

Субпопуляции В-лимфоцитов у больных ревматоидным артритом и влияние на них ингибитора рецепторов интерлейкина 6

Герасимова Е.В.¹, Попкова Т.В.¹, Алексанкин А.П.¹, Мартынова А.В.¹, Насонов Е.Л.^{1,2}

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), кафедра ревматологии Института профессионального образования, Москва, Россия
¹115522 Москва, Каширское шоссе, 34А;
²119991 Москва, ул. Трубетцкая, 8, стр. 2

¹V.A. Nasonova
 Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia; ²Department of Rheumatology, Institute of Professional Education, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia
¹34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522; ²8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991

Контакты: Елена Владимировна Герасимова;
 gerasimovaev@list.ru

Contact: Elena Gerasimova;
 gerasimovaev@list.ru

Поступила 05.07.18

При хорошо изученной клинической эффективности и безопасности данные о влиянии терапевтического ингибирования интерлейкина 6 (ИЛ6) на В-клетки малочисленны и противоречивы. Предварительные сообщения показали, что функция В-клеток и гуморальный иммунный ответ могут быть модулированы под влиянием ингибитора рецепторов ИЛ6.

Цель исследования – оценить влияние 12-месячной терапии тоцилизумабом (ТЦЗ) на фенотип В-клеток и экспрессию генов при РА и проанализировать связь между субпопуляциями В-клеток и активностью РА. **Материал и методы.** Обследовано 24 пациента с РА (20 женщин и 4 мужчины); медиана возраста составила 55 [49; 64] лет; продолжительности болезни – 72 [24; 108] мес; DAS28 – 5,8 [5,3; 6,3]; все больные были серопозитивны по ревматоидному фактору (РФ), 87% – по антителам к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП). Пациенты получали ТЦЗ из расчета 8 мг/кг каждые 4 нед. После 12 мес лечения согласно критериям эффективности EULAR (DAS28) хороший эффект был достигнут у 54%, удовлетворительный – у 46% больных РА. Контрольная группа состояла из 29 добровольцев (21 женщина и 8 мужчин; медиана возраста – 58,5 [53,0; 62,0] года).

Имунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводили при включении в исследование и через 12 мес. Абсолютное и относительное количество CD19+В-лимфоцитов, В-клеток памяти (CD19+CD27+), непереключенных (CD19+IgD+CD27+) и переключенных (CD19+IgD-CD27+) В-клеток памяти, наивных (CD19+IgD+CD27-), двойных негативных (CD19+IgD-CD27-), транзиторных (CD19+IgD+CD10+CD38++CD27) В-клеток, плазмочитов (CD19+CD38+) и плазмобластов (CD19+CD38+++IgD-CD27+CD20-) определялось методом многоцветной проточной цитофлуориметрии.

Результаты и обсуждение. У больных РА относительное и абсолютное количество В-клеток памяти (CD19+CD27+) (1,3 [0,9; 1,7]%, 0015 [0,001; 0,003] • 10⁹/л), переключенных В-клеток памяти (CD19+IgD-CD27+) (6,8 [3,6; 11,6]%, 0,01 [0,005; 0,02] • 10⁹/л) и абсолютное число транзиторных В-клеток (CD19+CD38++CD10+IgD+CD27-) (0,00009 [0; 0,00028] • 10⁹/л) оказалось ниже, чем у доноров: 2,2 [1,1; 3,0]%, 0,003 [0,001; 0,007] • 10⁹/л; 12,8 [9,3; 17,0]%, 0,02 [0,01; 0,04] • 10⁹/л; 0,0001 [0; 0,0003] • 10⁹/л соответственно (p<0,05 для всех случаев). Через 12 мес после начала терапии ТЦЗ определялось снижение относительного и абсолютного количества плазмобластов (CD19+CD38+++CD27+IgD-CD20-) с 0,15 [0,1; 0,3] до 0,1 [0,01; 0,1] и с 0,0003 [0,00007; 0,004] • 10⁹/л до 0,0001 [0; 0,0003] • 10⁹/л соответственно (p<0,05).

При этом относительное и абсолютное количество В-клеток памяти (CD19+CD27+) и переключенных клеток памяти (CD19+CD27+IgD-) у пациентов с РА оставалось ниже, чем у доноров: 1,0 [0,7; 1,2] и 2,2 [1,1; 3,0]%; 0,001 [0,006; 0,003] • 10⁹/л и 0,003 [0,001; 0,007] • 10⁹/л; 3,1 [1,1; 4,2] и 12,8 [9,3; 17,0]%; 0,003 [0,002; 0,006] • 10⁹/л и 0,02 [0,01; 0,04] • 10⁹/л соответственно (p<0,05 для всех случаев). Численность других субпопуляций В-лимфоцитов через 12 мес существенно не изменилась. У больных РА при включении в исследование были выявлены корреляции между абсолютным количеством В-клеток памяти (CD19+CD27+) и уровнем С-реактивного белка (r=0,50; p<0,05); абсолютным количеством плазмобластов (CD19+CD38+++CD27+IgD-CD20-) и содержанием РФ (r=0,41 и r=0,52; p<0,05). Корреляций субтипов В-клеток с клинико-лабораторными показателями через 12 мес после назначения ТЦЗ не отмечалось.

Заключение. Имунофенотипирование субтипов В-лимфоцитов периферической крови показало уменьшение относительного и абсолютного количества В-клеток памяти (CD19+CD27+) и переключенных В-клеток памяти (CD19+CD27+IgD-) у больных РА по сравнению со здоровыми донорами. Выявленные корреляции между числом В-клеток памяти, плазмобластов и значениями лабораторных показателей у больных с высокой активностью РА могут свидетельствовать об участии В-лимфоцитов в патогенезе РА. Наблюдалось снижение уровня плазмобластов после 12 мес терапии ТЦЗ.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; ингибитор рецепторов интерлейкина 6; тоцилизумаб; CD19+В-клетки; В-клетки памяти; наивные В-клетки; двойные негативные В-клетки; проточная цитофлуориметрия. **Для ссылки:** Герасимова ЕВ, Попкова ТВ, Алексанкин АП и др. Субпопуляции В-лимфоцитов у больных ревматоидным артритом и влияние на них ингибитора рецепторов интерлейкина 6. Научно-практическая ревматология. 2018;56(6):731-738.

B-LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AND THE EFFECT OF AN INTERLEUKIN-6 RECEPTOR INHIBITOR ON THEM Gerasimova E.V.¹, Popkova T.V.¹, Aleksankin A.P.¹, Martynova A.V.¹, Nasonov E.L.^{1,2}

The clinical efficacy and safety of interleukin-6 (IL-6) receptor blockade have been well studied, but the data on the impact of therapeutic inhibition of IL-6 on B cells are scarce and contradictory. Preliminary reports have shown that B cell function and a humoral immune response may be modulated by an IL-6 receptor inhibitor.

