

УДК 616.72-002.77-085:576.353.4

*А.В. Безгин, Л.А. Князева***ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕРАПИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА В СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И КЛИНИЧЕСКУЮ СИМПТОМАТИКУ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЗИТИВНОСТИ ПО РЕВМАТОИДНОМУ ФАКТОРУ***Курский государственный медицинский университет***Контактная информация***Безгин Артем Вячеславович, канд. мед. наук, ассистент кафедры внутренних болезней №1*

Адрес: 305051, г. Курск, ул. Карла Маркса, 3; тел. +7(919)271-62-32

e-mail: kafedra_n1@bk.ru

Статья поступила 03.12.2010., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

В статье проведена оценка показателей цитокинового статуса в синовиальной жидкости у 74 больных РА. Установлены отличия в содержании ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α и ВЭФР-А в синовиальной жидкости больных в зависимости от позитивности по 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 инфликсимаба на исследуемые показатели при серонегативном по РФ варианте РА.

Ключевые слова: цитокины, васкулоэндотелиальный фактор роста-А, ревматоидный артрит, инфликсимаб.*A.V. Bezgin, L.A. Knyazeva***THE INFLUENCE OF TREATMENT ON THE LOCAL IMMUNE STATUS AND CLINICAL PICTURE IN DIFFERENT SEROLOGICAL SUBTYPES OF RHEUMATOID ARTHRITIS***State Medical University, Kursk***Abstract**

The cytokines status in the synovial liquid of the 74 RA patients was performed in this article. It was estimated 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 vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) in the synovial liquid of RA patients, according to the serological subtypes RF. The higher concentrations of IL-1 β and VEGF-A were observed in seropositive patients. The seronegative variant of RA was characterised by increased levels of TNF- α , IL-6, IL-8. Moreover, the efficacy of infliximab therapy was more distinguished in the patients with seronegative RA.

Key words: cytokines, vasculoendotheliae growth factor-A, infliximab, rheumatoid arthritis.**Введение**

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].

Известно, что основным принципом лечения РА является применение БПВП, от эффективности действия которых напрямую зависит прогноз заболевания. Следует отметить, что на стандартную терапию БПВП удовлетворительно отвечают не более 50 % больных [6]. Внедрение в клиническую практику нового класса БПВП, – ГИБП – коренным образом изменило сложившуюся ситуацию, поскольку значительно расширило терапевтические возможности, сделало достижимым торможение эрозивного процесса в суставах и ремиссию заболевания [2]. Известно, что ГИБП – инфликсимаб – уже более 10 лет применяется в лечении ревматологических заболеваний, в том числе РА. Однако результаты оценки эффективности применения инфликсимаба при РА неоднозначны, имеются сведения, что примерно

половина больных недостаточно реагирует на лечение ингибиторами ФНО- α , что во многом обусловлено гетерогенностью патогенетических механизмов и вариантов течения РА [11]. Данные положения обосновывают необходимость проведения исследований по выявлению особенностей патогенетических механизмов при РА, уточнение которых будет способствовать индивидуализации и повышению эффективности назначаемой терапии.

Цель работы – 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 инфликсимабом и метотрексатом.

Материалы и методы

На базе ревматологического отделения областной клинической больницы г. Курска обследовано 74 пациента, страдающих РА с умеренной и высокой активностью; длительность заболевания колебалась от 6 мес. до 7 лет.

Средний возраст больных составил 48,2 \pm 6,5 года. Группа контроля включала 20 здоровых доноров.

Критерии включения в исследование:

- РА 2–3 степени активности, (DAS 28 > 3,2);
- наличие показаний и отсутствие противопоказаний к применению БПВП;
- пациенты, получавшие в качестве БПВП метотрексат и инфликсимаб;
- 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 Американской Коллегии Ревматологов (ACR, 1987 г.). Количественная оценка активности РА проводилась с использованием индекса DAS 28 (Disease Activity Score), рекомендованного EULAR. Оценка эффективности терапии проводилась на основании анализа динамики клинической симптоматики РА по критериям EULAR и ACR. Определение показателей цитокинового статуса, ВЭФР-А в синовиальной жидкости проводилась до начала терапии, и после 12 мес. лечения. Все обследованные больные были разделены на две группы в зависимости от серопозитивности по РФ: первую группу (1n=38) составили пациенты с серопозитивным по РФ РА, вторую (2n=36) – больные с серонегативным по РФ вариантом РА. Все больные получали в качестве базисной противовоспалительной терапии инфликсимаб – вводили в/в капельно по 200 мг/сутки в соответствии с рекомендуемой схемой: 0; 2; 4; 6 неделя, затем каждые 8 недель на фоне приема метотрексата 10 мг/нед. Концентрацию ИЛ-1β, ИЛ-6, ФНО-α, ИЛ-8 в синовиальной жидкости больных РА оценивали с помощью тест-систем Pro Con (НПО «Протеиновый контур», г. Санкт-Петербург). Васкулоэндотелиальный фактор роста А (ВЭФР-А) исследовали иммуноферментным методом (Bender, Medsystems Qmbh). Синовиальную жидкость для исследования получали при пункции коленных суставов. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы «Microsoft Excel-2000» 2003.

