

*Originalni članci/
Original articles*

EFEKTI RITUXIMABA U LEČENJU
REUMATOIDNOG ARTRITISA

EFFECTIVENESS OF THERAPEUTIC
RESPONSE TO RITUXIMAB (RTX) IN
PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Correspondence to:

Dr Sanja Bukilica

specijalista interne medicine-reumatolog
PZU Opšta bolnica Meljine
Braće Grakalića 94-100,
85340 Herceg Novi, Crna Gora
Tel: +382 31 640 988,
e-mail: sanja.bukilica@gmail.com

Sanja Bukilica¹, Dušan Stefanović², Milan Petronijević²,
Milan Ćirković², Vjeroslava Slavić³.

¹ Privatna zdravstvena ustanova Meljine, Herceg Novi, Crna Gora

² Vojnomedicinska akademija Beograd, Srbija

³ Institut „Dr Simo Milošević” Igalo, Crna Gora

Ključne reči

rituximab, reumatoidni artritis.

Key words

rituximab, rheumatoid arthritis

Sažetak

UVOD: Istraživanja posljednjih decenija XX veka rezultovala su boljim razumevanjem patogenetskih mehanizama u nastajanju reumatoidnog artritisa (RA) kao hroničnog sistemskog autoimunskog oboljenja. Mada je postignut značajan iskorak u kontroli oboljenja, još uvek postoji populacija pacijenata sa refrakternim RA (r-RA) koji su poseban izazov u terapijskom odabiru.

CILJ: Cilj rada je bio da se ukaže na efikasnost terapijskog odgovora na rituximab (RTX) kod bolesnika sa RA preko DAS28 skora, kao i da se ispita da li postoji razlika u postignutom terapijskom odgovoru kod seropozitivnih i seronegativnih RA bolesnika.

MATERIJAL I METODE: Retrospektivna studija je obuhvatila 35 bolesnika koji su ispunjavali kriterijume za dijagnozu RA (ACR/EULAR 2010.) i koji su lečeni u Vojnomedicinskoj akademiji u Klinici za reumatologiju u periodu od 2006-2012. godine. Kod svih bolesnika je zbog lošeg terapijskog odgovora na ranije primenjeno lečenje započeto lečenje biološkom terapijom RTX u dozi od 1000 mg po protokolu. Procena terapijskog odgovora je urađena na osnovu DAS28 skora, određenog pre započinjanja terapije i nakon 24 nedelje.

REZULTATI: Terapija RTX, jedan ciklus u dozi od 1000 mg, dovodi do značajnog poboljšanja kod bolesnika sa RA što je utvrđeno statistički značajno nižim vrednostima DAS28 skora na ukupnom uzorku ($p < 0.001$), kod seropozitivnih ($p < 0.001$) i seronegativnih ($p < 0.001$) ispitanika. Na kontrolnom pregledu nakon 24 nedelje seropozitivni ispitanici su imali značajno nižu aktivnost bolesti ili značajno veći terapijski odgovor na depleciju B ćelija u odnosu na seronegativne ispitanike ($p < 0.05$).

ZAKLJUČAK: Terapija RTX kod pacijenata sa refraktornim RA značajno smanjuje aktivnost bolesti primenom samo jednog terapijskog ciklusa. RTX dovodi do značajnog smanjenja DAS28 skora kod seropozitivnih i seronegativnih RA bolesnika mada se efikasni odgovor postiže kod seropozitivnih s obzirom na značaj B ćelija u produkciji autoantitela.

UVOD

Reumatoidni artritis (RA) je hronično sistemsko inflamatorno oboljenje koje se manifestuje destrukcijom, deformacijom i poremećenom funkcijom diartrotičnih zglobova što za posledicu može imati invaliditet obolelog. Glavna klinička manifestacija oboljenja jeste artritis, koji je poliartrikularan, simetričan, perzistentan i progresivan. Sistemski karakter oboljenja se ogleda kroz postojanje vanzglobnih manifestacija sa zahvatanjem drugih organa, što opravdava termin „reumatoidna bolest“ [1].