Objective: to assess the effect of 12-month tocilizumab (TCZ) therapy on B-cell phenotype and gene expression in RA and to analyze the association between B-cell subsets and RA activity.

Subjects and methods. Examinations were made in 24 active RA patients (20 women and 4 men) (median age, 55 [49; 64] years; disease duration, 72 [24; 108] months; DAS28 5.8 [5.3; 6.3]; the patients were seropositive for rheumatoid

factor (RF) (100%) and for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies (87.3%). The patients received TCZ 8 mg/kg every 4 weeks. After 12 months of therapy, 54% of patients were categorized as good responders, 46% as moderate responders according to the EULAR response criteria. A control group consisted of 29 volunteers (21 women and 8 men; median age, 58.5 [53.0; 62.0] years).

Peripheral blood lymphocytes were immunophenotyped at the time of enrollment and after 12 months. The absolute and relative counts of CD19+B lymphocytes, memory B cells (CD19+CD27+), non-switched memory B cells (CD19+IgD+CD27+), switched memory B cells (CD19+IgD-CD27+), naive (CD19+IgD+CD27-), double-negative (CD19+IgD-CD27-), transitional (CD19+IgD+CD10+CD38++CD27) B cells, plasma cells (CD19+CD38+), and plasmablasts (CD19+CD38+++IgD-CD27+CD20-) were estimated using multicolor flow cytometry.

Results and discussion. The relative and absolute counts of memory B cells (CD19+CD27+) ($1.3 [0.9; 1.7]\%$, $0015 [0.001; 0.003] \cdot 10^9/l$), switched memory B cells (CD19+IgD-CD27+) ($6.8 [3.6; 11.6]\%$, $0.01 [0.005; 0.02] \cdot 10^9/l$), and the absolute number of transitional B cells (CD19+CD38++CD10+IgD+CD27-) ($0.00009 [0; 0.00028] \cdot 10^9/l$) were found to be lower in RA patients than in donors: $2.2 [1.1; 3.0]\%$, $0.003 [0.001; 0.007] \cdot 10^9/l$; $12.8 [9.3; 17.0]\%$, $0.02 [0.01; 0.04] \cdot 10^9/l$; $0.0001 [0; 0.0003] \cdot 10^9/l$, respectively ($p < 0.05$ for all cases). After 12 months of TCZ therapy initiation, there were decreases in the relative and absolute counts of plasmablasts (CD19+CD38+++CD27+IgD-CD20-) from $0.15 [0.1; 0.3]$ to $0.1 [0.01; 0.1]\%$ and from $0.0003 [0.00007; 0.004] \cdot 10^9/l$ to $0.0001 [0; 0.0003] \cdot 10^9/l$, respectively ($p < 0.05$). At the same time, the relative and absolute counts of memory B cells (CD19+CD27+) and switched memory B cells (CD19+CD27+IgD-) remained lower in RA patients than in donors: $1.0 [0.7; 1.2]$ and $2.2 [1.1; 3.0]\%$; $0.001 [0.006; 0.003] \cdot 10^9/l$ and $0.003 [0.001; 0.007] \cdot 10^9/l$; $3.1 [1.1; 4.2]$ and $12.8 [9.3; 17.0]\%$; $0.003 [0.002; 0.006] \cdot 10^9/l$ and $0.02 [0.01; 0.04] \cdot 10^9/l$, respectively ($p < 0.05$ for all cases). Following 12 months of TCZ therapy, the numbers of other B-cell subpopulations were not considerably altered. When included in the study, the patients with RA showed correlations between the absolute count of memory B cells (CD19+CD27+) and the level of C-reactive protein ($r = 0.50$; $p < 0.05$); between the absolute count of plasmablasts (CD19+CD38+++CD27+IgD-CD20-) and the level of RF ($r = 0.41$ and $r = 0.52$; $p < 0.05$). There were no correlations of B cell subsets with clinical and laboratory findings after 12 months of TCZ initiation.

Conclusion. Immunophenotyping of peripheral blood B lymphocyte subsets showed the lower relative and absolute counts of memory B cells (CD19+CD27+) and switched memory B cells (CD19+CD27+IgD-) in RA patients than in healthy donors. The found correlations between the counts of memory B cells and plasmablasts and the values of laboratory parameters in patients with high RA activity may suggest that B lymphocytes are involved in the pathogenesis of RA. There was a decline in plasmablast levels after 12 months of TCZ therapy.

Keywords: rheumatoid arthritis; interleukin-6 receptor inhibitor; tocilizumab; CD19+ B cells; memory B cells; naive B cells; double negative B cells; flow cytometry.

For reference: Gerasimova EV, Popkova TV, Aleksankin AP, et al. B-lymphocyte subpopulations in patients with rheumatoid arthritis and the effect of an interleukin-6 receptor inhibitor on them. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2018;56(6):731-738 (In Russ.).

doi: 10.14412/1995-4484-2018-731-738

Ревматоидный артрит (РА) – иммуновоспалительное (аутоиммунное) ревматическое заболевание, характеризующееся тяжелым прогрессирующим поражением суставов и внутренних органов, развитие которого определяется сложным взаимодействием факторов внешней среды и генетической предрасположенности, ведущих к глобальным нарушениям в системе гуморального и клеточного иммунитета [1]. В основе развития РА лежит активация В-клеток, которая приводит как к антителозависимым, обуславливающим образование ревматоидного фактора (РФ) и антител к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП), так и неантителозависимым реакциям, включающим стимуляцию артритогенных Т-клеток и продукцию цитокинов [2–4]. Среди широкого спектра «провоспалительных» медиаторов, принимающих участие в патогенезе РА, важная роль принадлежит интерлейкину 6 (ИЛ6) [5, 6]. ИЛ6 – плейотропный цитокин, который синтезируется многими клетками, включая В-лимфоциты [7], и проявляет широкий спектр «провоспалительных» биологических эффектов. Он вызывает поликлональную активацию В-клеток, плазмодитоз и В-клеточную неоплазию [8].

Успех анти-В-клеточной терапии вызвал интерес к изучению влияния на субпопуляции В-лимфоцитов препаратов, направленных против воспалительных медиаторов [9]. Для лечения пациентов с высокой активностью РА с успехом применяются ингибиторы рецепторов ИЛ6, оказывающие быстрый положительный эффект в отношении широкого спектра клинических проявлений и лабораторных нарушений [6]. При хорошо изученной клинической эффективности и безопасности данные об их влиянии на В-клетки малочисленны и противоречивы [10, 11].

Цель настоящей исследования – уточнить влияние ингибитора рецепторов ИЛ6 на основные субпопуляции В-лимфоцитов периферической крови у пациентов с РА.