Результаты и 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-1β – $288,4 \pm 11,7$ 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 сравнении содержания изучаемых цитокинов у больных в зависимости от серопозитивности по РФ было установлено, что при серонегативном варианте РА 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-1β 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-1β и ВЭФР-А составил соответственно $318,4 \pm 24,7$ пг/мл и $393,7 \pm 25,2$ пг/мл; табл. 2). Таким образом, проведенные исследования выявили особенности в со-

держании 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-1β, 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 при РА. Таким цитокином, как ФНО-α, ИЛ-6, 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 [8] 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 стимулирует продукцию ИЛ-1β, ИЛ-6. Гиперпродукция ИЛ-6 активирует экспрессию молекул адгезии на эндотелии синовиоцитов, усиливает активность фибробластов и остеокластов, тем самым потенцирует воспаление при РА [3]. Важным свойством ИЛ-8 является стимуляция ангиогенеза путем активации пролиферации эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток, усиления продукции ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α [3]. 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-1β, ИЛ-6 и ФНО-α, обладающих свойствами инициировать воспаление и разрушение костной и хрящевой ткани [9]. ФНО-α потенцирует эффекты ключевых медиаторов воспаления в синовиальной оболочке, запуская деструктивные процессы в суставах, стимулирует остеокластогенез и вместе с другими цитокинами (ИЛ-1β и ИЛ-6) способствует развитию костной и хрящевой деструкции сустава и прогрессированию заболевания. Под влиянием ФНО-α активируется продукция ИЛ-8, который в свою очередь, обладает способностью потенцировать синтез клетками ИЛ-1β, 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 обуславливает прогрессирование воспаления синовиальной оболочки суставов [3]. Под влиянием ИЛ-1β хондроциты вырабатывают собственные провоспалительные медиаторы, а повышенное количество оксида азота, приводит к гибели хондроцитов. ИЛ-1β 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 мембраны, индуцируют синтез хемотаксических факторов, стимулируют продукцию фактора роста фибробластов, вызывая тем самым прогрессирование деструкции суставов [1]. Следует подчеркнуть важную роль ИЛ-1β в активировании экспрессии ВЭФР-А [10].

Определение в синовиальной жидкости у обследованных больных РА уровня ВЭФР-А показало, что его концентрация при серопозитивном варианте болезни была в 1,6 раза выше, чем у больных с серонегативным РА.

Известно, что васкулоэндотелиальный фактор роста А, секретирующийся макрофагами, фибробластами, лимфоцитами, играет важную роль в неангиогенезе при РА, осуществляя стимуляцию пролиферации синовиальных и эндотелиальных клеток, образование новых сосудов, активный рост паннуса с обилием в нем кровеносных сосудов [11].

Более высокое содержание ВЭФР-А у больных с серопозитивным вариантом заболевания отражает прогрессирование болезни, высокую активность процессов неангиогенеза, 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 [8].

Сравнительная оценка клинической эффективности применения инфликсимаба у больных РА в зависимости от серопозитивности по РФ показала, что у серонегативных пациентов, получавших инфликсимаб, эффективность лечения (число пациентов с ответом по DAS 28 составило более 50 %) была достоверно выше, чем в группе серопозитивных по РФ больных (всего 17,5 % больных с ответом по DAS 28).

При этом после 12 мес. терапии только у 15 % больных, позитивных по РФ, в сравнении с 45 % пациентов, негативных по РФ, имел место «хороший ответ» (снижение DAS >1,2) и минимальная активность заболевания (1,6 < DAS < 2,4). Число пациентов, «не отвечающих» на терапию (DAS > 3,7), составило соответственно 50 % в первой группе, и 18 % – во второй.

Проведенный мониторинг лабораторных показателей (после 2 мес. терапии) установил достоверное снижение содержания в синовиальной жидкости больных с РФ-позитивным РА ВЭФР-А – на 29,1 %, ФНО- α – на 15,0 %, ИЛ-1 β – на 18,0 % и ИЛ-6 – на 17,3 %, ИЛ-8 – на 19,5 %.

При этом у пациентов с РФ-негативным вариантом РА после 2-месячного лечения инфликсимабом выявлена большая результативность коррекции изучаемых показателей: концентрация ФНО- α уменьшилась на 48,6 % ($p < 0,05$), ИЛ-1 β – на 39,8 % ($p < 0,05$), ИЛ-6 – на 32,1 % ($p < 0,05$); ИЛ-8 – на 34,7 % ($p < 0,05$); снижение концентрации ВЭФР-А в синовиальной жидкости составило 52,3 % ($p < 0,05$).

