Динамика субпопуляций лимфоцитов, CD4+CD25+CD127- Т-регуляторных клеток у больных ревматоидным артритом на фоне терапии биоаналогом ритуксимаба (Ацеллбия)

Авдеева А.С.[1], Рубцов Ю.П.[2], Черкасова М.В.[1], Насонов Е.Л.[1,3]

[1]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва; [2]лаборатория биокатализа ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук» Минобрнауки России, Москва; [3]ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

[1]Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, 34А; [2]Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; [3]Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Цель *исследования – оценка влияния биоаналога ритуксимаба (РТМ, Ацеллбия) на содержание CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD16+CD56+, CD19+, CD4+CD25+CD127- лимфоцитов в периферической крови пациентов с ревматоидным артритом (РА).*

Пациенты и методы. *Обследовано 20 больных РА, получивших по 2 инфузии РТМ в суммарной дозе 1200 мг. Уровень СРБ, IgM ревматоидного фактора, IgG, IgM, IgA определялся нефелометрическим методом. Относительное и абсолютное содержание CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD16+CD56+, CD19+, CD4+CD25+CD127- Т-регуляторных клеток (Т-рег) – методом многоцветной проточной цитофлюориметрии.*

Результаты и обсуждение. *К 24-й неделе терапии РТМ хороший/удовлетворительный эффект по критериям EULAR отмечался у 17 (85%) пациентов; ремиссия по DAS28 – у 4 (20%), ремиссия по SDAI – у 2 (10%). Применение РТМ сопровождалось достоверным повышением относительного содержания CD4+CD25+CD127-Т-лимфоцитов, медиана которого через 12 и 24 нед после начала терапии увеличилась с 6,8 [5,2; 7,6] % до 7,3 [6,1; 8,3] и 6,97 [6,4; 8,2] % соответственно ($p<0,05$). Отмечалась тенденция к повышению абсолютного содержания Т-рег в периферическом кровотоке через 12 нед после первой инфузии препарата (до 0,05 [0,04; 0,075] $\cdot 10^9$/л; $p=0,05$). Среди пациентов, достигших ремиссии/низкой активности заболевания по SDAI к 24-й неделе наблюдения, исходное относительное содержание Т-рег было значимо выше – 7,35 [6,8; 7,97] % по сравнению с группой больных с умеренной активностью патологического процесса – 5,8 [4,3; 7,22] %; $p<0,05$.*

Заключение. *Применение биоаналога РТМ сопровождается развитием полной деплеции CD19+ лимфоцитов, повышением числа CD3+ и CD3+CD4+ лимфоцитов, а также Т-рег. Большее исходное количество CD4+CD25+CD127- лимфоцитов ассоциируется с более высокой эффективностью терапии РТМ.*

Ключевые слова: *ревматоидный артрит; анти-В-клеточная терапия; биоаналог ритуксимаба.*

Контакты: *Анастасия Сергеевна Авдеева;* ***9056249400@mail.ru***

Для ссылки: *Авдеева АС, Рубцов ЮП, Черкасова МВ, Насонов ЕЛ. Динамика субпопуляций лимфоцитов, CD4+CD25+CD127-Т-регуляторных клеток у больных ревматоидным артритом на фоне терапии биоаналогом ритуксимаба (Ацеллбия). Современная ревматология. 2020;14(2):20–26.* ***DOI****: 10.14412/1996-7012-2020-2-20-26*

Dynamics of lymphocyte subpopulations, CD4+CD25+CD127- T regulatory cells in patients with rheumatoid arthritis during therapy with the rituximab biosimilar Acellbia

Avdeeva A.S.[1], Rubtsov Yu.P.[2], Cherkasova M.V.[1], Nasonov E.L.[1,3]

[1]V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow; [2]Laboratory of Biocatalysis, Academicians M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Ministry of Education and Science of Russia, Moscow; [3]I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia, Moscow

[1]34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia; [2]16/10, Miklukho-Maklai St., Moscow 117997, Russia; [3]8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991, Russia

Objective: *to evaluate the effect of the rituximab (RTM) biosimilar Acellbia on the peripheral blood levels of CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD16+CD56+, CD19+, and CD4+CD25+CD127- lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis (RA).*

Patients and methods. *Examinations were made in 20 RA patients who received 2 RTM infusions at a total dose of 1200 mg. The levels of C-reactive protein, IgM rheumatoid factor, IgG, IgM, and IgA were measured by a nephelometric method. The relative and absolute contents of CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD16+CD56+, CD19+, CD4+CD25+CD127- T regulatory cells (Tregs) were estimated by multicolor flow cytofluorometry.*

Results and discussion. *At week 24 of RTM therapy, there was a good/satisfactory effect according to EULAR criteria in 17 (85%) patients; DAS28 remission in 4 (20%), and SDAI remission in 2 (10%). The use of RTM was accompanied by a significant increase in the relative con-*

tent of CD4+CD25+CD127- T lymphocytes, the median of which at weeks 12 and 24 after therapy initiation increased from 6.8 [5.2; 7.6]% to 7.3 [6.1; 8.3] and 6.97 [6.4; 8.2]%, respectively ($p<0.05$). The absolute peripheral blood count of Tregs tended to increase at weeks 12 after the first infusion of the drug (up to 0.05 [0.04; 0.075] · 10^9/l; $p=0.05$). At week 24 follow-up, the patients who achieved SDAI remission/low disease activity had significantly higher baseline relative Tregs levels (7.35 [6.8; 7.97]% than those with the moderate activity of the pathological process (5.8 [4.3; 7.22] %; $p<0.05$).