Материал и методы

В исследование включено 24 пациента (20 женщин и 4 мужчины) с достоверным диагнозом РА, установленным согласно критериям Американской коллегии ревматологов / Европейской антиревматической лиги (ACR/EULAR) 2010 г. Медиана возраста составила 55 [49; 64] лет, длительности РА – 72 [24; 108] мес. Все больные были серопозитивны по IgM РФ, 64% – по АЦЦП. Развернутая стадия РА зафиксирована у 8 (33%), поздняя – у 16 (67%) больных. Больные РА имели высокую степень активности заболевания: медиана DAS28 – 5,8 [5,3; 6,3], SDAI – 31 [24; 34], CDAI – 29 [24; 32] баллов; функциональное состояние пациентов по индексу HAQ – 1,6 [1,3; 2,1]. Внеосновные проявления выявлены у 38% больных. Общая характеристика пациентов с РА представлена в табл. 1.

У 42% пациентов отмечена неэффективность, у 58% – непереносимость предшествовавшей терапии БПВП (МТ, ЛЕФ, ССЗ). При включении в исследование ГК принимали 54% больных, НПВП – 75% (см. табл. 1). Терапия ГИБП до включения в исследование не проводилась. Всем пациентам в течение 12 мес проводилось лечение тоцилизумабом (ТЦЗ) в дозе 8 мг/кг, 11 из них (46%) получали его в виде монотерапии, 13 (54%) – в комбинации с МТ (медиана дозы 17,5 [15; 20] мг/нед). Контрольная группа состояла из 29 здоровых добровольцев (21 женщина и 8 мужчин, медиана возраста 58,5 [53; 62] года).

Для исследования использовали цельную кровь из локтевой вены в количестве 2,7 мл, которую собирали в вакуумную пробирку с добавлением солей ЭДТА в концентрации 1,6 мг/мл (S-monovette, 2,7 ml КЗЕ; Sarstedt, Германия). Иммунофенотипирование В-лимфоцитов периферической крови, включавшее определение В-клеток (CD19+), общей популяции В-клеток памяти (CD19+CD27+), непереключенных (CD19+IgD+CD27+) и переключенных (CD19+IgD-CD27+) В-клеток памяти,

наивных (CD19+IgD+CD27-), двойных негативных клеток (CD19+IgD-CD27) и транзиторных (CD19+IgD+CD10+CD38++CD27-) В-клеток, плазмочитов (CD19+CD38+) и плазмобластов (CD19+CD38+++IgD-CD27+CD20-), проводилось методом многоцветной проточной цитофлуориметрии. Использовались конъюгированные мышиные моноклональные антитела (мАТ): CD19-ECD (R Phycoerythrin-Texas Red®-X, IgG1, фикоэритрин техасский красный); CD45-PC7 (R Phycoerythrin Cyanin 7, IgG1, фикоэритрин цианин 7), CD38-PC5 (R Phycoerythrin Cyanin 5.1, IgG1, фикоэритрин цианин 5.1); CD20-PC5 (Beckman Coulter, США); CD10-PE (IgG1, HI10a), CD27-PE (IgG1, MT271; Becton Dickinson, США), а также человеческие мАТ: IgD-FITC (fluorescein isothiocyanate, IA62, флюоресцеин-изотиоцианат; Becton Dickinson, США). Изотипический (негативный) контроль проводился для определения границ неспецифического связывания рецепторов В-лимфоцитов с мАТ с помощью набора реагентов Simulstest IMK Plus Kit (CD45-FITC, CD14-PE, CD3-FITC, CD19-PE, CD4-FITC, CD8-PE) и IgG1-FITC, IGG2a-PE (Becton Dickinson, США).

Для каждого пациента использовались две полипропиленовые пробирки Coulter (12×75 мм; Beckman Coulter, США). К 50 мкл ($1 \cdot 10^6$ клеток) образцов крови добавляли 5 мкл меченых мАТ и помещали в темное место при комнатной температуре. После 15-минутной инкубации эритроциты лизировали с помощью коммерческого набора IOTest 3 Lysing Solution (Beckman Coulter, США). В полученную суспензию лимфоцитов вносили 50 мкл Flow-Count™ Fluorospheres и проводили оценку результатов пятицветного окрашивания лимфоцитов на анализаторе NAVIOS. Для каждого анализа было подсчитано 50 000 событий. Клеточные популяции идентифицировали с помощью программного обеспечения СХР (Beckman Coulter, США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием компьютерной программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Для параметров, распределение которых отличалось от нормального, при сравнении двух групп использовали U-критерий Манна–Уитни. Результаты представлены в виде медианы (Me) с интер-

квартильным размахом [25-й; 75-й перцентили]. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В отличие от здоровых доноров, у пациентов с РА на момент включения в исследование были выявлены более низкие уровни общей популяции В-клеток памяти (CD19+CD27+) и переключенных В-клеток памяти (CD19+IgD-CD27+; $p < 0,05$; табл. 2, рис. 1 и 2). Кроме того, у пациентов с РА, в отличие от группы контроля, отмечено достоверное снижение абсолютного числа транзитор-

Таблица 1 Общая характеристика пациентов с РА (n=24)

| Показатель | Значение |
|---|------------------|
| Возраст, годы, Me [25-й; 75-й перцентили] | 55 [49; 64] |
| Пол, женщины/мужчины, n (%) | 20 (83) / 4 (17) |
| Длительность заболевания, мес, Me [25-й; 75-й перцентили] | 72 [24; 108] |
| Стадия, n (%): | |
| развернутая | 8 (33) |
| поздняя | 16 (67) |
| Внесуставные проявления, % | 38 |
| DAS28, Me [25-й; 75-й перцентили] | 5,8 [5,3; 6,3] |
| РФ+, % | 100 |
| АЦП+, % | 64 |
| SDAI, Me [25-й; 75-й перцентили] | 31 [24; 34] |
| CDAI, Me [25-й; 75-й перцентили] | 29 [24; 32] |
| HAQ, Me [25-й; 75-й перцентили] | 1,6 [1,3; 2,1] |
| Неэффективность трех и более БПВП, % | 42 |
| Непереносимость БПВП, n (%) | 14 (58) |
| в том числе: | |
| MT | 9 (38) |
| MT+ЛЕФ | 3 (12) |
| MT+ЛЕФ+ССЗ | 2 (8) |
| Прием ГК, % | 54 |
| Прием НПВП, % | 75 |

Примечание. БПВП – базисные противовоспалительные препараты, MT – метотрексат, ЛЕФ – лефлуномид; ССЗ – сульфасалазин, ГК – глюкокортикоиды, НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты. * – $p = 0,03$.

