

А.А. Новиков, Е.Н. Александрова, Т.В. Попкова, О.Г. Линева, А.С. Авдеева, Д.С. Новикова,
Г.Х. Кузикянц, Г.В. Лукина, Я.А. Сигидин, А.В. Караулов, С.Н. Быковская, Е.Л. Насонов

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт ревматологии РАМН, Москва

РОЛЬ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА ЦИТОКИНОВ В ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РИТУКСИМАБА ПРИ ЛЕЧЕНИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Работа выполнена при поддержке грантом РФФИ № 09-04-01604

Контакты: Александр Александрович Новиков aleksandrovaen@iramn.ru

Ритуксимаб (РТМ) наряду со своим основным действием — удалением В-лимфоцитов — вызывает деплецию популяции CD20+ Т-клеток, способных продуцировать целый ряд иммунорегуляторных и провоспалительных цитокинов, хемокинов.

Целью данного исследования стало определение роли мультиплексного анализа цитокинов в оценке эффективности применения РТМ при ревматоидном артрите (РА).

Материал и методы. Обследовано 34 больных с достоверным по классификационным критериям ACR (1987) диагнозом РА. Концентрацию цитокинов определяли с использованием технологии «xMAP» (27-plex).

Результаты и обсуждение. В группе с наличием клинического ответа на терапию данным генно-инженерным биологическим препаратом (ГИБП) на 8-й неделе снизилась концентрация: интерлейкинов (ИЛ) 1 β , 1 α , 2, 4, 6, 9, 13, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), γ -интерферона (ИФН γ), моноцитарного хемоаттрактантного белка (МХБ 1); на 24-й неделе — ИЛ 1 β , 1 α , 2, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 15, фактора роста фибробластов (ФРФ 2), ГМ-КСФ, ИФН γ , фактора некроза опухоли α (ФНО α), на 40-й — ИЛ 9. В группе с отсутствием клинического ответа на 8-й неделе снижалась концентрация ГМ-КСФ, на 40-й — ИЛ 2 и макрофагального белка воспаления 1 β (МБВ 1 β), также на 8-й неделе отмечено повышение уровня ИЛ 8. В качестве возможных ранних предикторов ответа (на 40-й неделе) можно выделить повышение уровней ИЛ 17 и МБВ 1 β на 8-й неделе после инфузии препарата. При сравнении базальных уровней цитокинов в группах с различным клиническим ответом на 8-й и 40-й неделях у ответивших на терапию обнаружено более чем трехкратное повышение концентраций ИЛ 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 17, ИФН γ , васкулоэндотелиального фактора роста и ИЛ 8 соответственно.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, ритуксимаб, цитокины, мультиплексный анализ

ROLE OF MULTIPLEX CYTOKINE ANALYSIS IN THE EVALUATION OF THE EFFICACY OF RITUXIMAB DURING TREATMENT FOR RHEUMATOID ARTHRITIS

A.A. Novikov, E.N. Aleksandrova, T.V. Popkova, O.G. Lineva, A.S. Avdeyeva, D.S. Novikova,
G.Kh. Kuzikyants, G.V. Lukina, Ya.A. Sigidin, A.V. Karaulov, S.N. Bykovskaya, E.L. Nasonov

Research Institute of Rheumatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Contact: Aleksandr Aleksandrovich Novikov aleksandrovaen@iramn.ru

Along with its basic activity in removing B-lymphocytes, rituximab (RTM) causes depletion of a population of CD20+ T cells that can produce a variety of immunoregulatory and proinflammatory cytokines and chemokines.

Objective: to define a role of multiplex cytokine analysis in the evaluation of the efficiency of using RMT in rheumatoid arthritis (RA).

Subjects and methods. Thirty-four patients with the valid diagnosis of RA according to the ACR criteria of 1987 were examined. The concentrations of cytokines were measured using the xMAP technology (27-plex).