Conclusion. *The use of the RTM biosimilar is accompanied by the development of complete depletion of CD19+ lymphocytes and by an increase in CD3+ and CD3+CD4+ lymphocytes and Tregs. The larger baseline number of CD4+CD25+CD127- lymphocytes is associated with the higher efficiency of RTM therapy.*

Keywords: *rheumatoid arthritis; anti-B-cell therapy; rituximab biosimilar.*
Contact: *Anastasia Sergeevna Avdeeva;* ***9056249400@mail.ru***
For reference: *Avdeeva AS, Rubtsov YuP, Cherkasova MV, Nasonov EL. Dynamics of lymphocyte subpopulations, CD4+CD25+CD127- T regulatory cells in patients with rheumatoid arthritis during therapy with the rituximab biosimilar Acellbia. Sovremennaya Revmatologiya=Modern Rheumatology Journal. 2020;14(2):20–26.* ***DOI:*** *10.14412/1996-7012-2020-2-20-26*

По современным представлениям, ключевую роль в развитии синовиального воспаления и суставной деструкции при ревматоидном артрите (РА) играют активированные CD4+ Т-лимфоциты. Эти клетки распознают аутоантигены, что способствует активации В-лимфоцитов и макрофагов, а также усиливает продукцию цитокинов [1–3]. В настоящее время выделяют несколько субпопуляций эффекторных CD4+ Т-хелперов (Th), которые различаются в зависимости от набора продуцируемых ими цитокинов и спектра клеток-мишеней. При активации специфическим антигеном «наивные» Th-клетки дифференцируются в эффекторные Th1-, Th2-, Th17-лимфоциты, причем направление этой дифференцировки зависит от сигнала, который «наивная» клетка в момент активации Т-клеточного рецептора получает от цитокинов, представленных в ее микроокружении. Негативную регуляцию Th1-, Th2- и Th17-лимфоцитов осуществляют CD4+ регуляторные Т-клетки (Т-рег), играющие основную роль в поддержании периферической толерантности к собственным антигенам [4]. Т-рег выполняют ключевую функцию в иммунной системе благодаря подавлению гипериммунного ответа в отношении аутоантигенов, а также кишечных условно-патогенных микроорганизмов [5, 6]. В последние годы получены данные о способности Т-рег подавлять различные иммуновоспалительные реакции в ответ на широкий спектр физиологических и патологических стимулов, включая микроорганизмы, опухолевые клетки, аллогенные трансплантаты, клетки плода [6, 7]. Ведущую роль CD4+CD25+FOXP3+ Т-клеток в контроле иммунологической толерантности к собственным антигенам наглядно иллюстрируют врожденные наследственные заболевания человека, вызываемые мутациями в гене *FOXP3* и проявляющиеся в развитии летального синдрома IPEX (Immunodysregiilation, Polyendocrinopathy and Enteropathy, X-Linked), который сопровождается сахарным диабетом 1-го типа, тиреоидитом, тяжелой аллергией и воспалительным поражением кишечника, сочетающимися с цитокиновым штормом [8].

У человека Т-рег относятся к субпопуляции CD4+Foxp3+Т-клеток и отличаются высоким уровнем CD25 и низким уровнем CD127 на поверхности клеток [9–11]. Данные о содержании Т-рег в периферическом кровотоке у пациентов с РА весьма противоречивы. Большинство исследователей наблюдали уменьшение процентного количества (ПК) циркулирующих Т-рег [12–15], в то время как в других работах выявлено его увеличение [16, 17] или отсутствие отличий по этому показателю от здоровых доноров [18–20]. В наших исследованиях было продемонстрировано снижение ПК FoxP3+CD25+ клеток, ПК и абсолютного количества (абс.) FoxP3+ICOS+ клеток; FoxP3+CD154+ клеток и FoxP3+ CD274+ Т-клеток в периферическом кровотоке пациентов с ранним РА, не получавших базисные противовоспалительные препараты (БПВП) [21].

В современной стратегии терапии РА важное место занимают анти-В-клеточные препараты, основным из которых является ритуксимаб (РТМ). По сравнению с другими генно-инженерными биологическими препаратами (ГИБП) РТМ характеризуется длительной эффективностью одного курса терапии, сохраняющейся в течение 6 мес и более. Результаты рандомизированных плацебоконтролируемых исследований РТМ [22–25], данные национальных регистров [26, 27] свидетельствуют о его высокой клинической эффективности при тяжелом развернутом РА, сопровождающемся резистентностью к синтетическим БПВП и ингибиторам фактора некроза опухоли α (ФНОα), а также при раннем РА. При этом отмечены тенденция к нарастанию клинического эффекта терапии и торможение деструкции суставов на фоне повторных курсов РТМ [28].