Таблица 2 Численность основных субпопуляций В-лимфоцитов у больных РА и здоровых доноров, (%) / абсолютное количество ($\cdot 10^9/\text{л}$)

| Субпопуляция | Доноры (n=29) | РА (n=24) | |
|---|--|--|--|
| | | исходно | через 12 мес |
| CD19+ В-клетки | 8,5 (7,2–11,0) / 0,2 (0,1–0,2) | 8,4 (6,0–10,5) / 0,11 (0,1–0,2) | 8,7 (7,7–12,1) / 0,15 (0,1–0,3) |
| В-клетки памяти (CD19+CD27+) | 2,2 (1,1–3,0) * / 0,003 (0,001–0,007)* | 1,3 (0,9–1,7) * / 0,0015 (0,001–0,003)* | 1,1 (0,7–1,2) * / 0,001 (0,01006–0,003)* |
| Непереключенные В-клетки памяти (CD19+CD27+IgD+) | 7,4 (3,7–11,1) / 0,01 (0,005–0,02) | 7,5 (5,1–11,4) / 0,01 (0,006–0,01) | 7,0 (4,8–9,9) / 0,01 (0,006–0,01) |
| Переключенные В-клетки памяти (CD19+CD27+IgD-) | 12,8 (9,3–17,0) * / 0,02 (0,01–0,04)* | 6,8 (3,6–11,6) * / 0,01 (0,005–0,02)* | 3,1 (1,1–4,2) * / 0,003 (0,002–0,006)* |
| Двойные негативные В-клетки (CD19+CD27-IgD-) | 13,3 (7,1–19,3) / 0,02 (0,01–0,02) | 15,1 (11,9–18,1) / 0,02 (0,01–0,03) | 11,4 (7,7–18,4) / 0,02 (0,01–0,03) |
| Наивные В-клетки (CD19+CD27-IgD+) | 64,7 (57,6–72,4) / 0,1 (0,06–0,1) | 70,9 (62,5–75,6) / 0,095 (0,07–0,1) | 76,9 (69,3–82,9) * / 0,1 (0,07–0,2) |
| Транзиторные В-клетки (CD19+CD38++CD10+IgD+CD27-) | 0,1 (0–0,1) / 0,0001 (0–0,0003)* | 0 (0–0,1) / 0,00009 (0–0,00028)* | 0,05 (0–0,1) / 0,00003 (0–0,0001) |
| Плазмобласты (CD19+CD38+++CD27+IgD-CD20-) | 0,1 (0,1–0,2) / 0,0002 (0,0001–0,0004) | 0,2 (0,1–0,3)** / 0,0003 (0,0001–0,0004)** | 0,1 (0,01–0,1)** / 0,0001 (0–0,0003)** |

Примечание. * – $p < 0,05$ между донорами и пациентами с РА; ** – $p < 0,05$ между пациентами с РА в начале исследования и после 12 мес терапии ТЦЗ.

ных В-клеток (CD19+CD38++CD10+ IgD+CD27-; $p < 0,05$; рис. 3). Уровни CD19+В-клеток, переключенных В-клеток памяти, наивных В-клеток, двойных негативных В-клеток и плазмобластов у больных РА и доноров достоверно не различались ($p > 0,05$).

У больных РА при включении в исследование была выявлена корреляция между абсолютным числом В-клеток памяти (CD19+CD27+) и концентрацией С-реактивного белка (СРБ) ($r = 0,50$, $p < 0,05$); абсолютным числом плазмобластов (CD19+CD38+++CD27+IgD-CD20-) и уровнем РФ ($r = 0,52$; $p < 0,05$; рис. 4).

После 12 мес терапии ТЦЗ согласно критериям эффективности EULAR (DAS28) хороший эффект достигнут у 54%, удовлетворительный – у 46% больных РА. Отмечено снижение активности РА по индексам DAS28, SDAI, CDAI, острофазовых показателей (СОЭ, СРБ), улучшение функционального состояния пациентов по HAQ. К окончанию исследования у 54% пациентов отмечена ремиссия заболевания (DAS28 $\leq 2,6$), у 46% – низкая активность (DAS28 – 3,2–2,6). Кроме того, в два раза снизилось число больных, получающих ГК (с 54 до 29%; $p > 0,05$), и в три раза – НПВП (с 75 до 25%; $p = 0,05$; табл. 3).

Отмечалось достоверное снижение относительного и абсолютного количества плазмобластов (CD19+CD38+++CD27+IgD-CD20-; $p < 0,05$; см. табл. 2).

Выявленная тенденция к снижению относительного числа переключенных В-клеток памяти (CD19+CD27+IgD-) и общей популяции В-клеток памяти (CD19+CD27+) не достигла статистической значимости ($p > 0,05$). Изменений других субпопуляций В-клеток у больных РА на фоне 12 мес терапии ТЦЗ не наблюдалось.

Анализ исходного уровня субпопуляций В-лимфоцитов, а также их динамики в зависимости от эффективности проводимой терапии и достижения ремиссии или низкой активности заболевания к 12-му месяцу наблюдения каких-либо закономерностей не выявил.

По сравнению с донорами у пациентов с РА к концу исследования сохранялось более низким относительное и абсолютное количество переключенных В-клеток памяти (CD19+CD27+IgD-). У больных РА после 12 мес терапии ТЦЗ зафиксирована более низкая относительная и абсолютная численность общей популяции В-клеток памяти (CD19+CD27+) и высокое процентное содержание наивных В-клеток (CD19+CD27-IgD+) по сравнению с данными показателями здоровых доноров. Численность других субпопуляций В-клеток у пациентов с РА после 12 мес терапии ТЦЗ не отличалась от таковой от контрольной группы.

Корреляций субтипов В-клеток с клинико-лабораторными показателями РА у пациентов в конце наблюдения обнаружено не было.

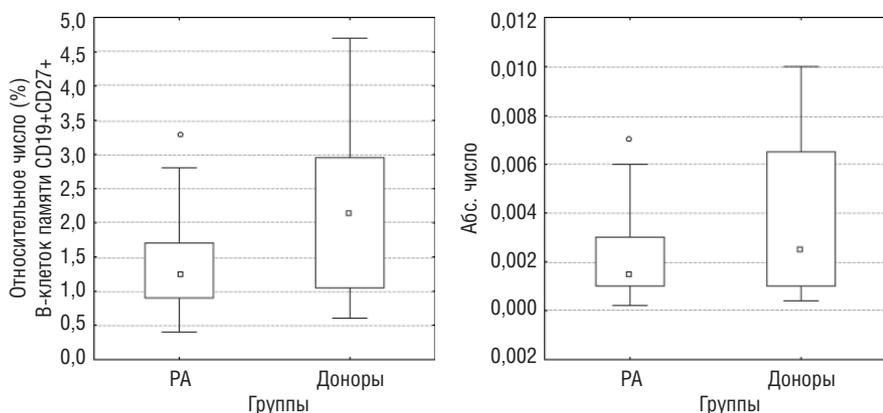


Рис. 1. Сравнение относительного и абсолютного количества В-клеток памяти (CD19+CD27+) у больных РА в начале исследования (n=24) и здоровых доноров (n=29), Ме [25-й; 75-й перцентили]