Results and discussion. In the group of patients with a clinical response to therapy with the gene engineering biological agent, there was a decrease in the concentrations of interleukins (IL) 1 β , 1 α , 2, 4, 6, 9, and 13, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), γ -interferon (IFN- γ), monocyte chemoattractant 1 at week 8 of therapy; that in IL 1 β , 1 α , 2, 5, 6, 9, 10, 12, 13, and 15, fibroblast growth factor 2 (FGF-2), GM-CSF, IFN- γ , and tumor necrosis factor- α at week 24, and that in IL-9 at week 40. The no-clinical response group showed a reduction in GM-CSF at week 8 and in IL-2 and macrophage inflammatory protein 1 β (MIP-1 β) at week 40, and an increase in IL-8 at week 8. At week 8 after drug infusion, the elevated levels of IL-17 and MIP-1 β can be identified as possible early predictors of a response (at week 40). Comparison of the baseline cytokine levels in the groups with different clinical response demonstrated a more than three-fold increase in the concentrations of IL 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 17, IFN- γ , and vascular endothelial growth factor, and IL-8 at weeks 8 and 40, respectively.

Key words: rheumatoid arthritis, rituximab, cytokines, multiplex analysis

Введение

Прогресс в изучении роли «провоспалительных» цитокинов в патогенезе ревматоидного артрита (РА) позволил внедрить в клиническую практику новый класс лекарственных средств, получивших общее название — генно-инженерные биологические препараты (ГИБП), одним из представителей которых является ритуксимаб

(РТМ) [1]. Действие РТМ заключается в удалении В-лимфоцитов за счет комбинации нескольких механизмов: комплемент-зависимой и антитело-зависимой клеточной цитотоксичности, а также индукции апоптоза [2]. Показано, что совместно с синтезом аутоантител В-лимфоциты участвуют в презентации антигена Т-клеткам и являются продуцентами провоспалительных цито-

кинов [3, 4]. Наряду со своим основным действием – удалением В-лимфоцитов – РТМ вызывает деплецию популяции CD20+ Т-клеток, способных продуцировать целый ряд иммунорегуляторных: трансформирующий фактор роста β , γ -интерферон (ИФН γ), интерлейкины (ИЛ) 2 и 4 – и провоспалительных цитокинов: ИЛ 1 β , 10, фактор некроза опухоли α (ФНО α), ИЛ 17, – хемокинов: моноцитарного хемоаттрактного белка (МХБ 1), ИЛ 8 [5]. Кроме того, после терапии РТМ отмечено резкое снижение способности синтезировать цитокины клетками, отвечающими за Th1-, Th2- и Th17-типы иммунного ответа [6].

Появление в клинической практике ГИБП обуславливает необходимость дальнейшего совершенствования иммунологических методов мониторинга и поиска предикторов эффективного ответа на проводимую биологическую терапию [7]. Данные, касающиеся использования иммунологических маркеров для прогнозирования эффективности лечения ГИБП при РА, остаются противоречивыми. В последние годы при поиске предиктивных биомаркеров ответа на терапию ГИБП наряду с рутинными

клинико-лабораторными методами все шире применяются мультиплексные аналитические технологии [8]. Мультиплексный анализ – принципиально новый уровень лабораторных исследований, позволяющий проводить одновременное тестирование множества аналитов в одном образце [9]. Среди мультиплексных методик наибольшее распространение получила суспензионная технология

Таблица 2

Концентрация цитокинов в сыворотке больных РА и здоровых доноров

Цитокин	РА (n=34), Ме (ИР: 25–75)	Здоровые доноры (n=30), Ме (ИР: 25–95)
ИЛ 1 β	0,19 (0,01–6,91)*,**	4,07 (2,61–7,57)
ИЛ 1 α	1456,20 (210,5–12017,17)*,**	150,64 (111,19–1082,79)
ИЛ 2	101,23 (20,65–415,7)*,**	10,77 (5,53–37,46)
ИЛ 4	17,70 (3,5–45,98)*,**	3,31 (0,21–8,86)
ИЛ 5	0,81 (0,01–4,11)**	2,92 (0,2–9,48)
ИЛ 6	217,34 (82,37–553,41)*,**	7,78 (4,5–33,47)
ИЛ 7	32,50 (5,32–118,72)*,**	8,15 (0,5–76,48)
ИЛ 8	22,70 (7,35–50,82)*	12,47 (4,76–28,15)
ИЛ 9	384,92 (131,48–1110,89)*,**	34,17 (26,3–186,21)
ИЛ 10	81,30 (36,87–243,6)*,**	13,22 (5,83–411,34)
ИЛ 12	15,97 (3,18–107,28)*,**	5,78 (2,24–27,59)
ИЛ 13	93,52 (19,86–249,39)*,**	16,69 (9,9–63,34)
ИЛ 15	25,73 (9,8–108,5)*,**	6,7 (3,92–40,82)
ИЛ 17	47,82 (12,6–155,44)**	22,87 (5,23–385,67)
Эотаксин	790,94 (349,48–1265,46)	102,41 (19,39–1247,91)
ФРФ 2	41,18 (9,91–71,56)*,**	27,25 (19,32–70,13)
G-ГКФ	0,01 (0,01–3,27)*,**	10,86 (2,37–31,50)
ГМ-КСФ	417,71 (101,97–20038,91)*	39,93 (21,6–182,15)
ИФН γ	4461,59 (749,26–7847,71)*,**	285,35 (112,2–2342,56)
ИБ 10	7013,12 (3494,97–13 748,41)*,**	717,8 (188,68–17 831,02)
МХБ 1	149,52 (46,61–514,44)*,**	48,59 (22,26–248,53)
МБВ 1 α	37,07 (23,27–88,11)*	10,82 (8,84–37,22)
МБВ 1 β	408,00 (201,17–844,24)*,**	66,05 (49,36–153,31)
ТФР-ВВ	42 491,11 (40 514,10–60 538,8)*,**	26 024,51 (5854,75–93 646,95)
ФНО α	78,25 (0,01–658,26)	38,9 (17,2–97,96)
ВЭФР	510,54 (299,94–2421,50)*,**	205,56 (63,85–2887,44)

