

Влияние генно-инженерных биологических препаратов на субпопуляции В-лимфоцитов у больных системной красной волчанкой

Меснянкина А.А.¹, Соловьев С.К.¹, Асеева Е.А.¹, Алексанкин А.П.², Александрова Е.Н.³, Насонов Е.Л.⁴

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва, Россия; ²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия; ³ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия; ⁴кафедра ревматологии Института профессионального образования ФГАОВ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет)» Минздрава России, Москва, Россия

¹115522, Москва, Каширское шоссе, 34А; ²117418, Москва, ул. Цюрупы, 3; ³111123, Москва, шоссе Энтузиастов, 86; ⁴119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Цель исследования — оценка влияния различных генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП), включая комбинированное лечение ритуксимабом (РТМ) и белимумабом (БЛМ), на субпопуляции В-лимфоцитов при динамическом наблюдении пациентов с системной красной волчанкой (СКВ).

Пациенты и методы. В исследование включено 64 пациента с достоверным диагнозом СКВ с высокой и средней степенью активности по индексу активности СКВ SLEDAI-2K; 47 из них получали РТМ, 10 — БЛМ, 7 — комбинированную терапию РТМ + БЛМ. Проводили определение субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови методом многоцветной проточной цитофлуориметрии с использованием панели моноклональных антител к поверхностным мембранным маркерам В-лимфоцитов. Оценка результатов осуществляли с помощью индексов SLEDAI-2K, BILAG.

Результаты и обсуждение. Терапия РТМ приводила к выраженному сокращению основных популяций В-лимфоцитов, при этом остаточными клетками являлись наивные В-клетки и различные субпопуляции В-клеток памяти, процентное распределение которых зависело от степени деплеции после курса РТМ. Неполная деплеция В-лимфоцитов связана с наличием высокого базального количества плазматических клеток — ПК (>0,2%). Через год после инициации терапии процентное соотношение субпопуляций В-лимфоцитов восстанавливалось практически до исходных значений, за исключением общей популяции В-клеток памяти. Применение БЛМ сопровождалось сокращением числа ПК и плазмобластов (ПБ), вплоть до полной деплеции. Отмечено снижение общего содержания CD19+ В-лимфоцитов и наивных В-лимфоцитов. Применение комбинации ГИБП позволило контролировать общую популяцию В-лимфоцитов, ее более медленное восстановление наблюдалось у пациентов с полной деплецией после курса РТМ. Терапия способствовала поддержанию низких концентраций ПБ и ПК, общей популяции В-клеток памяти и наивных В-лимфоцитов.

Выводы. У пациентов с СКВ все три метода терапии ГИБП продемонстрировали хорошую эффективность, выразившуюся в снижении клинической и лабораторной активности заболевания. Выявленная динамика субпопуляций В-лимфоцитов может быть использована для выбора терапии и оценки ее эффективности.

Ключевые слова: системная красная волчанка; субпопуляции В-лимфоцитов; ритуксимаб; белимумаб.

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

Для ссылки: Меснянкина АА, Соловьев СК, Асеева ЕА и др. Влияние генно-инженерных биологических препаратов на субпопуляции В-лимфоцитов у больных системной красной волчанкой. Современная ревматология. 2019;13(1):35–43.

Effect of biological agents on B-lymphocyte subpopulations in patients with systemic lupus erythematosus Mesnyankina A.A.¹, Solovyev S.K.¹, Aseeva E.A.¹, Aleksankin A.P.², Aleksandrova E.N.³, Nasonov E.L.⁴

¹V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia; ²Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia;

³A.S. Loginov Moscow Clinical Research and Practical Center, Moscow Healthcare Department of Health, Moscow, Russia;

⁴Department 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; ²3, Tsyurupa St., Moscow 117418; ³86, Shosse Entuziastov, Moscow 111123;

⁴8, Trubetskaya St., Build 2, Moscow, 119991

Objective: to evaluate the effect of different biological agents (BAs), including rituximab (RTM) and belimumab (BLM) combination therapy, on B-lymphocyte subpopulations during a follow-up of patients with systemic lupus erythematosus (SLE).

Patients and methods. The investigation enrolled 64 patients with a verified diagnosis of SLE with high and moderate disease activities according to the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI)-2K scores; 47 patients of them took RTM, 10 used BLM, and 7 received RTM + BLM combination therapy. Peripheral blood B-lymphocyte subpopulations were measured by multicolor flow cytometry, using a panel of monoclonal antibodies to B-lymphocyte surface membrane markers. The results were assessed using the SLEDAI-2K scores and the British Isles Lupus Assessment Group (BILAG) index.

Results and discussion. RTM therapy led to a marked decrease in major B-lymphocyte populations, the residual cells being naïve B-cells and different memory B cell populations, the percentage of which depended on the degree of depletion after a RTM cycle. Incomplete B-lymphocyte depletion was associated with the large baseline numbers of plasma cells (PCs) (>0.2%). One year after initiation of therapy, the percentage ratio of B-lymphocyte subpopulations returned almost completely to baseline values, except the whole memory B-cell population. BLM therapy resulted in a decrease in PCs and plasmablasts (PBs) to the point of their complete depletion. There were reductions in total CD19+ B-lymphocytes and naïve B lymphocytes. The use of the combination of BAs permitted the monitoring of the total B-lymphocyte population; its slower recovery was seen in patients with its complete depletion after a rituximab cycle. The therapy promoted maintenance of low concentrations of PCs and PBs, total memory B-cell and naïve B-cell populations.

Conclusion. In patients with SLE, all the three therapy with BAs demonstrated a good efficiency manifested by a decrease in clinical and laboratory disease activity. The found time course of changes in B-lymphocyte subpopulations can be used for the selection of therapy and for the evaluation of its efficacy.

Keywords: systemic lupus erythematosus; B-lymphocyte subpopulations; rituximab; belimumab.

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

For reference: Mesnyankina AA, Solovyev SK, Aseeva EA, et al. Effect of biological agents on B-lymphocyte subpopulations in patients with systemic lupus erythematosus. *Sovremennaya Revmatologiya=Modern Rheumatology Journal*. 2019;13(1):35–43.

DOI: 10.14412/1996-7012-2019-1-35-43

Системная красная волчанка (СКВ) — мультисистемное аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся гиперпродукцией органоспецифических аутоантител к различным компонентам клеточного ядра с развитием иммуновоспалительного повреждения тканей и внутренних органов [1]. Ведущую роль в патогенезе заболевания играют аутореактивные В-лимфоциты, которые синтезируют аутоантитела к множеству антигенов, участвуют в синтезе цитокинов и презентации антигена Т-лимфоцитам [2]. Процесс формирования В-лимфоцитов включает несколько стадий — от про-В-клетки до зрелой В-клетки. Контакт с антигеном приводит в последующем к образованию В-клеток памяти и плазматических клеток (ПК), которые подразделяются на короткоживущие и долгоживущие. При развитии В-клетки на ее поверхности появляются CD-мембранные маркеры и иммуноглобулины разных классов, что позволяет их идентифицировать и классифицировать [3–5].