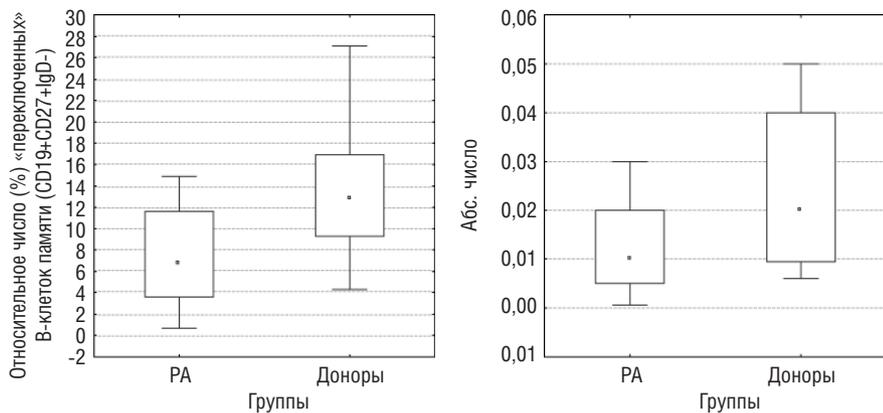


Рис. 2. Сравнение относительного и абсолютного количества переключенных В-клеток памяти (CD19+IgD-CD27+) у больных РА в начале исследования (n=24) и здоровых доноров (n=29), Ме [25-й; 75-й перцентили]

Обсуждение

Участие В-клеток в иммунопатогенезе РА реализуется за счет нескольких взаимосвязанных механизмов: синтез аутоантител и «провоспалительных» цитокинов, антигенпрезентирующей и иммунорегулирующей функций, приводящих к активации аутореактивных Т-клеток [2–4]. Активация В-клеток наблюдается у пациентов с РА уже в «преклиническую» и раннюю стадии болезни [12]. У лиц с высоким риском развития РА отмечена тенденция к ассоциации между позитивностью по АЦЦП

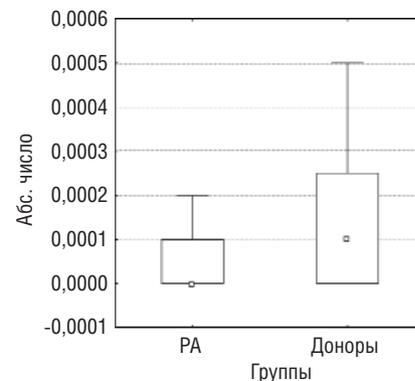


Рис. 3. Сравнение абсолютного числа транзитных В-клеток (CD19+CD38++CD10+IgD+CD27-) у больных РА в начале исследования (n=24) и здоровых доноров (n=29), Ме [25-й; 75-й перцентили]

и увеличением числа CD19+ В-клеток в лимфатических узлах [13]. Показано, что в крови и синовиальной жидкости пациентов с РА присутствуют цитруллинин-реактивные В-клетки [14, 15]. Наиболее важная роль в поддержании хронического воспаления принадлежит В-клеткам памяти, которые обеспечивают быстрый иммунный ответ и выработку большого количества иммуноглобулинов при повторном введении антигена [16, 17]. Полагают, что активация В-клеток при РА происходит в синовиальной оболочке и лимфатических узлах. При высокой активности заболевания отмечается их накопление с изменениями концентраций отдельных субпопуляций в периферической крови [17–19].

В нашем исследовании наблюдалось значимое уменьшение относительной и абсолютной численности общей популяции В-клеток памяти (CD19+CD27+) и переключенных В-клеток памяти (CD27+IgD-) у больных РА по сравнению с донорами при неизменных показателях непереключенных В-клеток памяти (CD27+IgD+) и наивных В-клеток (CD27-IgD+).

Исследование Е.В. Супоницкой и соавт. [20] по иммунофенотипированию субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови у доноров и больных РА выявило снижение процентного содержания общего количества В-клеток памяти (CD19+CD27+; $p=0,038$) у больных РА и отсутствие различий по уровням переключенных и непереключенных В-клеток памяти, наивных и транзитных В-лимфоцитов, плазмобластов. О более низком относительном количестве IgM В-клеток памяти в периферической крови больных РА ($n=22$) по сравнению с донорами свидетельствуют и результаты работы S. Nakayamada и соавт. [21]. В исследовании J. Lübberts и соавт. [22] обнаружено снижение уровней CD27+ В-клеток памяти и активированных CD80+ В-клеток у 89 пациентов с ранним нелеченым РА по сравнению с донорами ($n=37$).

В работе P. Roll и соавт. [10] у больных РА выявлена абсолютная В-клеточная лимфопения, 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. Анализ же относительного количества В-клеток в группе больных РА определил увеличение доли переключенных (CD27+IgD-) и непереключенных (CD19+CD27+) В-клеток памяти, а также уменьшение процентного содержания наивных В-клеток (CD27-IgD+) по сравнению с донорами.

Вклад непереключенных В-клеток памяти (CD19+CD27+IgD+) в развитие РА представляется спорным. Процентное содержание этих клеток в периферической крови у больных РА либо сопоставимо с их уровнем у здорового контроля [18], что согласуется с нашими данными, либо снижено [10, 23].

Напротив, преобладание в В-клеточной субпопуляции двойных негативных В-клеток, которые чаще относятся к В-клеткам памяти [16, 17], может отражать активацию В-клеток при ревматоидном воспалении. Об этом свидетельствует ряд исследований [11, 21, 24], продемонстрировавших увеличение относительного числа этих клеток в популяции В-лимфоцитов периферической крови у больных с высокой активностью РА. Фенотипический анализ двойных негативных В-клеток (CD19+CD27-IgG-) у больных РА ($n=44$) показал, что их

количество было выше, чем в группе здоровых доноров ($n=45$), и они были представлены гетерогенной смесью клеток, экспрессировавших IgA, IgM и, особенно, IgG [24]. В работе португальских исследователей R. Moura и соавт. [11] у пациентов с ранним нелеченым РА ($n=13$) и больных, получающих МТ ($n=20$), также обнаружено увеличение относительного количества двойных негативных В-клеток (CD27-IgD-), относительное и абсолютное число других субтипов В-клеток не отличалось от группы здорового контроля.

