 [0,0002; 0,008]	0,1 [0,05; 0,1] / 0,0001 [0,00; 0,0002]
Плазмобласты	CD19+CD38+++IgD-CD27+CD20-	0,3 [0,1; 0,6] / 0,00032 [0,0002; 0,0008]	0,1 [0,1; 0,2] / 0,0002 [0,0001; 0,0004]
Двойные негативные В-клетки	CD19+CD27-IgD-	20,8 [12,2; 35,3] / 0,029 [0,0147; 0,05]	13,3 [7,1; 19,3] / 0,02 [0,01; 0,02]

гематологические нарушения; SLEDAI-2K – 12–37 баллов), только двое пациентов имели предшествующую терапию цитостатиками более чем за 1 год до момента включения в исследование, один – проходил ежегодные курсы плазмафереза. Ни один из них не получал ранее ГИБП.

Таким образом, исходное количество В-лимфоцитов оценивалось у 39 пациентов, которые были условно разделены на две группы: с высокой степенью активности заболевания, обусловленной тяжелым поражением внутренних органов и систем (люпус-нефрит, нейролюпус, проявления васкулита; n=24, среднее значение SLEDAI-2K – 18±5, медиана BILAG – 20 [17; 26]) и средней степенью активности заболевания без поражения жизненно важных органов (ЖВО; n=15, среднее значение SLEDAI-2K – 8±2, медиана BILAG – 16 [9; 17]). Эти группы не различались между собой по возрасту и длительности заболевания.

У пациентов с поражением почек, центральной нервной системы, проявлениями васкулита выявлено перераспределение процентного количества субпопуляций в сторону увеличения процентного содержания двойных негативных клеток «памяти» (без поражения ЖВО – 13,6 [10,4; 20,7]%, с поражением ЖВО – 26,3 [18,4; 41,2]%; r=0,52; p<0,001), в то время как уровень наивных В-лимфоцитов был ниже (62 [43; 68]%) по сравнению с больными СКВ без органной патологии (76 [66; 84]%; r=-0,54; p<0,0007; рис. 1). Определялось также некоторое увеличение абсолютного количества наивных В-лимфоцитов у больных без поражения ЖВО, однако статистически достоверных различий не выявлено (p=0,052), что, возможно, обусловлено небольшим числом включенных на настоящий момент больных.

Статистически значимой корреляции содержания антител (в том числе антител к нДНК, Ro, La) и определенных субпопуляций В-клеток у представленных 39 больных выявить не удалось.

Также в группах обнаружены достоверные различия длительности заболевания с момента установления диагноза и начала лечения. Процентное содержание общей популяции CD19+ В-лимфоцитов было ниже у пациентов с длительностью заболевания >1 года (n=15; p<0,04; рис. 2).

*Динамика субпопуляций В-лимфоцитов на фоне терапии ритуксимабом. Деpletion – 3-й месяц после введения ГИБП. Степень деpletion В-клеток к 3-му месяцу не зави-*

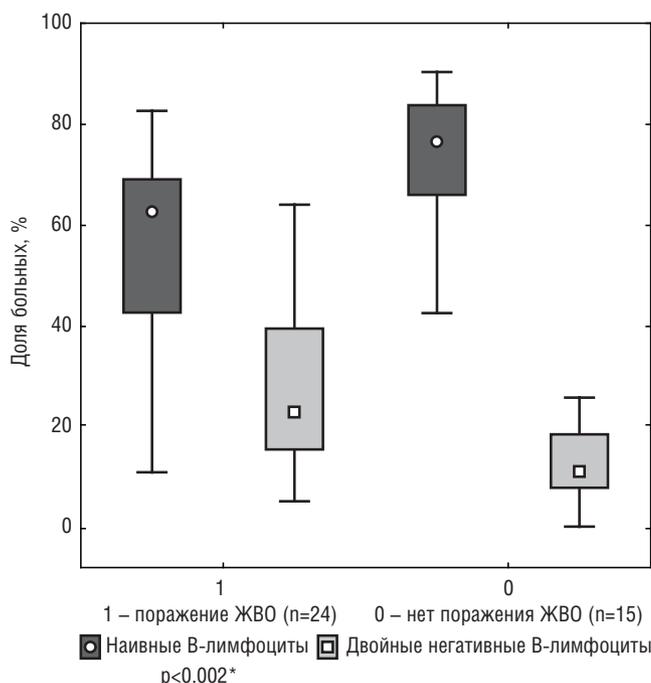
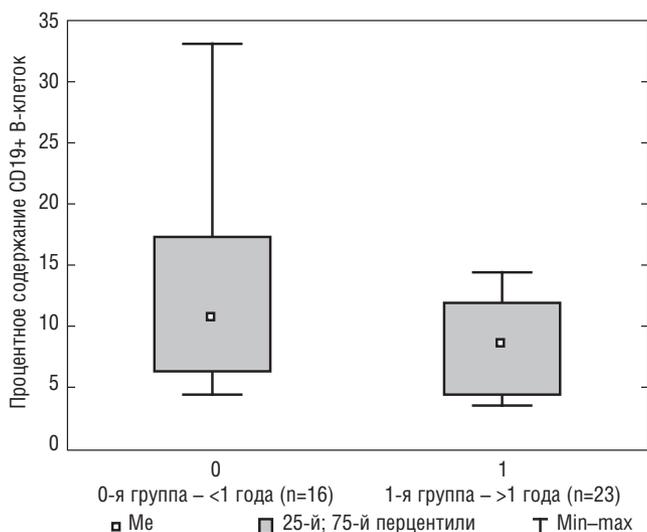