Неудивительно, что повышение эффективности лечения СКВ связано с внедрением в терапию генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП) — ритуксимаба (РТМ) и белимумаба (БЛМ), ориентированных на подавление В-лимфоцитов. РТМ представляет собой химерные моноклональные антитела к CD20, которые вызывают деплецию В-клеток. В 2010 г. был зарегистрирован БЛМ — человеческие рекомбинантные моноклональные антитела (IgG1 λ), предотвращающие взаимодействие rBlyS (B-lymphocyte stimulator — В-лимфоцитарный стимулятор) с клеточными рецепторами аутореактивных В-лимфоцитов и тем самым уменьшающие В-клеточную гиперреактивность и выживаемость аутореактивных клонов В-лимфоцитов [6]. В настоящее время клеточными маркерами эффективности терапии ГИБП являются степень деплеции В-клеток, динамика клинических и лабораторных признаков активности заболевания, а маркерами обострения — репопуляция или сохранение остаточных В-лимфоцитов после применения ГИБП [7–9].

Тем не менее при использовании одинаковых схем лечения у пациентов со схожим клиническим течением заболевания не всегда удается достичь эффекта и ремиссии [8]. Сохраняется проблема идентификации показателей, которые характеризовали бы прогноз СКВ, исходы и эффективность лечения у конкретного пациента, отсутствуют надежные биомаркеры волчанки для диагностики, мониторинга и

прогнозирования реакции на терапию. Актуален поиск клинико-лабораторных показателей, способствующих прогнозированию будущего ответа на терапию, рецидива и течения заболевания. В связи с этим закономерен интерес к изучению конкретных звеньев патогенеза заболевания. Поскольку В-клетки играют огромную роль в развитии СКВ, современные методы терапии ГИБП ориентированы на их подавление, определение роли отдельных субпопуляций В-лимфоцитов у больных имеет большое значение для определения прогноза заболевания. Таким образом, подробный анализ субпопуляций В-лимфоцитов может способствовать решению поставленных задач. Данных об исходном составе субпопуляций В-лимфоцитов у пациентов с СКВ и их динамике на фоне лечения ГИБП немного, но накопленный исследователями материал позволяет выделить их как важный инструмент для оценки течения СКВ и исходов терапии.

Краткая характеристика субпопуляций В-лимфоцитов

В-клетки памяти подразделяются на IgD+/IgM+ (клетки памяти до переключения) и IgD–/IgG+, IgA+ (клетки памяти после переключения). Стимуляция этих клеток происходит по «облегченному» пути (имеют более низкие пороги активации и обладают гиперответом на различные раздражители), а следовательно, приводит к дальнейшей продукции ПК, секретирующих аутоантитела [10]. В-лимфоциты памяти могут представлять антигены за счет экспрессии В-клеточных рецепторов, а также молекул главного комплекса гистосовместимости класса II [3, 11].

Двойные негативные (ДН) В-лимфоциты (CD27–, IgD–) характеризуются как активированные В-клетки памяти. Их происхождение до конца не изучено, но, по имеющимся данным, эти клетки могут играть существенную роль в развитии СКВ. Увеличение их числа коррелирует с развитием СКВ, и на их долю часто приходится значительная часть всех В-клеток памяти [10, 12].

ПК классифицируются на долгоживущие (CD19+, CD138+) и короткоживущие (CD19+, CD38+). Особенностью этих клеток является отсутствие на их поверхности рецептора CD20, который служит основной мишенью для РТМ. После активации часть naïвных В-лимфоцитов дифференцируется в короткоживущие ПК (CD19+, CD38high+, CD20–, CD27high), которые секретируют при СКВ преимущественно антитела к двуспиральной ДНК (дсДНК) [3, 8].

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Таблица 1. Характеристика больных, включенных в исследование

Показатель	РТМ (n=47)	БЛМ (n=10)	РТМ + БЛМ (n=7)
Возраст, годы	35 [25; 40]	32 [26; 34]	21 [20; 29]
Женщины/мужчины, n	44/3	9/1	6/1
Длительность заболевания, n:			
0–5 лет	30	5	4
>6 лет	17	5	3
SLEDAI-2K, баллы	16 [11; 20]	10 [8; 11]	10 [9; 16]
SLEDAI-2K, n:		–	
активность 2-й степени	10	6	3
активность 3-й степени	37	4	4
BILAG total	18 [14; 25]	16 [12; 17],	17 [10; 18]
Поражение органов и систем, n (%):			
ВН	19 (40)	0	1 (14,2)
нейролюпус	8	0	0
васкулит	5 (10,6)	0	2 (28,6)
кожа	19 (40)	7 (70)	3 (42)
слизистые оболочки	15 (32)	3 (42)	4 (57)
артрит	21 (44,7)	6 (60)	4 (57)
серозит	18 (38)	3 (30)	1 (14,2)
гематологические нарушения	27 (57)	5 (50)	5 (71)
SLICC/ИП ≥1, n (%)	20 (42,5)	2 (28,6)	4 (57)

Примечание. Там, где не указано иначе, данные представлены как Ме [25; 75]. ВН – волчаночный нефрит; ИП – индекс повреждения.

Таблица 2. Исходные и повторные визиты, n

Визит	РТМ	БЛМ	РТМ + БЛМ	Всего
Исходно	47	10	7	64
3 мес	47	10	7	64
6 мес	42	7	7	56
9 мес	31	5	7	43
12 мес	34	5	5	44

Остальные наивные В-клетки развиваются в зародышевых центрах. Конечным результатом является продукция клеток памяти и долгоживущих ПК, которые секретируют антитела к Ro-, La-, Sm-антигенам [3].

BLyS (BAFF) и *APRIL* регулируют активацию и дифференцировку, а также повышают выживаемость аутореактивных клонов В-клеток. Они имеют три рецептора: BAFF-R, трансмембранный активатор, модулятор кальция и активатор лиганда циклофилина (TACI) и В-клеточный антиген созревания (BCMA), каждый из которых по-разному экспрессируется В-клетками в процессе их онтогенеза. BAFF-R экспрессируется всеми зрелыми и В-клетками памяти, подавляется в зародышевых центрах и появляется на ПК. BCMA в основном присутствует на плазмобластах (ПБ), но также обнаружен на небольшом количестве ДН В-клеток. TACI экспрессируется В-лимфоцитами, ПБ и ПК [13].

Цель исследования – оценка влияния различных ГИБП, включая комбинированное лечение РТМ и БЛМ, на субпопуляции В-лимфоцитов при динамическом наблюдении пациентов с СКВ.