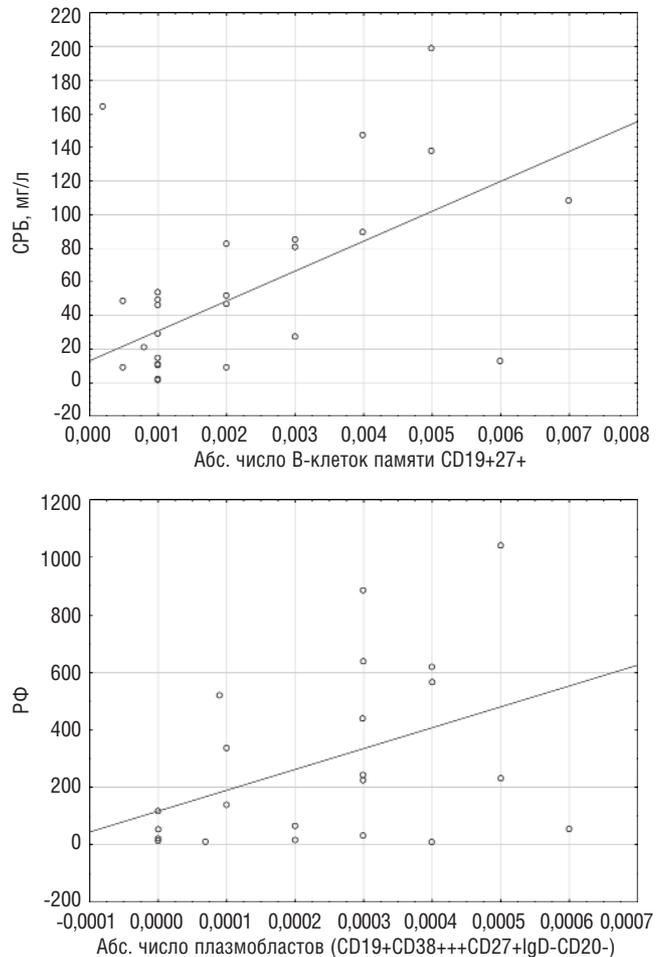


Рис. 4. Корреляции между абсолютным общим содержанием В-клеток памяти и уровнем СРБ, количеством плазмобластов и содержанием РФ у больных РА в начале исследования

Таблица 3. Динамика индексов активности (DAS28, SDAI, CDAI), функционального статуса (HAQ), лабораторных показателей у больных РА на фоне терапии ТЦЗ, Ме [25-й; 75-й перцентили]

| Индекс | Исходно | Через 12 мес |
|-----------------|----------------|------------------|
| DAS28 | 6,2 [5,3; 8,3] | 2,2 [1,8; 2,5] * |
| SDAI | 31 [24; 34] | 5 [3; 6] * |
| CDAI | 29 [24; 32] | 3 [2; 5] * |
| HAQ | 1,6 [1,3; 2,1] | 1,1 [0,9; 1,5] * |
| СОЭ, мм рт. ст. | 50 [30; 67] | 8 [4; 16] * |
| СРБ, мг/л | 28 [11; 82] | 0,5 [0,2; 0,8] * |

Примечание. * – $p<0,05$.

В то же время данные исследования D. Adlowitz и соавт. [17] свидетельствуют об отсутствии увеличения числа В-клеток данного типа в крови больных РА по сравнению с донорами. В нашей работе некоторое увеличение относительного количества двойных негативных В-клеток (CD19+CD27-IgD-), отмечавшееся в периферической крови больных РА по сравнению с донорами, не достигло статистической значимости. Ожидается, что продолжающиеся исследования, в том числе и наше, позволят получить более определенную информацию и выявить признаки активации В-клеток памяти при РА.

Процесс активации и пролиферации В-клеток завершается созреванием и дифференцировкой активированных В-лимфоцитов в плазматические клетки, продуцирующие антитела. Для пациентов с РА не характерно увеличение числа плазмочитов и их предшественников плазмобластов в периферической крови [10]; таких изменений не наблюдалось и в нашем исследовании. В отличие от РА, увеличение количества (CD38^{high}CD19^{low}IgD-) плазмобластов обнаружено у пациентов с обострением системной красной волчанки (СКВ) с восстановлением их до нормального уровня при ингибировании ИЛ6 [25]. В работе А.А. Меснянкиной и соавт. [26] у пациентов с высокой активностью СКВ отмечено достоверное повышение относительного и абсолютного числа плазмочитов (CD19+CD38+) и двойных негативных В-клеток (CD19+CD27-IgD-) по сравнению с группой здоровых доноров.

Идентификация незрелых транзиторных В-клеток периферической крови (CD19+CD38++CD10+IgD+CD27-) позволяет оценить активность аутоиммунных заболеваний [27]. Важно отметить, что накопление транзиторных В-клеток, в отличие от богатых CD38+++ плазмобластов, может наблюдаться во вторичных лимфоидных органах, в первую очередь, в лимфатических узлах. Этим фактом можно объяснить выявленное в нашем исследовании снижение абсолютного количества транзиторных В-клеток (CD38++CD10+IgD+CD27-) у больных активным РА по сравнению с донорами.

Влияние ингибитора рецепторов ИЛ6 на В-клетки. ИЛ6 играет важную роль в дифференцировке клеток периферической крови и является наиболее значимым цитокином, влияющим на хемотаксис В-клеток и выработку антител плазматическими клетками [28, 29].

Основное влияние ингибиторы рецептора ИЛ6 оказывают на популяцию В-клеток памяти [10]. Особенно восприимчивы к их действию непереключенные (IgD+CD27+) и переключенные (IgD-CD27+) В-клетки памяти [30].

В нашем исследовании после 12 мес терапии ТЦЗ относительное и абсолютное количество В-клеток памяти (CD19+CD27+) и переключенных клеток памяти (CD19+CD27+IgD-) оказалось ниже у пациентов с РА по сравнению с донорами. При сравнении численности субпопуляций В-клеток у больных до и после 12 мес терапии ТЦЗ мы наблюдали снижение только относительного и абсолютного количества плазмобластов, в то же время снижение числа переключенных В-клеток памяти не достигло статистической значимости. Об участии переключенных В-клеток памяти и плазмобластов в поддержании ревматоидного воспаления может свидетельствовать выявленная в настоящем исследовании корреляция их числа с характерными для РА лабораторными нарушениями (повышение уровней СРБ, РФ).

В ранее проведенном исследовании P. Roll и соавт. [10] у больных РА после 24 нед терапии ТЦЗ отмечено снижение относительного и абсолютного числа переключенных В-клеток памяти (CD19+CD27+IgD-) и абсолютного количества непереключенных В-клеток памяти (CD19+CD27+IgD+), в то время как содержание плазмобластов не менялось. Снижение относительного количества непереключенных В-клеток памяти коррелировало с уменьшением DAS28, абсолютное число наивных В-клеток (CD19+CD27-IgD+) у больных РА через 24 нед после начала терапии ТЦЗ увеличилось, а их процентное содержание оставалось неизменным.