Rituximab (RTX) je himerično humano monoklonsko antitelo usmereno na CD20, molekulski marker B ćelija. CD20, fosfoprotein molekulske mase 35-37 kD, je integralni deo ćelijske membrane, visoko ekspresiran u naivnim, zrelim i memorijskim B ćelijama, ali ne i na prekurzorim B ćelijama i plazma ćelijama. Međutim, CD20 postoji i kod malog broja T i NK ćelija [2,3]. RTX dovodi do deplecije CD20 pozitivnih ćelija kroz mehanizme apoptoze, antitelima posredovane ćelijske citotoksičnosti i kompleментом posredovane citotoksičnosti [4].

Broj CD20 pozitivnih B ćelija se prosečno smanjuje za 97% kod RA pacijenata jedan mesec nakon jednog kursa i održava se nekoliko meseci kasnije [5,6,7]. Oporavak broja B ćelija na periferiji sa vraćanjem na bazalne vrednosti traje 6 do 10 meseci nakon terapije [8,9]. Repopulacija počinje sa naivnim ćelijama, a potom nezrelim B ćelijama [10] dok se broj memorijskih ćelija obnavlja za više od 2 godine. RTX selektivno deluje na kratko živeće plazma ćelije, ali ne i na dugo živeće čime se objašnjava činjenica da dovodi do značajnog smanjenja serumskih titara RF i anti-citrulinskih antitela u periodu od 24 do 36 nedelja, a ne deluje na serumske koncentracije ukupnih imunoglobulina [8,9,11].

Na bazi navedenih zapažanja, odobrena je primena RTX kod pacijenata koji su refraktorni na anti-TNF terapiju. Lečenje je uspešno ponovljeno nakon 6 meseci kada su mnogi pacijenti uvedeni u remisiju [12,13]. Kratkotrajna efikasnost i bezbednost, kao i efikasnost i bezbednost ponovljenog davanja RTX potvrđeni su multicentričnim, randomiziranim, placebo-kontrolisanim studijama [14,15,16,17,18]. Rezultati ovih studija su pokazali da je RTX u kombinaciji sa MTX efikasan i bezbedan u lečenju bolesnika sa RA koji nisu reagovali ili nisu tolerisali inhibitore TNF. Manje je podataka o efikasnosti i bezbednosti RTX kod bolesnika koji prethodno nisu primali blokatore TNF.

CILJ

Cilj rada je bio da se ukaže na efikasnost terapijskog odgovora na RTX kod bolesnika sa RA preko DAS28 skora, kao i da se ispita da li postoji razlika u postignutom terapijskom odgovoru kod seropozitivnih i seronegativnih RA bolesnika.

MATERIJAL I METODE

Retrospektivna studija je obuhvatila 35 bolesnika koji su ispunjavali kriterijumje za dijagnozu RA (ACR/EULAR 2010.) i koji su lečeni u Vojnomedicinskoj akademiji-Klinika za reumatologiju u periodu od 2006.-2012. godine. Kod svih bolesnika je zbog lošeg terapijskog odgovora na ranije primenjeno lečenje započeto lečenje biološkom terapijom RTX u dozi od 1000 mg po protokolu. Pre započinjanja terapije svim bolesnicima je urađen predviđeni skrining program za započinjanje lečenja RTX.

Ispitanici su na osnovu RF-a podeljeni u dve grupe: seropozitivni (n=25) i seronegativni (n=10). Odnos polova je bio u korist žena na celokupnom uzorku (27:8), među seropozitivnim (18:7) i seronegativnim (9:1) ispitanicima. Procena terapijskog odgovora je urađena na osnovu DAS28 skora koji je određen pre započinjanja terapije i nakon 24 nedelje. S obzirom da se radi o bolesnicima sa visokom aktivnošću bolesti, analizirali smo i prethodno primenjena lečenja, sa posebnim osvrtom na primenu bioloških agensa.

Dobijeni rezultati su obrađeni primenom statističkog programa Windows, verzija 20.0 (Statistical Package for S

ocial Science-SPSS Inc., IL, USA). U svim grupnim uzorcima izračunavana je srednja vrednost, standardna devijacija i varijansa. Za utvrđivanje statističke značajnosti dobijenih razlika između ispitivanih grupa korišćen je Studentov-t test, kao parametrijski i Wilcoxonov rank test kao neparametrijski test. Statistički značajnim razlikama smatrane su vrednosti $p < 0.05$ odnosno $p < 0.001$ visoko statistički značajnim. Svi dobijeni rezultati su prikazani numerički, tabelarno ili grafički.