Пациенты и методы.

В исследование включено 64 больных: 59 (92%) женщин и 5 (6%) мужчин с достоверным диагнозом СКВ высокой и средней степени активности по SLEDAI-2K. Медиана (Ме) возраста всей группы составляла 33 [25; 40] года. У 47 пациентов проводилась терапия РТМ в дозе от 500 до 2000 мг. При повторных визитах (через 3, 6, 9 мес) у 21 пациента было осуществлено плановое введение РТМ в дозе 500–1000 мг. 10 больным назначался БЛМ в дозе 10 мг/кг

массы тела ежемесячно. БЛМ применялся у 10 больных преимущественно кожно-слизистыми, суставными поражениями, имеющих гематологические нарушения. Другим 7 больным назначали комбинированную терапию РТМ + БЛМ. Им вводили РТМ в дозе 500–1000 мг, а через 3 мес – БЛМ по стандартной схеме 10 мг/кг 1 раз в месяц в течение 8 мес. Повторных курсов РТМ на протяжении периода наблюдения в этой группе не было (табл. 1, 2).

Все пациенты получали стандартную терапию, включающую иммуносупрессивные препараты, глюкокортикоиды (ГК), а при назначении ГИБП 55 (85%) пациентам проводили пульс-терапию 6-метилпреднизолоном в дозе от 0,25 до 3 г. В целом в группе пациентов, леченных РТМ, доза ГК составляла 15 [10; 28] мг/сут. У больных, находившихся на терапии БЛМ, использовали средние и низкие дозы ГК (15 [5; 20] мг/сут). На фоне комбинированной терапии РТМ + БЛМ пациенты также получали средние и низкие дозы ГК – от 20 до 5 мг/сут (10 [5; 15] мг/сут). У некоторых пациентов ввиду развития поражения жизненно важных органов применяли цитостатические препараты, включая циклофосфан (коротким курсом), микофенолата мофетил, а также метотрексат.

О Р И Г И Н А Л Ь Н Ы Е И С С Л Е Д О В А Н И Я

На момент включения и каждые 3 мес в течение года всем больным проводили стандартное обследование, принятое при СКВ: клинический, биохимический анализы крови, анализы мочи и иммунологическое обследование (определение антител к дсДНК, С3с-, С4-компонентов комплемента, IgG, IgA, IgM). При необходимости выполняли рентгенографию органов грудной клетки, УЗИ органов брюшной полости, эхокардиографию. В динамике оценивали индексы SLEDAI-2K, BILAG. Субпопуляции В-лимфоцитов определяли в периферической крови методом многоцветной проточной цитофлуориметрии с использованием панели моноклональных антител к поверхностным мембранным маркерам В-лимфоцитов. Результаты четырехцветного окрашивания В-лимфоцитов оценивали на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter NAVIOS™ (Beckman Coulter, США). Для каждого анализа подсчитано 50 000 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 (табл. 3).

В-клеточную деплецию CD19+ В-лимфоцитов после курса РТМ оценивали через 3 мес: 0% – полная деплеция; от 0,1 до 0,5% – частичная деплеция; >0,5% – отсутствие деплеции. Репопуляцией В-лимфоцитов считали их восстановление >1% у больных, которые достигли полной или частичной деплеции.

Статистическую обработку результатов проводили с применением программы Statistica 7.0 (StatSoft, США), включая

Таблица 3. Субпопуляции В-лимфоцитов и молекулярные маркеры

В-лимфоциты	Молекулярные маркеры
Наивные В-клетки	CD19+, CD27–, IgD+
Общая популяция В-клеток памяти	CD19+, CD27+
Непереключенные В-клетки памяти	CD19+, CD27+, IgD+
Переключенные В-клетки памяти	CD19+, CD27+, IgD–
ПБ	CD19+, CD38+++ , CD27+, IgD–, CD20–
ПК	CD19+, CD38+
ДН В-клетки памяти	CD19+, CD27–, IgD–

методы непараметрического анализа. Для параметров, распределение которых отличалось от нормального, при сравнении двух групп использовали U-критерий Манна–Уитни, результаты представлены в виде медианы (Me) [25-й; 75-й перцентили]. Применяли также методы описательной статистики. Статистическая значимость определялась как $p < 0,05$.

Результаты (собственные данные)

Исходное количество субпопуляций В-лимфоцитов у больных СКВ и здоровых доноров

При оценке общего исходного содержания CD19+ В-лимфоцитов у 64 пациентов с СКВ и здоровых доноров достоверных различий не выявлено. В табл. 4 представлено абсолютное и процентное содержание различных субпопуляций В-лимфоцитов у 64 больных СКВ и 20 здоровых доноров на момент включения в исследование. Пациенты с СКВ имели низкое количество переключенных В-клеток памяти, в то время как уровень ДН В-лимфоцитов и ПБ был выше.

Влияние терапии РТМ на субпопуляции В-лимфоцитов

Динамика В-лимфоцитов к 3-му месяцу после введения ГИБП. Оценка динамики В-лимфоцитов в этот период

Таблица 4. Субпопуляции В-лимфоцитов у больных СКВ и здоровых доноров (Me [25; 75])

В-лимфоциты	Молекулярные маркеры	Количество В-клеток, %/абс. (×10 ⁹ /л)		p
		больные СКВ (n=64)	здоровые доноры (n=20)	
Общая популяция В-лимфоцитов	CD19+ В-клетки	8,85 [4,4; 13,5]/0,1 [0,08; 0,25]	8,5 [7,2; 11,0]/0,2 [0,09; 0,2]	0,79/0,56
Наивные В-клетки	CD19+, CD27–, IgD+	67 [49; 78]/0,08 [0,03; 0,13]	64,7 [57,6; 72,4]/0,1 [0,06; 0,1]	0,15/0,44
В-клетки памяти (общая популяция)	CD19+, CD27+	1 [0,6; 1,8]/0,001 [0,0006; 0,004]	2,2 [1,1; 3,0]/0,003 [0,001; 0,007]	0,028/0,12
Непереключенные В-клетки памяти	CD19+, CD27+, IgD+	5 [2,7; 8,2]/0,005 [0,0026; 0,01]	7,4 [3,7; 11,1]/0,01 [0,005; 0,02]	0,12/0,056
Переключенные В-клетки памяти	CD19+, CD27+, IgD–	4,85 [2; 11]/0,0079 [0,003; 0,015]	12,8 [9,3; 17,0]/0,02 [0,01; 0,04]	0,001/0,0025
ПБ	CD19+, CD38+++ , CD27+, IgD–, CD20–	0,3 [0,1; 0,4]/0,0003 [0,00017; 0,00077]	0,1 [0,1; 0,2]/0,0002 [0,0001; 0,0004]	0,022/0,33
ПК	CD19+, CD38+	0,1 [0,1; 0,2]/0,0001 [0,00005; 0,00038]	0,1 [0,05; 0,1]/0,0001 [0,00; 0,0002]	0,06/0,2
ДН В-клетки памяти	CD19+, CD27–, IgD–	18 [11,1; 29,6]/0,02 [0,01; 0,04]	13,3 [7,1; 19,3]/0,02 [0,01; 0,02]	0,02/0,19

