

ЗАВИСИМОСТЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ОТ УРОВНЯ СЫВОРОТОЧНЫХ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Елена Владимировна ЗОНОВА, Ольга Валерьевна ГОЛОВАНОВА, Юлия Борисовна ЛЕОНОВА, Елена Алексеевна ЛЕТЯГИНА, Максим Александрович КОРОЛЕВ, Владимир Иосифович КОНЕНКОВ

ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН
6300117, г.Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 4

Проведено исследование концентрации сывороточных провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13) у больных ревматоидным артритом. Гиперпродукция про- и противовоспалительных цитокинов с преобладанием IFN- γ , TNF- α , GM-CSF ассоциирована с благоприятным прогнозом иммуносупрессивной терапии. Определение концентрации цитокинов до начала лечения улучшает качество ранней диагностики обострения и эффективного подбора терапии.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, провоспалительные цитокины, противовоспалительные цитокины, эффективность терапии.

Введение

Ревматоидный артрит (РА) — распространенное аутоиммунное заболевание, характерным проявлением которого является формирование необратимых деформаций суставов вследствие потери артикулярного хряща и прогрессирующей костной деструкции.

Основное значение в развитии ревматоидного артрита придают двум тесно взаимосвязанным процессам: антиген-специфической активации CD4+Т-лимфоцитов по Th1-типу, характеризующейся избыточным синтезом IL-2, IFN γ , IL-17, IL-18, и дисбалансу между гиперпродукцией провоспалительных цитокинов преимущественно макрофагальной природы, таких как TNF- α , IL -1, IL-6, IL-8, IL-15 и др., и противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10, IL-13, растворимый антагонист IL-1, растворимые TNF-рецепторы), с преобладанием продукции первых над вторыми [1, 2, 3].

Производство определенных цитокинов и их концентрация в крови, тканях определяют полиморфизм аутоиммунных воспалительных заболеваний, в том числе и РА [4]. Уровни провоспалительных цитокинов отражают злокачественность течения и прогноз РА [5]. Однако концентрации большинства цитокинов бывают изменены определенный ограниченный период времени, а стимуляция и ингибирование их продукции зависят от функции других цитокинов [6].

Лучше всего изучены механизмы формиро-

вания воспаления при ревматоидном артрите с участием TNF- α . Биологическая активность TNF- α опосредуется связыванием со специфическими рецепторами, экспрессированными на различных клетках, в том числе на нейтрофилах, эндотелиоцитах, фибробластах, кератиноцитах и др. TNF- α запускает механизм активации факторов транскрипции (NF- κ B, AP-1, JNK и др.), которые, в свою очередь, регулируют активность генов, кодирующих синтез провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8) и других медиаторов воспаления, и индуцируют запрограммированную гибель клеток (апоптоз) [7]. GM-CSF наряду с IFN- γ и TNF- α вызывает активацию провоспалительных цитокинов и гиперэкспрессию молекул II класса главного комплекса гистосовместимости на мембранах макрофагов и фибробластов синовиальной ткани и тем самым участвует в развитии аутоиммунного процесса при ревматоидном артрите [8]. IL-2 играет центральную роль в ряде Т-клеточных функций и имеет ведущее значение в регуляции Th1/Th2 цитокинов [9].

Развитие заболевания не ограничивается активностью провоспалительных цитокинов. Реализация аутоиммунного воспаления связана с продукцией противодействующих их влиянию и воздействию противовоспалительных цитокинов, в том числе IL-4, IL-10, IL-13, и концентрация цитокинов-антагонистов на определенном этапе определяет прогноз воспаления, степень его прогрессии [10].

Е.В. Зонova — зав. отделением терапии, канд.м.н., e-mail: elena_zonova@list.ru

Голованова О.В. — н.с. лаб. иммуногенетики, канд.м.н.

Леонова Ю.Б. — аспирант

Летягина Е.А. — н.с. лаб. лимфотропной терапии и лимфодиагностики, старший ординатор отделения терапии, канд.м.н.

