

Е.Н. Александрова, Е.Л. Насонов

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт ревматологии РАМН

## ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Контакты: Елена Николаевна Александрова [irramnlab@rambler.ru](mailto:irramnlab@rambler.ru)

Contact: Elena Nikolayevna Aleksandrova [irramnlab@rambler.ru](mailto:irramnlab@rambler.ru)

По современным представлениям, ревматические заболевания (РЗ) относятся к континууму иммуновоспалительных болезней человека, в патогенезе которых ключевую роль играют аутоиммунитет и аутовоспаление, связанные с генетически детерминированными и индуцированными факторами внешней среды (инфекции, курение и др.) дефектами активации приобретенного и врожденного иммунного ответа [1]. Наиболее яркими примерами иммуновоспалительных РЗ являются ревматоидный артрит (РА), системная красная волчанка (СКВ), системная склеродермия (ССД), синдром Шегрена (СШ), системные васкулиты, дерматомиозит (ДМ), полимиозит (ПМ), а также ювенильные артриты, спондилоартриты и псориатический артрит. Прогноз системных РЗ, характеризующихся тяжелым течением и высокой летальностью, во многом зависит от ранней диагностики, которая позволяет проводить активную противовоспалительную терапию в дебюте болезней.

В настоящее время лабораторная диагностика РЗ включает определение широкого спектра биомаркеров (аутоантител, белков острой фазы воспаления, цитокинов, маркеров повреждения эндотелия, компонентов системы комплемента, иммуноглобулинов, криоглобулинов, субпопуляций лимфоцитов, показателей костного метаболизма, маркеров апоптоза, генетических маркеров и др.) на клеточном и гуморальном уровнях (табл. 1). Лабораторные тесты, применяемые в ревматологии, позволяют получить объективную информацию о характере иммунопатологических нарушений при РЗ и являются важным инструментом диагностики, оценки активности болезни, тяжести течения, прогноза и эффективности проводимой фармакотерапии [2–8].

Современные стандарты лабораторной диагностики РЗ основаны на критериях доказательной медицины, обеспечивающих оптимальное использование иммунологических лабораторных тестов. Клиническая информативность лабораторных исследований определяется путем расчета операционных характеристик теста (диагностической чувствительности и специфичности — ДЧ и ДС, предсказательной ценности положительных и отрицательных результатов, отношения правдоподобия положительных и отрицательных результатов — ОППР и ОПОР), а также с помощью ROC-анализа [3, 8]. Согласно международным рекомендациям, наиболее полезными для диагностики РЗ служат лабораторные тесты с ОППР >5 и ОПОР <0,2; полезными — с ОППР 2–5, ОПОР 0,2–0,5; не имеющими пользы — с ОППР <2 и ОПОР >0,5 [9].

Центральное место в лабораторной диагностике РЗ занимают серологические тесты, связанные с обнаружением циркулирующих аутоантител [4, 10, 11]. Основными диагностическими лабораторными маркерами РЗ являются антинуклеарные антитела (АНА), ревматоидные факторы (РФ), антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП), антифосфолипидные антитела (АФЛА)

и антинейтрофильные цитоплазматические антитела (АНЦА). Положительные результаты определения этих аутоантител входят в число диагностических критериев ряда системных РЗ и могут использоваться при оценке активности и прогноза этих заболеваний. Кроме того, обнаружение аутоантител представляется важным для ранней диагностики и характеристики клинико-лабораторных субтипов РЗ [2–4, 8, 11–17]. По данным проспективных исследований, аутоантитела также могут служить предикторами развития аутоиммунных РЗ [18].

Особое внимание в последние годы уделяется изучению клинико-диагностического значения РФ и антител к цитруллинированным белкам/пептидам. Результаты определения АЦЦП и IgM РФ в сыворотках 18 658 пациентов ревматологических клиник Института Jan Van Breemen (Амстердам, Нидерланды) свидетельствуют о том, что АЦЦП (ДС 96%) являются более специфичным и стабильным серологическим маркером РА по сравнению с IgM РФ (ДС 80%), не подвергаются сероконверсии в течение заболевания и не зависят от возраста, тогда как частота обнаружения IgM РФ у здоровых лиц с возрастом увеличивается [19]. Повышение концентрации IgM РФ коррелирует с острофазовыми показателями (СОЭ, С-реактивным белком — СРБ) и отражает активность воспаления в большей степени, чем АЦЦП. Синтез антител к цитруллинированным белкам/пептидам ассоциируется с генетическими маркерами РА («shared epitope», SE, — сходной аминокислотной последовательностью аллелей HLA DRB1\*0401 и DRB1\*0404, полиморфизмом гена белка тирозинфосфатазы N22 — RTPN22), предшествует появлению IgM РФ на доклинической стадии болезни и связан с развитием выраженного иммунного ответа к доминантным эпитопам [20]. Имеются данные о достаточно высокой чувствительности (ДЧ 69,5–82%), специфичности (ДС 89,8–98,7%) и диагностической эффективности определения антител к модифицированному цитруллинированному виментину (АМЦВ) при РА [21]. Недавно показано, что обнаружение АМЦВ ассоциируется с развитием тяжелого деструктивного поражения суставов [20].

Характерной чертой аутоиммунных РЗ является одновременное присутствие в сыворотке больного нескольких типов аутоантител с различной специфичностью, так называемого профиля аутоантител [22]. В связи с этим разработаны стандартные профили аутоантител для диагностики системных РЗ, оценка которых значительно увеличивает диагностическую и прогностическую ценность определения аутоантител при данных заболеваниях (табл. 2) [3, 8, 11].

Наряду с идентификацией аутоантител одним из ведущих аспектов лабораторной диагностики РЗ является исследование уровня маркеров воспаления в крови (СОЭ, СРБ, сывороточного амилоидного белка, ферритина, прокальцитонина, апополипротеина AI, кальпротектина и др.) [3, 7, 8, 23–26]. Анализ маркеров воспаления позволяет

