

ЛЕЧЕНИЕ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ВЛИЯНИЕ МЕТОТРЕКСАТА И ЛЕФЛУНОМИДА НА ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ И МЕТАБОЛИЗМ ОКСИДА АЗОТА У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Е.Э. Медведь, А.И. Дубиков, Л.А. Белоголовых

ГОУ ВПО Владивостокский государственный медицинский университет,

Городской ревматологический центр, Владивосток

Резюме

Цель. Установить значение отдельных цитокинов и оксида азота в реализации фармакологических эффектов метотрексата и лефлуномида у больных ревматоидным артритом (РА).

Материал и методы. Исследовано 94 больных достоверным серопозитивным РА в активной фазе, 87 жен. и 7 муж. в возрасте от 20 до 60 лет. Длительность заболевания от 6 мес. до 10 лет. 63 больных получали метотрексат в дозе 20 мг 1 раз в нед. внутримышечно, 31 – лефлуномид по стандартной схеме. Количественное определение интерлейкинов (ИЛ) 1 β , 6, 10 и фактора некроза опухоли альфа (ФНО α) методом твердофазного иммуноферментного анализа в сыворотке крови и синовиальной жидкости, спектрофотометрическое исследование NO $_2$ и NO $_3$ в тех же биологических жидкостях и моче проводилось до и через 6 мес. терапии. Оценка эффективности базисных противовоспалительных препаратов (БПВП) проводилась в те же сроки.

Результаты. Повышенное содержание цитокинов, за исключением ИЛ-6, и метаболитов оксида азота обнаружено только в синовиальной жидкости и моче больных РА. Лечение метотрексатом сопровождалось увеличением уровней ИЛ-1, ФНО α и метаболитов оксида азота в периферическом кровотоке. Лефлуномид в отличие от метотрексата активно подавлял продукцию ИЛ-6 в сыворотке крови. На фоне терапии метотрексатом и лефлуномидом произошло многократное снижение концентрации ИЛ-1, ФНО α и метаболитов NO в синовиальной жидкости, что сопровождалось снижением степени активности РА.

Ключевые слова: *ревматоидный артрит, оксид азота, цитокины, метотрексат, лефлуномид*

Патогенетическая терапия ревматоидного артрита (РА) представляет собой сложную задачу. Существующие на сегодняшний день представления о развитии аутоиммунного воспалительного процесса при РА придают большое значение цитокиновому дисбалансу в патогенезе заболевания [1, 2, 5]. Активно изучается роль оксида азота (NO) в реализации воспаления при РА. Значение NO в патологии суставов подтверждена в ряде экспериментальных и клинико-лабораторных работ, но полученные данные не позволяют конкретизировать роль NO в патогенезе РА [6, 10, 18]. Не до конца ясны

механизмы реализации фармакодинамических эффектов базисных противовоспалительных препаратов (БПВП). К проблемам, связанным с фармакотерапией РА, относят: первичную резистентность, неудовлетворительные результаты применения ранее эффективных лекарственных средств, развитие побочных реакций [2]. В большинстве случаев не более одной трети больных РА могут продолжать лечение одним и тем же БПВП более четырех лет [2], что диктует необходимость дальнейшего исследования механизмов действия уже известных препаратов, определения маркеров для оценки эффективности проводимой фармакотерапии.

Цель работы: установить значение цитокинов и NO в реализации фармакодинамических эффектов метотрексата и лефлуномида у больных РА.

Материал и методы

В проспективное когортное исследование были включены 94 больных серопозитивным РА (87 жен. и 7 муж. в возрасте от 20 до 60 лет), диагноз которых соответствовал критериям Американской ревматологической ассоциации (1987). Больных разделили на 2 группы: с ранним РА (средняя длительность заболевания 18 мес.) и поздним РА (течение заболевания более 3 лет) [13]. Наличие эрозий в костных структурах, образовавшихся по истечении 24 мес. от начала заболевания, определяло эрозивный вариант течения РА, отсутствие эрозий – неэрозивный [12, 19]. Активность заболевания в 46,7% случаев определена как средняя, в 53,3% случаев – высокая.