Примечание. Концентрация цитокинов представлена в пг/мл.
* – $p < 0,05$ относительно контрольной группы; ** – изменение значения Ме $\geq 30\%$ относительно 95-го перцентиля в контрольной группе.

Таблица 1

Клинико-лабораторная характеристика больных РА

Показатель	Значение
Пол, м/ж	3/31
Возраст, годы	49 (42–64)*
Длительность заболевания, мес	66 (36–132)*
Стадия РА, n (%):	
I	1 (2,9)
II	15 (44)
III	10 (29,4)
IV	8 (23,5)
Функциональный класс, n (%):	
I	1 (2,9)
II	28 (82,4)
III	4 (11,8)
IV	0
DAS 28	6,23 (5,52–6,81)*
Системные проявления, n (%):	24 (70,6)
HAQ	1,88 (1,5–2,37)*
Предшествующая терапия БПВП, n (%):	
метотрексат	19 (55,9)
лефлуномид	8 (23,5)
сульфасалазин и др.	3 (8,8)
комбинация двух БПВП	1 (2,9)
отсутствие терапии БПВП 5 (14,7)	
на момент включения в исследование	
Прием ГК, n (%)	25 (73,5)
Прием НПВП, n (%)	28 (82,4)
СОЭ, мм/ч	56,5 (37–62)
СРБ, мг/мл	20,5 (13,8–46,2)

Примечание. * – значения представлены в виде Ме (ИР). ГК – глюкокортикоиды; НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты; СРБ – С-реактивный белок.

«хМАР», основанная на использовании принципов прочной цитометрии, с применением микросфер из полистирола, маркированных красными и инфракрасными флуорофорами.

Целью данного исследования стало определение роли мультиплексного анализа цитокинов в оценке эффективности применения РТМ при РА.

Материал и методы

Обследовано 34 пациента с достоверным по классификационным критериям ACR (1987) диагнозом РА, наблюдавшихся в НИИР РАМН в период с 2007 по 2010 г., контрольную группу составили 30 здоровых до-

норов, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными. Большинство больных были женского пола, среднего возраста, с длительным течением заболевания, серопозитивные по IgM ревматоидного фактора (IgM РФ) и антителам к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП), имели высокую активность воспалительного процесса, II, III или IV рентгенологическую стадию, II или III функциональный класс, умеренное нарушение жизнедеятельности, до начала терапии РТМ получали различные базисные противовоспалительные препараты (БПВП) и глюкокортикоиды (ГК), часть пациентов (41%) получали терапию другими ГИБП без достаточного терапевтического эффекта.

