

УДК 616.72–002.77–08

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЛИЯНИЯ ТЕРАПИИ РИТУКСИМАБОМ НА ПОКАЗАТЕЛИ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА В СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И КЛИНИЧЕСКУЮ СИМПТОМАТИКУ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

© Безгин А.В., Князева Л.А.

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

В данной статье проведена оценка показателей цитокинового статуса в синовиальной жидкости у 64 больных ревматоидным артритом (РА). Установлены отличия в содержании ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО α и васкулоэндотелиального фактора роста-А (ВЭФР-А) в синовиальной жидкости больных в зависимости от позитивности по ревматоидному фактору (РФ). У серопозитивных по РФ пациентов преобладало содержание ИЛ-1 β и ВЭФР-А, при серонегативном РА – ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-8. Определена большая эффективность влияния ритуксимаба на показатели цитокинового статуса у больных с серопозитивным по РФ вариантом РА.

Ключевые слова: цитокины, васкулоэндотелиальный фактор роста-А, ревматоидный артрит, ритуксимаб.

THE TREATMENT INFLUENCE ON THE LOCAL IMMUNE STATUS AND CLINICAL PICTURE IN DIFFERENT SEROLOGICAL SUBTYPES OF RHEUMATOID ARTHRITIS

Bezgin A.V., Knyazeva L.A.

Department of Internal Diseases N 2 of Kursk State Medical University, Kursk

The results of the research of cytokines status in the synovial liquid of the 64 rheumatoid arthritis (RA) patients are offered in this article. The differences between the concentrations of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and vasculoendothelial growth factor-A (VEGF-A) were estimated in the synovial liquid of RA patients, according to the serological subtypes (rheumatoid factor-RF). In seropositive patients the higher concentration of IL-1 β and VEGF-A took place and the seronegative variant of RA was characterized by the increased levels of TNF- α , IL-6, IL-8. The efficacy of rituximab therapy was more distinguished in the patients with seropositive RA.

Keywords: cytokines, vasculoendothelial growth factor-A, rituximab, rheumatoid arthritis.

Ревматоидный артрит (РА) является одним из самых тяжелых заболеваний человека и представляет серьезную медико-социальную проблему из-за прогрессирующего характера течения, приводящего к быстрому развитию инвалидности вследствие функциональной недостаточности суставов. Так, в первые 3 года болезни трудоспособность утрачивают около 35% больных, а через 5 лет - более половины. При этом продолжительность жизни больных примерно на 7-10 лет меньше популяционной [4, 5]. Эти положения делают терапию РА важной задачей.

В последние годы в лечении РА наметился значительный прогресс, что напрямую связано с разработкой и внедрением в клиническую практику нового класса противовоспалительных средств - генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП), значительно расширявших терапевтические возможности и сделавших достижимым торможение эрозивного процесса в суставах и ремиссию заболевания [3]. Среди широкого спектра ГИБП, применяющихся для лечения РА, уникальное место принадлежит препарату ритуксимаб. Известно, что ритуксимаб (РТМ) представляет собой химерные моноклональные антитела к мембранныму CD 20 антигену В-клеток, вызывающие деплецию различных субпопуляций

В-клеток, играющих фундаментальную роль в иммунопатогенезе РА и других аутоиммунных заболеваний [6]. Результаты рандомизированных плацебо контролируемых исследований (РПКИ) РТМ [8] свидетельствуют о высокой клинической эффективности РТМ при РА. Следует при этом отметить, что первые полученные результаты, показавшие высокую эффективность терапевтического действия ритуксимаба при ревматологической патологии, явились основанием для интенсивных исследований, направленных на оптимизацию терапии РТМ, поиск "предикторов" эффективности терапии, определение показаний для повторных курсов терапии. Уточнение данных положений будет способствовать индивидуализации и повышению эффективности терапии.