Королев М.А. — зам. директора

Коненков В.И. — директор, д.м.н., профессор, академик РАМН

Таблица 1

Общая характеристика больных ревматоидным артритом

Параметры	M±m
Количество пациентов (Ж/М)	38 (37/1)
Средний возраст на момент обследования	54,1±1,78 (22–73)
Средний возраст начала РА	44,6±13,4(18–67)
Средняя продолжительность заболевания (годы)	9,8±1,33(0–29)
Позитивность по РФ	30/38 (79%)
Системные проявления	31/38 (81,6%)
DAS28, баллы	5,47±0,23(2,24–7,93)
HAQ, баллы	2,46±0,23(0,125–5,25)

Примечания: HAQ – функциональная способность, оцененная по опроснику состояния здоровья (Health Assessment Questionnaire).

Патогенез РА сложен и многоступенчат. Высокая частота ревматоидного артрита в популяции (около 1%), неблагоприятный прогноз и окончательно не определенные возможности патогенетической терапии диктуют необходимость дальнейшего углубленного изучения роли определенных цитокинов в прогрессировании воспалительного процесса.

Целью данной работы явилось изучение содержания в сыворотке крови провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, GM-CSF) у больных РА в стадии развернутых клинических проявлений с целью уточнения их влияния на формирование эффекта проводимой болезньюмодифицирующей терапии.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 38 пациентов (1 мужчина и 37 женщин) в возрасте от 22 до 73 лет (средний возраст 54,1±11 лет) с достоверным диагнозом РА в соответствии с критериями ACR (1987), с длительностью заболевания от трех месяцев до 29 лет (средняя продолжительность 9,8±8,2 лет). Положительные титры ревматоидного фактора (РФ) были обнаружены в сыворотке крови 30 пациентов (79 %), при этом средняя концентрация РФ в сыворотке всех пациентов составила 223,8±194,49 ЕД/мл. Системные проявления выявлены у 31 пациента (81,6 % обследованных). Преобладала 3 рентгенологическая стадия (42 %). Степень активности РА с учетом индекса активности DAS28 (Disease Activity Score, оценка 28 суставов) была высокой у 23 пациентов (60,5 %), умеренной – у 12 (31,6 %). Точками динамического наблюдения за пациентами явились неделя 0, неделя 12, неделя 24 со времени назначения терапии. На неделе 0 всем пациентам начата иммуносупрессивная терапия, усилена или подобрана комбинированная в связи с неэф-

фективностью предыдущего подхода лечения. В качестве болезньюмодифицирующих антиревматических препаратов (DMARDs) использовались метотрексат (10–15 мг в неделю), сульфасалазин (2 г в сутки). Все пациенты до и во время исследования принимали нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), их доза оставалась стабильной, смены НПВП не проводилось. Основные характеристики пациентов с РА суммированы в **таблице 1**.

Обследование пациентов проводили по стандартной программе, включающей оценку боли и общего состояния пациента по VAS (визуальная аналоговая шкала), длительности скованности в суставах, оценку суставных индексов и функциональных нарушений. В динамике определялись сывороточные уровни С-реактивного белка, РФ.

Периферическую кровь забирали разовым шприцем из локтевой вены и инкубировали в стерильной пробирке 1 ч при комнатной температуре и 1 ч при 4 °С. Затем, после центрифугирования при 3000 об./мин в течение 10 мин, собирали сыворотку, замораживали и хранили до проведения исследования при -70 °С.

Содержание в сыворотке 9 цитокинов: TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, GM-CSF оценивали методом проточной флюориметрии на двулучевом лазерном автоматизированном анализаторе Bio-Plex™ 200 System (Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем «Human Cytokine Th1/Th2 Assay» в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Измерения проводились в 25 мкл сыворотки. Диапазон измерений составлял 0,2–4000 пг/мл. Расчеты концентрации 9 исследуемых цитокинов производили на основании калибровочных кривых, построенных для каждого анализа, с помощью программы Bio-Plex Manager 4.1 (Bio-Rad, США). Концентрацию цитокинов выражали в пг/мл.