REZULTATI

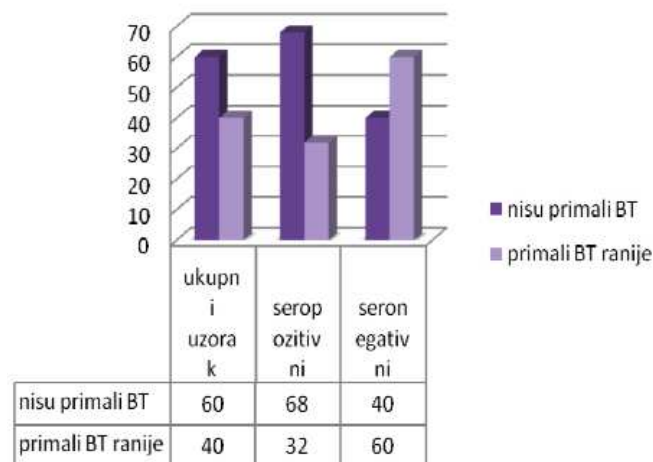
Bazični statistički parametri za godine starosti i dužinu trajanja bolesti su prikazani u tabeli 1.

	Ukupni uzorak (n=35)			Seropozitivni (n=25)			Seronegativni (n=10)		
	Xmin-Xmax	Xsr	SD	Xmin-Xmax	Xsr	SD	Xmin-Xmax	Xsr	SD
Godine starosti	26-76	50	13.06	32-76	52.80	12.78	26-62	43	11.51
Dužina trajanja bolesti	1-37	9.69	8.11	1-37	9.68	8.34	1-26	9.70	7.93

Tabela 1. Godine starosti i dužina trajanja bolesti na ukupnom uzorku, kod seropozitivnih i seronegativnih ispitanika (bazični statistički parametri)

Seropozitivni i seronegativni ispitanici se međusobno nisu razlikovali po godinama starosti i dužini trajanja bolesti.

U prethodnom lečenju RA među ispitanicima je analizirana i procentualna zastupljenost drugih bioloških agensa (BT) što je prikazano u grafikonu 1.



Grafikon 1. Procentualna zastupljenost lečenja biološkim agensima pre terapije RTX na ukupnom uzorku, kod seropozitivnih i seronegativnih ispitanika

U celokupnom uzorku 14 ispitanika je ranije primalo BT, od kojih su 13 primali anti TNF (Enbrel) i 1 je lečen Tocilizumabom. Procentualno veća je zastupljenost prethodnog lečenja BT kod seronegativnih bolesnika.

Procena aktivnosti bolesti je praćena određivanjem DAS28 skora pre započinjanja terapije RTX i nakon 24 nedelje. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 2.

	DAS 28 na početku	DAS 28 nakon 24 nedelje	p
Ukupni uzorak	6.434±0.968	4.045±1.318	<0.001
Seropozitivni	6.430±0.986	3.876±1.203	<0.001
Seronegativni	6.440±0.974	4.470±1.555	<0.001

Tabela 2. DAS28 na početku terapije RTX i nakon 24 nedelje na ukupnom uzorku i kod seropozitivnih i seronegativnih ispitanika (srednja vrednost ±SD).

Terapija RTX, jedan ciklus u dozi od 1000 mg, dovodi do značajnog poboljšanja aktivnosti bolesti kod bolesnika sa RA što je pokazano statistički značajno nižim vrednostima DAS28 skora na ukupnom uzorku ($t=11.167$; $p<0.001$), kod seropozitivnih ($t=9.556$; $p<0.001$) i seronegativnih ($t=6.186$; $p<0.001$) ispitanika.

Analizirali smo efekat RTX u donosu na prisustvo RF. Upoređujući seropozitivne i seronegativne ispitanike, utvrđeno je da se oni međusobno ne razlikuju u odnosu na aktivnost bolesti iskazanu kroz DAS28 skor pre započinjanja terapijskog protokola. Na kontrolnom pregledu nakon 24 nedelje seropozitivni ispitanici su imali značajno nižu aktivnost bolesti ili značajno veći terapijski odgovor na depleciju B ćelija u odnosu na seronegativne ispitanike ($z=0.878$; $p<0.05$).