Таблица 3

Динамика уровня цитокинов в сыворотке пациентов с РА после введения РТМ (n=34)

Цитокин	0-я	8-я	Неделя	24-я	40-я
ИЛ 1β	0,19 (0,01–6,91)	0,03 (0,01–1,38)		0,01 (0,01–0,94)	0,11 (0,01–2,81)
ИЛ 1α	1456,20 (210,5–12 017,17)	1461,01 (224,36–5824,15)*		676,02 (150,17–2200,46)*,**	919,66 (298,79–4629,11)
ИЛ 2	101,23 (20,65–415,7)	105,48 (25,21–195,53)*		38,15 (15,88–144,22)*,**	52,38 (22,00–262,03)
ИЛ 4	17,70 (3,5–45,98)	21,28 (3,83–33,06)		13,19 (2,39–26,47)*	5,72 (3,51–20,97)
ИЛ 5	0,81 (0,01–4,11)	0,42 (0,01–2,25)		0,38 (0,01–1,035)*,**	0,98 (0,31–3,58)
ИЛ 6	217,34 (82,37–553,41)	117,53 (44,15–240,45)*		64,26 (15,89–145,7)*,**	83,00 (26,42–284,62)
ИЛ 7	32,50 (5,32–118,72)	35,37 (2,13–78,35)		7,67 (1,99–45,48)*,**	7,36 (4,53–23,25)
ИЛ 8	22,70 (7,35–50,82)	26,20 (9,23–86,49)		26,76 (10,57–50,56)	13,91 (8,09–48,19)
ИЛ 9	384,92 (131,48–1110,89)	246,72 (95,88–524,46)*,**		173,11 (52,94–434,45)*	186,95 (46,66–461,26)*,**
ИЛ 10	81,30 (36,87–243,6)	104,53 (23,5–172,31)		50,98 (23,98–107,89)*,**	40,75 (22,14–136,82)
ИЛ 12	15,97 (3,18–107,28)	15,23 (2,43–79,84)		8,07 (1,33–44,16)*,**	7,42 (2,00–23,66)
ИЛ 13	93,52 (19,86–249,39)	78,78 (14,47–189,98)		41,12 (11,36–138,18)**	24,05 (13,20–95,38)
ИЛ 15	25,73 (9,8–108,5)	19,32 (7,16–101,74)*		10,07 (3,92–44,54)*,**	21,95 (4,45–111,01)
ИЛ 17	47,82 (12,6–155,44)	53,38 (16,08–116,05)		33,53 (10,38–106,43)*,**	17,63 (10,38–72,88)
Эотаксин	790,94 (349,48–1265,46)	859,37 (382,34–1332,91)		584,06 (298,34–1179,70)	584,43 (243,18–1066,18)
ФРФ 2	41,18 (9,91–71,56)	38,31 (11,55–64,41)		22,84 (11,81–51,28)*,**	28,36 (13,87–40,53)
G-ГКФ	0,01 (0,01–3,27)	0,00 (0,00–0,00)		0,01 (0,01–0,01)	0,01 (0,01–1,99)
ГМ-КСФ	417,71 (101,97–20 038,91)	274,20 (144,19–1306,14)*,**		236,34 (87,60–535,01)*	311,14 (177,98–922,29)
ИФН γ	4461,59 (749,26–7847,71)	3162,92 (856,86–7358,89)*		1376,28 (498,19–4665,86)*,**	1699,56 (464,04–3433,32)
ИБ 10	7013,12 (3494,97–13 748,41)	5850,55 (2343,21–9845,67)*		4800,42 (2313,70–9387,53)*,**	3288,95 (2494,43–7854,71)
МХБ 1	149,52 (46,61–514,44)	164,81 (45,67–252,24)*		90,81 (40,39–221,24)*,**	121,62 (40,61–223,09)
МБВ 1α	37,07 (23,27–88,11)	28,56 (18,02–56,38)*		28,02 (18,11–41,83)*	23,29 (16,59–54,51)
МБВ 1β	408,00 (201,17–844,24)	723,98 (207,8–925,53)		437,21 (255,50–908,37)	273,75 (171,75–666,15)
ТФР-ВВ	42 491,11 (40 514,10–60 538,8)	45 591,39 (42 491,00–64 783,58)		42 491,11 (42 491,11–57 837,03)	42 491,11 (42 491,11–48 557,40)
ФНО α	78,25 (0,01–658,26)	115,61 (0,01–619,95)		48,99 (0,01–354,43)*,**	100,74 (0,01–198,71)
ВЭФР	510,54 (299,94–2421,50)	800,63 (244,62–2667,14)		605,01 (208,05–1564,65)	355,84 (150,44–726,20)

Примечание. Здесь и в табл. 4–6: Концентрации цитокинов представлены в пг/мл, Ме (ИР). * – $p < 0,05$ относительно базального уровня; ** – снижение уровня $\geq 30\%$ относительно базального.