Рис. 1. Процентное содержание наивных и двойных негативных В-лимфоцитов у пациентов с поражением и без поражения ЖВО

села от базального количества определенных субпопуляций В-лимфоцитов, активности СКВ, возраста пациентов и длительности заболевания.

К 3-му месяцу полной деплеции удалось достичь у 53% пациентов, и к 6-му месяцу она сохранялась у 26% больных (табл. 4, рис. 3).

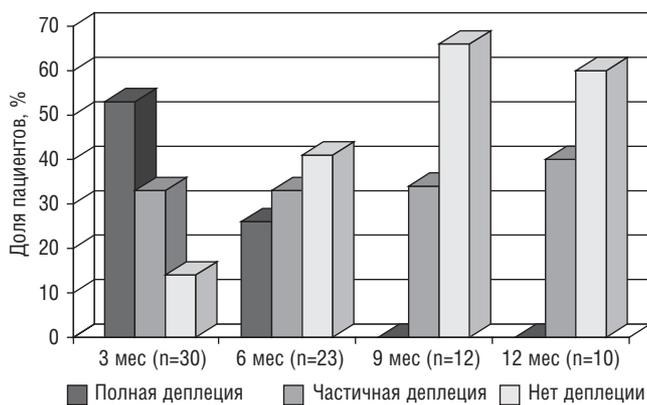
У пациентов с частичной деплецией, ответивших на лечение, к 3-му месяцу после одного курса РТМ отмеча-



**Рис. 2.** Процентное содержание CD19+ В-лимфоцитов у пациентов в дебюте СКВ и у больных с давностью заболевания >1 года (6 [3; 12])

**Таблица 4** Степень деплеции В-лимфоцитов к 3-му месяцу наблюдения, n (%)

Доза РТМ, мг (число больных)	Деплеция к 3-му месяцу наблюдения		
	полная деплеция	частичная деплеция	нет деплеции
500 (n=6)	2 (33)	4 (67)	–
1000 (n=21)	11 (52,4)	6 (28,6)	4 (19)
2000 (n=3)	3 (100)	–	–
Всего (n=30)	16 (53)	10 (33)	4 (14)
С поражением ЖВО	12 (40)	5 (16)	2 (7)
Без поражения ЖВО	4 (13)	5 (16)	2 (7)



**Рис. 3.** Число пациентов, у которых сохраняется деплеция CD19+ В-лимфоцитов (во время последующих визитов исключены пациенты, получившие курс РТМ через 6 и 9 мес)

лось снижение уровней всех субпопуляций В-клеток, такая терапия приводила к быстрому истощению пула наивных и двойных негативных В-клеток «памяти». Резидуальными клетками являлись, главным образом, наивные ( $0,0005 [0,0003; 0,001] \cdot 10^9/\text{л}$ ), «непереключенные» ( $0,00055 [0,00003; 0,001] \cdot 10^9/\text{л}$ ), «переключенные» ( $0,0005 [0,0002; 0,001] \cdot 10^9/\text{л}$ ), двойные негативные В-клетки «памяти» ( $0,0006 [0,0003; 0,001] \cdot 10^9/\text{л}$ ), а их процентное распределение в группе составляло: 19,7 [13,5; 32,7]%, 20,5 [2,5; 30]%, 27,65 [6,7; 52,7]%, 19,7 [14,9; 40]%, соответственно. Следует отметить, что такое соотношение обусловлено более низкой деплецией и сохранением «непереключенных» и, в большей степени, «переключенных» В-клеток «памяти».