О Р И Г И Н А Л Ь Н Ы Е И С С Л Е Д О В А Н И Я

Таблица 5. Степень деплеции В-лимфоцитов к 3-му месяцу наблюдения, n (%)

РТМ, мг	Полная деплеция	Частичная деплеция	Отсутствие деплеции
500 (n=12)	4 (33)	5 (42)	3 (25)
1000 (n=39)	21 (54)	9 (23)	9 (23)
2000 (n=3)	2 (67)	—	1 (33)
Всего (n=54)	27 (50)	14 (26)	13 (24)

была проведена у 54 пациентов, которые получали РТМ (n=47) и комбинированную терапию РТМ и БЛМ (n=7). Степень деплеции В-клеток к 3-му месяцу не зависела от исходной активности СКВ (SLEDAI-2K) и длительности заболевания. К 3-му месяцу полная деплеция В-лимфоцитов чаще наблюдалась при применении более высоких доз РТМ; полной деплеции удалось достичь у 50% пациентов (табл. 5).

Активность заболевания по SLEDAI-2K/BILAG исходно соответствовала 14 [10; 18] / 17 [13; 22] баллам, а к 3-му месяцу наблюдения отмечалось ее снижение до 4 [2; 10] / 8 [1; 10] баллов у пациентов с полной деплецией, до 5 [4; 8] / 8 [1; 9] баллов у больных с частичной деплецией и до 8 [5; 10] / 9 [2; 16] баллов у пациентов с отсутствием деплеции (p<0,00000). Концентрация антител к дсДНК снизилась до 54 [14; 111], 45 [25; 75] и 135 [33; 300] Ед/мл у больных с частичной, полной деплецией и отсутствием деплеции соответственно (p<0,000003). Однако уровни С3с-, С4-компонентов комплемента у больных с полной деплецией были значительно выше, чем у пациентов с отсутствием деплеции: С3с – 0,97 [0,84; 1,18], 0,75 [0,66; 0,97] и 0,69 [0,52; 0,78] г/л; С4 – 0,17 [0,13; 0,21], 0,13 [0,12; 0,15] и 0,13 [0,072; 0,16] г/л (p<0,0007 и p<0,02 соответственно для пациентов с полной и частичной деплецией).

У 14 пациентов с частичной деплецией, ответивших на лечение, к 3-му месяцу после 1-го курса РТМ отмечалось снижение уровней всех субпопуляций В-клеток, терапия приводила к быстрому истощению наивных и ДН В-клеток памяти. Остаточными клетками являлись преимущественно наивные, непереключенные, переключенные, ДН В-клетки памяти. Особенностью стало их процентное перераспределение с тенденцией к увеличению доли В-клеток памяти: ДН – 27,7 [18,4; 50]%, переключенных – 22,7 [4,3; 50]%, непереключенных – 20 [2,5; 35]%, с относительно более низким количеством наивных В-клеток – 15 [8,7; 23,3]%, причем у половины больных превалировала доля непереключенных, у другой половины – переключенных В-клеток памяти. Процентное количество общей популяции В-клеток памяти достоверно сокращалось (0,1 [0; 0,2]%; p<0,000007).

У 13 пациентов с отсутствием деплеции также отмечалось снижение общей популяции CD19+ В-лимфоцитов по сравнению с базальными уровнями, однако их процентное соотношение практически не отличалось от исходного, т. е. сохранялось высокое количество наивных (30 [16; 60]%) и ДН (42 [20; 51]%) В-клеток памяти при более низких показателях переключенных (6,6 [2,2; 23]%) и непереключенных (4,5 [2,8; 10,8]%) В-клеток памяти.

У пациентов с более высоким базальным процентным количеством ПК чаще отмечалась неполная деплеция общей популяции CD19+ В-лимфоцитов через 3 мес после инициации терапии ГИБП (p<0,006; рис. 1). Так, из 27 больных с частичной деплецией и отсутствием деплеции В-лимфоцитов у 17 (62%) уровень ПК был равен или превышал 0,2% (с максимальным значением до 0,7%), тогда как из 27 пациентов с полной деплецией у 22 (81%) количество ПК соответствовало 0–0,1% (p<0,006).

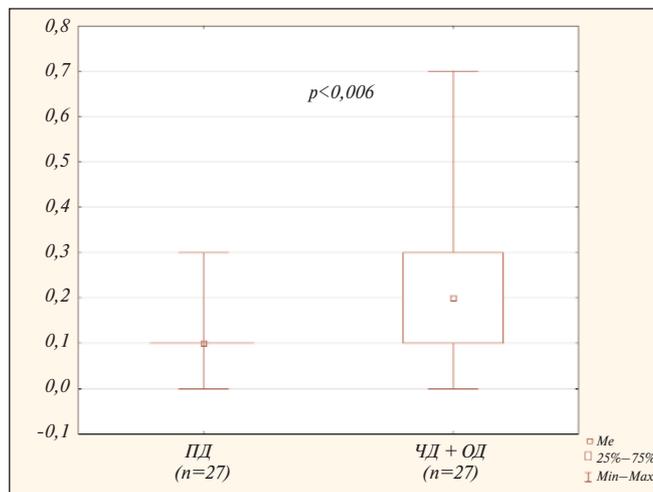


Рис. 1. Базальное содержание (в %) ПК (CD19+, CD38+): пациенты с полной деплецией (ПД) к 3-му месяцу после курса РТМ (n=27); пациенты с частичной деплецией (ЧД) и отсутствием деплеции (ОД) после курса РТМ (n=27)

Динамика В-лимфоцитов с 6-го по 12-й месяц после введения ГИБП. Репопуляция к 6-му месяцу наблюдения отмечалась у 38 (78%) больных больше за счет наивных, ДН, непереключенных, переключенных В-клеток памяти.

У 16 больных с полной деплецией после курса РТМ и последующим восстановлением CD19+ В-лимфоцитов к 6-му месяцу выявлена более медленная репопуляция общей группы В-клеток памяти (0,1 [0,1; 0,2]%) и наивных В-клеток (32 [17; 68]%). Однако у половины из них зарегистрировано нарастание процентного количества непереключенных (от 17 до 83%), а у другой половины – переключенных (от 14 до 87%) В-клеток памяти.

