

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ ПРОВСПАЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ РИТУКСИМАБОМ

© *Безгин А.В., Гришина О.В., Михайлова Н.А., Тимонова А.Н., Князева Л.А.*

Кафедра внутренних болезней № 1 Курского государственного медицинского университета, Курск
E-mail: kafedra_n1@bk.ru

В данной статье представлены результаты исследования содержания цитокинов провоспалительного действия (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α), рФНО – Р1 в сыворотке крови у 54 больных ревматоидным артритом (РА). Установлены различия в уровне исследованных цитокинов, у больных с различной длительностью заболевания, показавшие увеличение концентрации ФНО α , рФНО – Р1, ИЛ-1 β в большей степени, при развернутой стадии заболевания. У больных с поздним РА в сыворотке крови преобладала концентрация ИЛ-6. Назначение ритуксимаба сопровождалось большей эффективностью корригирующего действия на показатели цитокинового статуса в сыворотке крови больных с развернутой стадией РА.

Ключевые слова: провоспалительные цитокины, ритуксимаб, ревматоидный артрит.

THE INFLUENCE OF RITUXIMAB THERAPY ON THE PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS

Bezgin A.V., Grishina O.V., Michaylova N.A., Timonova A.N., Knyazeva L.A.

Department of Internal Diseases N 1 of the Kursk State Medical University, Kursk

The article introduces the investigation results of the proinflammatory cytokine concentration (IL-1 β , IL-6, TNF- α), TNF-R1 in the blood of 54 patients with rheumatoid arthritis. The research has revealed the differences between the levels of the analyzed cytokines in the patients with different duration of rheumatoid arthritis (RA) that has shown the considerable increase in the concentration of TNF α , TNF-R1, IL-1 β , at the extensive stage of the disease. The patients with the tardy RA revealed the highest possible concentration of IL-6 in the blood serum. Rituximab therapy was associated with the corrective influence on the cytokine status in the blood serum in the patients with the extensive stage of RA.

Keywords: proinflammatory cytokines, rituximab, rheumatoid arthritis.

Ревматоидный артрит (РА) – одно из самых тяжелых заболеваний человека, в основе которого лежит выраженное воспаление с пролиферацией синовиальной оболочки, приводящей к постепенному разрушению суставов и периартикулярных тканей, поражению внутренних органов и систем. Распространенность РА составляет 0,6-1,4% населения, заболевание характеризуется упорным прогрессирующим течением, сложными патогенетическими механизмами, гетерогенностью клинико-иммунологических форм. В отсутствие адекватного лечения инвалидизация пациентов может наступить в первые годы заболевания. Так, в первые 3 года болезни трудоспособность утрачивают примерно 35% больных, а через 5 лет - более половины [4].

Долгое время РА считался неуклонно прогрессирующим заболеванием, контролировать течение которого чрезвычайно сложно. Известно, что на стандартную терапию базисными противовоспалительными препаратами (БПВП), удовлетворительно отвечают только 50-60% больных [6]. Таким образом, около половины пациентов оказываются резистентными к БПВП. Однако в последние годы взгляд на РА как на неизлечимое

заболевание пересматривается, это во многом связано с появлением нового класса противовоспалительных препаратов – генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП).

Внедрение ГИБП в клиническую практику позволяет не только купировать симптомы заболевания, но делает возможным торможение эрозивного процесса в суставах, нормализацию функционального статуса и качества жизни пациента, потенциальное увеличение продолжительности жизни до популяционного уровня [5]. Среди широкого спектра ГИБП, применяющихся для лечения РА, уникальное место принадлежит препарату ритуксимаб. Известно, что ритуксимаб (РТМ) представляет собой химерные моноклональные антитела к мембранному CD 20 антигену В-клеток, вызывающие деплецию различных субпопуляций В-клеток, играющих фундаментальную роль в иммунопатогенезе РА и других аутоиммунных заболеваний [6]. Результаты рандомизированных плацебоконтролируемых исследований (РПКИ) РТМ свидетельствуют о высокой клинической эффективности РТМ при РА [8]. Достоинством ГИБП является селективное воздействие на определенные звенья иммунопатогенеза

РА. Важно отметить, что РА является гетерогенным с точки зрения патогенетических механизмов заболеванием, эффективность влияния на которые ритуксимаба требует уточнения.