Таблица 4

Динамика уровня цитокинов в сыворотке при наличии клинического ответа на введение РТМ

Цитокин	Неделя					
	0-я n=18	8-я	0-я n=30	24-я	0-я n=11	40-я
ИЛ 1β	2,08 (0,01–42,10)	0,33 (0,01–4,21)*,**	0,18 (0,01–7,05)	0,01 (0,01–1,30)*,**	0,03 (0,01–4,90)	0,11 (0,01–0,73)
ИЛ 1ra	2557,235 (961,86–25 280,58)	1861,22 (877,63–6622,38)*,**	1677,36 (326,34–17 879,40)	754,00 (134,72–2561,30)*,**	1750,86 (231,30–2560,56)	1258,89 (261,28–3707,18)
ИЛ 2	233,32 (59,12–432,70)	131,63 (36,20–195,53)*,**	110,77 (33,01–432,70)	46,90 (14,72–148,00)*,**	65,32 (15,94–314,81)	55,66 (24,88–247,85)
ИЛ 4	32,41 (11,37–62,95)	21,88 (6,65–35,11)*,**	19,97 (3,61–47,82)	16,30 (2,52–28,01)*	11,37 (2,80–32,54)	5,87 (4,43–25,5)
ИЛ 5	1,88 (0,48–9,27)	0,87 (0,01–4,56)	0,81 (0,01–2,30)	0,36 (0,01–0,94)*,**	0,86 (0,48–1,88)	0,77 (0,01–1,62)
ИЛ 6	282,64 (93,92–1099,77)	155,20 (44,15–240,45)*,**	217,33 (82,27–553,41)	73,12 (18,73–147,54)*,**	233,98 (85,36–312,09)	92,87 (16,89–252,93)
ИЛ 7	106,49 (9,15–170,34)	44,84 (16,36–131,38)	32,49 (5,32–118,72)	8,60 (1,80–47,05)*,**	8,48 (3,36–83,91)	10,08 (6,35–29,36)
ИЛ 9	613,97 (211,74–2593,01)	352,19 (138,07–932,83)*,**	441,64 (131,48–1672,56)	162,40 (45,84–397,17)*,**	276,42 (40,58–647,13)	62,83 (23,51–217,79)*,**
ИЛ 10	182,72 (76,73–315,82)	155,32 (75,72–290,07)	103,01 (36,87–279,16)	66,10 (25,43–111,11)*,**	71,21 (28,84–136,12)	79,16 (22,27–139,14)
ИЛ-12	73,60 (9,60–167,55)	23,19 (13,79–159,05)	15,97 (3,18–141,76)	9,26 (1,38–45,17)*,**	5,79 (2,69–78,89)	11,38 (2,17–22,71)
ИЛ 13	224,27 (39,83–323,87)	107,57 (44,80–214,00)*,**	114,89 (19,86–253,05)	57,75 (14,03–141,94)*,**	39,83 (19,86–214,00)	34,13 (14,17–125,48)
ИЛ 15	56,63 (18,58–140,06)	41,72 (12,50–106,29)	31,16 (10,23–140,06)	12,36 (3,64–48,28)*,**	28,82 (8,23–57,83)	26,58 (5,04–110,02)
ИЛ 17	94,83 (17,26–337,17)	69,40 (28,00–156,20)	47,82 (15,25–155,44)	54,67 (11,18–107,17)	18,65 (12,16–131,79)	23,60 (13,95–94,00)
Эотаксин	909,13 (675,29–1673,25)	1031,3 (659,0–1389,40)	838,40 (367,42–1367,98)	625,30 (310,40–1229,29)	606,66 (288,23–953,82)	679,00 (515,37–1081,34)
ФРФ 2	48,45 (30,18–377,38)	39,3 (19,00–83,20)	42,16 (9,91–72,95)	20,34 (10,89–50,95)*,**	39,52 (5,49–68,96)	25,42 (15,25–44,09)
G-ГКФ	0,50 (0,01–329,15)	0,00 (0,00–0,00)	0,01 (0,01–3,27)	0,01 (0,01–0,01)	0,01 (0,01–0,55)	1,80 (0,01–3,27)
ГМ-КСФ	797,38 (273,48–3850,23)	480,5 (218,00–1357,20)*,**	528,41 (142,23–2569,07)	236,34 (79,03–466,55)*,**	390,04 (135,53–614,02)	287,88 (224,48–827,00)
ИФН γ	7221,55 (1565,22–34 980,80)	3533,30 (1376,00–10 623,80)*,**	5689,66 (862,38–9638,29)	1702,74 (925,35–5901,50)*,**	1690,03 (555,72–7728,79)	1833,90 (708,99–2849,08)
ИБ 10	7709,89 (4204,10–16 622,56)	6047,20 (3356,0–15 453,40)	6585,69 (2602,73–13 742,41)	4800,42 (2305,10–10 709,22)	5528,52 (4184,53–8436,51)	4158,90 (2798,55–8913,83)
МХБ 1	320,12 (48,15–835,53)	202,00 (57,00–391,40)*,**	125,29 (46,61–397,51)	92,45 (40,78–229,14)*	124,44 (43,91–306,27)	121,54 (38,24–231,13)
МБВ 1α	55,76 (26,37–226,08)	28,50 (18,00–62,80)	38,96 (23,27–88,11)	28,02 (18,36–39,35)	26,70 (18,36–51,13)	24,08 (19,36–56,38)
МБВ 1β	797,02 (232,60–1003,70)	781,50 (251,00–943,40)	570,50 (201,17–844,24)	458,47 (264,51–910,69)	308,35 (225,64–748,02)	386,39 (254,19–966,65)
ТФР-ВВ	42 491,11 (36 493,05–60 539,0)	44 612,50 (42 491,00–58 944,20)	42 491,1 (40 514,10–58 640,19)	42 491,11 (42 491,1–57 235,93)	42 491,11 (42 491,1–50 562,8)	42 491,11 (42 491,1–49 704,3)
ФНО α	405,14 (0,01–2359,50)	166,90 (96,00–867,90)	168,15 (0,01–1011,69)	63,94 (0,01–381,15)*,**	85,26 (41,09–391,21)	105,13 (0,01–128,65)
ВЭФР	1703,76 (465,72–6382,78)	1595,70 (246,00–3681,20)	571,38 (302,21–2421,50)	668,35 (241,82–1664,56)	496,32 (239,50–871,75)	489,05 (203,29–2052,10)