Таблица 1

*Лабораторные биомаркеры ревматических заболеваний*

Аутоантитела	АНА, РФ, АЦЦП, АНЦА, АФЛА
Маркеры воспаления	СОЭ, СРБ, SAA, фибриноген, ферритин, прокальцитонин, АроА 1, кальпротектин и др.
Цитокины, хемокины, факторы роста	ФНО α, рФНО РI, ИЛ 1α, ИЛ 1ра, ИЛ 2, рИЛ 2Р, ИЛ 6, 8, 10, 13, 15, 17, 18, ИФН α, рCD 40L, MCP 1, MIP, VEGF, SCGF, CTGF, BAFF, APRIL, эндостатин, RANTES и др.
Маркеры активации эндотелия	рР-селектин, рЕ-селектин, sVCAM 1, sICAM 1, антиген фактора Виллебранда, NO, тромбомодулин, антиэндотелиальные клеточные антитела, эндотелиальные прогениторные клетки — ЭПК (CD 34+/ KDR+/ CD 133+) и др.
Иммуноглобулины, криоглобулины, иммунные комплексы	
Компоненты комплемента	С 1q, С 3, С 4, С 1-ингибитор, С 5b-9, С 3b, С 4d
Субпопуляции лимфоцитов	CD 4+, CD 8+, HLA DR+, CD 4+ CD 25+, CD 4+ CD 25 <sup>high</sup> Foxp 3, CD 4+ CD 28 <sup>null</sup> Т-клетки, CD 19+ В-клетки, CD 27+, CD 20+ В-клетки памяти, CD 38+ плазматические клетки, НК-клетки и др.
Генетические маркеры	HLA В 27; DR 4 и др.
Маркеры костного метаболизма	PINP, CTXI (CrossLaps), остеокальцин, ВАР, OPG, sRANKL, CTXII (CARTILAPS), COMP
Маркеры апоптоза	sFas, MMP 1, 3, 9, TIMP 1, 2 и др.

Таблица 2

*Стандартные профили аутоантител для диагностики системных РЗ*

Заболевание	Профиль
СКВ	Антиядерный фактор — АНФ, аДНК, аSm, аRo/SS-A, аLa/SS-B, антитела к рибонуклеопротеину — аРНП, антитела к кардиолипину — аКЛ, аС1q
РА	IgM/IgA РФ, антитела к цитруллинированным белкам — АЦЦП, АМЦВ, антикератиновые антитела, антиперинуклеарный фактор, антифилагриновые антитела, антитела к Ра 33, ВiР (Р-68)
Антифосфолипидный синдром	IgG/IgM аКЛ, IgG/IgM антитела к β <sub>2</sub> -гликопротеину I (аβ <sub>2</sub> -ГПИ), волчаночный антикоагулянт (ВА)
ССД	аScl-70, антицентромерные антитела, антиядерные антитела (аTh/То, аРНК-полимераза III, аPM-Scl, аU1 РНП, антитела к фибрилларину — аU3 РНП)
ПМ/ДМ	Антитела к аминоксилсинтетазам тРНК — Jo-1, PL-7, PL-12, EJ, OJ, KS; антитела к SRP, Mi-2, PM-Scl, KJ
Системные васкулиты	Цитоплазматические АНЦА — цАНЦА, перинуклеарные АНЦА — пАНЦА, антитела к протеиназе 3 и миелопероксидазе
Аутоиммунные гепатиты	АНФ, антитела к гладкой мускулатуре, микросомам печени и почек типа — LKM 1, цитоплазматическому антигену печени LC 1, растворимому антигену печени/поджелудочной железы SLA/LP, митохондриям — AMA-M 2
Воспалительные заболевания кишечника (болезнь Крона, неспецифический язвенный колит)	IgG/IgA Anti-Saccharomyces Cerevisiae — ASCA, атипичные пАНЦА

оценить активность болезни, характер прогрессирования и прогноз исходов хронического воспалительного процесса, а также эффективность проводимой терапии.

Важным фактором иммунопатогенеза РЗ является дисбаланс цитокиновой сети. В настоящее время выделяют три группы цитокин-зависимых иммуновоспалительных РЗ: с преимущественной гиперпродукцией фактора некроза опухоли α (ФНО α), интерлейкина (ИЛ) 1 или 6, — развитие которых тесно связано с нарушениями Т-клеточной иммунорегуляции [7]. Согласно данной концепции, определение концентрации ФНО α, ИЛ 1 и 6 в крови целесообразно использовать как для ранней диагностики и оценки прогноза

иммуновоспалительных РЗ, так и для оптимального назначения биологических препаратов, ингибирующих функциональную активность доминантных цитокинов.

Ключевым звеном в нарушении периферической толерантности к собственным аутоантигенам и индукции хронического аутоиммунного воспаления при СКВ и РА служит снижение количества и супрессорной активности CD 4+ CD 25<sup>high</sup> Foxp 3 Т-регуляторных клеток в периферической крови, ассоциирующееся с высокой активностью болезни [27]. В последние годы разрабатываются новые подходы к адаптивной иммунотерапии РЗ путем инфузии аутологичных CD 4+ CD 25<sup>high</sup> Foxp 3 Т-регуляторных клеток.

Важную роль в развитии аутоиммунных заболеваний играют аутореактивные В-клетки. Показано, что В-лимфоциты синтезируют аутоантитела (аДНК, РФ, АЦЦП и др.), участвуют в презентации антигена Т-клеткам, являются продуцентами провоспалительных цитокинов [28]. Все это вместе взятое послужило теоретической базой для применения моноклональных антител к В-клеткам (ритуксимаба) при РА, СКВ, СШ и других аутоиммунных РЗ.

Значительный прогресс в оценке диагностического и прогностического значения аутоантител и других биологических маркеров РЗ был достигнут благодаря внедрению в клиническую практику стандартных иммунологических методов исследования (реакций агглютинации, фиксации компонента и иммунопреципитации, двойной иммунодиффузии по Оухтерлони, контриммуноэлектрофореза, радиоиммуноанализа — РИА, нефелометрии, непрямого реакции иммунофлюоресценции — НРИФ, иммуноферментного анализа — ИФА, иммуноблоттинга) [22, 29]. На рубеже XX—XXI вв. бурное развитие лигандных методов иммуноанализа с использованием ферментных, флюоресцентных и люминесцентных меток, применение новых высокоочищенных аутоантигенов и моноклональных антител, полученных на основе генно-инженерных технологий, появление высокотехнологичных автоматизированных анализаторов с блоком термостатирования и проточной кюветой, внедрение информационных систем позволили значительно повысить диагностическую точность и чувствительность иммунологических лабораторных тестов, а также расширить спектр определяемых биомаркеров РЗ [30, 31]. В частности, использование в качестве аутоантигенов циклических цитруллинированных пептидов привело к созданию высокочувствительных и высокоспецифичных тест-систем 2-й и 3-й генераций для иммуноферментного определения АЦЦП [31]. Предложены новые технологии для выявления аутоантител при РА: иммунохемилюминесцентный метод определения АЦЦП в сыворотке крови на анализаторе «Cobas e411» («Roche», Швейцария), а также полуколичественные иммунохроматографические экспресс-методы обнаружения IgM РФ, АМЦВ («Rheumachec» фирмы «Orgentec», Германия) и АЦЦП («CCPointTest» фирмы «Euro-Diagnostica AB», Швеция) в цельной крови с помощью тест-полосок на мембранной основе. Разработан метод ИФА повышенной чувствительности для диагностики АНЦА-ассоциированных васкулитов, в основе которого лежит выявление АНЦА к смеси нативной и рекомбинантной протеиназы 3 человека, нанесенной на поверхность лунок микроплат [32].