Внедрение инновационных ГИБП в клиническую практику, с одной стороны, позволило повысить эффективность терапии и улучшить прогноз у пациентов, страдающих наиболее тяжелыми формами РА, а с другой – привело к кардинальному удорожанию лечения [29]. Снижение стоимости лечения эффективными, но дорогостоящими ГИБП и, как следствие, увеличение доступности инновационной терапии для пациентов, живущих в странах с ограниченными экономическими ресурсами, является приоритетной задачей здравоохранения во всем мире. Эта проблема частично решена благодаря разработке биоаналогов (biosimilars) ГИБП, широкое применение которых в клинической практике стало возможным после окончания срока действия патентов для многих оригинальных ГИБП [30]. Российской биотехнологической компанией «БИОКАД» разработан препарат химерных моноклональных антител к CD20 (BCD-020, Ацеллбия®) – биоаналог оригинального РТМ (Мабтера®, «Ф. Хоффманн-Ля Рош» Лтд., Швейцария), зарегистрированный для лечения неходжкинской лимфомы в 2014 г. В 2016 г. закончено международное клиническое исследование препарата Ацеллбия в сравнении с препаратом Мабтера у пациентов с активным РА (BIORA), которое продемонстрировало их терапевтическую эквивалентность [31], что послужило основой регистрации препарата Ацеллбия для терапии РА.

Цель данной работы – оценка влияния биоаналога РТМ (Ацеллбия) на содержание CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD16+CD56+, CD19+, CD4+CD25+CD127- лимфоцитов в периферической крови у пациентов с РА.

Пациенты и методы. Обследовано 20 больных с достоверным диагнозом РА (критерии American College of Rheumatology, ACR / European League Against Rheumatism, EULAR, 2010), наблюдавшихся в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой» с 2016 по 2017 г. (табл. 1).

Как видно из этой таблицы, большинство пациентов были женского пола, среднего возраста, имели длительное течение заболевания (Me 39,5 мес), серопозитивность по IgM РФ и АЦЦП, высокую активность воспалительного процесса, II или III рентгенологическую стадию, II функциональный класс (ФК), умеренное нарушение жизнедеятельности. До начала терапии Ацеллбией они получали метотрексат (МТ) в стабильной дозе (Me 15 [10; 17,5] мг/нед) не менее 4 нед, а также нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) и глюкокортикоиды (ГК) до 10 мг/сут в пересчете на преднизолон без достаточного терапевтического эффекта.

Таблица 1. Клинико-иммунологическая характеристика больных РА до назначения РТМ (n=20)
Table 1. RTM pretreatment clinical and immunological characteristics of RA patients (n=20)

Показатель	Значение
Пол: мужчины/женщины, n (%)	2 (10)/18 (90)
Возраст, годы, Me [25-й; 75-й перцентили]	61,5 [54,0; 66,5]
Длительность заболевания, мес, Me [25-й; 75-й перцентили]	39,5 [20,0; 84,0]
Рентгенологическая стадия: I/II/III/IV, n (%)	2 (10)/13 (65)/4 (20)/1 (5)
ФК: I/II/III/IV, n (%)	4 (20)/11 (55)/5 (25)/0
DAS28, Me [25-й; 75-й перцентили]	5,6 [4,9; 6,8]
HAQ, Me [25-й; 75-й перцентили]	1,7 [1,2; 2,3]
СОЭ по Вестергрену, мм/ч, Me [25-й; 75-й перцентили]	45,0 [19,5; 80,0]
СРБ, мг/мл, Me [25-й; 75-й перцентили]	12,3 [8,9; 42,5]
IgM РФ, МЕ/мл, Me [25-й; 75-й перцентили]	197,0 [83,2; 492,5]
РФ+/-, n (%)	18 (90)/2 (10)
АЦЦП, Ед/мл, Me [25-й; 75-й перцентили]	161,8 [98,3; 300,0]
АЦЦП+, n (%)	20 (100)

Примечание. РФ – ревматоидный фактор; АЦЦП – антитела к циклическому цитруллинированному пептиду.
Note. RF – rheumatoid factor; anti-CCP – anti-cyclic citrullinated peptide.

Всем больным проведено по 2 инфузии РТМ (Ацеллбия) в дозе 600 мг внутривенно с интервалом в 2 нед на фоне терапии МТ, НПВП и ГК. Клинические показатели анализировали непосредственно перед началом терапии, через 12 и 24 нед после первой инфузии. Для оценки эффективности использовали критерии EULAR (индекс DAS28). Ремиссию заболевания оценивали по DAS28; функциональное состояние – с помощью опросника HAQ (Health Assessment Questionnaire).

СОЭ определяли стандартным международным методом по Вестергрену (норма ⩽30 мм/ч). Сывороточную концентрацию СРБ, IgM РФ, IgG, IgM, IgA измеряли иммунонефелометрическим методом на анализаторе BN ProSpec (Siemens, Германия), при этом для определения СРБ использовали высокочувствительный тест с латексным усилением (чувствительность 0,175 мг/л). Нормальный уровень СРБ в сыворотке крови составлял ⩽5,0 мг/л. По инструкции фирмы-изготовителя за верхнюю границу нормы IgM РФ была принята концентрация 15,0 МЕ/мл. Нормальный уровень IgG составлял 8,0–17,0 г/л, IgA для мужчин – 1,0–4,9 г/л, для женщин – 0,85–4,5 г/л, IgM для мужчин – 0,5–3,2 г/л, для женщин – 0,6–3,7 г/л. Количественное определение АЦЦП в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью коммерческих наборов реагентов (Axis-Shield, Великобритания); верхняя граница нормы – 5,0 ЕД/мл. Для оценки ПК и абс. CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD16+CD56+, CD19+, CD4+CD25+CD127- клеток в периферической крови применяли метод проточной цитофлюориметрии на анализаторе Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США). Исследуемые сыворотки хранили при -70 °C.