14,7% до начала терапии РТМ не получали БПВП в связи с непереносимостью или развитием побочных эффектов терапии (табл. 1). РТМ вводился по 1000 мг внутривенно двукратно с интервалом в 2 нед. Терапевтический эффект при применении РТМ оценивался согласно критериям EULAR. Клинические и лабораторные показатели анализировались непосредственно перед началом терапии (нулевая точка), а также через 8, 24 и 40 нед после инфузии РТМ. В результате оценки эффективности лечения все пациенты были разделены на две группы: группа 1 — достигнут хороший или удовлетворительный эффект на 8, 24, 40-й неделях (клинический ответ) и группа 2 — без эффекта на 8-й и 40-й неделях приме-

ния РТМ (отсутствие клинического ответа) [10]. Концентрацию цитокинов в сыворотке крови определяли с использованием технологии «xMAP» (27-plex) на анализаторе BioPlex-200 (Bio-Rad, США). Исследуемые сыворотки хранили при температуре -70°C . Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, США), включая общепринятые методы параметрического и непараметрического анализа. При сравнении базальных уровней цитокинов в контрольной группе и у всех пациентов, включенных в исследование, а также у лиц с наличием и отсутствием клинического ответа использовали критерий Манна–Уитни, при оценке динамики кон-

Таблица 5

Динамика уровня цитокинов в сыворотке пациентов с РА при отсутствии клинического ответа на введение РТМ