Традиционные методы иммунодиагностики позволяют в одном образце биологического материала большого одновременно определять с помощью одного теста только один лабораторный маркер, тогда как для РЗ характерно наличие множества циркулирующих аутоантител, цитокинов, острофазовых белков, показателей активации эндотелия, генетических и метаболических маркеров [29]. К ограничениям данных технологий относят также низкую межлабораторную сопоставимость полученных результатов, длительность выполнения, трудоемкость и высокую стоимость анализов [29, 31]. Успехи геномики и протеомики последнего десятилетия, базирующиеся на применении высокопроизводительных многопараметрических методов исследования и миниатюризированных диагностических платформ, в том числе ПЦР, ДНК- и белковых микрочипов, способствовали созданию мультиплексных биоаналитических технологий для диагностики РЗ [33, 34].

Мультиплексный анализ — принципиально новый уровень лабораторных исследований в ревматологии, позволяющий проводить одновременное тестирование множества аутоантител и других аналитов в одном образце небольшого объема, измеряемого в микролитрах, что значительно сокращает время получения результатов [22, 31, 35]. Преимуществами мультиплексных методов на основе использования протеомных, транскриптомных и геномных технологий являются идентификация индивидуальных профилей биомаркеров, персонализированный подход к комплексной диагностике и антиген-специфическому лечению РЗ, снижение стоимости лабораторных исследований [33, 36—38]. При мультиплексном исследовании сотни и тысячи молекул ДНК или белков помещаются на плоскую твердую подложку (планарные микрочипы) либо на поверхность специально приготовленных микросфер или наночастиц (суспензионные микрочипы) [22, 31—34]. Наряду с ДНК- и белковыми микрочипами разработаны тканевые и клеточные микрочипы, а также микрожидкостные биосенсорные аналитические устройства [29]. Планарные микрочипы — мультиплексные аналитические системы на основе упорядоченного размещения и иммобилизации ДНК и белков (аутоантигенов) на плоской твердой подложке в виде микропятен на слайд-пластинках, в лунках полистиреновых микроплат, на нитроцеллюлозной мембране либо в виде линейного иммуноблота с детекцией сигнала методами колориметрии, иммунофлюоресценции, хемилюминесценции и масс-спектрометрии. Среди суспензионных мультиплексных методик наибольшее распространение получила технология xMAP с использованием проточной цитометрии, микросфер из полистирола, маркированных красными и инфракрасными флюорофорами, и лазерной детекции. Микросферы, имеющие диаметр 5,6 мкм, обладают уникальными спектральными характеристиками, что позволяет измерять до 100 аналитов в одном образце. Каждая микросфера снаружи связана с флюоресцентными репортерами — реагентами, взаимодействующими со специфическими аналитами. Разработана мультиплексная система Ultra Plex на основе наночастиц, несущих штрих-код, которая предназначена для исследования одновременно тысячи аналитов в одном образце [29, 39].

В ревматологии наиболее перспективными методами мультиплексного анализа являются протеомные технологии [7, 31, 34, 35]. Так, в настоящее время разработаны тест-системы для скрининга диагностических аутоантител с использованием планарных микрочипов и суспензионных мультиплексных технологий xMAP [31—34, 40—53]. Также созданы коммерческие наборы, базирующиеся на технологии xMAP, которые позволяют одновременно исследовать широкий спектр других биомаркеров (острофазовых белков, цитокинов, хемокинов, факторов роста, растворимых клеточных молекул адгезии — rKMA, металлопротеиназа, маркеров апоптоза и др.), играющих важную роль в оценке иммунопатогенетических особенностей, прогноза и эффективности терапии РЗ.

К. Raza и соавт. [54] провели измерение 23 цитокинов методом xMAP в синовиальной жидкости у 36 больных с ранним артритом длительностью менее 6 мес, 9 больных с РА длительностью более 6 мес, 12 больных подагрическим артритом и 4 больных остеоартрозом. Авторами показано селективное транзитное увеличение концентрации ИЛ 2, 4, 13, 17, 15, bFGF и EGF у 8 больных ранним РА в течение первых 3 мес после появления клинических симпто-

мов заболевания и повышение уровня интерферона  $\gamma$  (ИФН  $\gamma$ ) у 14 больных с недифференцированным, псориазическим и другими вариантами неревматоидного персистирующего артрита на ранней стадии болезни. W. Hueber и соавт. [55], проанализировавшие методом xMAP панель из 22 цитокинов в сыворотках 56 больных ранним РА, 21 больного псориазическим артритом/спондилоартритом и 19 здоровых лиц, выявили при раннем РА достоверное увеличение концентрации провоспалительных цитокинов ИЛ 1 $\alpha$ , ФНО  $\alpha$ , ИЛ 12p40, ИЛ 13 и хемокинов IP 10/CXCL 10, MCP 1/CCL 2, эотаксина/CCL 11, а при псориазическом артрите и спондилоартрите — только ИЛ 8/CXCL8. Результаты тестирования 25 цитокинов у 82 больных ранним РА с помощью технологии xMAP позволили S.W. Syversen и соавт. [56] сделать вывод о том, что увеличение концентрации эотаксина/CCL 11 в сыворотке крови ассоциируется с менее выраженной рентгенологической прогрессией суставной деструкции. W. de Jager и соавт. [57] при мультиплексном суспензионном иммуноанализе 38 цитокинов выявили повышение уровня ФНО  $\alpha$ , MIF, CCL 2, 3, 11, 22, CXCL 9 в плазме крови больных ювенильным идиопатическим артритом ( $n=65$ ) по сравнению с донорами ( $n=20$ ). При этом в синовиальной жидкости ( $n=34$ ) увеличение концентрации ИЛ 6 и 15, CCL 2 и 3, CXCL 8 и 10 было более выраженным, чем в плазме.