У пациентов с отсутствием деплеции выявлено снижение абсолютных значений всех популяций В-клеток по сравнению с базальными уровнями, однако их процентное распределение не отличалось от исходного, а именно – сохранялся сдвиг формулы в сторону увеличения доли наивных и двойных негативных В-клеток (69,7 [43,5; 80,4]%) и 17,6 [12,4; 40,85]%, соответственно). Двое больных с отсутствием деплеции после одного курса РТМ имели неблагоприятные реакции (крапивница, гриппоподобный синдром), у одного пациента ответа на терапию не наблюдалось, и ему продолжено лечение РТМ по 500 мг 1 раз в 3 мес в течение года до достижения деплеции В-лимфоцитов.

Пациенты с частичной и полной деплецией к 3-му месяцу не различались по степени активности заболевания (SLEDAI-2К 6 [2; 10] и 6 [4; 8], BILAG – 8 [0; 12] и 8 [0; 9]) и концентрации антител к нДНК (53,7 [23; 112] и 52,8 [28; 75,4] Ед/мл) соответственно, однако уровни С3с-, С4-компонентов комплемента при полной деплеции были значительно выше, чем при частичной (С3с – 1,04 [0,91; 1,18] и 0,75 [0,67; 0,92] г/л, С4 – 0,18 [0,155; 0,26] и 0,13 [0,1; 0,155] г/л соответственно;  $p < 0,019$ ). Больные с отсутствием деплеции демонстрировали лишь незначительное повышение уровня антител к нДНК (81,1 [31; 190] Ед/мл).

**Репопуляция.** Репопуляция к 6-му месяцу наблюдения отмечалась у 74% больных за счет наивных, «переключенных», «непереключенных» В-клеток «памяти», двойных негативных, в меньшей степени – плазмобластов и плазматических клеток, однако полного восстановления субпопуляций В-лимфоцитов до исходных значений не выявлено ни у одного больного. Пациенты с обострением и без обострения СКВ имели одинаково высокие уровни наивных В-лимфоцитов ( $0,006 [0; 0,008] \cdot 10^9/\text{л}$ ).

У 4 больных с обострением СКВ одновременно с увеличением активности заболевания (SLEDAI-2К – 15 [13; 21]) и повышением уровня антител к нДНК (224 [131; 300]) выявлена более быстрая репопуляция двойных негативных, «непереключенных», «переключенных» В-клеток «памяти», плазмобластов по сравнению с пациентами без раннего обострения ( $0,0035 [0,0019; 0,005]$  и  $0,0005 [0,0; 0,002] \cdot 10^9/\text{л}$ ;  $0,0024 [0,0005; 0,005]$  и  $0,00014 [0,0; 0,00085] \cdot 10^9/\text{л}$ ;  $0,001 [0,0003; 0,0035]$  и  $0,00015 [0,0; 0,001] \cdot 10^9/\text{л}$ ;  $0,000015 [0,000009; 0,00006]$  и  $0,000002 [0; 0,00001] \cdot 10^9/\text{л}$  соответственно; рис. 4).

У двух из трех пациентов с более поздним обострением (>6 мес после введения РТМ) к визитам на 9-м и 12-м месяцах соответственно содержание В-клеток было  $\leq 0,4\%$  от общего числа лимфоцитов, однако обострение у таких

больных наблюдалось после восстановления клеток «памяти» (до  $0,000007$  и  $0,00001 \cdot 10^9/\text{л}$  соответственно) и увеличения количества двойных негативных В-клеток (до  $0,003$  и  $0,001 \cdot 10^9/\text{л}$  соответственно). К 9-му месяцу у одного больного произошла полная репопуляция до исходных значений всех субпопуляций В-клеток, однако обострение в виде усиления кожных высыпаний и повышения иммунологической активности у него выявлено только к 12-му месяцу наблюдения.

**Терапия белимумабом.** БЛМ получали пациенты со средней степенью активности заболевания и высокой иммунологической активностью, без признаков органной патологии. Ответ на терапию в виде постепенного уменьшения клинико-лабораторных показателей активности СКВ (BILAG – 16 [13; 17], 8 [1; 8], 8 [1; 9], 5 [2; 12]; SLEDAI-2K – 8 [8; 10], 6 [5; 8], 6 [4; 8], 5 [4; 7] исходно, через 3, 6, 9 мес соответственно), снижения уровней антител к нДНК (87 [73; 137], 140,9 [55; 144], 73,9 [41,9; 139], 43,7 [42,3; 81] Ед/мл), нарастания концентрации компонентов комплемента у 4 пациентов отмечался в различные периоды наблюдения, и в одном случае сохранялась средняя активность заболевания.