Цитокины	Неделя			
	0-я n=15	8-я	0-я n=10	40-я
ИЛ 1 β	0,01 (0,01–0,69)	0,01 (0,01–0,86)	0,085 (0,01–1,69)	0,68 (0,01–5,96)
ИЛ 1 α	800,41 (197,4–4459,62)	604,23 (148,39–1170,98)	1202,135 (154,2–17 879,4)	580,43 (363,97–9027,69)
ИЛ 2	58,80 (13,78–192,01)	45,64 (13,49–105,48)*	58,96 (15,75–411,64)	23,26 (11,37–276,21)*,**
ИЛ 4	6,87 (2,74–20,97)	18,98 (2,65–30,70)	3,83 (1,68–15,06)	4,78 (1,83–14,64)
ИЛ 5	0,44 (0,01–0,84)	0,24 (0,01–0,77)	0,79 (0,44–7,70)	2,42 (0,70–8,66)
ИЛ 6	169,35 (63,60–410,23)	109,80 (46,19–237,01)	83,46 (53,48–477,56)	79,50 (62,13–316,31)
ИЛ 7	6,0 (2,74–44,49)	5,60 (1,95–51,66)	5,66 (2,16–34,12)	5,22 (4,19–7,15)
ИЛ 8	10,02 (5,38–21,62)	15,81 (8,26–48,40)*,**	7,05 (4,33–9,34)	8,92 (5,52–15,58)
ИЛ 9	247,14 (47,97–643,13)	174,96 (95,88–426,74)	309,63 (47,97–485,57)	377,46 (164,16–494,07)
ИЛ 10	36,87 (15,63–85,86)	43,66 (22,47–124,47)	35,32 (15,63–62,41)	37,90 (22,01–59,04)
ИЛ 12	2,69 (0,29–59,6)	3,24 (1,51–22,33)	2,91 (0,29–83,43)	4,24 (1,83–24,61)
ИЛ 13	19,86 (6,36–161,14)	30,08 (11,70–129,97)	17,62 (5,90–61,46)	22,63 (6,19–35,86)
ИЛ 15	10,23 (2,80–58,32)	10,68 (3,22–17,60)	30,55 (9,80–140,06)	10,27 (4,25–112,00)
ИЛ 17	18,65 (4,14–120,52)	23,79 (15,58–105,69)	9,07 (3,93–32,03)	10,74 (8,09–20,35)
Эотаксин	446,84 (158,62–953,82)	624,20 (278,11–926,27)	9,07 (3,93–32,03)	10,74 (8,09–20,35)
ФРФ 2	40,32 (2,84–62,77)	29,53 (6,42–60,81)	436,69 (158,62–1125,54)	271,79 (233,92–878,35)
G-ГКФ	0,01 (0,01–0,01)	0,01 (0,01–0,01)	16,81 (2,56–68,50)	31,29 (12,48–33,70)
ГМ-КСФ	246,69 (95,88–1140,24)	163,25 (87,91–638,40)*,**	630,50 (81,39–4056,15)	587,50 (147,62–2054,24)
ИФН γ	1690,03 (284,44–6482,44)	2120,78 (219,75–6323,31)	1509,95 (384,89–6204,38)	1123,50 (178,09–4017,55)
ИБ 10	6128,4 (2215,9–11 256,1)	5850,55 (1523,79–6648,76)	2433,98 (1984,65–4289,70)	2872,48 (2078,96–3911,46)
МХБ 1	99,48 (29,20–265,96)	92,13 (40,42–174,90)	49,98 (29,20–397,51)	188,02 (46,61–215,05)
МБВ 1 α	23,75 (18,19–48,85)	29,23 (18,64–48,19)	23,79 (12,90–26,37)	15,25 (14,41–52,640)
МБВ 1 β	315,24 (129,56–786,03)	250,24 (195,65–910,33)*	134,13 (119,76–315,24)	230,86 (145,34–267,14)*,**
ТФР-ВВ	42 491,11 (42 491,1–58 640,19)	45 591,39 (42 491,1–64 783,58)	42 491,1 (23 287,87–55 233,86)	42 491,1 (42 491,1–47 410,5)
ФНО α	41,09 (0,01–235,59)	23,95 (0,01–347,40)	0,01 (0,01–22,30)	44,03 (0,01–588,90)
ВЭФР	321,62 (101,00–632,21)	463,35 (244,62–868,05)	214,44 (100,36–447,33)	177,14 (88,85–399,77)

центрации цитокинов — тест Вилкоксона, результаты представлены в виде медианы (Ме) с интерквартильным размахом (ИР, 25-й — 75-й процентиля). Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В сыворотках больных РА Ме концентрации большинства цитокинов достоверно отличались от значения 95-го процентиля таковой в группе здоровых доноров. Отмечено значимое повышение $\geq 30\%$ уровней антагониста рецептора ИЛ 1 (ИЛ 1га), ИЛ 2, 4, 6, 9, 13, ИФН γ , макрофагального белка воспаления 1 β (МБВ 1 β) и снижение — ИЛ 1 β , 10, 12, 15, фактора роста фибробластов 2 (ФРФ 2), гранулоцитарного колониестимулирующего

фактора G (G-ГКФ), ИФН γ -индуцибельного белка, МХБ-1, тромбоцитарного фактора роста-ВВ (ТФР-ВВ), васкулоэндотелиального фактора роста (ВЭФР) (табл. 2).