Таблица 2

Динамика уровня цитокинов в сыворотке крови в процессе проводимой иммуносупрессивной терапии у больных ревматоидным артритом ($M \pm m$)

Показатель	Неделя 0	Неделя 12	Неделя 24
IL-2	194,6 ± 88	89,6 ± 59,2	213,2 ± 114
IL-4	3,5 ± 1,6	1,14 ± 0,4	2,15 ± 0,89* ¹⁻³
IL-5	3,2 ± 1	2,4 ± 1	2,3 ± 0,75
IL-10	21,7 ± 9,4	9,9 ± 4,5	7,6 ± 2,8
IL-12	25,5 ± 13,1	13,8 ± 9,7	7,4 ± 4* ²⁻³
IL-13	37,1 ± 16,7	22,3 ± 10,4* ¹⁻²	25,3 ± 11,2
GM-CSF	330,7 ± 148,9	257,6 ± 179,9	733,9 ± 400,3* ¹⁻³
IFN γ	519,1 ± 262,3	347,6 ± 235,2	1046,2 ± 530,2* ²⁻³
TNF- α	92,1 ± 39,7	58,6 ± 30	214,6 ± 115,5

Примечания: * — различие в результате проведения терапии достоверно при $p < 0,05$ (применен критерий Вилкоксона).

Математическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере с использованием пакета программ «Statistica 6.0». Результаты были выражены как $M \pm m$ (среднее значение и ошибка средней величины). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При оценке цитокинового профиля у пациентов с РА исследовали уровни провоспалительных (TNF- α , IFN- γ), противовоспалительных (IL-4, IL-10, IL-13) цитокинов и IL-2, IL-12 (p70), GM-CSF, IL-5 в сыворотке крови. В динамике выявлена тенденция к снижению содержания как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов к 12 неделе лечения, что обусловлено отсутствием избирательности воздействия проводимой болезнью-модифицирующей терапии и формированием системной иммуносупрессии (табл. 2).

К 24 неделе лечения в общей группе пациентов отмечено значительное увеличение концентрации основных провоспалительных цитокинов TNF- α , IFN- γ и GM-CSF у четырех пациентов, что изменило средние показатели исследуемой группы. Наблюдение за этими больными в следующие 12 недель выявило клинко-лабораторное обострение, таким образом, значимое увеличение содержания в сыворотке крови провоспалительных цитокинов проявило себя как предшественник грядущей клинической и лабораторной активации воспалительного процесса.

Проводился анализ продукции про- и противовоспалительных цитокинов у пациентов на протяжении 24 недель терапии в зависимости от оценки результата полугодового лечения. Пациенты с ответом на терапию иммуносупрессивными препаратами перед началом лечения имели более высокий уровень TNF- α , IFN- γ , чем пациенты с отсутствием ответа на

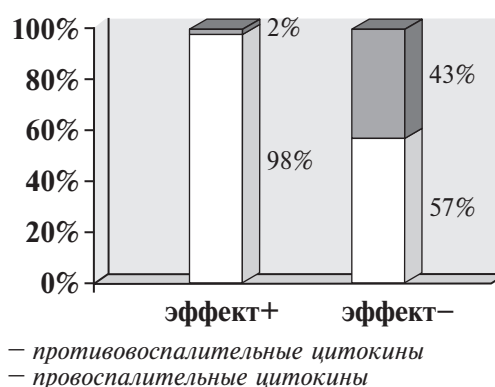


Рис. Соотношение содержания про- и противовоспалительных цитокинов перед началом болезнью-модифицирующей терапии в группах пациентов с наличием и отсутствием эффекта через 6 месяцев лечения

иммуносупрессивное воздействие в виде монотерапии метотрексатом или сульфасалазином, или ускользанием эффекта к исходу 24 недель, при этом в первой группе содержание TNF- α , IFN- γ существенно превышало концентрацию противовоспалительных цитокинов (рис.), а во второй было практически равным.