Целью работы явилось изучение содержания в синовиальной жидкости цитокинов провоспалительного действия (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО α), васкулоэндотелиального фактора роста – А (ВЭФР-А) у больных ревматоидным артритом в зависимости от позитивности по ревматоидному фактору (РФ) и их динамики под влиянием терапии ритуксимабом и метотрексатом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На базе ревматологического отделения областной клинической больницы г. Курска обследовано 64 пациента с ревматоидным артритом с умеренной и высокой активностью; длительность заболевания колебалась от 6 месяцев до 7 лет. Средний возраст больных составил $48,2 \pm 6,5$ года. Группа контроля включала 20 здоровых доноров. Критериями включения пациентов в исследование явились: РА 2-3 степени активности, ($DAS 28 > 3,2$); пациенты, получавшие в качестве базисных противовоспалительных препаратов (БПВП) метотрексат; наличие информированного согласия пациента о включении в исследование. Критерии исключения пациентов из исследования: РА 1 степени активности; инфекционные процессы любой локализации. Диагноз ревматоидного артрита устанавливался в соответствии с критериями Европейской антиревматической лиги (EULAR, 2010). Количественная оценка активности РА проводилась с использованием индекса DAS 28 (Disease Activity Score), рекомендованного EULAR [11]. Оценка эффективности терапии проводилась на основании анализа динамики клинической симптоматики РА по критериям EULAR. Определение показателей цитокинового статуса, ВЭФР-А в синовиальной жидкости проводилась до начала терапии, и после четырех месяцев лечения. Все обследованные больные были рандомизированы на две группы в зависимости от серопозитивности по РФ: первую группу ($1n=38$) составили пациенты с серопозитивным по РФ РА, вторую ($2n=26$) – больные с серонегативным по РФ вариантом РА. Все больные получали в качестве базисной противовоспалительной терапии ритуксимаб – вводили в/венно капельно по 1000 мг/сутки в соответствии рекомендуемой схемой: 0, 2 неделя, на фоне приема метотрексата 10 мг/нед. Концентрацию ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α , ИЛ-8 в синовиальной жидкости больных РА оценивали с помощью тест-систем Pro Con (НПО «Протеиновый контур», г. Санкт-Петербург). Вакулоэндотелиальный фактор роста - А (ВЭФР-А) исследовали иммуноферментным методом (Bender, Medsystems Qmbh). Ревматоидный фактор определяли иммуноферментным методом (Orgentect). Синовиальную жидкость для исследования получали при пункции коленных суставов. Статистический анализ полученных данных проводился с вычислением среднего арифметического (M), среднеквадратичного (стандартного) отклонения (SD); стандартной ошибки среднего арифметического (m).

Значимость различий определяли согласно критерию t Стьюдента. Данные представлены в

виде $M \pm m$. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование исходного содержания цитокинов провоспалительного действия в синовиальной жидкости больных РА показало достоверное увеличение их содержания: ФНО α - $426,5 \pm 14,8$ пг/мл; ИЛ-1 β - $288,4 \pm 11,7$ пг/мл; ИЛ-6 - $234,5 \pm 13,1$ пг/мл; ИЛ-8 - $148,6 \pm 16,1$ пг/мл в сравнении с показателями здоровых людей. У всех обследованных больных РА определено повышение уровня ВЭФР - А ($76,8 \pm 10,6$ пмоль/л; $p < 0,05$) в синовиальной жидкости. При серонегативном варианте РА (уровень РФ в сыворотке крови составил $15,1 \pm 3,6$ МЕ/мл) по сравнению с серопозитивным, в синовиальной жидкости имел место более высокий уровень ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-8 ($498,4 \pm 13,7$ пг/мл, $p < 0,05$; $298,5 \pm 19,1$ пг/мл, $p < 0,05$; $398,6 \pm 19,7$ пг/мл, $p < 0,05$ соответственно) (табл. 1). Концентрация ИЛ-1 β и ВЭФР - А у больных этой группы составляла соответственно: $204,7 \pm 12,3$ пг/мл и $76,8 \pm 10,6$ пг/мл, и была достоверно ниже в сравнении с показателями при серопозитивном по РФ варианте РА; при котором уровень ИЛ-1 β и ВЭФР - А соответственно был равен: $318,4 \pm 24,7$ пг/мл и $393,7 \pm 25,2$ пг/мл (табл. 2), у больных этой группы концентрация РФ в сыворотке крови ($65,2 \pm 5,4$ МЕ/мл) достоверно превышала показатель группы контроля ($12,3 \pm 4,6$ МЕ/мл). Таким образом, проведенные исследования выявили особенности в содержании исследуемых цитокинов в синовиальной жидкости больных в зависимости от серопозитивности по РФ. При серонегативном варианте РА в синовиальной жидкости преобладало содержание ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-8. У больных с серопозитивной формой РА отмечена значительно большая концентрация ИЛ-1 β , ВЭФР-А, при меньшем уровне ФНО α , ИЛ-6 и ИЛ-8, что отражает особенности патогенеза данных вариантов РА. Следует отметить, что нарушения в системе цитокинов имеют патогенное значение в развитии РА. Таким цитокинам, как ФНО α , ИЛ-6, вырабатывающимся в процессе иммунного взаимодействия макрофагов и лимфоцитов в синовиальной мембране, принадлежит ведущая роль в дальнейшем активировании клеток и развитии острого воспалительного процесса [7], прежде всего при серонегативном варианте РА.

Гиперпродукция ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-8 является основным стимулом для агрессивной пролиферации синовиальных клеток. Следует отметить, что ФНО α в цитокиновой иерархии занимает стабильно более высокую позицию и стимулиру-

Таблица 1

Влияние терапии ритуксимабом на показатели цитокинового статуса в синовиальной жидкости больных с серонегативным по РФ ревматоидным артритом ($M \pm m$)

Группы обследованных	№ п/п	Показатели				
		ФНО α (пг/мл)	ИЛ-1 β (пг/мл)	ИЛ-6 (пг/мл)	ВЭФР-А (пмоль/л)	ИЛ-8 (пг/мл)
Группа контроля (n= 20)	1	35,2±4,6	16,1±6,3	6,2±0,9	15,6±3,6	6,8±2,1
До лечения: больные с серонегатив- ным по РФ РА (n=26)	2	498,4±13,7*1	204,7±12,3*1	298,5±19,1*1	76,8±10,6*1	398,6±19,7*1
Через 4 месяца терапии ритуксимабом + мето- трексат 10 мг/неделю (n= 26)	3	256,2±3,7*1- 2	123,2±2,8*1- 2	202,7 ±1,8*1- 2	36,6±4,5*1-2	260,3±3,6*1- 2

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

Таблица 2

Влияние терапии ритуксимабом на показатели цитокинового статуса в синовиальной
жидкости больных с серопозитивным по РФ ревматоидным артритом ($M \pm m$)

Группы обследованных	№ п/п	Показатели				
		ФНО α (пг/мл)	ИЛ-1 β (пг/мл)	ИЛ-6 (пг/мл)	ВЭФР-А (пмоль/л)	ИЛ-8 (пг/мл)
Группа контроля (n= 20)	1	35,2±4,6	16,1±6,3	6,2±0,9	15,6±3,6	6,8±2,1
До лечения: больные с серопозитивным по РФ РА (n=38)	2	128,5±14,8*1	318,4±24,7*1	232,5±8,4*1	393,7±25,2 *1	160,3±6,8*1
Через 4 месяца терапии ри- туксимабом + метотрексат 10 мг/неделю (n=38)	3	38,8±6,2*2	100,3±10,2*1- 2	50,5±9,8*1- 2	57,5±15,8*1-2	44,2±4,9*1- 2

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

ет продукцию ИЛ-1 β , ИЛ-6. Гиперпродукция ИЛ-6 активирует экспрессию молекул адгезии на эндотелии синовии, усиливает активность фибробластов и остеокластов, тем самым потенцирует воспаление при РА [2]. Важным свойством ИЛ-8 является стимуляция ангиогенеза путем активации пролиферации эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток, усиления продукции ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α [2]. Преимущественное увеличение уровня ИЛ-8 при негативном по РФ варианте РА можно рассматривать в качестве компенсаторной реакции, направленной на частичное замещение в ангиогенезе активности ВЭФР-А, содержание которого у больных этой группы оказалось достоверно ниже в сравнении с серопозитивным по РФ ревматоидным артритом. Прогрессирование заболевания, формирование паннуса при РА сопряжено с гиперпродукцией ВЭФР-А, ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α , обладающих свойствами иницииро-

вать воспаление и разрушение костной и хрящевой ткани [10]. ФНО α потенцирует эффекты ключевых медиаторов воспаления в синовиальной оболочке, запуская деструктивные процессы в суставах, стимулирует остеокластогенез и вместе с другими цитокинами (ИЛ-1 β и ИЛ-6) способствует развитию костной и хрящевой деструкции сустава, прогрессированию заболевания. Под влиянием ФНО α активируется продукция ИЛ-8, который, в свою очередь, обладает способностью потенцировать синтез клетками ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α , также ИЛ-8 играет ключевую роль в миграции нейтрофилов в очаг воспаления в синовиальной ткани. Источником ИЛ-8 в полости суставов могут являться синовиальные клетки, гиперэкспрессия ИЛ-8 обусловливает прогрессирование воспаления синовиальной оболочки суставов [2]. Под влиянием ИЛ-1 β хондроциты вырабатывают собственные провоспалительные медиато-

ры, а повышенное количество оксида азота, приводит к гибели хондроцитов. ИЛ-1 β и ФНО α 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 мембранны, индуцируют синтез хемотаксических факторов, стимулируют продукцию фактора роста фибробластов, вызывая тем самым прогрессирование деструкции суставов [1]. Следует подчеркнуть важную роль ИЛ-1 β в активировании экспрессии ВЭФР-А [14].

Определение в синовиальной жидкости у обследованных больных РА уровня ВЭФР - А показало, что его концентрация при серопозитивном варианте болезни была в 5,1 раза выше, чем у больных с серонегативным РА. Известно, что вакулоэндотелиальный фактор роста - А, секретирующийся макрофагами, фибробластами, лимфоцитами, играет важную роль в неоангиогенезе при РА, осуществляя стимуляцию пролиферации синовиальных и эндотелиальных клеток, образование новых сосудов, активный рост паннуса с обилием в нем кровеносных сосудов [13]. Более высокое содержание ВЭФР-А у больных с серопозитивным вариантом заболевания отражает прогрессирование болезни, высокую активность процессов неоангиогенеза, стимулированных ВЭФР-А. При этом надо отметить, что процессы деструкции хряща и кости при РА связаны не столько с механическим давлением растущего паннуса, сколько с гиперпродукцией провоспалительных медиаторов, в том числе ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО α [7].

Сравнительная оценка клинической эффективности применения ритуксимаба у больных РА в зависимости от серопозитивности по РФ показала, что у серопозитивных пациентов, получавших ритуксимаб, клиническая эффективность лечения (число пациентов с ответом по DAS 28 составило более 75%) была достоверно выше, чем в группе серонегативным по РФ больных (всего 27,5% больных с ответом по DAS 28). При этом после четырех месяцев терапии только у 15% больных, негативных по РФ, в сравнении с 65% пациентов позитивных по РФ ($p<0,05$), имел место "хороший ответ" (снижение DAS более чем на 1,2) и минимальная активность заболевания (DAS $<2,4$). Число пациентов, "не отвечающих" на терапию (снижение DAS менее, чем на 0,6, или DAS $>3,7$), составило 18% у больных с серонегативным вариантом РА, в группе с РФ - позитивным РА таких пациентов выявлено не было ($p<0,05$).

Определение уровня изучаемых цитокинов после четырех месяцев терапии показало, что у