Целью работы явилось изучение динамики содержания провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α , растворимого ФНО α – рецептора 1) в сыворотке крови у больных ревматоидным артритом под влиянием терапии ритуксимабом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 54 пациента с ревматоидным артритом умеренной и высокой активностью; длительность заболевания составляла от 12 месяцев до 5 лет (табл. 1). Средний возраст больных составил 38,2 \pm 6,5 года. Группа контроля включала 20 клинически здоровых лиц в возрасте 40,5 \pm 4,3 года. Критериями включения пациентов в исследование явились: наличие РА 2-3 степени активности; наличие показаний и отсутствие противопоказаний к применению БПВП; наличие информированного согласия пациента о включении в исследование. Критериями исключения пациентов из исследования явились: РА 1 степени активности; инфекционные процессы любой локализации; сахарный диабет. Диагноз ревматоидного артрита устанавливался в соответствии с критериями EULAR, 2010. Общая активность РА и функциональный класс (ФК) регистрировались в соответствии с классификацией РА, принятой на пленуме ассоциации ревматологов России в 2007 году. Количественная оценка активности РА проводилась с использованием индекса DAS 28 (Disease Activity Score), рекомендованного EULAR [11]. Для оценки эффективности терапии использовались критерии EULAR, основанные на динамике индекса DAS 28. Оценка ответа на терапию по критериям EULAR: улучшение DAS28 по сравнению с исходными более чем на 1,2 (DAS28 \leq 3,2) отражает хороший ответ на лечение; уменьшение DAS28 $>0,6$, $\leq 1,2$ (3,2<DAS28 \leq 5,1) – умеренный ответ; динамика DAS28 $\leq 0,6$ (DAS28 $>5,1$) – отсутствие ответа на лечение; DAS28 $<2,6$ – свидетельствует о ремиссии заболевания. Определение показателей цитокинового статуса в сыворотке крови проводилось до начала терапии, спустя 4 недели и 16 недель после курса лечения ритуксимабом. Все больные были рандомизированы на две группы: первую группу (1n=18) составили пациенты с развернутой стадией РА (длительность заболевания до 2 лет), вторую (2n=36) – больные с поздней стадией (длительностью более 2 лет). Критериями рандомизации больных на группы явились активность и длительность течения РА. Ритуксимаб вводили

в/в капельно по 1000 мг/сутки в соответствии с рекомендуемой схемой: две инфузии с интервалом в 2 недели на фоне приема метотрексата 12,5 \pm 2,5 мг/неделю. Уровень растворимого ФНО α – рецептора 1 (рФНО α -P1) в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом (Bio-source, Бельгия), концентрацию ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α в сыворотке крови больных РА оценивали с помощью тест-систем Pro Con (НПО «Протеиновый контур», г. Санкт-Петербург). Во всех процедурах статистического анализа за уровень значимости принимали $p = 0,05$. Статистическая обработка цифровых данных произведена с применением стандартного пакета прикладных программ Microsoft Excel и STATISTICA 5.0 for Windows. Статистический анализ количественных переменных основывался на различии средних арифметических совокупностей. В случае двух несвязанных выборок использовался t-критерий Стьюдента с отдельной оценкой дисперсии для независимых групп. Для оценки зависимости между количественными параметрами рассчитывались коэффициенты линейной корреляции Пирсона, а в случае порядковых переменных вычислялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для оценки достоверности изменений показателей на фоне лечения применялись критерии Стьюдента и Уилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование исходного уровня цитокинов провоспалительного действия в сыворотке крови больных РА показало достоверное увеличение их содержания в сравнении с показателями здоровых людей (табл. 1, 2).