Определение уровня изучаемых цитокинов после 12 мес. терапии показало нормализацию их содержания в синовиальной жидкости у больных с РФ-негативным РА, получавших лечение инфликсимабом. У пациентов с РФ-позитивным РА, на фоне лечения было достигнуто достоверное уменьшение концентрации ФНО- α – на 69,8 %, ИЛ-1 β – на 48,5 %, ИЛ-6 – на 78,3 %, ВЭФР-А – на 85,4 %. Анализ полученных данных установил большую клиническую эффективность терапии инфликсимабом при серонегативном варианте РА, что во многом связано с высоким содержанием при этом варианте РА ФНО- α , являющегося мишенью для реализации активности инфликсимаба.

Известно, что ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α обладают частично перекрещивающейся и самоиндуцирующей активностью [7], поэтому снижение продукции ФНО- α под влиянием инфликсимаба сопровождается большей эффективностью корригирующего влияния на цитокиновый статус в синовиальной жидкости при серонегативном варианте РА.

Выводы

Полученные результаты дают основание рекомендовать применение инфликсимаба у больных серонегативным по РФ вариантом РА, учитывая большую результативность действия препарата, достаточно быстрое и эффективное купирование активности заболевания, контроль за его прогрессированием, что лежит в основе предотвращения процессов деструкции костной и хрящевой ткани и, следовательно, сохранения целостности и функциональной активности суставов.

Таблица 1

Влияние терапии на показатели цитокинового статуса в синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом РФ⁺

Группа	Показатель				
	ФНО- α , пг/мл	ИЛ-1 β , пг/мл	ИЛ-6, пг/мл	ВЭФР-А, пмоль/л	ИЛ-8, пг/мл
1. Контроль (n=20)	35,2 \pm 4,6	16,1 \pm 6,3	6,2 \pm 0,9	15,6 \pm 3,6	6,8 \pm 2,1
Больные ревматоидным артритом РФ ⁺ (n=36)					
2. До лечения:	498,4 \pm 13,7* ¹	204,7 \pm 12,3* ¹	298,5 \pm 19,1* ¹	76,8 \pm 10,6* ¹	398,6 \pm 19,7* ¹
3. Через 12 мес. терапии*	32,7 \pm 4,8* ²	17,4 \pm 2,6* ²	11,3 \pm 1,3* ²	26,5 \pm 5,4* ²	7,9 \pm 3,2* ²
*инфликсимаб + метотрексат 10 мг/нед (n=36)					

Таблица 2

Влияние терапии на показатели цитокинового статуса в синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом РФ⁺

Группа	Показатель				
	ФНО- α , пг/мл	ИЛ-1 β , пг/мл	ИЛ-6, пг/мл	ВЭФР-А, пмоль/л	ИЛ-8, пг/мл
1. Контроль (n=20)	35,2 \pm 4,6	16,1 \pm 6,3	6,2 \pm 0,9	15,6 \pm 3,6	6,8 \pm 2,1
Больные ревматоидным артритом РФ ⁺ (n=38)					
2. До лечения:	128,5 \pm 14,8* ¹	318,4 \pm 24,7* ¹	232,5 \pm 8,4* ¹	393,7 \pm 25,2* ¹	160,3 \pm 6,8* ¹
3. Через 12 мес. терапии*	38,8 \pm 6,2* ¹	164 \pm 10,2* ¹⁻²	50,5 \pm 9,8* ¹⁻²	57,5 \pm 15,8* ¹⁻²	44,2 \pm 4,9* ¹⁻²
*инфликсимаб + метотрексат 10 мг/нед (n=38)					

Литература

1. *Бадюкин В.В.* Избранные лекции по клинической ревматологии / Под ред. В.А. Насоновой, Н.В. Бунчука. – М., 2003. – С. 82–90.
2. *Каратеев Д.Е.* Современная медикаментозная терапия ревматоидного артрита // *Лечащий врач.* – 2007. – № 2. – С. 40–6.
3. *Кетлинский С.А.* Цитокины. – С-Пб.: Фолиант, 2008. – 550 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., Каратеев Д.Е.* Ревматоидный артрит. Ревматология. Национальное руководство; под ред. Е.Л. Насонова, В.А. Насоновой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 852 с.
7. *Насонова В.А.* Ревматология. – М.: Медицина, 2008. – 457 с.
8. *Сигидин Я.А., Лукина Г.В.* Биологическая терапия в ревматологии– 2-е изд., доп. – М.: Практическая медицина, 2009. – 302 с.
9. *Antoni C., Krueger G.G., de Vlam K. et al.* Infliximab improves signs and symptoms of psoriatic arthritis: results of IMPACT 2 trial // *Ann Rheum Dis.* – 2005. – 64. – P. 197–200.
10. *Kowantz M., Ferrava N.* Vascular endothelium growth factor signaling pathways: therapeutic perspective // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – 12(17). – P. 5018–22.
11. *Smolen J.S., Weinblatt M.* When patients with rheumatoid arthritis fail tumor necrosis factor inhibitors what is the next step // *J Ann Rheum Dis.* – 2008. – 67. – P. 1497–8.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОИЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН