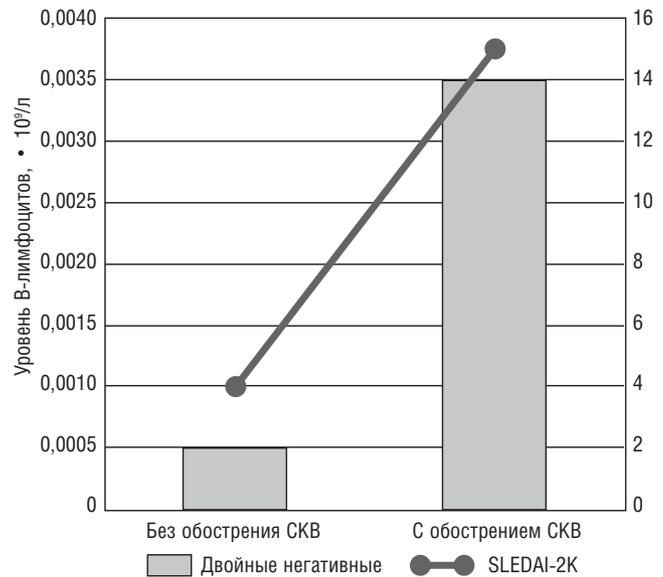
На протяжении 9 мес наблюдения у представленных больных выраженного влияния на уровень CD19+ В-лимфоцитов препарат не оказывал. Изменения субпопуляций В-клеток на фоне терапии БЛМ характеризовались нарастанием числа двойных негативных ( $0,01$  [0,01; 0,044],  $0,02$  [0,01; 0,076],  $0,03$  [0,02; 0,046],  $0,04$  [0,025; 0,075]  $\cdot 10^9/\text{л}$ ), «непереключенных» В-клеток «памяти» ( $0,0017$  [0,001; 0,003],  $0,029$  [0,008; 0,04],  $0,006$  [0,002; 0,03],  $0,025$  [0,007; 0,065]  $\cdot 10^9/\text{л}$ ) с одновременным снижением содержания наивных В-лимфоцитов ( $0,09$  [0,03; 0,105],  $0,02$  [0,02; 0,12],  $0,02$  [0,02; 0,03],  $0,025$  [0,02; 0,065]  $\cdot 10^9/\text{л}$ ), плазматических клеток ( $0,0001$  [0,00007; 0,013],  $0,00006$  [0,00004; 0,029],  $0,00008$  [0; 0,007],  $0$  [0; 0,005]  $\cdot 10^9/\text{л}$ ) и плазмобластов ( $0,0005$  [0,0001; 0,0007],  $0,0003$  [0,0002; 0,0006],  $0$  [0; 0],  $0,0001$  [0,00005; 0,0002]  $\cdot 10^9/\text{л}$ ) исходно, через 3, 6 и 9 мес соответственно (рис. 5).

**Двойная терапия.** Возраст пациентов, которым проводилась комбинированная терапия РТМ и БЛМ, варьировал от 20 до 25 лет. Все больные получали стандартную терапию согласно принятым рекомендациям. Два пациента имели органные поражения (люпус-нефрит, признаки васкулита), два – поражение кожи, суставов, слизистых оболочек.

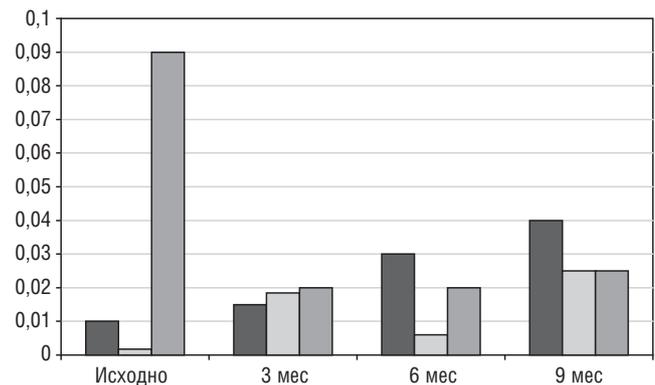
Двойная анти-В-клеточная терапия приводила к быстрому снижению активности заболевания (BILAG и SLEDAI-2K; рис. 6). Благодаря такому эффекту удалось снизить дозу ГК без риска нового обострения ниже 15 мг/сут (в пересчете на преднизолон). К 3-му месяцу полная деплеция достигнута у двух пациентов, частичная деплеция – у одного, и еще у одного деплеции не было. У последней больной на фоне лечения БЛМ количество В-лимфоцитов продолжало снижаться.