При сопоставлении содержания данных цитокинов у больных с различной длительностью РА было установлено, что при анамнезе болезни до 2 лет (развернутая стадия) имел место достоверно более высокий уровень ФНО α , рФНО α -P1, ИЛ-1 β (198,4 \pm 13,7 пг/мл ($p<0,05$), 4,21 \pm 0,7 пг/мл ($p<0,05$), 154,7 \pm 12,3 пг/мл ($p<0,05$) соответственно). При этом концентрация ИЛ-6 у больных этой группы была несколько ниже (189,5 \pm 9,1 пг/мл; $p<0,05$) в сравнении с показателем при поздней стадии РА (табл. 1, 2). Известно, что ИЛ-1 β и ФНО α обладают свойствами инициировать воспаление и разрушение костной и хрящевой ткани [12]. Считают, что рФНО α -P1 обеспечивает большинство биологических активностей ФНО α [2]. Под влиянием ИЛ-1 β хондроциты вырабатывают собственные провоспалительные медиаторы, а также повышенное количество оксида азота, приводящего к гибели хрящевых клеток.

Влияние терапии на показатели цитокинового статуса в сыворотке крови больных с развернутой стадией ревматоидного артрита (M±m)

Группы обследованных			№ n/n	Показатели			
				ФНОα (пг/мл)	ИЛ-1β (пг/мл)	ИЛ-6 (пг/мл)	рФНОα-P1 (пг/мл)
Группа контроля (n= 20)			1	32,2±4,6	36,1±6,3	13,2±1,9	2,1±0,5
До лечения: больные с длительностью РА до 2 лет (n=18)			2	198,4±9,1*1	154,7±12,3*1	189,5±9,1*1	4,21±0,7*1
Больные РА с длительностью заболевания до 2 лет (n= 18)	Через 4 недели после терапии	Ритуксимаб (n= 18)	3	133,7±6,8*1,2	108,6±9,3*1,2	128,7±7,4*1,2	3,61±0,1*1,2
	Через 16 недель после терапии	Ритуксимаб (n= 18)	4	39,8±5,7*2,3	42,4±6,9*2,3	19,6±4,4*2,3	2,3±0,12*2,3

Примечание: * отмечены достоверные различия средних арифметических ($p < 0,05$), цифры рядом со звездочкой по отношению к показателям какой группы эти различия достоверны.

Таблица 2

Влияние терапии на показатели цитокинового статуса в сыворотке крови больных с поздней стадией ревматоидного артрита (M±m)

Группы обследованных			№ n/n	Показатели			
				ФНОα (пг/мл)	ИЛ-1β (пг/мл)	ИЛ-6 (пг/мл)	рФНОα-P1 (пг/мл)
Группа контроля (n= 20)			1	32,2±4,6	36,1±6,3	13,2±1,9	2,1±0,5
До лечения: больные с длительностью РА более 2 лет (n=36)			2	168,5±8,8*1	129,3±10,1*1	223,6±7,8*1	3,2±0,4*1
Больные РА с длительностью заболевания более 2 лет (n= 36)	Через 4 недели после терапии	Ритуксимаб (n= 36)	3	120,7±5,9*1,2	102,7±4,5*1,2	182,9±6,7*1,2	2,36±0,12*1,2
	Через 16 недель после терапии	Ритуксимаб (n=36)	4	56,6±10,7*1-3	65,3±9,2*1-3	92,6±5,4*1-3	2,32±0,14*1-2

Примечание: * отмечены достоверные различия средних арифметических ($p < 0,05$), цифры рядом со звездочкой - по отношению к показателям какой группы эти различия достоверны.