J. Kikuchi и соавт. [31], изучая изменения процентного содержания В-клеток у 39 больных РА после 52 нед терапии ТЦЗ, отметили увеличение числа наивных и уменьшение общего количества В-клеток памяти. В нашем исследовании, несмотря на то что абсолютное число наивных В-клеток (CD19+CD27-IgD+) у больных в ходе наблюдения не менялось, относительное их количество несколько увеличилось к концу наблюдения и превысило аналогичный показатель в группе контроля. Кроме того, были выявлены тенденции к изменению соотношения В-клеток памяти и наивных В-клеток в сторону увеличения процентного содержания последних ($p>0,05$). Поэтому у больных РА после 12 мес терапии ТЦЗ относительная и абсолютная численность общей популяции В-клеток памяти оказалась выше, а относительное содержание наивных В-клеток – ниже, чем в группе контроля.

P. Roll и соавт. [10], в отличие от полученных нами результатов, выявили увеличение относительного и абсолютного количества транзиторных В-клеток (CD38^{high}IgD+CD10+) на фоне терапии ТЦЗ, что может указывать на улучшение регенерационной способности, «ювенилизацию» периферических В-клеток и уменьшение нагрузки на В-клетки памяти при ингибировании ИЛ6.

В исследовании японских авторов [21] под влиянием 24-недельной терапии ТЦЗ снизился относительный уровень двойных негативных В-клеток и отмечалась тенденция к снижению числа плазмобластов, изменений других подтипов В-клеток не обнаружено. В нашей работе прослеживалась тенденция к уменьшению двойных негативных В-клеток при достоверном снижении относительного и абсолютного содержания плазмобластов.

В работе Z. Mahmood и соавт. [24] через 12, 24, 48 нед после назначения ТЦЗ больным РА ($n=44$) наблюдалось снижение относительного количества двойных негативных В-клеток и мутировавших иммуноглобулиновых рецепторов на них. Проведенный логистический регрессионный анализ показал, что процентное содержание этого типа В-клеток у больных РА до назначения ТЦЗ обратно коррелирует с последующим хорошим ответом на терапию по критериям EULAR (отношение шансов – ОШ – 1,48; 95% доверительный интервал – ДИ – 1,05–2,06; $p=0,024$). Это позволило авторам рассматривать процентное содержание двойных негативных В-клеток (CD19+CD27-IgD-) периферической крови в качестве предиктора ответа на ТЦЗ.

R. Moura и соавт. [11] при назначении ТЦЗ 11 больным РА в среднем через 8 мес отмечали восстановление относительного количества двойных негативных В-клеток (CD27-IgD-) до уровня контрольной группы. В данной работе не выявлено ассоциаций субтипов В-клеток с возрастом и клинико-лабораторными параметрами РА.

S. Fleischer и соавт. [32] обнаружили, что выработка цитокинов В-клетками заметно ухудшалась у пациентов с активным РА при недостаточной эффективности терапии БПВП и увеличивалась после назначения ТЦЗ. В работе не обнаружено существенных различий между экспрессией ИЛ6 и ИЛ10 в В-клетках больных РА и здорового контроля, но было выявлено нарушение регуляции выработки ИЛ8 и цитокина семейства ФНО TRAIL, что, предположительно, может способствовать прогрессированию болезни. Показано, что ассоциация между клинической эффективностью ТЦЗ и продуцированием В-клетками таких хемокинов, как макрофагальный воспалительный белок 1 β и трансформирующий фактор роста β , свидетельствует о нарушении выработки цитокинов в В-клетках при РА.

R. Moua и соавт. [11] после лечения ТЦЗ также обнаружили повышение экспрессии некоторых маркеров В-клеток, таких как TAC1, TLR9, CD5, CD95 и HLA-DR, в то время как экспрессия CXCL13, sCD23 и BAFF существенно не менялась.

Недавние исследования [33] показали, что микроРНК-155, важный регулятор активации В-клеток, в большом количестве содержится в В-клетках периферической крови, особенно в В-клетках памяти (IgD-CD27-), у АЦЦП-позитивных пациентов, что может поддерживать хроническую активацию В-клеток при РА. Нормализация содержания IgD-CD27- В-клеток в периферической крови после лечения ТЦЗ может указывать на важную роль этой субпопуляции В-клеток, способствующих активации Т-клеток, синтезу цитокинов и антител.

Таким образом, ингибиторы рецепторов ИЛ6, блокируя один из важнейших «провоспалительных» цитокинов, позитивно влияют на иммуновоспалительные процессы, лежащие в основе развития РА. Экспериментальная работа Y. Wu и соавт. [34] продемонстрировала выраженное подавление иммунных ответов В-клеток, особенно снижение уровней IgG1, IgG2a и IgG3, при иммунизации Т-клеточно-зависимым антигеном мышей, лишенных рецепторов

ИЛ6. Вероятно, ИЛ6 имеет большое значение для индукции созревания и/или поддержания жизнедеятельности плазматических клеток, которые продуцируют эти иммуноглобулиновые подклассы. Действительно, МАТ, которые блокируют опосредуемую рецепторами ИЛ6 сигнализацию, оказались эффективными в лечении РА [6].

Заключение

Имунофенотипирование субтипов В-лимфоцитов периферической крови показало уменьшение относительного и абсолютного количества В-клеток памяти (CD19+CD27+) и переключенных В-клеток памяти (CD19+CD27+IgD-) у пациентов с РА. Выявленные ассоциации между содержанием В-клеток памяти, плазмобластов и значениями лабораторных показателей у больных с высокой активностью РА могут свидетельствовать об участии В-лимфоцитов в патогенезе заболевания. Снижение уровня плазмобластов на фоне терапии ТЦЗ может указывать на возможное влияние блокады ИЛ6 на дифференцировку активированных В-лимфоцитов. Существенных изменений других субпопуляций В-клеток после 12 мес терапии ТЦЗ обнаружено не было. Однако, учитывая малое число включенных в исследование пациентов, необходимо продолжить изучение влияния ингибитора рецепторов ИЛ6 на фенотипический состав В-лимфоцитов для оценки возможности прогнозирования эффективности данного ГИБП при лечении РА.