Несмотря на восстановление числа В-лимфоцитов к 6-му месяцу, что наблюдалось и при монотерапии РТМ, репопуляция основных групп В-лимфоцитов происходила медленно (рис. 7). К 6-му месяцу выявлена тенденция к сокращению количества плазматических клеток и плазмобластов (к 6-му, 9-му месяцам; рис. 8). Несмот-

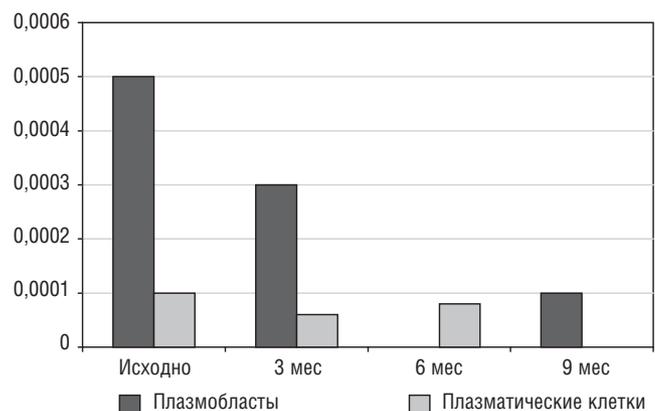
ря на нарастание к 9-му и 12-му месяцам количества CD19+ В-лимфоцитов, обострения СКВ не было ни у одного пациента.



**Рис. 4.** Уровень двойных негативных В-лимфоцитов «памяти» и активность СКВ (SLEDAI-2K) у пациентов с ранним обострением и отсутствием обострения СКВ к 6-му месяцу после введения РТМ



■ Двойные негативные В-лимфоциты  
 □ «Непереключенные» В-лимфоциты  
 ▒ Наивные В-лимфоциты



**Рис. 5.** Динамика абсолютного количества субпопуляций В-клеток на фоне терапии БЛМ ( $\cdot 10^9/\text{л}$ )

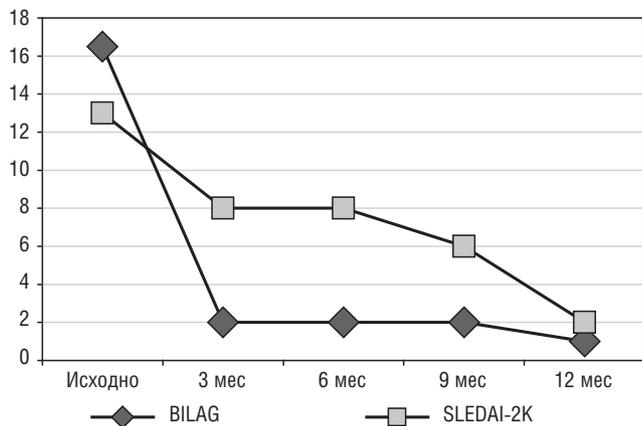


Рис. 6. Динамика активности СКВ по SLEDAI-2K и BILAG

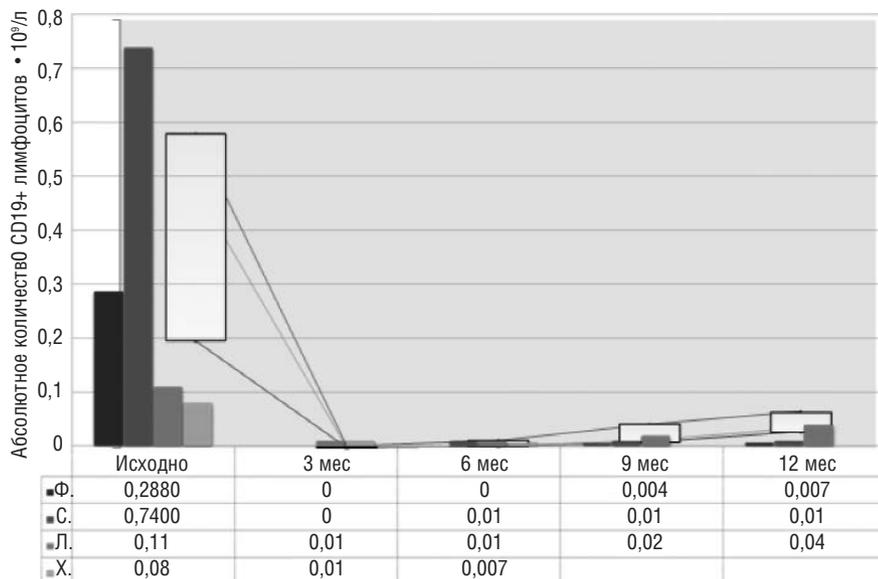


Рис. 7. Динамика абсолютного количества CD19+ лимфоцитов у 4 пациентов (Ф., С., Л., Х.) на фоне комбинированной терапии и лечения РТМ, абсолютные значения  $\cdot 10^9/л$ . Серая шкала – количество CD19+ у пациентов, находящихся на комбинированной терапии РТМ и БЛМ; белая шкала – количество CD19+ у пациентов, находящихся на терапии РТМ (повторных инфузий РТМ в течение наблюдения не было или такие пациенты были исключены в последующем)