Для оценки влияния РТМ на субпопуляции В-лимфоцитов при длительном наблюдении были выделены 16 пациентов, которым РТМ вводили однократно, т. е. в последующем периоде наблюдения повторные курсы ГИБП у них не проводились. У этих пациентов зарегистрировано восстановление процентного соотношения практически всех субпопуляций В-лимфоцитов к 12-му месяцу, однако при сопоставлении с базальным распределением у них выявлено значимо более низкое процентное количество общей популяции В-клеток памяти (0,15 [0,1; 0,3]; p<0,000012).

Таблица 6. Динамика субпопуляций В-лимфоцитов на фоне терапии БЛМ

Период	Непереключенные В-клетки памяти		ДН В-клетки памяти		Наивные В-лимфоциты	
	%	абс. ($\times 10^9/\text{л}$)	%	абс. ($\times 10^9/\text{л}$)	%	абс. ($\times 10^9/\text{л}$)
Исходно (n=10)	3,5 [1,3; 6,8]	0,004 [0,002; 0,005]	15,2 [10,4; 22]	0,01 [0,01; 0,04]	70,4 [67; 83]	0,09 [0,05; 0,2]
3 мес (n=10)	22,3 [9,9; 29,5]*	0,009 [0,008; 0,034]*	22 [17; 25,5]	0,01 [0,0095; 0,03]	45,5 [33; 63,8]	0,04 [0,02; 0,01]
6 мес (n=7)	14 [7,3; 41]	0,009 [0,002; 0,03]	32 [18; 42]	0,02 [0,005; 0,046]	31,8 [22,7; 47,7]	0,02 [0,004; 0,04]
9 мес (n=5)	18 [15,7; 22]	0,01 [0,004; 0,04]	28 [27,3; 32]	0,03 [0,02; 0,05]	22,7 [21,6; 48,8]	0,02 [0,02; 0,03]
12 мес (n=5)	27,9 [24; 36,8]	0,01 [0,0065; 0,045]	39 [23; 46]	0,015 [0,0065; 0,03]	16,4 [14,3; 27,5]	0,013 [0,003; 0,04]

* $p < 0,008$.

Влияние терапии БЛМ на субпопуляции В-лимфоцитов

БЛМ получали 10 пациентов со средней и высокой степенью активности заболевания, из них 3 использовали препарат 9 мес (ввиду его отсутствия в аптечной сети), 7 – 12 мес. На фоне терапии БЛМ клинико-иммунологический ответ зафиксирован у 9 пациентов. Такое лечение приводило к постепенному уменьшению активности СКВ, что регистрировалось уже к 3-му месяцу наблюдения у 7 пациентов, к 6-му и 9-му месяцам еще у 2 больных: SLEDAI-2K/BILAG исходно – 10 [8; 11] / 16 [12; 17] баллов, через 12 мес – 4 [2; 4] / 1 [1; 5] балл. В иммунологическом анализе крови зарегистрировано снижение титра антител к дсДНК: исходно – 113 [73; 300] Ед/мл, через 12 мес – 73 [27; 206] Ед/мл; нарастание уровня компонентов комплемента С3: исходно – 0,7 [0,57; 0,9] г/л, через 12 мес – 0,9 [0,7; 0,94] г/л и С4: исходно – 0,09 [0,06; 0,12] г/л, через 12 мес – 0,15 [0,12; 0,2] г/л. Динамика этих показателей была наиболее выражена с 6-го месяца наблюдения.

За 12 мес исследования у больных отмечалось снижение общей популяции CD19+ В-лимфоцитов (с 7,5 [6,4; 11,6]% до 2,9 [1,5; 6,5]%), однако полной деплеции не достигнуто. Выявлено перераспределение процентного соотношения

субпопуляций В-лимфоцитов в сторону снижения доли наивных В-лимфоцитов и увеличения количества непереключенных и в меньшей степени ДН В-клеток памяти. Одновременно с этим зарегистрировано прогрессирующее снижение абсолютных значений наивных В-лимфоцитов и нарастание непереключенных В-клеток памяти к 3-му месяцу после инициации БЛМ. Однако количество последних после 3-го месяца не увеличивалось. На популяцию общей группы В-клеток памяти препарат значимо не влиял (табл. 6).

При оценке динамики ПК и ПБ отмечалось снижение их абсолютных показателей к 6–9-му месяцу терапии БЛМ, к 6-му месяцу наблюдения у 4 из 7 пациентов не определялись в периферической крови ПБ, у 3 из 7 – ПК. Однако к 12-му месяцу доля ПК нарастала (рис. 2, а, б).

Влияние комбинированной терапии РТМ + БЛМ на субпопуляции В-лимфоцитов

Комбинированную терапию получали 7 пациентов с различными симптомами СКВ, преимущественно с высокой степенью активности заболевания. К 3-му месяцу после начала терапии РТМ ответ на терапию был достигнут у 4 больных. Еще у 2 пациентов ответ получен к 6-му месяцу

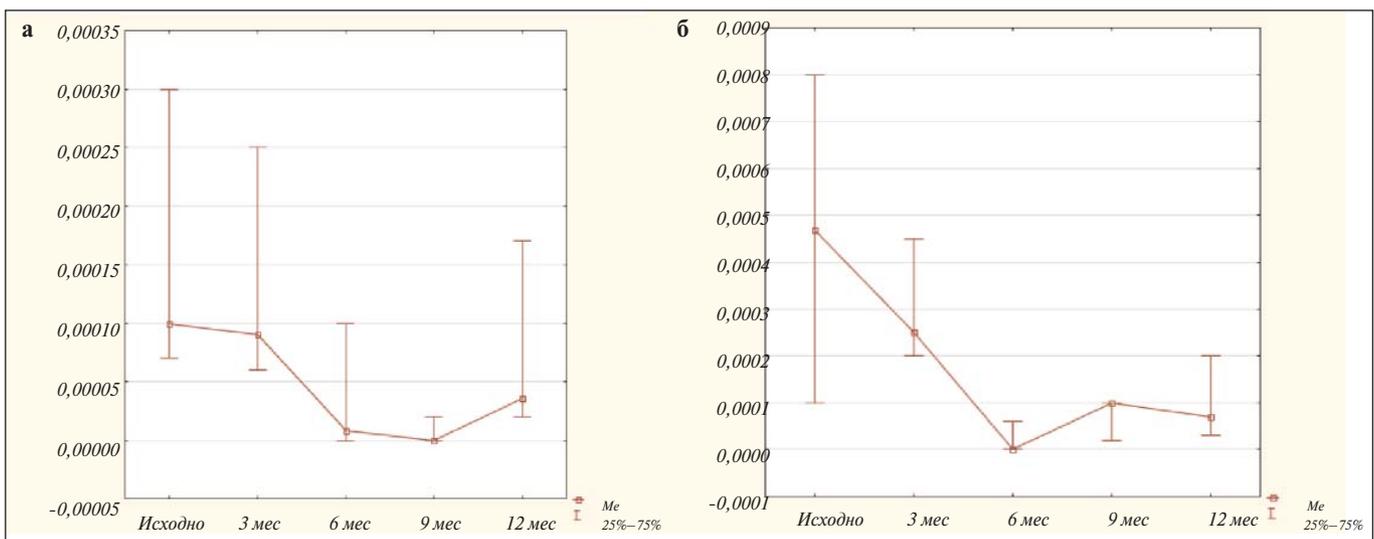


Рис. 2. Динамика абсолютного содержания ($\times 10^9/\text{л}$) субпопуляций В-лимфоцитов на фоне терапии БЛМ за 12 мес наблюдения: а – ПК; б – ПБ