Распределение больных по рентгенологическим стадиям (Steinbrocker) было следующим: I стадия – 2,3%, II – 27,3%, III – 46,3%, IV – 24,1%. Преобладали больные со 2 и 3 функциональным классом недостаточности суставов (АКР, 1992 г.). В исследуемых группах исходно не было статистически значимых различий в клинических и демографических показателях. В исследование вошли больные с признаками активной фазы заболевания, наличием показаний и отсутствием противопоказаний к применению всех назначаемых БПВП, не получавшие БПВП в течение двух предшествующих месяцев, с отсутствием нарушений со стороны когнитивных функций. Допускался прием нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП). 63 больным была назначена терапия метотрексатом, 31 больному – лефлуномидом. Метотрексат назначался в дозе – 20 мг в сутки 1 раз в нед. внутримышечно, лефлуномид – в начальной дозе 100 мг/сут. однократно три дня подряд, поддерживающая доза 20 мг/сут. ежедневно. Оценка эффективности БПВП проводилась через 6 мес. после начала лечения с использованием комбинированного индекса активности заболевания DAS 28 [17]. Информационное согласие было получено от всех пациентов. Работа была утверждена Независимым междисциплинарным этическим комитетом Владивостокского государственного медицинского университета.

До лечения проводили количественное определение цитокинов в образцах сыворотки крови и пробах синовиальной жидкости больных методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов BioSource International для интерлейкинов (ИЛ) -1 β , -10, -6, фактора некроза опухоли α (ФНО α). Спектрофотометрически определяли нитрат- и нитрит- ионы в тех же биологических жидкостях и моче. Повторные исследования

производили не ранее 6 мес. от начала терапии. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы "Статистика 2".

Результаты

Иммуноферментный анализ выявил существенное превалирование концентрации цитокинов в синовиальной жидкости по сравнению с сыворотками у больных РА (табл.1).

Содержание цитокинов в сыворотке крови у исследуемых пациентов не превышало показателей здоровых доноров, за исключением ИЛ-6. Обращает на себя внимание значительно повышенный уровень ИЛ-6 в системном кровотоке и в синовиальной жидкости в основном за счет группы "позднего" артрита, что позволяет обсуждать роль этого цитокина в хронизации воспалительного процесса при РА [2, 14, 15].

В ходе исследования повышение концентрации ИЛ-1 в синовиальной жидкости обнаружено только на ранних стадиях РА (табл. 1). Уровень ФНО в синовиальной жидкости характеризовался исходно высокими величинами, еще более повышаясь в группе больных с "поздним" РА. Динамика содержания ИЛ-10 носила аналогичный характер (табл.1).

Выявлена обратная корреляционная связь уровня ИЛ-10 сыворотки крови с ревматоидным фактором (РФ) ($r=-0,67$; $p<0,05$).

В сыворотке крови больных РА не обнаружено повышения уровня метаболитов NO в сравнении с контролем. Иной паттерн экспрессии метаболитов NO был обнаружен в синовиальной жидкости: концентрация последних значительно превосходила контрольные показатели (соответственно $17,99 \pm 3,41 \text{ мкмМ/мл}$ и $1,66 \pm 0,11 \text{ мкмМ/мл}$, $p<0,05$). Экскреция исследуемых метаболитов с мочой у больных РА также была повышена.

Влияние метотрексата на цитокиновый профиль носило разнонаправленный характер. Концентрация ИЛ-1 и ФНО в сыворотке крови увеличилась, в то время как в синовиальной жидкости произошло значительное уменьшение содержания этих цитокинов (табл. 2). Интересно, что сывороточный уровень ФНО возрастал только за счет группы "эрозивного" РА.

Лечение метотрексатом сопровождалось повышением уровня метаболитов NO в периферическом кровотоке, в то время как в синовиальной жидкости произошло значительное снижение этих показателей (табл. 3). Ранний артрит характеризовался более выраженной регрессией количества нитратов на локальном уровне.