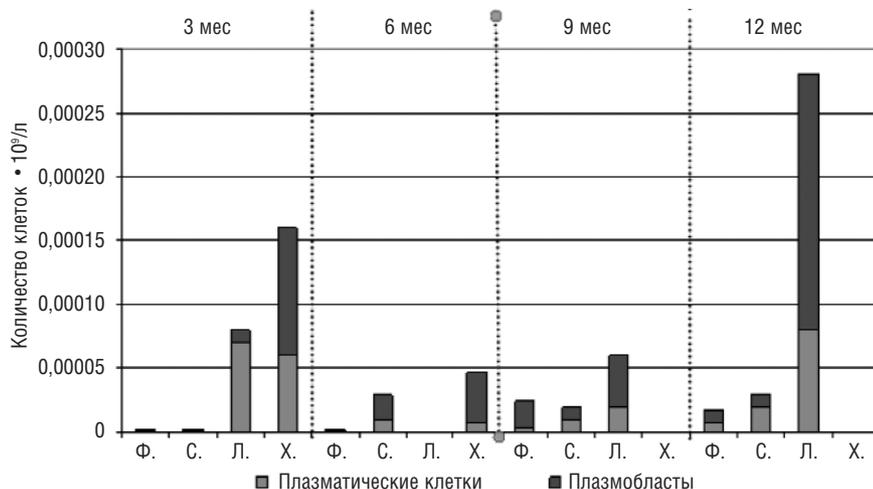


Рис. 8. Количество плазмобластов и плазматических клеток у 4 пациентов, находящихся на комбинированной терапии, в динамике на 3, 6, 9, 12-м месяцах

### Обсуждение

В нашей работе изучались связь между соотношением субпопуляций В-клеток и активностью СКВ, гомеостаз В-клеток на фоне лечения ГИБП, возможность идентификации среди субпопуляций В-клеток потенциальных предикторов ответа, эффективности терапии ГИБП и развития обострения СКВ.

Полученные нами результаты свидетельствуют о значимом увеличении процентного соотношения двойных негативных В-клеток «памяти», что подтверждается данными других авторов [12], а также о снижении количества наивных В-клеток у пациентов с высокой активностью СКВ, обусловленной поражением внутренних органов и систем. Возможно, низкий уровень наивных В-клеток в данном случае обусловлен их усиленным потреблением на последующих этапах развития В-лимфоцитов с нарастанием количества

В-клеток «памяти», антителопродуцирующих клеток (периферической крови и тканевых), что приводит к увеличению синтеза аутоантител, прогрессированию и усилению активности заболевания. Накопление двойных негативных В-клеток у пациентов с СКВ свидетельствует об особой их роли в развитии заболевания, такой феномен подлежит дальнейшему наблюдению и анализу. Таким образом, есть две точки опоры для дополнительного уточнения степени активности заболевания – это снижение количества наивных В-лимфоцитов с увеличением числа двойных негативных В-клеток «памяти», что ассоциируется с высокой активностью СКВ.

У пациентов с длительностью заболевания более 1 года с момента установления диагноза отмечено уменьшение процентного содержания В-лимфоцитов, что, вероятно, связано с проведением длительной иммуносупрессивной терапии (включая лечение цитостатиками и высокие дозы ГК), которая также в некоторой степени влияет на определенные субпопуляции В-клеток.

В динамике нами было обнаружено, что терапия РТМ приводила к деплеции CD19+ В-лимфоцитов к 3-му месяцу у 86% больных, достигших ответа на терапию без признаков рецидива СКВ. Такие результаты у данной группы были достигнуты благодаря эффективному уничтожению наивных, двойных негативных В-клеток, даже при относительном сохранении и меньшей степени деплеции «непереключенных» и «переключенных» В-клеток «памяти», что может объяснять сохраняющиеся повышенными титры аутоантител после терапии ГИБП.

Малое количество пациентов, у которых было зафиксировано обострение заболевания, не позволяет на настоящий момент выявить определенные предикторы обострения в отношении репопуляции определенных субпопуляций В-клеток. Значительное восстановление наивных В-лимфоцитов и их большее количество по сравнению с другими субпопуляциями выявлено у большинства пациентов, однако признаков обострения СКВ не зафиксировано. С другой стороны, больные с ранним рецидивом имели более высокие уровни различных групп клеток «памяти» и плазмобластов. Таким образом, настороженность в отношении обострения заболевания должна возникнуть при быстром восстановлении (к 6-му месяцу наблюдения) количества двойных негативных, «непереклоченных», «переклоченных» В-клеток «памяти», плазмобластов. Низкая частота обострений у представленных больных обусловлена периодическим плановым повторным проведением лечения РТМ в дозе 500–1000 мг.