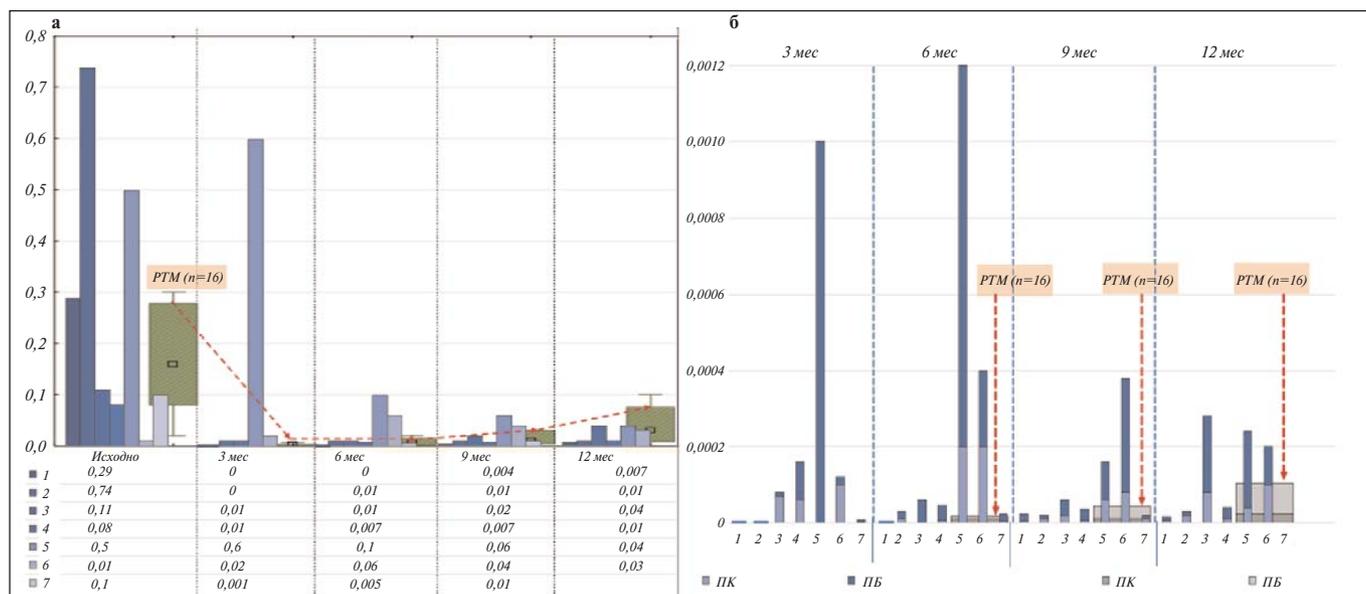


Рис. 3. Динамика абсолютного содержания ($\times 10^9/\text{л}$) CD19+ лимфоцитов на фоне комбинированной терапии и лечения РТМ: синяя шкала – количество CD19+ В-лимфоцитов у 7 пациентов, находившихся на комбинированной терапии РТМ + БЛМ; зеленая шкала – количество CD19+ В-лимфоцитов у 16 пациентов, получавших РТМ (а). Количество ($\times 10^9/\text{л}$) ПБ и ПК у 7 пациентов, которые получали комбинированную терапию, на 3-м, 6-м, 9-м и 12-м месяце (б)¹

наблюдения после подключения к терапии БЛМ. У 1 больной терапия была неэффективна.

При оценке активности СКВ отмечено прогрессирующее ее снижение в течение периода наблюдения, согласно индексам активности SLEDAI-2K / BILAG: исходно – 10 [9; 16] / 17 [10; 18] баллов, через 12 мес – 3 [2; 6] / 1 [1; 2] балл. За указанный период титр антител к дсДНК снижался (174 [36; 300] и 12 [6; 34] Ед/мл исходно и через 12 мес). Одновременно отмечалось увеличение содержания компонентов комплемента С3 (0,4 [0,37; 0,44] и 0,85 [0,81; 0,88] г/л исходно и на 12-м месяце) и С4 (0,038 [0,03; 0,054] и 0,17 [0,15; 0,26] г/л исходно и на 12-м месяце).

К 3-му месяцу полная деплеция достигнута у 2 пациентов, частичная – у 1, отсутствие деплеции отмечено у 4 (57%). Учитывая ранее полученные данные о влиянии БЛМ на В-лимфоциты, представлялось любопытным оценить дальнейшую динамику общей популяции В-лимфоцитов после добавления к терапии этого препарата. С этой целью была проведена количественная оценка общей популяции В-лимфоцитов у 16 пациентов с СКВ, которым однократно вводили только РТМ; полученные результаты были сопоставлены с данными каждого пациента, находившегося на комбинированной терапии. Установлено, что у 16 пациентов, которым проводили монотерапию ГИБП, после достижения полной и частичной деплеции в дальнейшем отмечалось нарастание уровня В-лимфоцитов ($p < 0,003$), тогда как у пациентов, получавших комбинированное лечение ГИБП (даже несмотря на отсутствие полной деплеции в большом числе случаев), количество В-лимфоцитов продолжало сокращаться на протяжении всего периода наблюдения. Кроме того, у больных с полной и частичной деплецией наблюдалась более медленная их репопуляция (рис. 3, а).

У пациентов, получавших РТМ однократно с 6-го месяца, отмечалась тенденция к нарастанию уровня ПК и ПБ.

Комбинированная терапия способствовала поддержанию низкого количества этих клеток у больных с полной и частичной деплецией или дальнейшему уменьшению их содержания у больных, у которых деплеция после курса РТМ не была достигнута (рис. 3, б).

Репопуляция В-лимфоцитов на фоне комбинированной терапии происходила, как и при монотерапии РТМ. К 12-му месяцу процентное соотношение субпопуляций В-лимфоцитов почти соответствовало исходному, однако отмечались более высокая доля непереключенных В-клеток памяти (3,7 [2,7; 14,5]% и 23,6 [10,5; 39,4]% исходно и через 12 мес соответственно) и сокращение количества наивных В-клеток (69 [21; 83]% и 34 [10; 43]% исходно и через 12 мес соответственно) по сравнению с исходным составом. Процентное содержание общей популяции В-лимфоцитов памяти у пациентов, у которых был достигнут эффект после терапии РТМ, также имело тенденцию к снижению.