Для статистической обработки результатов использовали пакет программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США), включая общепринятые методы параметрического и непараметрического анализа. Для параметров, распределение которых отличалось от нормального, при сравнении двух групп использовали критерий Манна–Уитни, а при сравнении трех и более групп – критерий Краскела–Уоллиса, результаты представлены в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом [25-й; 75-й перцентили]. Корреляционный анализ проводился по методу Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты. До начала терапии РТМ медиана DAS28 составляла 5,6 [4,9; 6,8], SDAI – 27,17 [23,08; 39,9] и CDAI – 26,6 [22,25; 37]. Через 12 и 24 нед введения РТМ DAS28 снизился до 4,28 [3,24; 4,75] и 4,14 [3,11; 4,66] соответственно ($p<0,05$). К 24-й неделе хороший/удовлетворительный эффект по критериям EULAR зарегистрирован у 17 (85%) пациентов; ремиссия по DAS28 (<2,6) была достигнута у 4 (20%), по SDAI (⩽3,3) – у 2 (10%), по CDAI (⩽2,8) – у 1 (5%). На 12-й неделе исследования число больных, достигших 20% улучшения согласно критериям ACR (ACR20), составило 70%, ACR50 – 55% и ACR70 – 5%, на 24-й неделе – 75; 45 и 15% соответственно.

Динамика уровня острофазовых показателей и основных клеточных субпопуляций на фоне терапии биоаналогом РТМ представлена в табл. 2.

Уровень СРБ и СОЭ на 12-й и 24-й неделях после начала терапии РТМ был значимо ниже, чем до лечения. Концентрация СРБ и СОЭ достигали нормальных значений к 12-й неделе по сравнению с исходными данными; к 24-й неделе СОЭ снизилась в 2,1 раза; уровень СРБ – в 2,5 раза.

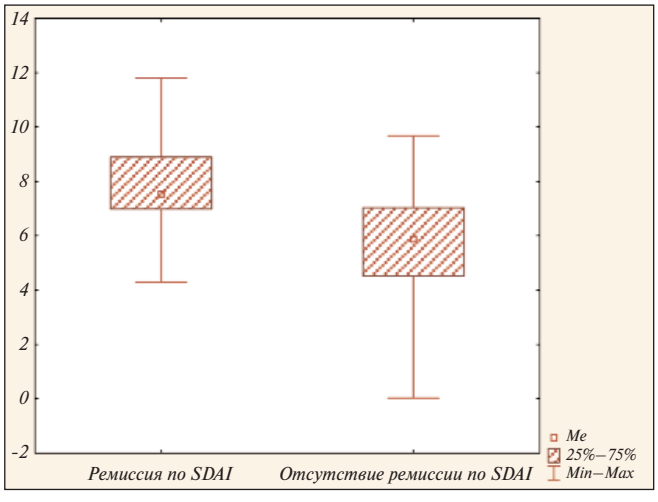
Таблица 2. Динамика острофазовых показателей и субпопуляций лимфоцитов на фоне терапии биоаналогом РТМ (n=20), Me [25-й; 75-й перцентили]
Table 2. Dynamics of acute phase indices and lymphocyte subpopulations during therapy with RTM biosimilar (n=20); Me [25th; 75th percentile]