Высокая продукция провоспалительных цитокинов в группе с благоприятным исходом лечения сочеталась с повышением концентрации IL-5, IL-12 и IL-4 (табл. 3). Увеличение содержания цитокинов, отражающих активацию лимфоцитов по Th2-типу (IL-4, IL-5) логично для пациентов с благоприятным исходом лечения, поскольку соотношение между про- и противовоспалительными цитокинами с повышением концентрации последних определяет выраженность и прогрессию воспаления и, таким образом, может иметь выход на использование в клинической практике для повышения качества оценки результатов терапевтического воздействия [11].

Таблица 3

Концентрация сывороточных цитокинов до назначения болезньюмодифицирующей терапии у больных ревматоидным артритом с различными результатами лечения ($M \pm m$)

Показатель	Эффект на терапию DMARDs (n = 21)	Отсутствие эффекта на терапию DMARDs (n = 17)	p
IL-4	$6,2 \pm 2,7$	$0,1 \pm 0,06$	$<0,005$
IL-5	$4,5 \pm 1,7$	$1,6 \pm 0,7$	$<0,025$
IL-12	$44 \pm 23,1$	$2,5 \pm 1,1$	$<0,05$
IFN γ	$918,5 \pm 460,9$	$25,6 \pm 15,8$	$<0,025$
TNF- α	$160,8 \pm 68,8$	$7,2 \pm 4,3$	$<0,05$

Таблица 4

Показатели клинической и лабораторной активности до назначения болезньюмодифицирующей терапии у больных ревматоидным артритом с различными результатами лечения ($M \pm m$)

Показатель	Эффективность терапии DMARDs (n = 21)	Отсутствие эффекта на терапию DMARDs (n = 17)	p
DAS28	$6,1 \pm 0,26$	$4,7 \pm 0,34$	$<0,002$
HAQ	$3 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,2$	$<0,02$
СОЭ	$35,7 \pm 3,5$	$23,6 \pm 2,9$	$<0,003$

Таблица 5

Динамика уровня сывороточных цитокинов в группе пациентов с эффективностью болезньюмодифицирующей терапии (n = 21, $M \pm m$)

Показатель	Неделя 0	Неделя 12	Неделя 24
IL-2	$349,5 \pm 152,4$	$155,4 \pm 104,6$	$254,4 \pm 153,9$
IL-4	$6,2 \pm 2,7$	$1,76 \pm 0,66$	$3,1 \pm 1,5$
IL-5	$4,48 \pm 1,7$	$3,26 \pm 1,73$	$3,2 \pm 1,4$
IL-10	$30,1 \pm 15,3$	$14,18 \pm 7,73$	$8,1 \pm 4,$
IL-12	$44 \pm 23,1$	$22,6 \pm 17,3^{*1-2}$	$12,3 \pm 8,3$
IL-13	$56,1 \pm 28,6$	$38,2 \pm 17,9$	$37,1 \pm 19,3$
GM-CSF	$593,7 \pm 257,7$	$452,4 \pm 318,3^{*1-2}$	$926,7 \pm 602,1$
IFN γ	$918,5 \pm 460,9$	$610,4 \pm 415,7$	$230,5 \pm 69,5$
TNF- α	$160,8 \pm 68,8$	$101,9 \pm 52$	$243,1 \pm 148,9$

Примечания: * — различие в результате проведения терапии достоверно при $p < 0,05$ (применен критерий Вилкоксона).

Низкий уровень цитокинов обеих групп среди пациентов, не отвечающих на лечение, частично определяется продолжительным анамнезом иммуносупрессии, что потребовало изменения подходов к лечению. Другим объяснением может служить первично неблагоприятный вариант течения РА в дебюте с низкой лабораторной активностью и, соответственно, меньшими, чем в группе сравнения, объективными показателями функциональной недостаточности, локального статуса, но инертным ответом на лечебные мероприятия (табл. 4).