В нашем исследовании также был показан эффект БЛМ, при назначении которого отмечалось угнетение наивных, плазматических клеток и плазмобластов с одновременным снижением клинико-иммунологической активности, что подтверждается данными других авторов [14], однако такая терапия не оказывала существенного влияния на В-лимфоциты «памяти».

Двойная анти-В-клеточная терапия способствовала быстрому снижению клинико-иммунологической активности заболевания, которая оценивалась по BILAG и SLEDAI-2K. Обострения СКВ за 12 мес динамического контроля не было ни у одного пациента. Анализ субпопуляций В-лимфоцитов демонстрировал более медленную репопуляцию В-клеток, а также продолжающееся сокращение количества плазматических клеток и плазмобластов к 6, 9, 12-му месяцам после введения РТМ, что было достигнуто благодаря таргетному действию БЛМ на эти клетки.

В данной статье также в отдельную группу были выделены 5 пациентов без предшествующей терапии ГИБП, с высокой клинико-иммунологической активностью СКВ в сочетании с исходно низким содержанием В-лимфоцитов (CD19+ <3%). У всех проводилось лечение РТМ. В данной подгруппе эффективность РТМ была существенно ниже, чем у остальных больных. Тем не менее в 4 случаях мы наблюдали некоторое клиническое улучшение. У двух из этих пациентов (у одной из которых выявлялся васкулит) положительная динамика клинических симптомов (уменьшение кожных высыпаний, артритов и артралгий) сопровождалось снижением уровня антител к нДНК, тем не менее отмечалось быстрое нарастание иммунологических показателей крови до исходных значений (антител к нДНК Ед/мл >300 к 6-му месяцу), которое сопровождалось усугублением клинической симптоматики СКВ. У двух других больных с явлениями васкулита отмечалась положительная динамика со стороны клинических проявлений СКВ, тем не менее к 3-му и 6-му месяцам наблюдения зафиксировано обострение заболевания, даже несмотря на применение высоких доз цитостатиков, ГК. При анализе данных еще одной пациентки не выявлено какой-либо положительной динамики в отношении клинико-лабораторных показателей активности СКВ. Вероятнее всего, у таких больных механизм патологического процесса связан в большей степени с ак-

тивацией и воздействием цитотоксических Т-клеток и иммунных комплексов и требует дальнейшего дополнительного анализа. Таким образом, низкий базальный уровень В-лимфоцитов у больных, не получавших ранее ГИБП, может быть связан с повышенным риском раннего обострения и тяжелого течения СКВ.

### Выводы

В сравнении со здоровыми добровольцами, больные СКВ обладают большим количеством двойных негативных В-клеток и плазматических клеток.

Пациенты с высокой активностью СКВ и поражением ЖВО, как правило, имеют более высокие уровни двойных негативных клеток «памяти» при относительно низких количествах наивных В-клеток по сравнению с больными со средней активностью заболевания.

Терапия РТМ приводит к заметному уменьшению количества наивных и двойных негативных В-клеток «памяти», в меньшей степени — «непереклоченных» и «переклоченных» В-клеток «памяти».

Быстрое восстановление числа В-клеток «памяти» (двойных негативных, «непереклоченных», «переклоченных») и плазмобластов после курса РТМ должно рассматриваться как предиктор раннего обострения СКВ.

Уменьшение клинико-лабораторных признаков активности СКВ на фоне лечения БЛМ связано с угнетением наивных В-клеток, плазматических клеток и плазмобластов.

Двойная анти-В-клеточная терапия наиболее эффективно обеспечивает снижение активности заболевания, пролонгирует достигнутую ремиссию без необходимости применения высоких доз ГК, пульс-терапии, иммуносупрессивной терапии, тем самым снижая риск формирования необратимых органных повреждений. Наблюдение в течение года не показало отрицательных результатов комбинированной терапии РТМ и БЛМ. Неблагоприятные реакции не зарегистрированы.

Двойная анти-В-клеточная терапия способствует достижению и сохранению низкого уровня В-лимфоцитов, дальнейшему сокращению количества плазмобластов и плазматических клеток, а следовательно, препятствует синтезу аутоантител.

Парадигма современной медицины — персонифицированный подход к терапии, в связи с этим необходимо продолжать поиски клинико-биологических субтипов СКВ. Полученные нами данные, возможно, позволят в будущем выявить среди пациентов с СКВ так называемых «ответивших» и «не ответивших» на применение ГИБП. В этом отношении роль динамики субпопуляций В-лимфоцитов трудно переоценить, поскольку именно эти иммунокомпетентные клетки являются основной мишенью РТМ и, опосредованно, БЛМ.