Лечение лефлуномидом сопровождалось значительным снижением показателей активности воспаления. Складывается впечатление, что лефлуномид обеспечивает свое противовоспалительное действие через уменьшение продукции ИЛ-1 и

Таблица 1

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У БОЛЬНЫХ РА (M±m)

Показатели, (пг/мл) в	Контроль n=20	Больные РА n=94	Ранний РА n=22	Поздний РА n=41
ИЛ-1 сыв.	1,65±0,03	0,86±0,17	0,25 ± 0,30*	0,96 ± 0,20*◊
ИЛ-6 сыв.	2,47±0,03	60,22±3,40 *	7,32 ± 4,33	104,55 ±41,20*◊
ИЛ-10 сыв.	0,21±0,02	0,50±0,23	0,25 ± 0,23	0,45 ± 0,39
ФНО сыв.	2,17±0,07	3,69±1,18	3,97 ± 1,93	3,06 ± 1,46
ИЛ-1 син.жид.	1,95±0,91	10,06±2,28*	13,87 ± 2,60*	0,60 ± 0,40 *◊
ИЛ-6 син.жид.	3,48±1,12	1431,77±110,96*	1505,00±182,04*	1745,00±35,53*
ИЛ-10 син.жид.	1,11±1,02	7,26±1,18*	4,30 ± 2,60	10,82 ± 5,17*◊
ФНО- син.жид.	4,12±2,03	150,59±15,61*	101,00 ± 80,00*	158,21 ± 8,05*

Примечания: n – число больных в каждой группе;

*- достоверность различия с контрольной группой p<0,05

◊- достоверность различия между группами p<0,05

Таблица 2

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У БОЛЬНЫХ РА НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ
МЕТОТРЕКСАТОМ И ЛЕФЛУНОМИДОМ (M±m)

Показатель (пг/мл)	Контроль n = 20	Метотрексат n = 63	Лефлуномид n = 63
ИЛ-1-сыв.	1,65 ± 0,03	0,69 ± 0,16* 1,77 ± 0,73	1,40 ± 0,14 1,03 ± 0,13
ИЛ-6-сыв.	2,47 ± 0,03	80,59 ± 35,17 53,96 ± 27,17	56,60 ± 12,54* 31,11 ± 3,66*
ИЛ-10-сыв.	0,21 ± 0,02	0,25 ± 0,17 0,31 ± 0,24	4,81 ± 0,13* 1,10 ± 0,02*◊
ФНО-сыв.	2,17 ± 0,07	3,40 ± 1,47 31,94 ± 8,37*◊	5,34 ± 1,12 6,42 ± 1,54
ИЛ-1-син.жид.	1,95 ± 0,91	11,12 ± 3,36 0,65 ± 0,12 ◊	12,55 ± 2,87* 4,77 ± 1,38 ◊
ИЛ-6-син.жид.	3,48 ± 1,12	1446,76±124,84* 1820,34 ±23,65*	1670,54 ± 89,44* 1856,49 ± 76,88*
ИЛ-10-син.жид.	1,11 ± 1,02	7,68 ± 1,43 43,80 ± 2,62*◊	14,87 ± 1,55* 64,33 ± 1,81*◊
ФНО-син.жид.	4,12 ± 2,03	164,51 ± 18,45* 25,50 ± 3,76*◊	170,45 ± 12,77* 22,87 ± 2,02*◊

Примечания: n – число больных в каждой группе;

*- достоверность различия с контрольной группой p<0,05;

◊- достоверность различия между группами p<0,05

верхняя строка – до лечения, нижняя – после лечения

ФНО и увеличение синтеза ИЛ-10 в синовиальной среде сустава (табл. 2). Уровень ИЛ-6 в сыворотке крови стал ниже, чего не было отмечено на фоне лечения метотрексатом. Кроме того, значительно уменьшилась и продукция ИЛ-10 (табл. 2). Концентрация метаболитов NO при лечении лефлуномидом уменьшалась как в сыворотке крови, так и в полости сустава (табл. 3).

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у больных РА существенное различие в уровнях цитокинов и метаболитов NO в сравнении со здоровыми донорами имеет место лишь в синовиальной жидкости (за исключением ИЛ-6). Обнаруже-

но, что механизмы действия метотрексата и лефлуномида имеют свои особенности и различаются точками приложения и эффектами на системном и локальном уровнях.

Хотя повышение уровня ФНО в системном кровотоке не отразилось на противовоспалительной эффективности метотрексата, увеличение концентрации ИЛ-1 и ФНОα в сыворотке крови может являться биологической основой развития вторичной резистентности к метотрексату. Повышение концентрации ИЛ-10 в полости сустава на фоне лечения метотрексатом, по-видимому, связано с урегулированием дисбаланса между Th1 и Th2 цитокинами [9].