Сравнительная оценка уровня сывороточных противовоспалительных цитокинов в динамике продемонстрировала значительно большее их накопление в группе больных с клинико-лабораторным улучшением к истечению шести месяцев терапии (табл. 5). С продолжительностью приема болезньюмодифициру-

ющего лечения сохраняется абсолютное преобладание IL-13, IL-4 в группе пациентов с положительным ответом на иммуносупрессию, при этом IL-4 определялся в группе больных с отсутствием ответа на терапию DMARDs в точке «неделя 0» только в следовых количествах. Такой характер распределения также может являться свидетельством эффективной функции противовоспалительных цитокинов в пределах цитокиновой сети и адекватности проводимого лечения (табл. 6).

Продукция провоспалительных цитокинов и GM-CSF, которые по ряду функций многие авторы объединяют в одну группу [12], значительно превалирует в группе пациентов с эффективным лечением (табл. 5). У этих пациентов концентрация TNF- α практически не изменяется на фоне терапии, чего нельзя сказать о IFN- γ , чья продукция многократно

Таблица 6

Динамика уровня сывороточных цитокинов в группе пациентов с неэффективностью болезньюмодифицирующей терапии ($n = 17$, $M \pm m$)

Показатель	Неделя 0	Неделя 12	Неделя 24
IL-2	$3,3 \pm 1,68$	$6,3 \pm 4$	$174,7 \pm 171,5$
IL-4	$0,11 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,04$	$1,25 \pm 1,03$
IL-5	$1,56 \pm 0,7$	$1,18 \pm 0,47$	$1,5 \pm 0,5$
IL-10	$11,3 \pm 9$	$4,37 \pm 2,64$	$7,2 \pm 3,49$
IL-12	$2,55 \pm 1,12$	$2,63 \pm 1,2$	$2,8 \pm 0,83$
IL-13	$13,6 \pm 10,9$	$2,1 \pm 0,63$	$14,3 \pm 12,09$
GM-CSF	$5,8 \pm 2,28$	$10,9 \pm 6,13$	$553,9 \pm 548,18$
IFN γ	$25,0 \pm 15,84$	$14,9 \pm 6,38$	$64,2 \pm 17,5$
TNF- α	$7,18 \pm 4,3$	$3,8 \pm 1,34$	$187,9 \pm 179,7$

снижается к 24 неделе наблюдения. Интересно, что на фоне приема иммуносупрессивных препаратов в группе больных РА с отсутствием эффекта также секретируется достаточный уровень провоспалительных цитокинов, тогда как до начала терапии в сыворотке крови они практически не определялись.

IL-2, как фактор регуляции Т-лимфоцитов, обладающий прямым и опосредованным стимулирующим влиянием через IFN- γ , обнаруживается в крови в стабильных концентрациях на протяжении всего периода лечения в группе пациентов с хорошим ответом на иммуносупрессию. В сыворотке крови больных РА, имеющих многократно повышенные концентрации IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, уровень IL-2, IL-13 и IL-10 значительно превышал средние значения в группе пациентов, отвечавших на терапию DMARDs. У пациентов без эффекта терапии IL-2 синтезируется в минимальных количествах до лечения, к исходу шести месяцев наблюдения его уровень повышается и практически выравнивается в группах, сравниваемых по эффективности терапии. Если анализировать эти данные совместно с результатами оценки содержания других провоспалительных цитокинов, то становится понятным, что период времени в 24 недели, которые определили в настоящем исследовании ответ на проводимое лечение, достаточен для прогрессии активности ревматоидного артрита у пациентов, не отвечающих на болезньюмодифицирующую терапию, клинически, лабораторно и в плане накопления иммунологических маркеров активности.

Выводы

Повышение концентрации провоспалительных цитокинов IFN- γ , TNF- α , GM-CSF в сыворотке крови на фоне проводимой болезньюмодифицирующей терапии у больных РА в состоянии клинической и лабораторной стабильности является ранним и чувствительным

показателем формирования резистентности и предшествует обострению.