Показатель	Исходно	Через 12 нед	Через 24 нед	Здоровые доноры (n=30)
СОЭ, мм/ч	45,0 [19,5; 80,0]	20,0 [16,0; 38,0]*	21,5 [12,0; 31,0]*	–
СРБ, мг/л	12,3 [8,9; 45,2]	4,9 [2,2; 11,3]*	4,9 [2,3; 21,9]*	–
CD3+, %	76,1 [68,5; 79,7]	83,6 [78,3; 97,8]*	82,9 [76,2; 87,5]*	77,05 [68,4; 79,7]
CD3+, · 10^9/л	1,36 [1,24; 1,83]	1,3 [1,0; 1,56]	1,42 [1,11; 1,8]	1,3 [1,2; 1,8]
CD3-CD19+, %	9,2 [7,3; 11,7]	0,005 [0,00; 0,01]*	0,2 [0,02; 1,7]*	9,7 [6,9; 12,3]
CD3-CD19+, · 10^9/л	0,19 [0,12; 0,24]	0,0 [0,0; 0,0]	0,003 [0,0; 0,027]	0,15 [0,1; 0,3]
CD3-CD16+CD56+, %	10,8 [7,9; 16,7]	13,9 [6,6; 20,7]*	14,4 [8,4; 20,1]	12,95 [8,5; 16,8]
CD3-CD16+CD56+, · 10^9/л	0,21 [0,17; 0,28]	0,22 [0,11; 0,34]	0,24 [0,14; 0,33]	0,2 [0,2; 0,5]
CD3+CD4+, %	51,7 [47,1; 54,3]	58,6 [51,8; 63,7]*	52,4 [46,5; 61,4]	46,2 [39,14; 50,39]
CD3+CD4+, · 10^9/л	0,71 [0,56; 0,98]	0,68 [0,55; 0,99]	0,66 [0,54; 0,95]	0,79 [0,68; 0,97]
CD3+CD8+, %	18,3 [14,9; 29,4]	20,7 [17,4; 28,7]	22,8 [16,9; 29,3]*	20,95 [18,6; 23,7]
CD3+CD8+, · 10^9/л	0,24 [0,2; 0,44]	0,26 [0,18; 0,43]	0,28 [0,23; 0,39]	0,35 [0,3; 0,5]
CD4+CD25+CD127-, %	6,8 [5,2; 7,6]	7,3 [6,1; 8,3]*	6,97 [6,4; 8,2]*	6,47 [5,17; 7,58]
CD4+CD25+CD127-, · 10^9/л	0,045 [0,035; 0,055]	0,05 [0,04; 0,075]**	0,054 [0,04; 0,06]	0,054 [0,04; 0,064]
IgG, г/л	11,9 [9,3; 14,1]	–	9,9 [8,7; 11,0]*	–
IgM, г/л	1,3 [0,9; 1,7]	–	0,8 [0,6; 1,3]*	–
IgA, г/л	3,7 [2,7; 4,1]	–	2,7 [1,8; 3,3]*	–

*p<0,05 по сравнению с исходным уровнем; **p=0,05 по сравнению с исходным уровнем.
*p<0.05 vs. baseline level; **p=0.05 vs. baseline level.

У пациентов с РА уровень CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3-CD16+CD56+, CD19+ лимфоцитов значимо не отличался от такового у здоровых доноров (p>0,05; табл. 2). В группе РА отмечалась тенденция к более низкому исходному ПК и абс. Т-рег по сравнению со здоровыми донорами (p=0,06). Регистрировалась позитивная корреляция между DAS28 и ПК CD3+ клеток (r=0,45, p=0,04); CDAI и абс. CD3+CD4+ (r=0,06, p=0,04); СОЭ и абс. CD3-CD19+ (r=0,56, p=0,009) и абс. CD3+CD4+ (r=0,52, p=0,017).

Применение РТМ сопровождалось достоверным повышением ПК CD3+ лимфоцитов через 12 и 24 нед после начала терапии, ПК CD3+CD4+ клеток через 12 нед после первой инфузии препарата. Деплеция CD19+ В-лимфоцитов достигнута к 12-й неделе у всех пациентов (абс. 0), к 24-й неделе отмечено нарастание числа CD19+В-лимфоцитов (0,003 [0,0003; 0,0270]·10^9/л), деплеция к 24-й неделе сохранялась у 14 (70%) пациентов, у 2 больных, не ответивших на терапию, регистрировалось практически полное восстановление уровня В-лимфоцитов к 24-й неделе (до 5,56 и 4,77%). Выявлено повышение ПК CD4+CD25+CD127- Т-лимфоцитов через 12 и 24 нед от начала терапии с 6,8 [5,2; 7,6] % до 7,3 [6,1; 8,3] и 6,97 [6,4; 8,2] % соответственно (p<0,05). К 24-й неделе терапии ПК Т-рег у больных РА не отличалось от соответствующего показателя у здоровых доноров. Отмечалась тенденция к повышению абс. Т-рег в периферическом кровотоке через 12 нед после первой инфузии препарата (медиана 0,05 [0,04; 0,075] · 10^9/л; p=0,05).



Исходное ПК CD4+CD25+CD127- Т-лимфоцитов в группах больных, достигших и не достигших ремиссии/низкой активности заболевания по SDAI к 24-й неделе терапии РТМ
Percentage of CD4+CD25+CD127- T lymphocytes at baseline in the groups of patients who achieved SDAI remission/low disease activity and who did not at week 24 of RTM therapy

К 24-й неделе наблюдалось значимое снижение уровня IgG, IgM и IgA соответственно на 15,4; 36,4 и 37,3% от исходного показателя (см. табл. 2). Однако средние значения иммуноглобулинов оставались в пределах нормы.

Для оценки роли Т-рег в прогнозировании эффективности терапии был проанализирован исходный уровень данной клеточной популяции в группах пациентов в зависимости от активности заболевания. Среди пациентов, достигших ремиссии/низкой активности болезни по SDAI к 24-й неделе наблюдения, исходное ПК Т-рег было достоверно выше – 7,35 [6,8; 7,97] % по сравнению с группой больных с умеренной активностью патологического процесса – 5,8 [4,3; 7,22] % ($p<0,05$; см. рисунок).