Протеомные микрочипы активно применяются в исследованиях, связанных с поиском новых биомаркерных молекул аутоиммунных РЗ [34, 36, 38]. Впервые антигенный микрочип, содержащий 18 белков и нуклеиновых кислот, был протестирован Т.О. Joos и соавт. на сыворотках 25 больных аутоиммунными заболеваниями и 10 здоровых доноров [58]. Чувствительность и специфичность данного микрочипа для определения аутоантител совпадали с таковыми у ИФА. W.H. Robinson и соавт. [37], использовавшие при изучении аутоантител в сыворотках у 50 больных РА и СКВ протеомный микрочип на основе 196 различных антигенов, установили, что его чувствительность и специфичность в 2—3 раза выше, чем у ИФА. W. Hueber и соавт. [59] разработали синовиальные антигенные микрочипы из 225 пептидов и протеинов для идентификации различных профилей аутоантител при РА. Протеомный анализ аутоантител в сыворотках крови 76 больных РА и 38 здоровых доноров продемонстрировал наличие двух клинико-лабораторных субтипов РА. Первый из них характеризуется аутореактивным В-клеточным ответом к цитруллинированным эпитопам, ассоциирующимся с серопозитивностью по РФ, высокой концентрацией СРБ, носительством SE, выраженным снижением функциональной активности и тяжелым прогрессирующим течением заболевания, второй — аутореактивностью в отношении нативных эпитопов (пептид gr39, коллаген II типа), являющейся предиктором более благоприятного прогноза. Теми же авторами обнаружена тесная взаимосвязь между продукцией АЦЦП и высокой концентрацией провоспалительных цитокинов ФНО  $\alpha$ , ИЛ 1 $\alpha$ , 6, 13, 15 и GM-CSF в сыворотке крови при раннем РА [55]. I. Rioja и соавт. [60] в результате протеомного исследования 163 белков плазмы крови у 44 больных РА, наряду с известными ранее ИЛ 6, онкостатином M и ИЛ 2, выявили 5 новых биомаркеров активности болезни, включая макрофагальный колониестимулирующий фактор — M-CSF, член суперсемейства рецепторов ФНО 9, трансформирующий фактор роста — TFR  $\alpha$ , хемокины CCL 23 и CXCL 13, уровень которых положительно коррелировал с

концентрацией СРБ, СОЭ, титрами РФ, числом припухших суставов и DAS. I. Auger и соавт. [61] при тестировании сывороток 19 больных РА генотипа HLA-DRB1 и HLA-DR7 с использованием планарных биочипов «Invitrogen ProtoArray», экспрессирующих 8268 белков человека, идентифицировали два новых аутоантигена, специфичных для РА: BRAF и PAD 4.

Революционным достижением фармакотерапии РЗ конца XX в. является разработка принципиально новой группы лекарственных средств, получивших название генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП). К ним относят в первую очередь моноклональные антитела против определенных детерминант иммунокомпетентных клеток (анти-В-клеточные препараты — ритуксимаб; блокаторы костимуляции Т-клеток — абатацепт) или провоспалительных цитокинов (ингибиторы ФНО  $\alpha$ , рецептора ИЛ 6 — ИЛ 6Р, — ИЛ 1). Достоинством ГИБП является их селективное воздействие на определенные звенья иммунопатогенеза РЗ. Все это вместе взятое обуславливает необходимость дальнейшего совершенствования иммунологических методов мониторинга и поиска предикторов ответа на терапию ГИБП [62, 63].

В многочисленных исследованиях показано, что ингибиторы ФНО  $\alpha$ , ритуксимаб и тоцилизумаб индуцируют выраженное снижение уровня маркеров острой фазы воспаления (СОЭ, СРБ, САА) при РА [64—70]. По данным G.J. Wolbink и соавт. [71], высокий базальный уровень СРБ у больных РА ассоциируется с пониженным ответом на инфликсимаб через 14 нед после назначения препарата. Наряду с этим обнаружено значительное уменьшение концентрации IgM РФ на фоне применения ГИБП, достигающее 30—60%. В отличие от IgM РФ сывороточный уровень АЦЦП под действием ГИБП, как правило, не изменяется либо незначительно понижается [72, 73]. Недавно получены данные о том, что серопозитивность по IgM РФ/АЦЦП и высокие уровни этих аутоантител в крови до начала лечения служат предиктором хорошего ответа на терапию ритуксимабом и отсутствия эффективного ответа на терапию ингибиторами ФНО  $\alpha$  [62]. Наличие IgA РФ в сыворотках больных РА также ассоциируется со снижением эффективности применения блокаторов ФНО  $\alpha$  [74].

При СКВ назначение ритуксимаба приводит к уменьшению концентрации АДНК преимущественно IgG и IgA классов, продуцируемых В-клеточным аутореактивным клоном VH4.34 [75—77], а также антител к C1q [73]. Достоверного снижения уровня антител к Ro/SS-A, La/SS-B, РНП, гистонам и Sm-антигену в сыворотках больных СКВ и ССД на фоне терапии ритуксимабом не выявлено [75, 78]. Имеются сообщения об увеличении концентрации АДНК, антител к нуклеосомам, C1q и экстрагируемым ядерным антигенам (ENA), в ряде случаев предшествующем обострению СКВ при лечении ритуксимабом [73, 75, 79, 80]. По данным K.P. Ng и соавт. [79], низкий базальный уровень С3 в сыворотках больных СКВ также ассоциируется с быстрым развитием обострения заболевания после курса лечения ритуксимабом.

T. Jonsdotir и соавт. [76] показали, что исходное количество CD 19+ лимфоцитов в периферической крови было больше у тех больных СКВ, индекс активности SLEDAI у которых не становился <3 через 6 мес после начала терапии ритуксимабом. С другой стороны, S. Lindholm и соавт. [80] обнаружили у больных волчаночным нефритом с положительным ответом на ритуксимаб более

высокий базальный уровень В-клеток. Исходное количество CD 20+ В-клеток в периферической крови больных РА, как правило, не влияет на результаты терапии ритуксимабом [62]. В то же время, по данным иммуногистохимического исследования биоптатов синовиальной ткани у 25 больных РА, незначительная синовиальная инфильтрация CD 20+ и CD 79a+ В-клетками до назначения ритуксимаба являлась предиктором хорошего ответа на анти-В-клеточную терапию [81]. Анализ В-клеток периферической крови 60 больных РА методом высокочувствительной проточной цитометрии выявил более эффективный ответ на ритуксимаб при полной деплеции В-клеток после первого введения препарата [82]. Важным индикатором полной В-клеточной деплеции и эффективности лечения ритуксимабом у больных СКВ и РА считается позднее восстановление количества CD 27+ и CD 20+ клеток памяти в периферической крови (не ранее чем через 2 года после окончания терапии данным препаратом) [83].

Деплеция В-клеток в периферической крови больных СКВ и РА, индуцированная ритуксимабом, сопровождается увеличением в 2,5—3 раза сывороточной концентрации фактора активации В-клеток (В-cell-activating factor — BAFF) через 3—4 мес после назначения препарата и ее возвращением к исходному уровню при репопуляции В-клеток к 8—12-му месяцу терапии ритуксимабом. Длительное сохранение повышенного уровня BAFF свидетельствует об увеличении активности патологического процесса и возможном развитии обострения заболевания [73].