ФНОα и ИЛ-1β обладают синергической и самоиндуцирующей активностью, потенцируют развитие синовита с лейкоцитарной инфильтрацией сустава. Эти цитокины усиливают экспрессию молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1) на мембранах эндотелия сосудов синовиальной мембраны, индуцируют синтез хемотаксических факторов, стимулируют продукцию фактора роста фибробластов, вызывая тем самым прогрессирование деструкции суставов [1]. ИЛ-1β и ФНОα являются мощными индукторами синтеза ИЛ-6, который

потенцирует эффекты ключевых медиаторов воспаления в синовиальной оболочке, запуская деструктивные процессы в суставах, стимулирует остеокластогенез и вместе с другими цитокинами (ИЛ-1β и ФНОα) способствует развитию костной и хрящевой деструкции сустава, прогрессированию заболевания [10].

Проведенный корреляционный анализ показал наличие прямой корреляции между величинами ИЛ-1β, ФНОα, рФНОα-P1, ИЛ-6.

Спустя 4 недели после терапии ритуксимабом у 36 (66,7%) из обследованных больных РА, имел место «хороший ответ» (снижение DAS более 1,2) и минимальная активность заболевания (DAS28<3,2), у 2 пациентов (3,7%) определена ремиссия заболевания; умеренная активность заболевания (3,2>DAS28>5,1) имела место у 16 больных (29,6%). Следует отметить большую эффективность проведенной терапии ($\chi^2=12,69$; $p<0,05$) у больных с развернутой стадией РА: хороший ответ был достигнут 16 больных (88,9%) и ремиссия заболевания установлена у 2 пациентов (11,1%).

Оценка лабораторных показателей через 4 недели после терапии ритуксимабом установила достоверное снижение содержания в сыворотке крови больных с развернутой стадией РА провоспалительной цитокинемии: средний уровень ФНО α снизился на – 32,6% ($p<0,05$), рФНО α -P1 на – 15,2% ($p<0,05$), ИЛ-1 β – на 29,8% ($p<0,05$), ИЛ-6 – на 32,1% ($p<0,05$). У больных с продолжительностью заболевания более 2-х лет определено достоверно меньшее снижение уровня провоспалительной цитокинемии ($\chi^2=11,51$; $p<0,05$), разница средней концентрации ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 в сравнении с исходным уровнем составила 28,4%, 20,6%, 18,2% соответственно; уровень рФНО α -P1 в этой группе больных снизился на 26,3% ($p<0,05$). Через 16 недель после курса терапии отмечено увеличение количества больных с «хорошим ответом» (DAS28<3,2) до 79,6% (43 человека), ремиссия (DAS28<2,6) определена у 6 (11,1%) больных с длительностью РА менее 2 лет, умеренная активность заболевания (3,2>DAS28<5,1) сохранялась у 5 (9,3%) человек.

Спустя 16 недель после терапии ритуксимабом установлено, что у больных с длительностью РА до 2 лет уровень провоспалительных цитокинов не имел достоверных отличий от показателей контроля.

У больных с длительностью РА более 2 лет спустя 16 недель после лечения ритуксимабом снижение среднего уровня исследуемых показателей составило соответственно: ФНО α – 66,4% ($p<0,05$), рФНО α -P1 – 27,5% ($p<0,05$), ИЛ-1 β – 49,5% ($p<0,05$), ИЛ-6 – 58,6% ($p<0,05$). Таким образом полученные результаты показали, что у больных РА имеет место существенное различие в содержании цитокинов провоспалительного действия в сыворотке крови по сравнению со здоровыми донорами. Наиболее высокое содержание исследуемых цитокинов было определено в сыворотке крови у больных при длительности РА более 2 лет, что, по-видимому, связано с прогрессированием заболевания, формированием паннуса, увеличением зоны поражения синовиальных оболочек, хрящевой и костной тканей, измененные