Обсуждение. Анти-В-клеточная терапия оказывает влияние на количество CD19+ В-лимфоцитов и Т-рег в периферическом кровотоке. Применение РТМ сопровождалось развитием полной деплеции CD19+ лимфоцитов к 12-й неделе терапии, повышением числа CD3+ и CD3+CD4+ лимфоцитов, а также CD4+CD25+CD127- Т-лимфоцитов. По данным многочисленных исследований, показана почти полная транзиторная деплеция В-клеток в периферической крови на фоне терапии РТМ. Так, в исследованиях REFLEX и DANCER деплеция В-клеток была достигнута у всех пациентов, получавших РТМ, и сохранялась до 24 нед, частичное восстановление содержания В-клеток наблюдалось к 16-й неделе [22, 23]. Аналогичные данные, согласно которым истощение популяции В-лимфоцитов в периферической крови отмечается к 12-й неделе и сохраняется до 28-й недели после курса РТМ, получены J. Higashida и соавт. [32]. Результаты исследований MIRROR и SERENE также подтверждают способность РТМ вызывать быструю и полную деплецию CD19+ В-клеток в периферическом кровотоке [24].

Интересные данные были получены M. Stradner и соавт. [33], оценивавшими роль различных субпопуляций лимфоцитов (CD45+, CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD56+ и CD16+), а также общего числа лимфоцитов в прогнозировании эффективности терапии РТМ при РА. В исследование было включено 44 пациента с РА, которым впервые начата терапия РТМ. Авторы выявили исходно более высокое содержание лимфоцитов в группе пациентов, не ответивших на терапию к 24-й неделе после первой инфузии препарата, по сравнению с ответившими на лечение ($2,681\pm0,36 \cdot 10^9$/л и $1,956\pm0,124 \cdot 10^9$/л соответственно; $p=0,019$). Также в группе не ответивших на терапию регистрировалось исходно более высокое число CD3+, CD4+ и CD19+ лимфоцитов ($p<0,05$). При проведении логистического регрессионного анализа было установлено, что исходно более высокое содержание лимфоцитов, CD3+, CD19+ и CD4+ клеток является предиктором отсутствия эффекта терапии по критериям EULAR ($p<0,05$). Также при проведении ROC-анализа было продемонстрировано, что исходный уровень лимфоцитов $>2,91 \cdot 10^9$/л и число плазмобластов >2,85% (от общего числа В-лимфоцитов) ассоциируются с более высоким значением DAS28 через 24 нед после назначения РТМ. Изменение числа CD3+, CD4+CD8+ Т-лимфоцитов не влияло на эффективность терапии РТМ. В более ранней работе этой же группы авторов [34] также было продемонстрировано значение определения уровня плазмобластов для прогнозирования ответа на терапию по критериям EULAR. В исследование было включено 52 пациента с РА, которым впервые была назначена терапия РТМ. При проведении логистического регрессионного анализа было установлено, что более низкий исходный уровень плазмобластов является независимым предиктором ответа по критериям EULAR через 24 нед после начала терапии (отношение шансов 2,22; $p=0,04$).

Значение мониторирования содержания Т-лимфоцитов на фоне терапии РТМ было продемонстрировано J. Melet и соавт. [35] при оценке динамики субпопуляций лимфоцитов (CD45+Ra, CD3+, CD19+, CD4+, CD8+, CD56+, CD19+) у 52 пациентов с РА, получавших РТМ. Авторы установили снижение числа CD3+, CD4+, CD8+ лимфоцитов через 12 нед после применения РТМ на 35; 37 и 24% соответственно; эта же тенденция сохранялась и через 24 нед после начала лечения. У ряда пациентов было выявлено выраженное снижение количества CD4+ Т-лимфоцитов более чем на 70% от исходного уровня. Также авторы установили связь между отсутствием динамики числа CD4+ Т-лимфоцитов и неэффективностью РТМ через 24 нед после первой инфузии препарата. Сходные данные были получены M. Lavielle и соавт. [36] при анализе количества CD4+ Т-лимфоцитов у 54 пациентов с РА. Выявлены значимое снижение числа этих клеток на фоне терапии РТМ, а также его корреляция с активностью заболевания по DAS28. Таким образом, мониторирование числа CD4+ лимфоцитов на фоне лечения может быть полезно при прогнозировании эффективности РТМ, а также при решении вопроса о проведении повторного курса терапии.

Учитывая, что механизм действия РТМ при РА до сих пор изучен недостаточно, а снижение числа В-лимфоцитов на фоне терапии не всегда коррелирует с клиническим эффектом препарата, было высказано предположение о возможном влиянии РТМ на уровень и функциональную активность Т-рег. K.M. Hamel и соавт. [37] на модели артрита мышей, индуцированного протеогликанами, при введении моноклональных антител к CD20 наблюдали увеличение числа CD4+ лимфоцитов, экспрессирующих Foxp3 и CD25, а также повышение их супрессорной активности. Однако динамики количества Т-рег на фоне терапии РТМ не выявлено [38]. Нами были получены данные о повышении содержания Т-рег на фоне терапии биоаналогом РТМ.

В настоящей работе исходно более высокий уровень Т-рег ассоциировался с достижением ремиссии/низкой активности заболевания по SDAI к 24-й неделе терапии РТМ. Сходные данные, но только в отношении применения ингибиторов ФНОα, были получены A. Julir и соавт. [39]. Они установили, что у пациентов, ответивших на терапию инфликсимабом (n=44), базальный уровень CD4+CD25+Т-рег был существенно выше, чем у тех, кто не ответил на лечение.