### Прозрачность исследования

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

### Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

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

## ЛИТЕРАТУРА

- Насонов ЕЛ, Насонова ВА, редакторы. Ревматология: Национальное руководство. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2008 [Nasonov EL, Nasonova VA, editors. *Revmatologiya: Natsional'noe rukovodstvo* [Rheumatology: National guidelines]. Moscow: GEOTAR-Media; 2008].
- Halverson R, Torres RM, Pelanda R. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat Immunol.* 2004;5(60):645-50. doi: 10.1038/ni1076
- Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, et al. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med.* 1999;189:1639-48. doi: 10.1084/jem.189.10.1639
- Looney RJ, Anolik JH, Campbell D, et al. B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum.* 2004;50(8):2580-9. doi: 10.1002/art.20430
- Vigna-Perez M, Hernandez-Castro B, Paredes-Saharopulos O, et al. Clinical and immunological effects of Rituximab in patients with lupus nephritis refractory to conventional therapy: a pilot study. *Arthritis Res Ther.* 2006;8:83. doi: 10.1186/ar1954
- Цанян МЭ, Соловьев СК, Торгашина АВ и др. Эффективность терапии ритуксимабом у больных рефрактерной к стандартной терапии системной красной волчанкой при длительном динамическом наблюдении. Научно-практическая ревматология. 2014;52(2):159-68 [Tsanyan ME, Soloviev SK, Torgashina AV, et al. Rituximab treatment efficacy in patients with systemic lupus erythematosus refractory to standard therapy in the long-term follow-up. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice.* 2014;52(2):159-68 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2014-159-168
- Асеева ЕА, Соловьев СК, Меснянкина АА и др. Опыт применения белимумаба у больных системной красной волчанкой. Научно-практическая ревматология. 2015;53(3):329-35 [Aseeva EA, Soloviev SK, Mesnyankina AA, et al. Experience with belimumab in patients with systemic lupus erythematosus. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice.* 2015;53(3):329-35 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2015-329-335
- Jacobi AM, Odendahl M, Reiter K, et al. Correlation between circulating CD27(high) plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2003;48:1332-42. doi: 10.1002/art.10949
- Vital EM, Dass S, Buch MH, et al. B cell biomarkers of rituximab responses in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2011;63:3038-47. doi: 10.1177/0961203309350752
- Anolik JH, Barnard J, Owen T, et al. Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. *Arthritis Rheum.* 2007;56:3044-56. doi: 10.1002/art.22810
- Wei C, Anolik J, Cappione A, et al. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2007;178:6624-33. doi: 10.4049/jimmunol.178.10.6624
- Iwata S, Tanaka Y. B-cell subsets, signaling and their roles in secretion of autoantibodies. *Lupus.* 2016 Jul;25(8):850-6. doi: 10.1177/0961203316643172
- Anolik JH, Barnard J, Cappione A. Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004;50(11):3580-90. doi: 10.1002/art.20592
- Jacobi AM, Huang W, Wang T, et al. Effect of long-term belimumab treatment on B cells in systemic lupus erythematosus: extension of a phase II, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. *Arthritis Rheum.* 2010;62(1):201-10. doi: 10.1002/art.27189
- Bekar KW, Owen T, Dunn R, et al. Prolonged effects of short-term anti-CD20 B cell depletion therapy in murine systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2010;62:2443-57. doi: 10.1002/art.27515
- Wei Yu Lin, Seshasayee D, Lee WP, et al. Dual B cell immunotherapy is superior to individual anti-CD20 depletion or BAFF blockade in murine models of spontaneous or accelerated lupus. *Arthritis Rheum.* 2015;67(1):215-24. doi: 10.1002/art.38907
- Kraaij T, Huizinga TW, Rabelink TJ, et al. Belimumab after rituximab as maintenance therapy in lupus nephritis. *Rheumatology.* 2014;53:2122-4. doi: 10.1093/rheumatology/keu369. Epub 2014 Sep 8.
- Супоницкая ЕВ, Алексанкин АП, Александрова ЕН и др. Определение субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови методом проточной цитофлуорометрии у здоровых лиц и больных ревматическими заболеваниями. Клиническая лабораторная диагностика. 2015;60(6):30-3 [Suponickaja EV, Aleksankin AP, Aleksandrova EN, et al. Determination of subpopulations of peripheral blood B-lymphocytes by flow cytometry in healthy individuals and patients with rheumatic diseases. *Klinicheskaja Laboratornaja Diagnostika.* 2015;60(6):30-3 (In Russ.)].