Быстрый и стойкий эффект на иммуносупрессивную терапию формируется у больных ревматоидным артритом со значительным преобладанием содержания провоспалительных цитокинов над противовоспалительными в сыворотке крови. Эффект не развивается или утрачивается в срок до 24 недель от начала лечения у пациентов с низким содержанием про- и противовоспалительных цитокинов с их равным соотношением.

Гиперпродукция про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови до начала лечения с преобладанием IFN- γ , TNF- α , GM-CSF ассоциирована с благоприятным прогнозом эффективности иммуносупрессивной терапии. Определение концентрации цитокинов в крови до начала лечения позволит объективизировать выбор адекватных подходов и повысить качество терапевтического воздействия.

Литература

1. Choy E.H., Panayi G.S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis // N. Engl. J. Med. 2001. 344. 907–916.
2. Steiner G., Tohidast-Akrad M., Witzmann G. et al. Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis // Rheumatology. 1999. 38. 202–213.
3. Raju K., Rabinovich B.A., Radvanyi L.G. et al. A central role for IL-2 in fate determination of mature T cells—I: role in determining the Th1/Th2 profile in primary T cell cultures // Int. Immunol. 2001. 13. 1453–1459.
4. Matsuzaki T., Nakajima A., Ishigami S. et al. Mirthful laughter differentially affects serum pro- and anti-inflammatory cytokine levels depending on the level of disease activity in patients with rheumatoid arthritis // Rheumatology. 2006. 45. 182–186.
5. Camilleri J.P., Amos N., Williams B.D. et al. Serum soluble interleukin 2 receptor levels and radiological progression in early rheumatoid arthritis // J. Rheumatol. 2001. 28. 2576–2578.
6. Sivalingam S.P., Thumboo J., Vasoo S. et al.

In vivo pro- and anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis // *Ann. Acad. Med. Singapore*. 2007. 36. 96–99.

7. de Vries N., Tak P.P. The response to anti-TNF- α treatment: gene regulation at the bedside // *Rheumatology*. 2005. 44. 705–707.

8. Rahman A. Regulators of cytokine signalling in rheumatoid arthritis // *Rheumatology*. 2007. 46. 1745–1746.

9. Thornton S., Boivin G.P., Kim K.N. et al. Heterogeneous effects of IL-2 on collagen-induced arthritis // *J Immunol*. 2000. 165. 1557–1563.

10. Aarvak T., Chabaud M., Thoen J. et al. Changes in the Th1 or Th2 cytokine dominance in the synovium of rheumatoid arthritis (RA): a kinetic study of the Th subsets in one unusual RA patient // *Rheumatology*. 2000. 39. 513–522.

11. Gerards A.H., de Lathouder S., de Groot E.R. et al. Inhibition of cytokine production by methotrexate. Studies in healthy volunteers and patients with rheumatoid arthritis // *Rheumatology*. 2003. 42. 1189–1196.

12. Zwerina J., Redlich K., Schett G., Smolen J.S. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines // *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2005. 1051. 716–729.

DEPENDENCE OF EFFICIENCY OF THERAPY ON A LEVEL OF CYTOKINES AT PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Elena Vladimirovna ZONOVA, Olga Valerievna GOLOVANOVA, Julia Borisovna LEONOVA, Elena Alekseevna LETYAGINA, Maxim Aleksandrovich KOROLEV, Vladimir Iosifovich KONENKOV

SI Institute of Clinical and Experimental Lymphology, SB RAMS,
4, Ac. Timakov str., Novosibirsk, 630117

We examined levels of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13) in serum of rheumatoid arthritis patients. Hyperproduction proinflammatory and anti-inflammatory cytokines with prevalence associate with the favorable forecast immunosuppressive therapies. Definition of concentration cytokines prior to the beginning of treatment will improve quality of early diagnostics of an aggravation and effective selection of therapy.

Key word: cytokines, rheumatoid arthritis.

Zonova E.V. — Head of therapy department, e-mail: elena_zonova@list.ru

Golovanova O.V. — research worker

Leonova J.B. — post-graduate student

Letyagina E.A. — research worker

Korolev M.A. — vice institute director

Konenkov V.I. — institute director, professor