Заключение. Таким образом, применение биоаналога РТМ сопровождается развитием полной деплеции CD19+ лимфоцитов к 12-й неделе терапии, повышением числа CD3+ и CD3+CD4+ лимфоцитов, а также Т-рег. Большее исходное количество CD4+CD25+CD127- лимфоцитов ассоциируется с более высокой эффективностью терапии РТМ.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Firestein G. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003;423:356-61. doi: 10.1038/nature01661
2. Choy E, Panayi G. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2001;344:907-16. doi: 10.1056/NEJM200103223441207
3. Cope A. T cellsin rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(Suppl1):S1. doi: 10.1186/ar2412
4. Steward-Tharp S, Song Y, Siegel R. O'Shea J. New insights into T cells biology and T cells directed therapy for autoimmunity inflammation and immunosuppression. *Ann NY Acad Sci*. 2010;1183:123-48. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05124.x
5. Быковская СН, Насонов ЕЛ. Роль дефектов иммуносупрессии в развитии аутоиммунных заболеваний. Научно-практическая ревматология. 2005;43(4): 81-4.
[Bykovskaya SN, Nasonov EL. Role of immunosupression defects in the development of autoimmune diseases. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2005;43(4):81-4. (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2005-623
6. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.009
7. Zeng H, Chi H. The interplay between regulatory T cells and metabolism in immune regulation. *Oncoimmunology*. 2013;2(11): e26586. Epub 2013 Oct 21. doi: 10.4161/onci.26586
8. Wildin RS, Freitas A. IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives. *J Autoimmun*. 2005;25 Suppl:56-62. doi: 10.1016/j.jaut.2005.04.008
9. Choy E. Selective modulation of T cell costimulation: a novel mode of action for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2009;27:510-8.
10. Klimiuk PA, Yang H, Goronzy JJ, Weyand CM. Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent. *Clin Immunol*. 1999;90:65-78. doi: 10.1006/clim.1998.4618
11. Prakken B, Wehrens E, van Wijk F. Quality or Quantity? Unraveling the role of T reg cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2013 Mar;65(3):552-4. doi: 10.1002/art.37831
12. Cao D, van Vollenhoven R, Klareskog L, et al. CD25+CD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther*. 2004;6(4):R335-46. doi: 10.1186/ar1192. Epub 2004 Jun 7.
13. Jiao Z, Wang W, Jia R, et al. Accumulation of FoxP3-expressing CD4+CD25+ T cells with distinct chemokine receptors in synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2007 Nov-Dec;36(6): 428-33. doi: 10.1080/03009740701482800
14. Sempere-Ortells JM, Perez-Garcia V, Marin-Alberca G, et al. Quantification and phenotype of regulatory T cells in rheumatoid arthritis according to disease activity Score-28. *Autoimmunity*. 2009;42(8):636-45. doi: 10.3109/08916930903061491
15. Kawashiri SY, Kawakami A, Okada A, et al. CD4+CD25(high)CD127(low/-) Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2011 Dec;38(12): 2517-21. doi: 10.3899/jrheum.110283. Epub 2011 Sep 15.
16. Van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum*. 2004 Sep;50(9):2775-85. doi: 10.1002/art.20499
17. Han GM, O'Neil-Andersen NJ, Zurier RB, Lawrence DA. CD4+CD25high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol*. 2008 May-Jun;253(1-2):92-101. doi: 10.1016/j.cellimm.2008.05.007. Epub 2008 Jul 22.
18. Cao D, Malmström V, Baecher-Allan C, et al. Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells fromthe target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2003 Jan;33(1):215-23. doi: 10.1002/immu.200390024
19. Möttönen M, Heikkinen J, Mustonen L, et al. CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2005 May;140(2):360-7. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02754.x
20. Liu MF, Wang CR, Fung LL, et al. The presence of cytokine-suppressive CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol*. 2005 Sep;62(3): 312-7. doi: 10.1111/j.1365-3083.2005.01656.x
21. Авдеева АС, Рубцов ЮП, Попкова ТВ и др. Особенности фенотипа Т-регуляторных клеток при раннем ревматоидном артрите. Научно-практическая ревматология. 2016;54(6):660-6.
[Avdeeva AS, Rubtsov YuP, Popkova TV, et al. Phenotypic features of T regulatory cells in early rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2016;54(6):660-6. (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2016-660-666
22. Emery P, Fleishmann R, Filipowicz-Sosnowska A, et al; for the DANCER Study group. 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-range trial. *Arthritis Rheum*. 2006;54:1390-400. doi: 10.1002/art.21778
23. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, 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. *Arthritis Rheum*. 2006; 54:2793-806. doi: 10.1002/art.22025
24. Emery P, Deodhar A, Rigby WF, et al. Efficacy and safety of different doses and retreatment of Rituximab: a randomized, placebo-controlled trial in patients who are biologically naïve with active rheumatoid arthritis and anadequate response to methotrexate (Study Evaluating Rituximab's Efficacy in MTX inadequate responders (SERENA). *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1629-35. doi: 10.1136/ard.2009.119933
25. Rubbert-Roth A, Tak PP, Zebrini C, et al. Efficacy and safety of various repeat treatment dosing regimes in Rituximab in patients with active rheumatoid arthritis: results of a phase III randomized study (MIRROR) dosing regimens of rituximab in patients with active RA: results of a phase III randomized study (MIRROR). *Rheumatology*. 2010;49: 1683-93. doi: 10.1093/rheumatology/keq116
26. Gabay C, Chatzidionysiou K, Nasonov E, et al. Effectiveness of different DMARD cotherapy in Rituximab-treated rheumatoid arthritis (RA) patients – results of a one-year follow up study from CERRERA collaboration. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(Suppl3): 68[OP0051].
27. Gottenberg JE, Ravaud P, Bardin T, et al. Risk factors of severe infections in patients with rheumatoid arthritis treated with Rituximab in the Autoimmunity and Rituximab (AIR) registry. *Arthritis Rheum*. 2010;62:2625-32. doi: 10.1002/art.27555
28. Cohen S, Keystone E, Genovese M, et al. Continued inhibition of structural damage over 2 years in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab in combination with methotrexate. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1158-61. doi: 10.1136/ard.2009.119222
29. Huscher D, Mittendorf T, von Hinuber U, et al. Evolution of cost structures in rheumatoid arthritis over the past decade. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(4):738-45. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204311
30. Насонов ЕЛ. Биоаналоги в ревматологии. Научно-практическая ревматология. 2016;54(6):628-40.
[Nasonov EL. Biosimilars in rheumatology. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2016; 54(6):628-40. (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2016-628-640
31. Насонов ЕЛ, Зонова ЕВ, Иванова ОН и др. Результаты сравнительного клини-