Особый интерес представляет динамика уровня метаболитов NO в сыворотке крови под влиянием

Таблица 3

МЕТАБОЛИТЫ NO НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ
МЕТОТРЕКСАТОМ И ЛЕФЛУНОМИДОМ (M±m)

Показатель, (мкМ/мл)	Контроль, n=20	Метотрексат, n=63	Лефлуномид, n=31
NO ₂ -сыв.	1,30 ± 0,11	2,44 ± 0,68 3,33 ± 0,59	1,38 ± 0,31 0,25 ± 0,13* ∅
NO ₃ -сыв.	1,17 ± 0,08	1,13 ± 0,28 2,01 ± 0,58	0,61 ± 0,27 0,42 ± 0,11*
NO-сыв.	2,47 ± 0,10	3,49 ± 0,54 5,35 ± 0,95	2,03 ± 0,18 0,67 ± 0,12* ∅
NO ₂ -моча	1,12 ± 0,31	9,31 ± 1,66* 14,21 ± 1,07*	10,06 ± 2,79* 9,54 ± 1,32*
NO ₃ -моча	0,58 ± 0,09	15,55 ± 3,75* 20,34 ± 2,23*	12,35 ± 8,15* 10,54 ± 3,54*
NO-моча	1,71 ± 0,12	24,86 ± 4,01* 34,45 ± 1,75*	22,42 ± 6,18* 20,08 ± 2,76*
NO ₂ -син.жид.	1,08 ± 0,07	7,94 ± 1,46* 2,56 ± 0,54 ∅	6,34 ± 1,22* 2,32 ± 1,43 ∅
NO ₃ -син.жид.	0,58 ± 0,04	12,22 ± 6,21* 0,23 ± 0,02	14,32 ± 3,34* 5,77 ± 1,22*
NO-син.жид.	1,66 ± 0,11	20,16 ± 4,47* 2,79 ± 1,23 ∅	20,66 ± 4,87* 8,09 ± 1,55*

Примечание: n – число больных в каждой группе;
* – достоверность различия с контрольной группой p<0,05;
∅ – достоверность различия между группами p<0,05;
верхняя строка – до лечения, нижняя – после лечения

метотрексата. Известно, что этот препарат реализует противовоспалительный эффект посредством аденозина, который при взаимодействии со своими рецепторами становится мощным эндогенным противовоспалительным медиатором [8]. В ходе ряда клинических исследований было установлено, что аденозин индуцирует выработку NO эндотелиальными клетками [7, 16]. В своих выводах авторы указывают, что эндотелиальная пуриnergическая рецепторная стимуляция может прямо индуцировать продукцию NO в артериях, что оказывает кардиопротективный эффект. В этой связи снижение смертности от сердечно-сосудистых катастроф у больных РА, которое ассоциируется с лечением метотрексатом [3, 11], может быть связано не только (и не столько) с его противовоспалительной активностью, но и со способностью повышать количество NO в периферическом кровотоке, несмотря на гипергомоцистеинемию.

Интересно, что действие лефлуномида характеризуется уменьшением уровня ИЛ-6 в системном кровотоке, чего не было отмечено на фоне лечения

метотрексатом. Этот факт характеризует, вероятно, иной по "качеству" эффект лефлуномида на цитокиновый профиль в отличие от метотрексата, особенно если учитывать роль ИЛ-6 в хронизации воспаления.

Выявление подобных особенностей механизмов действия различных препаратов позволяет обосновать рациональные комбинации при проведении БПВП терапии больных РА.

Выводы

1. Лечение больных РА метотрексатом сопровождается повышением уровня ИЛ-1, ФНОα в сыворотке крови и снижением этих показателей в синовиальной жидкости.

2. В ответ на лечение метотрексатом уровень метаболитов NO у больных РА в сыворотке крови повышается, в синовиальной жидкости снижается.

3. Лефлуномид ингибирует образование NO в системном кровотоке и синовиальной жидкости, что сопровождается уменьшением концентрации ИЛ-6 в синовиальной жидкости у больных РА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агеев В.А., Алекберова З.С., Габитов А.Г. и др. Современная модель патогенеза ревматоидного артрита и ее место в клинической практике. Тер. архив, 2004, 12, 83-87.
2. Насонов Е.Л. Применение инфликсимаба (моноклональные антитела к фактору некроза опухоли-α) в ревматологии: новые факты и идеи. Рус. мед. журн., 2004, 12, 20, 64-73.