DISKUSIJA

Istraživanja poslednjih decenija XX veka rezultovala su boljim razumevanjem patogenetskih mehanizama u nastajanju RA kao hroničnog sistemskog autoimunskog oboljenja. Mada je postignut značajan iskorak u kontroli oboljenja, još uvek postoji populacija pacijenata sa refrakternim RA (r-RA). U kliničkim trajalima sa anti-TNF terapijom je ukazano da 25 do 40% pacijenata ne postizu zadovoljavajući terapijski odgovor (American College of Rheumatology-ACR-20) [19,20,21,22], dok 30 do 40% bolesnika i dalje imaju aktivnu formu oboljenja [17,18]. Populacija pacijenata sa r-RA predstavlja izazov u odabiru terapijskog pristupa.

Novija istraživanja ukazuju da B ćelije imaju ključnu ulogu u patogenezi RA. Uloge ovih ćelija su višestruke u inflamatornoj kaskadi kroz prezentaciju antigena za T ćelije, indukciju povećane ekspresije proinflamatornih citokina i autoantitela, što sve zajedno inicira i održava inflamatorno oštećenje u RA [23,24,25,26,27,28]. I upravo je ovaj značaj B ćelija u nastanku i progresiji oboljenja izdvojio ove ćelije kao moguće targete terapijskog delovanja, čime se objašnjava započinjanje primene RTX u terapiji RA.

RTX je genetski modifikovano antitelo koje se vezuje za CD20 pozitivne B ćelije i dovodi do njihove deplecije u serumu i sinovijalnom tkivu kod RA bolesnika. Terapija RTX kod ovih pacijenata se pokazala kao efikasna i bezbedna. Inicijalno ona se koristila kod seropozitivnih RA bolesnika sa visokim titrom RF i anti-citrulinskih antitela. Kasnije primena RTX je bila opravdana i kod seronegativnih RA bolesnika boljim razumevanjem značaja B ćelija u održavanju inflamacije. Terapijski odgovor aktivnosti

bolesti je bio statistički značajno bolji kod seropozitivnih u odnosu na seronegativne bolesnike, ali inhibicija zglobnih oštećenja je bila podjednaka u obe grupe [28]. U brojnim kliničkim trajalima RTX se pokazao efikasnim u lečenju upravo pacijenata sa r-RA, pacijenata sa teškim komorbiditetima koji predstavljaju kontraindikaciju za primenu anti-TNF terapije, ali i kod pacijenata koji su imali neadekvatan odgovor ili intoleranciju na anti-TNF agense [29].

U našem istraživanju svi pacijenti su bili sa visoko aktivnim RA i analizirali smo ih kroz dve grupe u zavisnosti od toga da li su bili RF pozitivni ili ne. Ovakvo grupisanje je bilo u skladu sa kompleksnim mehanizmom djelovanja RTX. Međusobno se nisu razlikovali po godinama starosti, dužini trajanja bolesti i aktivnosti merene DAS28 skorom.

S obzirom na visoku aktivnost bolesti, 40% ispitanika na ukupnom uzorku je primalo prethodnu biološku terapiju (anti-TNF i jedan pacijent anti-IL-6) koja je isključena zbog lošeg terapijskog odgovora ili neželjenih efekata. U skladu sa literaturnim podacima procentualno veća zastupljenost prethodne biološke terapije je bila kod seronegativnih u poređenju sa seropozitivnim bolesnicima [28,17]. Preostalih 60% bolesnika su primali RTX kao prvi biološki agens zbog komorbiditeta koji su isključivali primenu drugih bioloških agenasa (68% seropozitivnih i 40% seronegativnih) što je veći procenat u odnosu na literaturne podatke. Prema Chatzidionysiou, 36.6% sa r-RA su imali RTX kao prvi biološki agens [16].