Обсуждение. Основной мишенью таргетной терапии при СКВ являются В-лимфоциты [14]. В нескольких экспериментальных открытых клинических исследованиях сообщалось, что терапия истощения В-клеток РТМ безопасна и эффективна для лечения СКВ, в том числе и ВН [15]. Другой ГИБП – БЛМ, эффективность которого подтверждена в масштабных клинических исследованиях, официально зарегистрирован для лечения СКВ. Различные по механизму действия, однако имеющие общую конечную точку (В-лимфоциты), РТМ и БЛМ занимают ключевое место в современной терапии СКВ. В нашем исследовании представлены опыт применения РТМ и БЛМ, а также комбинированного лечения РТМ и БЛМ, особенности их влияния на клеточный иммунитет и течение заболевания, отмечены предполагаемые предикторы ответа на терапию ГИБП.

Динамика субпопуляций В-лимфоцитов при терапии РТМ. Длительность эффекта после курса лечения РТМ со-

¹Цветной рисунок к этой статье размещен на сайте журнала: mj.ima-press.net

ставляет около 4–6 мес [16]. S. Nakayamada и соавт. [17] отмечают, что такое лечение вызывает быстрое истощение наивных В-клеток и непереклоченных В-клеток памяти, тогда как ПК персистируют в организме до 28 дней. Длительность ремиссии, вероятно, связана со стойким истощением В-клеток памяти независимо от репопуляции наивных В-клеток. В работе S. Iwata и соавт. [18] получены аналогичные результаты. По данным M.J. Leandro и соавт. [19], после курса РТМ остаточными клетками являются В-клетки памяти и ПК. P. Roll и соавт. [20] после достижения деплеции и начала репопуляции отметили увеличение количества наивных В-клеток и медленное восстановление популяции В-клеток памяти.

В нашем исследовании получены близкие результаты. Терапия РТМ приводила к выраженному сокращению количества В-лимфоцитов, преимущественно за счет наивных [17, 18] и ДН В-клеток памяти, при этом остаточными клетками являлись различные субпопуляции В-клеток памяти и наивные В-клетки, процентное распределение которых зависело от степени деплеции В-лимфоцитов [19].

Восстановление количества В-клеток происходило больше за счет наивных клеток и клеток памяти [17, 18], причем в дебюте репопуляции превалировала доля переключенных или непереклоченных В-клеток памяти. Полученные данные отражают характер восстановления клеток после достижения истощения В-лимфоцитов. Однако в дальнейшем субпопуляции В-клеток стремились к восстановлению исходного процентного количества, т. е. произошло нарастание уровня наивных и ДН В-клеток при более низких концентрациях непереклоченных и переключенных В-клеток памяти [20]. Тем не менее длительное наблюдение показало, что после успешного применения ГИБП происходит медленное восстановление общей популяции В-клеток памяти, количество которых к 12-му месяцу было значимо ниже при сравнении с исходным составом.

Другой нашей задачей был поиск предиктора ответа на терапию РТМ. Так, M.Y. Yusof и соавт. [7] установили, что наличие ответа на ГИБП может быть ассоциировано с низким исходным количеством ПК. J.H. Anolik и соавт. [21] связывают подобные результаты со степенью восстановления В-клеток памяти. В нашем исследовании показано, что неполная деплеция В-лимфоцитов обусловлена наличием высокого базального количества ПК (>0,2%), что также подтверждается данными M.Y. Yusof и соавт. [7]. Эти данные могут способствовать более качественному подбору терапии с включением РТМ, целью которой является полное клеточное истощение с помощью либо увеличения дозы ГИБП, либо применения дополнительной инфузии у больных с более высоким содержанием ПК.

Динамика субпопуляций В-лимфоцитов при терапии БЛМ. В настоящее время существует мало исследований, посвященных динамике субпопуляций В-лимфоцитов на фоне применения БЛМ. A.M. Jacobi и соавт. [22] отметили, что лечение БЛМ приводит к сокращению числа наивных, переходных В-клеток и ПК. Аналогичные результаты получены в исследовании E. Pontarini и соавт. [23], в котором подобные изменения с 24-й недели ассоциировались с нормализацией иммунологических параметров (С4, антинуклеарный фактор и ревматоидный фактор). В свою очередь, W. Stohl и соавт. [24] среди особенностей действия БЛМ на

субпопуляции В-клеток выделили отсутствие влияния на В-клетки памяти.

В нашем исследовании терапия БЛМ приводила к снижению количества наивных В-клеток [22–24], а у большей части пациентов – к сокращению и общей популяции CD19+ В-лимфоцитов, однако полная деплеция В-клеток не достигнута. Лечение БЛМ способствовало снижению доли ПК и ПБ [22, 23], а у части больных к 6-му месяцу эти субпопуляции не определялись в периферической крови, одновременно с этим отмечалось выраженное снижение иммунологической активности СКВ (уменьшение уровня антител к дсДНК, нарастание содержания С4-компонента комплемента) [23]. Поскольку 3 пациента получали ГИБП до 9-го месяца и наблюдение за ними продолжалось до 12 мес, это могло обосновать нарастание после 9-го месяца количества ПК и ПБ. Так, W.G. Halpern и соавт. [25] продемонстрировали снижение числа ПК на фоне применения БЛМ, однако оно было обратимым после отмены препарата.

Динамика субпопуляций В-лимфоцитов при комбинированной терапии РТМ + БЛМ. Существуют единичные исследования эффективности комбинированной терапии с применением РТМ + БЛМ, которые в основном демонстрируют влияние ГИБП на клинико-лабораторные параметры у больных СКВ. И только в одной работе проведен подробный анализ субпопуляций В-лимфоцитов при наблюдении за мышами (NZB/NZW) F1. W. Lin и соавт. [26] выдвинули предположение, что комбинированная терапия обеспечивает значительное улучшение течения и выживаемости при СКВ за счет наиболее эффективной деплеции тканевых и циркулирующих аутореактивных В-клеток. T. Kraaij и соавт. [11] и F. Simonetta и соавт. [27] отметили высокую эффективность терапии у больных ВН. R. Gualtierotti и соавт. [28] сообщили об эффективности последовательного применения РТМ и БЛМ: у 3 больных такая терапия позволила достигнуть длительной ремиссии и снизить дозу пероральных ГК.