3. Насонов, Е.Л. Клинические рекомендации. Ревматология. М., ГОЭТАР-Медиа, 2005, 228.
4. Чичасова, Н.В. Стратегия базисной терапии ревматоидного артрита. Матер. заседания московской школы ревматологов. 2003, 1, 2-6.
5. Aita T., Harada S., Kawashima M. et al. Differential in vitro effects of IL-4, IL-10, and IL-13 on proinflammatory cytokine production and fibroblast

proliferation in rheumatoid synovium. *Rheum. Intern.*, 2001, 20, 2, 49-54.

6. Beri A., Gupta A., Singh S. et al. Comparison of serum nitric oxide levels in active juvenile rheumatoid arthritis with those of patients in remission. *Rheum. Intern.*, 2004, 24, 5, 264-266.

7. Bottcher M., Buus N., Hermansen F. et al. Influence of nitric oxide synthase and adrenergic inhibition on adenosine-induced myocardial hyperemia. *Circulation*, 2001, 104, 2305-2310.

8. Chan E.S.L., Cronstein B.N. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthr. Res.*, 2002, 4, 10-18.

9. Constantin A., Loubet-Lescoulie P., Lambert N. Antiinflammatory and immunoregulatory action of methotrexate in treatment of rheumatoid arthritis: evidence of increased interleukin-4 and interleukin-10 gene expression demonstrated in vitro by competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Arthr. Rheum.*, 1998, 41, 48-57.

10. Hirai Y., Migita K. Effects of NO on metalloproteinase 2 production by rheumatoid synovial cells. *Life Sci.*, 2001, 68, 913-912.

11. Gong K., Zhang Z., Sun X. The nonspecific anti-inflammatory therapy with methotrexate for patients with chronic heart failure. *Am. Heart J.*, 2006, 151, 62-68.

12. Larsen A., Dale K., Eek M. Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by

reference films. *Acta Radiol. Diagn.*, 1977, 18, 481-491.

13. Nell V.P. Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2004, 43, 7, 906-914.

14. Nishimoto, N., Kishimoto T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2004, 4, 386-391.

15. Rose-John, S. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane bound and soluble receptors. *Acta Biochim. Pol.*, 2003, 50, 3, 603-611.

16. Steinert J. R., Wheeler-Jones C.P.D., Wyatt A. W. et al. Early activation of the p42/p44 pathway mediates adenosine-induced nitric oxide production in human endothelial cells: a novel calcium-insensitive mechanism. *Faseb J.*, 2002, 16, 1584-1594.

17. Van't Hof M.A., Kuper H.H., Prevoo M.L.L. et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint count: development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.*, 1995, 38, 44-48.

18. Van't Hof, R. J., Hosking L. Nitric oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joints. *Rheumatology (Oxford)*, 2000, 39, 1004-1008.

19. Vencovsky J., Machacek S. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2003, 62, 5, 427-430.

Поступила 12.05.06

Abstract

E.E. Medved, A.I. Dubikov, L.A. Belogoloviyh

Methotrexate and leflunomide effects on cytokine profile and nitric oxide metabolism in patients with rheumatoid arthritis

Objective. To determine significance of some cytokines and nitric oxide (NO) in realization of leflunomide and methotrexate pharmacological effects in pts with rheumatoid arthritis (RA).

Material and methods. 94 pts with active seropositive RA (87 female and 7 male aged 20 to 60 years) were included. Disease duration varied from 6 months to 10 years. 63 pts received methotrexate 20 mg once a week im, 31 were treated with leflunomide according to standard scheme. Quantitative evaluation of IL 1 β , 6, 10 and tumor necrosis factor α (TNF α) was performed with solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay in serum and synovial fluid. Spectrophotometric analysis of NO₂ and NO₃ in serum, synovial fluid and urine was performed at baseline and after 6 months of therapy. Efficacy of disease modifying antirheumatic drugs was assessed at the same time.

Results. Increased level of cytokines excluding IL 6 as well as NO metabolites was found in synovial fluid and urine of pts with RA. Treatment with methotrexate was accompanied by increase of IL1, TNF α and NO metabolites in peripheral blood. Leflunomide decreased IL 6 level in serum. Methotrexate and leflunomide suppress RA activity and significantly decreased IL 1, TNF α and NO metabolites level in synovial fluid.

Key words: *rheumatoid arthritis, nitric oxide, cytokines, methotrexate, leflunomide*