RTX, primjenjen u samo jednom ciklusu statistički visoko značajno smanjuje aktivnost RA merenu primenom DAS28 skora 24 nedelje nakon terapije, pri čemu se veće poboljšanje ostvaruje kod RF pozitivnih u odnosu na RF negativne bolesnike [16]. EULAR preporuka za dobar terapijski odgovor RTX podrazumeva smanjivanje DAS28 skora za najmanje 1.2 u odnosu na polazne vrednosti [30]. U DANCER i REFLEX studiji seropozitivni RA bolesnici su nakon 24 nedelje imali poboljšanje DAS28 skora za 1.97 a seronegativni za 1.5. U našem istraživanju kod seropozitivnih bolesnika DAS28 skor se prosečno smanjuje za 2.56, a kod seronegativnih bolesnika prosečno za 1.97. U skladu sa literaturnim podacima [28,29], u našoj studiji DAS28 skor se statistički značajno smanjuje kod obe grupe ispitanika. Veće poboljšanje DAS28 je dobijeno kod seropozitivnih bolesnika, odnosno seropozitivni bolesnici su imali značajno nižu aktivnost bolesti u odnosu na seronegativne 24 nedelje nakon terapije RTX-om.

ZAKLJUČAK

Terapija RTX kod pacijenata sa refrakternim RA značajno smanjuje aktivnost bolesti primenom samo jednog terapijskog ciklusa. RTX dovodi do značajnog smanjivanja DAS28 skora kod seropozitivnih i seronegativnih bolesnika mada se efikasniji odgovor postiže kod seropozitivnih s obzirom na značaj B ćelija u produkciji autoantitela.

Abstract:

BACKGROUND: Research in the last decades of the 20th century has resulted in a better understanding of the pathogenic mechanisms of rheumatoid arthritis (RA) as a chronic systemic autoimmune disease. Despite of a significant progress in disease control, there is still a population of patients with refractory RA (r-RA) that presents a special challenge in the therapeutic selection.

AIM: The aim of the study was to show the effectiveness of therapeutic response to rituximab (RTX) in patients with RA over DAS28 scores, and to determine whether there is a difference in the achieved therapeutic response in seropositive and seronegative RA patients.

MATERIALS AND METHODS: This retrospective study included 35 patients who met the criteria for the diagnosis of RA (ACR / EULAR 2010), and who were treated at the Military Medical Academy at the Department of Rheumatology from 2006 to 2012 year. Because of poor therapeutic response to previous treatment, all patients started treatment applied biological RTX therapy at a dose of 1000 mg per protocol. Evaluation of treatment response was based on DAS28 score determined prior to treatment and after 24 weeks.

RESULTS: Treatment with RTX, a cycle at a dose of 1000 mg, resulted in a significant improvement of disease activity in RA patients by obtaining a statistically lower values of DAS28 score in the total sample ($p < 0.001$), in seropositive ($p < 0.001$) and seronegative ($p < 0.001$) patients. Medical examination of seropositive subjects after 24 weeks showed significantly lower disease activity or significantly better therapeutic response to depletion of B cells compared to seronegative subjects ($p < 0,05$).

CONCLUSIONS: RTX therapy in patients with refractory RA significantly reduces disease activity after only one treatment cycle. RTX leads to a significant reduction of DAS28 score in seropositive and seronegative RA patients, although it is more efficient response achieved with seropositive indicating the importance of B cells in the production of autoantibodies.

LITERATURA

1. Vujanović-Stupar N. Reumatoidni artritis. Reumatologija N. Pilipović, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva 2000; str. 282-3

2. Hultin LE, Hausner MA, Hultin PM, Giorgi JV. CD20 (pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes. *Cytometry* 1993;14(2):196-204

3. Wilk E, Witte T, Marguardt N, Horvath T. et al. Depletion of functionally active CD20+ T cells by rituximab treatment. *Arthritis Rheum* 2009;60(12):3563-71

4. Chynes RA, Towers TL, Presta LG. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2006;6:443-6

5. De Vita S, Zaja F, Sacco S, De Candia A, Ferracioli G. Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells. *Arthritis Rheum* 2002;46(8):2029-33

6. Edwards JC, Cambridge G. Sustained improvement in rheumatoid arthritis Following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40 (2): 205-11.