Выводы. Несмотря на различия в развитии и тяжести заболевания, комбинированная терапия оказалась высокоэффективной у наших пациентов: наблюдались улучшение клинической картины, лабораторных маркеров активности СКВ, в частности повышение концентрации С3-, С4-компонентов комплемента, стойкое снижение концентрации антител к дсДНК. Нами впервые продемонстрировано влияние комбинированной терапии на субпопуляции В-лимфоцитов у больных СКВ. Такое лечение способствовало лучшей управляемости В-лимфоцитов. Последовательное применение ГИБП позволило контролировать общую популяцию В-лимфоцитов – в результате терапии происходила их более медленная репопуляция у больных с полной деплецией после курса РТМ и продолжалось сокращение у больных с отсутствием деплеции. Кроме того, ПК и ПБ удавалось поддерживать на низком уровне независимо от первичного ответа на РТМ. К 12-му месяцу процентное распределение всех субпопуляций В-лимфоцитов стремилось к исходному. Тем не менее при применении БЛМ процентное количество непереклоченных В-клеток памяти увеличивалось, а наивных В-клеток – сокращалось. В то же время лечение РТМ приводило к снижению общей популяции В-клеток памяти.

ЛИТЕРАТУРА

1. Насонов ЕЛ, Насонова ВА, редакторы. Ревматология. Национальное руководство. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2008. 714 с. [Nasonov EL, Nasonova VA, editors. *Revmatologiya. Natsional'noe rukovodstvo* [Rheumatology. National guidelines]. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. 714 p.]
2. Gottschalk TA, Tsantikos E, Hibbs ML. Pathogenic inflammation and its therapeutic targeting in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol.* 2015 Oct 28;6:550. doi: 10.3389/fimmu.2015.00550. eCollection 2015.
3. Anolik JH, Looney RJ, Lund FE, et al. Insights into the heterogeneity of human B cells: diverse functions, roles in autoimmunity, and use as therapeutic targets. *Immunol Res.* 2009 Dec;45(2-3):144-58. doi: 10.1007/s12026-009-8096-7. Epub 2009 Apr 7.
4. Александрова ЕН. В-клетки при аутоиммунных ревматических заболеваниях. В кн.: Насонов ЕЛ, редактор. Анти-В-клеточная терапия в ревматологии: фокус на ритуксимаб. Москва: ИМА-ПРЕСС; 2012. С. 8-45. [Aleksandrova EN. B-cells in autoimmune rheumatic diseases. In: Nasonov EL, editor. *Anti-V-kletochnaya terapiya v revmatologii: fokus na rituksimab* [Anti-B-cell therapy in rheumatology: focus on rituximab]. Moscow: IMA-PRESS; 2012. P. 8-45.]
5. 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.
6. Tesar V, Hruskova Z. Belimumab in the management of systemic lupus erythematosus — an update. *Expert Opin Biol Ther.* 2017 Jul;17(7):901-908. doi: 10.1080/14712598.2017.1324846. Epub 2017 May 16.
7. Md Yusof MY, Shaw D, El-Sherbiny YM, et al. Predicting and managing primary and secondary non-response to rituximab using B-cell biomarkers in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2017 Nov;76(11):1829-1836. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-211191. Epub 2017 Jul 6.
8. 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 May;48(5):1332-42.
9. Vital EM, Dass S, Buch MH, et al. B cell biomarkers of rituximab responses in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2011 Oct;63(10):3038-47. doi: 10.1002/art.30466.
10. Jacobi AM, Reiter K, Mackay M, et al. Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus delineation by expression: of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis Rheum.* 2008 Jun;58(6):1762-73. doi: 10.1002/art.23498.
11. Kraaij T, Huizinga TW, Rabelink TJ, Teng YK. Belimumab after rituximab as maintenance therapy in lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford).* 2014 Nov;53(11):2122-4. doi: 10.1093/rheumatology/keu369. Epub 2014 Sep 8.
12. 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 May 15;178(10):6624-33.
13. Thompson JS, Bixler SA, Qian F, et al. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science.* 2001 Sep 14;293(5537):2108-11. Epub 2001 Aug 16.
14. Liossis SC, Staveri C. B Cell-based treatments in SLE: past experience and current directions. *Curr Rheumatol Rep.* 2017 Nov 4;19(12):78. doi: 10.1007/s11926-017-0707-z.
15. Bertias GK, Tektonidou M, Amoura Z, et al; European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association. Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. *Ann Rheum Dis.* 2012 Nov;71(11):1771-82. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201940. Epub 2012 Jul 31.
16. Cambridge G, Isenberg DA, Edwards JC, et al. B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: relationships among serum B lymphocyte stimulator levels, autoantibody profile and clinical response. *Ann Rheum Dis.* 2008 Jul;67(7):1011-6. Epub 2007 Oct 25.
17. Nakayamada S, Iwata S, Tanaka Y. Relevance of lymphocyte subsets to B cell-targeted therapy in systemic lupus erythematosus. *Int J Rheum Dis.* 2015 Feb;18(2):208-18. doi: 10.1111/1756-185X.12534. Epub 2015 Jan 3.
18. Iwata S, Saito K, Hirata S, et al. Efficacy and safety of anti-CD20 antibody rituximab for patients with refractory systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2018 Apr;27(5):802-811. doi: 10.1177/0961203317749047. Epub 2018 Jan 7.
19. Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JC. Reconstitution of peripheral blood B cell after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006 Feb;54(2):613-20.
20. Roll P, Palanichamy A, Kneitz C, et al. Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006 Aug;54(8):2377-86.
21. 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 Sep;56(9):3044-56.
22. 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 Jan;62(1):201-10. doi: 10.1002/art.27189.
23. Pontarini E, Fabris M, Quartuccio L, et al. Treatment with belimumab restores B cell subsets and their expression of B cell activating factor receptor in patients with primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford).* 2015 Aug;54(8):1429-34. doi: 10.1093/rheumatology/kev005. Epub 2015 Mar 3.
24. Stohl W, Hiepe F, Latinis KM, et al. Belimumab reduces autoantibodies, normalizes low complement, and reduces select B-cell populations in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012 Jul;64(7):2328-37. doi: 10.1002/art.34400.
25. Halpern WG, Lappin P, Zanardi T, et al. Chronic administration of belimumab, a BlyS antagonist, decreases tissue and peripheral blood B-lymphocyte populations in cynomolgus monkeys: pharmacokinetic, pharmacodynamics and toxicologic effects. *Toxicol Sci.* 2006 Jun;91(2):586-99. Epub 2006 Mar 3.
26. Lin W, 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 Rheumatol.* 2015 Jan;67(1):215-24. doi: 10.1002/art.38907.
27. Simonetta F, Allali D, Roux-Lombard P, Chizzolini C. Successful treatment of refractory lupus nephritis by the sequential use of rituximab and belimumab. *Joint Bone Spine.* 2017 Mar;84(2):235-236. doi: 10.1016/j.jbspin.2016.01.008. Epub 2016 May 26.
28. Gualtierotti R, Borghi MO, Gerosa M, et al. Successful sequential therapy with rituximab and belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a case series. *Clin Exp Rheumatol.* 2018 Jul-Aug;36(4):643-647. Epub 2018 Feb 27.

Поступила 5.02.2019

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.