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

1. Насонов ЕЛ. Проблемы иммунопатологии ревматоидного артрита: эволюция болезни. Научно-практическая ревматология. 2017;55(3):277-94 [Nasonov EL. Problems of rheumatoid arthritis immunopathology: evolution of the disease. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2017;55(3):277-94 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2017-277-294
2. Leslie D, Lipsky P, Notkins AL. Autoantibodies as predictors of disease. *J Clin Invest*. 2001;108:1417-22. doi: 10.1172/JCI14452
3. Leandro M. B cells and rheumatoid factors in autoimmunity. *Int J Rheum Dis*. 2015;18:379-81. doi: 10.1111/1756-185X.12690
4. Lino AC, Dorner T, Bar-Or A, Fillatreau S. Cytokine-producing B cells: a translational view on their roles in human and mouse autoimmune diseases. *Immunol Rev*. 2016;269:130-44. doi: 10.1111/imr.12374
5. Насонов ЕЛ, Лила АМ. Ингибция интерлейкина 6 при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях: достижения, перспективы и надежды. Научно-практическая ревматология. 2017;55(6):590-9 [Nasonov EL, Lila AM. Inhibition of interleukin 6 in immune inflammatory rheumatic diseases: achievements, prospects, and hopes. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2017;55(6):590-9 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2017-590-599
6. Scott LJ. Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs*. 2017 Nov;77(17):1865-79. doi: 10.1007/s40265-017-0829-7
7. Yeo L, Toellner KM, Salmon M, et al. Cytokine mRNA profiling identifies B cells as a major source of RANKL in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Nov;70(11):2022-8. doi: 10.1136/ard.2011.153312
8. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, et al. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 2012 Feb;122(4):143-59. doi: 10.1042/CS20110340
9. Burmester GR, Feist E, Dörner T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014 Feb;10(2):77-88. doi: 10.1038/nrrheum.2013.168
10. Roll P, Muhammad K, Schumann M, et al. In vivo effects of the anti-interleukin-6 receptor inhibitor tocilizumab on the B cell compartment. *Arthritis Rheum*. 2011 May;63(5):1255-64. doi: 10.1002/art.30242
11. Moura RA, Quaresma C, Vieira AR, et al. B-cell phenotype and IgD-CD27- memory B cells are affected by TNF-inhibitors and tocilizumab treatment in rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2017 Sep 8;12(9):e0182927. doi: 10.1371/journal.pone.0182927
12. Lubbers J, Vosslander S, van de Stadt LA, et al. B cell signature contributes to the prediction of RA development in patients with arthralgia. *Ann Rheum Dis*. 2015;74:1786-8. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-207324

13. Van Baarsen LGM, de Hair MJH, Ramwadhoebe TH, et al. The cellular composition of lymph nodes in the earliest phase of inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72:1420-4. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202990
14. Amara K, Steen J, Murray F, et al. Monoclonal IgG antibodies generated from joint-derived B cells of RA patients have a strong bias toward citrullinated autoantigen recognition. *J Exp Med*. 2013;210:445-55. doi: 10.1084/jem.20121486
15. Li S, Yu Y, Yue Y, et al. Autoantibodies from single circulating plasmablasts react with citrullinated antigens and Porphyromonas gingivalis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2016;68:614-26. doi: 10.1002/art.39455
16. Muhammad K, Roll P, Einsele H, et al. Delayed acquisition of somatic hypermutations in repopulated IGD+CD27+ memory B cell receptors after rituximab treatment. *Arthritis Rheum*. 2009;60:2284-93. doi: 10.1002/art.24722
17. Adlowitz DG, Barnard J, Bear J, et al. Expansion of Activated Peripheral Blood Memory B Cells in Rheumatoid Arthritis, Impact of B Cell Depletion Therapy, and Biomarkers of Response. *PLoS One*. 2015 Jun 5;10(6):e0128269. doi: 10.1371/journal.pone.0128269
18. Fekete A, Soos L, Szekanecz Z, et al. Disturbances in B- and T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis: suggested relationships with antigen-driven immune responses. *J Autoimmun*. 2007;29:154-63. doi: 10.1016/j.jaut.2007.07.002
19. Moura RA, Graca L, Fonseca JE. To B or not to B the conductor of rheumatoid arthritis orchestra. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012 Dec;43(3):281-91. doi: 10.1007/s12016-012-8318-y
20. 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):30-33 [Suponitskaya EV, Aleksankin AP, Alexandrova EN, et al. Characterization of peripheral blood B-cell subset in patients with systemic lupus erythematosus. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015;60(6):30-3 (In Russ.)].
21. Nakayamada S, Kubo S, Yoshikawa M, et al. Differential effects of biological DMARDs on peripheral immune cell phenotypes in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2018 Jan 1;57(1):164-74. doi: 10.1093/rheumatology/kex012
22. Lü bbers J, van Beers-Tas MH, Vosslander S, et al. Changes in peripheral blood lymphocyte subsets during arthritis development in arthralgia patients. *Arthritis Res Ther*. 2016;18(1):205. doi: 10.1186/s13075-016-1102-2
23. Moura RA, Weinmann P, Pereira PA, et al. Alterations on peripheral blood B-cell subpopulations in very early arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:1082-92. doi: 10.1093/rheumatology/keq029
24. Mahmood Z, Muhammad K, Schmalzing M, et al. CD27-IgD-memory B cells are modulated by in vivo interleukin-6 receptor (IL-6R) blockade in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015 Mar 14;17:61. doi: 10.1186/s13075-015-0580-y
25. Illei GG, Shirota Y, Yarboro CH, et al. Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis Rheum*. 2010;62:542-52. doi: 10.1002/art.27221
26. 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):252-60 [Mesnyankina AA, Solovyev 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):252-60 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2017-252-260
27. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, et al. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol*. 2008;127:14-25. doi: 10.1016/j.clim.2007.11.013
28. Fonseca JE, Santos MJ, Canhao H, Choy E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun Rev*. 2009;8:538-42. doi: 10.1016/j.autrev.2009.01.012
29. Jourdan M, Cren M, Robert N, et al. IL-6 supports the generation of human long-lived plasma cells in combination with either APRIL or stromal cell-soluble factors. *Leukemia*. 2014 Aug;28(8):1647-56. doi: 10.1038/leu.2014.61
30. Muhammad K, Roll P, Seibold T, et al. Impact of IL-6 receptor inhibition on human memory B cells in vivo: impaired somatic hypermutation in preswitch memory B cells and modulation of mutational targeting in memory B cells. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:1507-10. doi: 10.1136/ard.2010.141325
31. Kikuchi J, Hashizume M, Kaneko Y, et al. Peripheral blood CD4(+)CD25(+)CD127(low) regulatory T cells are significantly increased by tocilizumab treatment in patients with rheumatoid arthritis: increase in regulatory T cells correlates with clinical response. *Arthritis Res Ther*. 2015 Jan 21;17:10. doi: 10.1186/s13075-015-0526-4
32. Fleischer S, Ries S, Shen P, et al. Anti-interleukin-6 signalling therapy rebalances the disrupted cytokine production of B cells from patients with active rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2018 Jan;48(1):194-203. doi: 10.1002/eji.201747191
33. Alivernini S, Kurowska-Stolarska M, Tolusso B, et al. MicroRNA-155 influences B-cell function through PU.1 in rheumatoid arthritis. *Nat Commun*. 2016 Sep 27;7:12970. doi: 10.1038/ncomms12970
34. Wu Y, El Shikh ME, El Sayed RM, et al. IL-6 produced by immune complex-activated follicular dendritic cells promotes germinal center reactions, IgG responses and somatic hypermutation. *Int Immunol*. 2009;21:745-56. doi: 10.1093/intimm/dxp041