Важным инструментом для оценки эффективности терапии ГИБП является мультиплексный анализ биомаркеров Р. I. Sekigawa и соавт. [84] впервые изучили влияние инфликсимаба на белково-пептидный профиль сыворотки/плазмы крови у 10 больных РА с использованием метода масс-спектрометрии. По данным авторов, через 24 ч после введения инфликсимаба в сыворотке/плазме крови начинают идентифицироваться белки, участвующие в зависимых от ФНО  $\alpha$  механизмах активации NF- $\kappa$ B (FAM62A/MBC 2) и регенерации суставного хряща (CTGF). Сходные результаты при масс-спектрометрическом анализе белков в сыворотках 10 больных РА через 12 нед после начала терапии инфликсимабом были получены R. C. Dwivedi и соавт. [85], которые обнаружили у 3 пациентов с хорошим ответом на препарат 20% изменение концентрации 39 сывороточных белков, регулируемых ФНО  $\alpha$  или NF- $\kappa$ B. S. Fabre и соавт. [86], используя технологию протеомных биочипов при изучении панели из 12 цитокинов (ИЛ 6, ФНО  $\alpha$ , ИЛ 1a, 1b, 2, 8, ИФН  $\gamma$ , ИЛ 4, 10, моноцитарного хемотаксического белка — MCP 1, эпидермального фактора роста — EGF, васкулоэндотелиального фактора роста — VEGF) у 46 больных РА на фоне терапии ритуксимабом, показали, что на 90-й день после введения препарата концентрация MCP 1 и EGF в сыворотках отвечающих на терапию ( $n=29$ ) значительно превышает таковую у больных с отсутствием ответа ( $n=17$ ). Анализ кинетики цитокинового профиля при лечении ритуксимабом с 0-го по 90-й день выявил достоверное снижение сывороточных уровней СРБ и ИЛ 6 в группе больных РА, отвечающих на проводимую терапию, а ИЛ 8 и EGF — в группе не отвечающих на нее. Однако авторам не удалось идентифицировать базальный (до начала лечения) цитокиновый профиль, который мог бы служить предиктором эффективного ответа на терапию ритуксимабом. По данным тех же исследователей, среди 33 больных РА, получавших этанерцепт, положи-

тельный ответ на препарат ассоциировался с увеличением сывороточной концентрации MCP 1 и EGF с 0-го по 90-й день лечения и повышением базальных уровней СРБ и EGF [87]. M. Blom и соавт. [88] с помощью мультиплексной суспензионной технологии обнаружили в сыворотках 16 больных РА уменьшение концентрации ИЛ 4, 15, GM-CSF, ИФН  $\gamma$ , ФНО  $\alpha$ , ИЛ 1 $\beta$ , 17, 12, 13 и 7 в первые 6 мес лечения ритуксимабом, а изменение уровней ИЛ 6 и 10 и моноцитарного воспалительного белка MIP 1 $\beta$  — уже через 6 ч после назначения данного препарата. Авторы рассматривают снижение концентрации ИЛ 6 через 6 ч и кратковременное повышение уровня MIP 1 через 2 ч после первой инфузии препарата в качестве возможных предикторов хорошего ответа на терапию ритуксимабом. При многоступенчатом протеомном исследовании сывороточных белков с помощью синовиальных антигенных микрочипов, мультиплексной суспензионной технологии xMAP и ИФА был идентифицирован профиль из 24 аутоантител и цитокинов, позволяющий прогнозировать ответ на терапию этанерцептом у больных РА [89].

В последние годы мультиплексные технологии активно используются в транскриптомных исследованиях для изучения экспрессии профилей генов в синовиальной ткани и периферической крови у больных РА в зависимости от проводимой терапии ГИБП. A. Parker и соавт. [90] при анализе РНК в периферической крови больных РА ( $n=30$ ) с помощью «Affymetrix arrays» и обратно-транскрипционной ПЦР выявили через 6 нед после назначения ингибиторов ФНО  $\alpha$  снижение экспрессии 11 из 16 генов, регулируемых ядерным фактором NF- $\kappa$ B, активация которого является ключевым медиатором сигнальной трансдукции для ФНО  $\alpha$ . В пилотном исследовании J. Lindberg и соавт. [91] показано, что хороший ответ на лечение инфликсимабом 10 больных РА связан с особенностями экспрессии 279 генов в биоптатах синовиальной ткани еще до назначения препарата, особенно с повышением исходного уровня мРНК матриксной металлопротеиназы 3 (ММР 3). По данным авторов, иммуногистохимическое обнаружение ФНО  $\alpha$  в синовиальной ткани больных РА сопровождалось хорошим ответом на препарат и изменениями в экспрессии 685 генов по сравнению с больными с отсутствием эффекта от проводимого лечения, а среди ответивших на терапию различия в экспрессии регистрировались по 115 генам. Однако наибольший положительный эффект терапии инфликсимабом и соответствующие ему отличия в экспрессии 1058 генов, кодирующих регуляцию иммунного ответа, межклеточные взаимодействия, сигнальную трансдукцию и хемотаксис, установлены у больных РА с наличием ФНО  $\alpha$  в синовиальной ткани до начала терапии данным препаратом. Сходные результаты получены С.А. Wijbrandts и соавт. [92], которые показали, что базальная экспрессия ФНО  $\alpha$  в синовиальной ткани 103 больных РА, оцениваемая иммуногистохимическим методом, является достоверным предиктором хорошего клинического ответа на инфликсимаб (снижение DAS 28  $\geq 1,2$ ) через 4 мес после первого введения препарата. T. C. van der Pijl, K. van der Pijl и соавт. [93] установлено, что положительный ответ на инфликсимаб, регистрируемый через 16 нед после начала лечения у 12 из 18 больных РА, ассоциируется с исходно более высокой, чем у больных с отсутствием ответа, экспрессией в синовиальной ткани транскриптов генов, связанных с воспалением. По данным I. Gutierrez-Roelens [94], на 12-й неделе лечения ритук-

ксимабом в биоптатах синовиальной ткани 8 больных РА из 54 675 транскриптов наблюдалось снижение экспрессии 206 генов, вовлеченных в процессы клеточной адгезии и хемотаксиса, и увеличение экспрессии 330 генов, ответственных за дифференцировку фибробластов.

На основе генотипического анализа выявлены полиморфизмы генов G→A ФНО α в позиции 308, ФНОР (1b676T>G), ИЛ 1b, 10, 158 V/F Fcγ RIIIA, ассоциирующиеся с хорошим ответом на терапию ингибиторами ФНО α, однако в целом эти данные остаются довольно противоречивыми [63].

Одним из факторов резистентности к ГИБП (инфликсимабу, адалимумабу, ритуксимабу и др.) является их потенциальная иммуногенность. Вследствие этого значительный интерес представляют тест-системы, позволяющие измерять концентрацию антител человека к химерным (НАСА) и человеческим (НАНА) моноклональным антителам, а также уровни самих ГИБП в сыворотке крови с помощью РИА и ИФА [95].

Важное место в лабораторной диагностике РЗ занимают исследования, связанные с определением иммунологических маркеров инфекционных осложнений, развивающихся на фоне лечения ГИБП. В частности, наряду с кожным туберкулиновым тестом для выявления латентной туберкулезной инфекции и активного туберку-

леза у больных РЗ при планировании и в ходе лечения блокаторами ФНО α применяются новые, более чувствительные и специфичные лабораторные тесты — QuantiFeron (QFT)-ТВ Gold и QuantiFeron (QFT)-ТВ Gold In Tube («Celestis», Австралия), а также Т-SPOT.ТВ («Oxford Immunotec», Великобритания), основанные на измерении *ex vivo* продукции ИФН γ, высвобождаемого Т-лимфоцитами в ответ на стимуляцию специфичными антигенами *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6, CFP-10 и TB7.7 (IFNγ release assays — IGRAs) [96].

Таким образом, в последние годы в ревматологии наряду с традиционными («классическими») методами лабораторной диагностики все шире применяются мультиплексные аналитические технологии, что позволяет радикально улучшить раннюю диагностику (возможно, на доклинической стадии), прогнозирование исходов патологического процесса, эффективность и безопасность фармакотерапии при РЗ, а также существенно снизить затраты на обследование пациентов. Перспективы иммунодиагностики РЗ связаны с необходимостью стандартизации недавно разработанных лабораторных тестов на международном уровне, а также с поиском новых высокочувствительных и специфичных молекулярных маркеров иммунного ответа и воспаления на основе протеомных, транскриптомных и геномных исследований [7, 22, 29, 97, 98].

ЛИТЕРАТУРА

- McGonagle D., McDermott M.F. A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS Med* 2006;3:1242—8.
- Насонов Е.Л. Современные направления иммунологических исследований при хронических воспалительных и аутоиммунных заболеваниях человека. *Тер архив* 2001;8:43—6.
- Насонов Е.Л., Александрова Е.Н. Современные стандарты лабораторной диагностики ревматических заболеваний: Клинические рекомендации. М.: ЗАО БюХимМак, 2006;71 с.
- Wiik A.S., Gordon T.P., Kavanaugh A.F. et al. IUIS/WHO/AF/CDC Committee for the Standardization of Autoantibodies in Rheumatic and Related Diseases. Cutting edge diagnostics in rheumatology: the role of patients, clinicians, and laboratory scientists in optimizing the use of autoimmune serology. *Arthr Rheum* 2004;51:291—8.
- Illei G.G., Tackey E., Lapteva L., Lipsky P.E. Biomarkers in systemic lupus erythematosus. I. General overview of biomarkers and their applicability. *Arthr Rheum* 2004;50:1709—20.
- Illei G.G., Tackey E., Lapteva L., Lipsky P.E. Biomarkers in systemic lupus erythematosus. II Markers of disease activity. *Arthr Rheum* 2004;50:2048—65.
- Dayer E., Dayer J.M., Roux-Lombard P. Primer: the practical use of biological markers of rheumatic and systemic inflammatory diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007;3:12—20.
- Александрова Е.Н.. Лабораторная диагностика. В кн.: Ревматология: национальное руководство. Под ред. Е.Л. Насонова, В.А. Насоновой. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008;35—62.
- Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: an introduction. American college of rheumatology ad hoc committee on immunologic testing guidelines. *Arthr Rheum* 2002;7:429—33.
- Shoenfeld Y., Gershwin M.E., Meroni P.L. Autoantibodies. 2nd ed. Oxford: Elsevier B.V., 2007.
- Conrad K., Schrobler W., Hiepe F., Fritzler M.J. Autoantibodies in systemic autoimmune diseases. A diagnostic reference. In: Conrad K., Sack U. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity. Vol. 2. 2nd ed. Lengerich, Berlin, Bremen, Miami, Riga, Viernheim, Wien, Zagreb: Past Science Publishers, 2007.
- Solomon D.H., Kavanaugh A.J., Schur P.H. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthr Rheum* 2002;47:434—44.
- Kavanaugh A.F., Solomon D.H. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests. *Arthr Rheum* 2002;47:546—55.
- Reveille J.D., Solomon D.H. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee of Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody tests. *Arthr Rheum* 2003;49:399—412.
- Nishimura K., Sugiyama D., Kogata Y. et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 2007;146:797—808.
- Miyakis S., Lockshin M.D., Atsumi T. et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4:295—306.
- Bartunkova J., Tesar V., Sediva A. Diagnostic and pathogenetic role of antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Clin Immunol* 2003;106:73—82.
- Bizzaro N., Tozzoli R., Shoenfeld Y. Are we at a stage to predict autoimmune rheumatic diseases? *Arthr Rheum* 2007;56:1736—44.
- Ursum J., Bos W.H., van de Stadt R.J. et al. Different properties of ACPA and IgM-RF derived from a large dataset: further evidence of two distinct autoantibody systems. *Arthr Res Ther* 2009;11:R7.
- Valesini G., Alessandri C. Anticitrullinate antibodies and rheumatoid factors: two distinct autoantibody systems. *Arthr Res Ther* 2009;11:125.
- Vossenaar E.R., Despres N., Lapointe E. et al. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthr Res Ther* 2004;6:R142—50.
- Meroni P.L., De Angelis V., Tedesco F. Future Trends. In: Shoenfeld Y., Gershwin M.E., Meroni P.L. Autoantibodies. 2nd ed. Oxford: Elsevier B.V., 2007;823—5.
- Costenbader K.H., Chibnik L.B., Schur P.H. Discordance between erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein measurements: clinical significance. *Clin Exp Rheum* 2007;25:746—9.

24. Yildirim K., Karatay S., Melikoglu M.A. et al. Associations between acute phase reactant levels and disease activity score (DAS28) in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Clin Lab Sci* 2004;34:423–6.
25. Combe B., Dougados M., Goupille P. et al. Prognostic factors for radiographic damage in early rheumatoid arthritis: a multiparameter prospective study. *Arthr Rheum* 2001;44:1736–43.
26. Chen Y.S., Yan W., Geczy C.L. et al. Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and of S100 proteins are associated with inflammatory, autoantibody, and classical risk markers of joint and vascular damage in rheumatoid arthritis. *Arthr Res Ther* 2009;11:R39.
27. Lyssuk E.Y., Torgashina A.V., Soloviev S.K. et al. Reduced number and function of CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol* 2007;601:113–9.
28. Dörner T. Crossroads of B cell activation in autoimmunity: rationale of targeting B cells. *J Rheumatol* 2006;77:3–11.
29. Fritzler M.J. Advances and applications of multiplexed diagnostic technologies in autoimmune diseases. *Lupus* 2006;15:422–7.
30. Kantor A.B. Biomarker discovery by comprehensive phenotyping for autoimmune diseases. *Clin Immunol* 2004;111:186–95.
31. Tozzoli R., Bizzaro N. Novel diagnostic methods for autoantibody detection. In: Shoenfeld Y., Gershwin M.E., Meroni P.L. *Autoantibodies*. 2nd ed. Oxford: Elsevier B.V., 2007;77–82.
32. Damoiseaux J., Dähmrich C., Rosemann A. et al. A novel enzyme-linked immunosorbent assay using a mixture of human native and recombinant proteinase-3 significantly improves the diagnostic potential for anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:228–33.
33. Binder S.R. Autoantibody detection using multiplex technologies. *Lupus* 2006;15:412–21.
34. Prestigiacomo T., Binder S.R. Detection of autoantibodies using protein arrays. In: Shoenfeld Y., Gershwin M.E., Meroni P.L. *Autoantibodies*. 2nd ed. Oxford: Elsevier B.V., 2007;799–807.
35. Kingsmore S.F. Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:310–20.
36. Hueber W., Utz P.J., Steinman L., Robinson W.H. Autoantibody profiling for the study and treatment of autoimmune disease. *Arthr Res* 2002;4:290–5.
37. Robinson W.H., DiGennaro C., Hueber W. et al. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med* 2002;8:295–301.
38. Sharp V., Utz P. Technology Insight: can autoantibody profiling improve clinical practice? *Nat Clin Pract Rheum* 2007;3:96–103.
39. Freeman R.G., Raju P.A., Norton S.M. et al. Use of nanobarcodes particles in bioassays. *Methods Mol Biol* 2005;303:73–83.
40. Meheus L., van Venrooij W.J., Wiik A. et al. Multicenter validation of recombinant, natural and synthetic antigens used in a single multiparameter assay for the detection of specific anti-nuclear autoantibodies in connective tissue disorders. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:205–14.
41. Pottel H., Wiik A., Loch H. et al. Clinical optimization and multicenter validation of antigen-specific cut-off values on the INNO-LIA ANA update for the detection of autoantibodies in connective tissue disorders. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:579–88.
42. Eissfeller P., Sticherling M., Scholz D. et al. Comparison of different test systems for simultaneous autoantibody detection in connective tissue diseases. *Ann NY Acad Sci* 2005;1050:327–39.
43. Damoiseaux J., Boesten K., Giesen J. et al. Evaluation of a novel line-blot immunoassay for the detection of antibodies to extractable nuclear antigens. *Ann NY Acad Sci* 2005;1050:340–7.
44. Martins T.B., Burlingame R., von Mühlen C.A. et al. Evaluation of multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for detection of autoantibodies to nuclear antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:1054–9.
45. Gilburd B., Abu-Shakra M., Shoenfeld Y. et al. Autoantibodies profile in the sera of patients with Sjogren's syndrome: the ANA evaluation a homogeneous, multiplexed system. *Clin Dev Immunol* 2004;11:53–6.
46. Shovman O., Gilburd B., Barzilai O. et al. Evaluation of the BioPlex 2200 ANA screen: analysis of 510 healthy subjects: incidence of natural/predictive autoantibodies. *Ann NY Acad Sci* 2005;1050:380–8.
47. Zandman-Goddard G., Gilburd B., Shovman O. et al. The homogeneous multiplexed system—a new method for autoantibody profile in systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol* 2005;12:107–11.
48. Rouquette A.M., Desgruelles C., Laroche P. Evaluation of the new multiplexed immunoassay, FIDIS, for simultaneous quantitative determination of antinuclear antibodies and comparison with conventional methods. *Am J Clin Pathol* 2003;120:676–81.
49. Buliard A., Fortenfant F., Ghillani-Dalbin P. et al. [Analysis of nine autoantibodies associated with systemic autoimmune diseases using the Luminex technology. Results of a multicenter study]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2005;63:51–8.
50. Gonzalez C., Garcia-Berrocal B., Talavan T. et al. Clinical evaluation of a microsphere bead-based flow cytometry assay for the simultaneous determination of anti-thyroid peroxidase and anti-thyroglobulin antibodies. *Clin Biochem* 2005;38:966–72.
51. Shovman O., Gilburd B., Barzilai O. et al. Evaluation of the BioPlex 2200 ANA screen: analysis of 510 healthy subjects: incidence of natural/predictive autoantibodies. *Ann NY Acad Sci* 2005;1050:380–8.
52. Binder S.R., Genovese M.C., Merrill J.T. et al. Computer-assisted pattern recognition of autoantibody results. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:1353–7.
53. Smith J., Onley D., Garey C. et al. Determination of ANA specificity using the UltraPlex platform. *Ann NY Acad Sci* 2005;1050:286–94.
54. Raza K., Falciani F., Curnow S.J. et al. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthr Res Ther* 2005;7:R784–95.
55. Hueber W., Tomooka B.H., Zhao X. et al. Proteomic analysis of secreted proteins in early rheumatoid arthritis: anti-citrulline autoreactivity is associated with up regulation of proinflammatory cytokines. *Ann Rheum Dis* 2007;66:712–9.
56. Syversen S.W., Goll G.L., Haavardsholm E.A. et al. A high serum level of eotaxin (CCL11) is associated with less radiographic progression in early rheumatoid arthritis patients. *Arthr Res Ther* 2008;10:R28.
57. Jager W., Hoppireijs E.P.A.H., Wulffraat N.M. et al. Blood and synovial fluid cytokines signatures in patients with juvenile idiopathic arthritis a cross-sectional study. *Ann Rheum Dis* 2007;66:589–98.
58. Joos T.O., Schrenk M., Höpfl P. et al. A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis* 2000;21:2641–50.
59. Hueber W., Kidd B.A., Tomooka B.H. et al. Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 2005;52:2645–55.
60. Rioja I., Hughes F.J., Sharp C.H. et al. Potential novel biomarkers of disease activity in rheumatoid arthritis patients: CXCL13, CCL23, transforming growth factor alpha, tumor necrosis factor receptor superfamily member 9, and macrophage colony-stimulating factor. *Arthr Rheum* 2008;58:2257–67.
61. Auger I., Balandraud N., Rak J. et al. New autoantigens in rheumatoid arthritis (RA): screening 8268 protein arrays with sera from patients with RA. *Ann Rheum Dis* 2009;68:591–4.
62. Gibbons L.J., Hyrich K.L. Biologic therapy for rheumatoid arthritis. Clinical efficacy and predictors of response. *Blodrugs* 2009;23:111–24.
63. Bansard C., Lequerre T., Daveau M. et al. Can rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and biologics be predicted? *Rheumatology (Oxford)* 2009, doi:10.1093/rheumatology/kep112.
64. Atzeni F., Puttini P., Dell'Acqua D. et al. Adalimumab clinical efficacy is associated with rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody titer reduction: a one-year prospective study. *Arthr Res Ther* 2006;8:R3.
65. Bobbio-Pallavicini F., Alpini C., Caporali R. et al. Autoantibody profile in rheumatoid arthritis during long-term inflix-

- imab treatment. *Arthr Res Ther* 2004;6:R264–72.
66. Klareskog L., Moreland L.W., Cohen S.B. et al. Safety and efficacy of over 10 years of continuous etanercept therapy in patients with rheumatoid arthritis in North America and Europe. *Ann Rheum Dis* 2008;67(Suppl. II):175.
67. Blank N., Max R., Briem S. et al. Combination therapy with rituximab and etanercept for patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67(Suppl. II):188.
68. Jones G., Gu J.R., Lowenstein M. et al. Tocilizumab monotherapy is superior to methotrexate monotherapy in reducing disease activity in patients with rheumatoid arthritis: the ambition study. *Ann Rheum Dis* 2008;67(Suppl. II):89.
69. Levi M., Frey N., Grange S. et al. Reduction in inflammatory biomarkers with increasing exposure to the IL-6 inhibitor, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis: graphical analysis of pooled data. *Ann Rheum Dis* 2008;67(Suppl. II):192.
70. Beaulieu A., McKay J., Pavelka K. et al. Treatment with the humanized anti-interleukin-6 receptor antibody tocilizumab results in rapid improvements in the signs and symptoms of rheumatoid arthritis: results from a pooled analysis of clinical trial data from option and toward. *Ann Rheum Dis* 2008;67(Suppl. II):195.
71. Wolbink G.L., Voskuyl A.E., Lems W.F. et al. Relationship between serum trough infliximab levels, pretreatment C reactive protein levels, and clinical response to infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:704–7.
72. Bruns A., Nicaise-Roland P., Hayem G. et al. Prospective cohort study of effects of infliximab on rheumatoid factor, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and antinuclear antibodies in patients with long-standing rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2009;76:248–53.
73. Cornec D., Avouac J., Youinou P., Saraux A. Critical analysis of rituximab-induced serological changes in connective tissue diseases. *Autoimmun Rev* 2009;8:515–9.
74. Bobbio-Pallavicini F., Caporali R., Alpini C. et al. High IgA rheumatoid factor levels are associated with poor clinical response to tumor necrosis factor alpha inhibitors in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:302–7.
75. Cambridge G., Stohl W., Leandro M.J. et al. Circulating levels of B lymphocyte stimulator in patients with rheumatoid arthritis following rituximab treatment: relationships with B cell depletion, circulating antibodies, and clinical relapse. *Arthr Rheum* 2006;54:723–32.
76. Jonsdottir T., Gunnarsson I., Risselada A. et al. Treatment of refractory SLE with rituximab plus cyclophosphamide: clinical effects, serological changes, and predictors of response. *Ann Rheum Dis* 2008;67:330–4.
77. Leandro M.J., Cambridge G., Edwards J.C. et al. B-cell depletion in the treatment of patients with systemic lupus erythematosus: a longitudinal analysis of 24 patients. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:1542–5.
78. Vallerskog T., Gunnarsson I., Widhe M. et al. Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with SLE. *Clin Immunol* 2007;122:62–74.
79. Ng K.P., Cambridge G., Leandro M.J. et al. B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: long-term follow-up and predictors of response. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1259–62.
80. Lindholm C., Bø rjesson-Asp K., Zendjanchi K. et al. Longterm clinical and immunological effects of anti-CD20 treatment in patients with refractory systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2008;35:826–33.
81. Teng Y.K., Levarht E.W., Hashemi M. et al. Immunohistochemical analysis as a mean to predict responsiveness to rituximab treatment. *Arthr Rheum* 2007;56:3909–18.
82. Dass S., Rawstron A.C., Vital E.M. et al. Highly sensitive B cell analysis predicts response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 2008;58:2993–9.
83. Anolik J.H., Barnard J., Owen T. et al. Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. *Arthr Rheum* 2007;56:3044–56.
84. Sekigawa I., Yanagida M., Iwabuchi K. et al. Protein biomarker analysis by mass spectrometry in patients with rheumatoid arthritis receiving anti-tumor necrosis factor-alpha antibody therapy. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:261–7.
85. Dwivedi R.C., Dhindsa N., Krokhn O.V. et al. The effects of infliximab therapy on the serum proteome of rheumatoid arthritis patients. *Arthr Res Ther* 2009;11:R32.
86. Fabre S., Guisset C., Tatem L. et al. Protein biochip array technology to monitor rituximab in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2009;155:395–402.
87. Fabre S., Dupuy A.M., Dossat N. et al. Protein biochip array technology for cytokine profiling predicts etanercept responsiveness in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2008;153:188–95.
88. Blom M., Wenink M.H., Huijbens R.J.F. et al. Altered circulating cytokine pattern after administration of rituximab is correlated with response to therapy in rheumatoid arthritis. Abstract Book ACR 2008. Rituximab abstracts, abstr.764: 26.
89. Hueber W., Tomooka B.H., Batliwalla F. et al. Blood autoantibody and cytokine profiles predict response to anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis. *Arthr Res Ther* 2009;11:R76.
90. Parker A., Izmailova E.S., Narang J. et al. Peripheral blood expression of nuclear factor-kappaB-regulated genes is associated with rheumatoid arthritis disease activity and responds differentially to anti-tumor necrosis factor-alpha versus methotrexate. *J Rheumatol* 2007;34:1817–22.
91. Lindberg J., af Klint E., Catrina A.I. et al. Effect of infliximab on mRNA expression profiles in synovial tissue of rheumatoid arthritis patients. *Arthr Res Ther* 2006;8:R179.
92. Wijbrandts C.A., Dijkgraaf M.G., Kraan M.C. The clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis is in part dependent on pretreatment tumor necrosis factor alpha expression in the synovium. *Ann Rheum Dis* 2008;8:1139–44.
93. Van der Pouw Kraan T.C., Wijbrandts C.A., van Baarsen L.G. et al. Responsiveness to anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  therapy is related to pre-treatment tissue inflammation levels in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis* 2008;67:563–6.
94. Gutierrez-Roelens I., Durez P., Toukap A.N. Effects of rituximab on global gene expression profiles in synovial biopsies obtained from rheumatoid arthritis patients. Abstract Book ACR 2008. Rituximab abstracts, abstr. 1191:38.
95. Bartelds G.M., Wijbrandts C.A., Nurmohamed M.T. et al. Clinical response to adalimumab: relationship to anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:921–6.
96. Menzies D., Pai M., Comstock G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Intern Med* 2007;146:340–54.
97. Kavanaugh A., Firestein G.S., Boyle D. Biomarkers in rheumatology: promise and pitfalls. *Future Rheumatol* 2008;3:303–5.
98. Bossuyt X., Louche C., Wiik A. Standardisation in clinical laboratory medicine: an ethical reflection. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1061–3.

Поступила 27.11.09