ческого исследования III фазы препаратов ритуксимаба (Ацеллбия® и Мабтера®) при ревматоидном артрите (исследование BIORA). Научно-практическая ревматология. 2016;54(5):510-9.
[Nasonov EL, Zonova EV, Ivanova ON, et al. The results of a phase III comparative clinical trial of rituximab (Acellbia® and Mabthera®) in rheumatoid arthritis (the BIORA study). *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2016; 54(5):510-9. (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2016-510-519
32. Higashida J, Wun T, Schmidt S, et al. Safety and efficacy of rituximab in patients with rheumatoid arthritis refractory to disease modifying antirheumatic drugs and anti-tumor necrosis factor-alpha treatment. *J Rheumatol*. 2005 Nov;32(11):2109-15.
33. Stradner MH, Dejaco C, Brickmann K, et al. A combination of cellular biomarkers predicts failure to respond to rituximab in rheumatoid arthritis: a 24-week observational study. *Arthritis Res Ther*. 2016 Aug 24;18:190. doi: 10.1186/s13075-016-1091-1
34. Brezinschek HP, Rainer F, Brickmann K, et al. B lymphocyte-typing for prediction of clinical response to rituximab. *Arthritis Res Ther*. 2012 Jul 6;14(4):R161. doi: 10.1186/ar3901
35. Melet J, Mulleman D, Goupille P, et al. Rituximab-induced T cell depletion in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2013 Nov;65(11):2783-90. doi: 10.1002/art.38107
36. Lavielle M, Mulleman D, Goupille P, et al. Repeated decrease of CD4+ T-cell counts in patients with rheumatoid arthritis over multiple cycles of rituximab treatment. *Arthritis Res Ther*. 2016 Oct 28;18(1):253. doi: 10.1186/s13075-016-1152-5
37. Hamel KM, Cao Y, Ashaye A, et al. B cell depletion enhance T regulatory cell activity essential in the supression of arthritis. *J Immunol*. 2011;187(9):4900-6. doi: 10.4049/jimmunol. 1101844
38. Feuchtenberger M, Muller S, Roll P, et al. Frequency of regulatory T cells is not affected by transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Open Rheumatol J*. 2008;2:81-8. doi: 10.2174/1874312900802010081
39. Julir A, Erra A, Palacio C, et al. An eight-gene blood expression profile predicts the response to infliximab in rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2009;4(10):e7556. doi: 10.1371/journal.pone.0007556

Поступила/отрецензирована/принята к печати
Received/Reviewed/Accepted
10.03.2020/23.03.2020/1.04.2020

Заявление о конфликте интересов/Conflict of Interest Statement

Исследование выполнено при частичной поддержке ЗАО «БИОКАД». Спонсор участвовал в разработке проекта исследования и поддержке исследовательской программы, а также принятии решения о представлении статьи для публикации. Конфликт интересов не повлиял на результаты исследования. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

The investigation has been partially funded by ZAO «BIOCAD». The sponsor has participated in the development of the investigation project and supported the investigation program, as well as in the decision to submit the article for publication. The conflict of interest has not affected the results of the investigation.The authors are solely responsible for submitting the final version of the manuscript for publication. All the authors have participated in developing the concept of the article and in writing the manuscript. The final version of the manuscript has been approved by all the authors.

Авдеева А.С. https://orcid.org/0000-0003-3057-9175
Рубцов Ю.П. https://orcid.org/0000-0001-9175-3013
Черкасова М.В. https://orcid.org/0000-0002-3246-1157
Насонов Е.Л. https://orcid.org/0000-0002-1598-8360