7. Cambridge G, Leandro MJ, Teodorescu M, Manson J, Rahman A, Isenberg DA, Edwards JC. B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: effect on autoantibody and antimicrobial antibody profiles. *Arthritis Rheum* 2006;54(11):3612-22

8. Roll P, Palanichamy A, Kneitz C, Dörner T, Tony HP. Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54(8):2377-86

9. Thurlings RM, Vos K, Wijbrandts CA, Zwiderman AH, Gerlag DM, Tak PP. Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Ann Rheum Dis* 2008;67:917-25

10. Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JC. Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54(2):613-20

11. Popa C, Leandro MJ, Cambridge G, Edwards JC. Repeated B lymphocyte depletion with rituximab in rheumatoid arthritis over 7 yrs. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46(4):626-30

12. De Vita S, Quartuccio L. Treatment of rheumatoid arthritis with rituximab: an update and possible indications. *Autoimmun Rev* 2006;5:443-8

13. Yamamoto A, Sato K, Miyoshi F, Shindo Y. Analysis of cytokine production patterns of peripheral blood mononuclear cells from a rheumatoid arthritis patient successfully treated with rituximab. *Mod Rheumatol* 2010; 20(2):183-7

14. Cambridge G, Stohl W, Leandro MJ, Migone TS, Hilbert DM, Edwards JC. Circulating levels of B lymphocyte stimulator in patients with rheumatoid arthritis following rituximab treatment: relationships with B cell depletion, circulating antibodies, and clinical relapse. *Arthritis Rheum* 2006;54:723-32

15. Cantaert T, van Baarsen LG, Wijbrandts CA, Thurlings RM, van de Sande MG, Bos C, van der Pouw TK, Verweij CL, Tak PP, Baeten DL. Type I interferons have no major influence on humoral autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2010;49:156-66

16. Chatzidionysiou K, Lie E, Nasonov E, Lukina G, Hetland ML, Tarp U, Gabay C, van Riel PLCM, Nordstrom DC, Gomez-Reino J, Pavelka K, Tomsic M, Kvien TK, van Vollenhoven RF. Highest clinical effectiveness of rituximab in autoantibody-positive patients with rheumatoid arthritis and in those for whom no more than on previous TNF antagonist has failed: pooled data from 10 European registries. *Ann Rheum Dis* 2011;70(9):1575-80

17. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, Keystone EC, Loveless JE, Burmester GR, Cravets MW, Hessey EW, Shaw T, Totoritis MC; REFLEX Trial Group. 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

18. Salliot AC, Dougados M, Gossec L. Risk of serious infections during rituximab, abatacept and anakinra treatments for rheuma-

toid arthritis: meta analyses of randomised placebo-controlled trials. *Ann Rheum Dis* 2009;68:25-32

19. Keystone EC, Schiff MH, Kremer JM, Kafka S, Lovy M, DeVries T. Et al. Once-weekly administration of 50mg etanercept in patients with active rheumatoid arthritis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2004;50:353-63

20. Lipsky PE, van der Heijde DM, St.Claire EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, et al and the anti-tumor necrosis factor trial in rheumatoid arthritis with concomitant therapy study group. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000;343:1594-602

21. Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Moreland LW, Weisman MH, Birbara CA, et al. Adalimumab a fully human anti-tumor necrosis factor \bar{U} monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum* 2003;48:35-45

22. Feltelius N, Fored CM, Blomquist P, Bertilsson L, Geborek P, Jacobsson LT, et al. Results from a nationwide postmarketing cohort study of patients in Sweden treated with etanercept. *Ann Rheum Dis* 2005;64:246-52

23. Dorner T, Burmester GR. The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:246-52

24. Olsen NJ, Stein CM. New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004;350:2167-79999

25. Metlay JP, Pure E, Steinman RM. Control of the immune response at the level of antigen-presenting cells: a comparison of the function of dendritic cells and B lymphocytes. *Adv Immunol* 1989;47:45-116

26. Pistoia V, Corcione A. Relationships between B cell cytokine production in secondary lymphoid follicles and apoptosis of germinal center B lymphocytes. *Stem Cells* 1995;13:487-500

27. Takemura S, Kimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* 2001;167:4710-8

28. Cohen S, Keystone E., Genovese MC et al. Continued inhibition of structural damage in rheumatoid arthritis patients treated with rituximab at 2 years: REFLEX study. *Ann Rheum Dis* 2008;67(2):189

29. Buch MH, Smolen JS, Betteridge N. Update consensus statement on the use of rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;70(6):909-20

30. Rituximab for treatment of rheumatoid arthritis (refractory). National Institute of Health and Clinical Excellence.

<http://www.nice.org.uk/Guidance/TA126> (August 2007, date last accessed).