больных с РФ - позитивным РА, на фоне лечения было достигнуто достоверное уменьшение концентрации ФНО α – на $63,8\pm4,1\%$, ИЛ-1 β – на $64,5\pm4,2\%$, ИЛ-6 – на $73,3\pm5,8\%$, ИЛ-8 – на $68,4\pm3,6\%$, ВЭФР-А – на $81,4\pm4,6\%$. Уровень РФ в сыворотке крови больных указанной группы составил $21,3\pm4,2$ МЕ/мл и достоверно не отличался от показателя контрольной группы. У пациентов с РФ - негативным вариантом РА, после 4 месяцев лечения ритуксимабом, выявлена следующая динамика исследуемых показателей: уменьшение концентрации ФНО α по сравнению с исходным уровнем на $44,7\pm3,9\%$ ($p<0,05$), ИЛ-1 β – на $36,7\pm3,9\%$ ($p<0,05$), ИЛ-6 – на $28,8\pm3,6\%$ ($p<0,05$); ИЛ-8 – на $32,5\pm4,2\%$ ($p<0,05$); снижение концентрации ВЭФР-А в синовиальной жидкости составило $51,2\pm3,6\%$ ($p<0,05$). Анализ полученных данных установил большую клинико-лабораторную активность терапии ритуксимабом при серопозитивном варианте РА, что напрямую связано с блокированием ведущих звеньев патогенеза. Следует отметить, что В-клетки вызывают активацию Т-клеток и индуцируют тем самым синтез широкого спектра провоспалительных цитокинов, поэтому деплеция В-клеток под влиянием ритуксимаба сопровождается снижением продукции таких медиаторов воспаления, как ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-1 β , ВЭФР-А. Существенное изменение функции моноцитов/макрофагов под воздействием препарата приводит к снижению синтеза провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α), имеющих фундаментальное значение в развитии РА [9]. В качестве одного из механизмов терапевтического действия препарата следует отметить уменьшение продукции РФ до значений контроля под влиянием ритуксимаба, что важно с позиций роли РФ в поддержании воспалительного процесса [15]. Известно, что РФ принимает участие в активации системы комплемента, сопровождающейся выработкой значительного количества медиаторов воспаления, способствующих самоподдержанию и хронизации воспалительного процесса [12].

Полученные результаты дают основание рекомендовать применение ритуксимаба у больных серопозитивным по РФ вариантом РА, вследствие большей результативности действия препарата, что обеспечивает достаточно быстрое и эффективное купирование активности заболевания, достижение контроля за его прогрессированием, что лежит в основе предотвращения процессов деструкции костной и хрящевой ткани и, следовательно, сохранения целостности и функциональной активности суставов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бадокин В.В. Избранные лекции по клинической ревматологии / Под ред. В.А. Насоновой, Н.В. Бунчука. – М., 2003. – С. 82-90
2. Кетлинский С.А. Цитокины. – СПб.: Фолиант, 2008. – 550 с.
3. Карапеев Д.Е. Современная медикаментозная терапия ревматоидного артрита. – М.: Лечебный врач, 2007. – 546 с.
4. Насонов Е.Л. Фармакотерапия ревматоидного артрита с позиций доказательной медицины; новые рекомендации // РМЖ. – 2002.: № 6. – С. 11-23.
5. Насонов Е.Л. Ревматоидный артрит как общемедицинская проблема // Терапевт. – 2004., № 5. – С. 5-7.
6. Насонов Е.Л., Александрова Е.Н. Применение ритуксимаба при РА // Научно-практическая ревматология. – 2010. – № 4. – С. 10-40.
7. Сигидин Я.А., Лукина Г.В. Биологическая терапия в ревматологии – 2-е изд., доп. – М.: Практическая медицина, 2009. – 302 с.
8. Emery P., Fleishmann R., Filipowicz-Sosnowska A. et al. For the DANCER study group. The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment. Results of a phase ii b randomized, double-blind, placebo-controlled dose- range trial. Arthr. Rheum. – 2006. – N 54. – P. 1390-1400.
9. Jocobi E., Kesser A., G. Slobodin. Macrophage function following rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. Ann. Rheumatic Disease. – 2006. – N 5. – P. 112-114.
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. – N 64. – P. 197-200.
11. Prevoo H.L.L., A.van Hoff, Kuper H.H. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts // Arthr. Rheum. – 1995. – N 38. – P. 44-52.
12. Renaudineau Y., Jamin C., Saraux A., Yoinon P. Rheumatoid factor on a daily bases // Autoimmunity. – 2005. – N 38. – P. 11-6.
13. Smolen J.S., Weinblatt M. When patients with rheumatoid fail tumor necrosis factor inhibitors what is the next step // J Ann Rheum Dis. – 2008. – N 67. – P. 1497-1498.
14. Kowantz M., Ferrava N. Vascular endothelium growth factor signaling pathways: therapeutic perspective // Clin. Cancer Res. – 2006. – Vol. 12, N 17. – P. 5018- 22.
15. Youinou P., Janin C., Saraux A. B-cell: a logical target for treatment of rheumatoid arthritis // Clin. Exp. Rheumatol. – 2007. – N 25. – P. 318-328.