клетки которых являются активными продуцентами данных медиаторов [3]. При этом следует отметить, что при развернутой стадии (длительность менее 2 лет) РА преобладало содержание в сыворотке крови ФНО α , рФНО α -P1, ИЛ-1 β , у больных с длительностью РА более 2 лет - ИЛ-6, достоверно превышавшее его уровень при развернутой стадии РА. Известно, что таким цитокинам, как ФНО α , ИЛ-1 β , вырабатываемым в процессе иммунного взаимодействия макрофагов и лимфоцитов в синовиальной мембране, принадлежит ведущая роль в дальнейшем активировании клеток и развитии острого воспалительного процесса в суставе [9]. Гиперпродукция ФНО α , рФНО α -P1 и ИЛ-1 β является основным стимулом для агрессивной пролиферации синовиальных клеток. Следует отметить, что ФНО α в цитокиновой иерархии занимает стабильно более высокую позицию и стимулирует продукцию ИЛ-1 β , ИЛ-6 [9]. Экспрессия рФНО α -P1 определяет и координирует биологическую активность ФНО α регулируя направление ответов – воспаление или пролиферация [2]. Выявленные в нашем исследовании различия в содержании изучаемых цитокинов у больных с различной длительностью РА, по всей видимости, обусловлены их свойствами, установленными в экспериментальных моделях, показавшими, что ФНО α в большей степени ответственен за острое воспаление суставов, а ИЛ-1 β – за клеточную инфильтрацию и деструкцию хряща, ИЛ-6 способствует хронизации процесса, стимулируя остеокластогенез, деструкцию костной и хрящевой ткани [9].

Анализ полученных данных установил высокую клиническую эффективность терапии ритуксимабом, что подтверждает результаты исследований других авторов [7]. Положительная клинико-лабораторная динамика определена уже спустя 4 недели после проведения курса терапии и нарастала к 16 неделям. Установлена большая активность корригирующего действия ритуксимаба на провоспалительную цитокинемию у больных с длительностью болезни менее 2 лет.

Полученные результаты обосновывают целесообразность применения ритуксимаба на более ранних стадиях прогрессирования РА, что позволяет рассчитывать на наиболее благоприятный исход заболевания, включая достижение ремиссии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бадюкин В.В.* Избранные лекции по клинической ревматологии / Под ред. В.А. Насоновой, Н.В. Бунчука. – М., 2003. – 230 с.
2. *Кетлинский С.А.* Цитокины. – СПб.: Фолиант, 2008. – 550 с.

3. *Насонова В.А.* Ревматология. – М.: Медицина, 2008. – 457 с.
4. *Насонов Е.Л.* Ревматоидный артрит как общемедицинская проблема // *Терапевт.* – 2004. – № 5. – С. 5-7.
5. *Насонов Е.Л., Каратеев Д.Е. и др.* Современные стандарты фармакотерапии ревматоидного артрита // *Клин. фармакология и терапия.* – 2005. – Т. 14, № 1. – С. 72-75.
6. *Насонов Е.Л., Каратеев Д.Е.* Ревматоидный артрит. Ревматология. Национальное руководство / Под ред. Е.Л. Насонова, В.А. Насоновой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 852 с.
7. *Насонов Е.Л.* Применение ингибиторов фактора некроза опухоли при РА: место этанерцепта // *Научно-практическая ревматология.* – 2008. – № 5. – С. 1-20.
8. *Потанин Т.К.* Ревматоидный артрит. Новые данные о старой болезни. – М., 2007. – 68 с.
9. *Сигидин Я.А., Лукина Г.В.* Биологическая терапия в ревматологии, 2-е изд., доп. – М.: Практическая медицина, 2009. – 302 с.
10. *Antoni C., Krueger G.G., K. de Vlam et al.* Infliximab improves signs and symptoms of psoriatic arthritis: results of IMPACT 2 trial // *Ann Rheum Dis.* – 2005. – Vol. 64. – P. 197-200.
11. *Prevo H.L.L., A.van Hoff, Kuper H.H.* Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts // *Arthr. Rheum.* – 1995. – Vol. 38. – P. 44-52.
12. *Tracey D., Klareskog L., Sasso E.H. et al.* Tumor necrosis factor antagonists mechanisms of actions: a comprehensive review. *Pharmacol Therapeut.* – 2008. – N117. – P. 244-279.