У всех пациентов независимо от ответа на РТМ через 8 нед применения препарата произошло значительное ($\geq 30\%$) снижение уровней ИЛ 6, 9, ГМ-КСФ; на 24-й неделе — ИЛ 1 β , 1га, 2, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 15, 17, ФРФ 2, ИФН γ , МБВ 1 β , МХБ 1, ФНО α ; на 40-й неделе отмечено падение концентрации только ИЛ 9 (табл. 3).

В группе с наличием клинического ответа на терапию данным ГИБП на 8-й неделе снизилась концентрация: ИЛ 1 β , 1га, 2, 4, 6, 9, 13, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ),

Таблица 6

Различия базальных уровней цитокинов между ответившими и не ответившими на терапию РТМ

Цитокин	Неделя			
	8-я	клинический ответ		40-я
	есть (n=18)	нет (n=15)	есть (n=11)	нет (n=10)
ИЛ 1 β	2,08 (0,01–42,10)	0,01 (0,01–0,69)	0,03 (0,01–4,90)	0,085 (0,01–1,69)
ИЛ 1га	2557,235 (961,86–25 280,58)	800,41 (197,4–4459,62)	1750,9 (231,3–2560,6)	1202,14 (154,2–17 879,4)
ИЛ 2	233,32 (59,12–432,70)	58,80 (13,78–192,01)	65,32 (15,94–314,81)	58,96 (15,75–411,64)
ИЛ 4	32,41 (11,37–62,95)*	6,87 (2,74–20,97)	11,37 (2,80–32,54)	3,83 (1,68–15,06)
ИЛ 5	1,88 (0,48–9,27)*	0,44 (0,01–0,84)	0,86 (0,48–1,88)	0,79 (0,44–7,70)
ИЛ 6	282,64 (93,92–1099,77)	169,35 (63,60–410,23)	233,98 (85,36–312,09)	83,46 (53,48–477,56)
ИЛ 7	106,49 (9,15–170,34)*	6,0 (2,74–44,49)	8,48 (3,36–83,91)	5,66 (2,16–34,12)
ИЛ 8	40,73 (10,55–86,64)*	10,02 (5,38–21,62)	23,78 (7,30–33,32)*	7,05 (4,33–9,34)
ИЛ 9	613,97 (211,74–2593,01)	247,14 (47,97–643,13)	276,42 (40,58–647,13)	309,63 (47,97–485,57)
ИЛ 10	182,72 (76,73–315,82)*	36,87 (15,63–85,86)	71,21 (28,84–136,12)	35,32 (15,63–62,41)
ИЛ 12	73,60 (9,60–167,55)*	2,69 (0,29–59,6)	5,79 (2,69–78,89)	2,91 (0,29–83,43)
ИЛ 13	224,27 (39,83–323,87)*	19,86 (6,36–161,14)	39,83 (19,86–214,00)	17,62 (5,90–61,46)
ИЛ 15	56,63 (18,58–140,06)*	10,23 (2,80–58,32)	28,82 (8,23–57,83)	30,55 (9,80–140,06)
ИЛ 17	94,83 (17,26–337,17)*	18,65 (4,14–120,52)	18,65 (12,16–131,79)	9,07 (3,93–32,03)
Эотаксин	909,13 (675,29–1673,25)	446,84 (158,62–953,82)	606,66 (288,23–953,82)	436,69 (158,62–1125,54)
ФРФ 2	48,45 (30,18–377,38)	40,32 (2,84–62,77)	39,52 (5,49–68,96)	16,81 (2,56–68,50)
G-ГКФ	0,50 (0,01–329,15)	0,01 (0,01–0,01)	0,01 (0,01–0,55)	0,01 (0,01–0,02)
ГМ-КСФ	797,38 (273,48–3850,23)	246,69 (95,88–1140,24)	390,04 (135,53–614,02)	630,50 (81,39–4056,15)
ИФН γ	7221,55 (1565,22–34 980,8)*	1690,03 (284,44–6482,44)	1690,03 (555,72–7728,79)	1509,95 (384,89–6204,38)
МХБ 1	320,12 (48,15–835,53)	99,48 (29,20–265,96)	124,44 (43,91–306,27)	49,98 (29,20–397,51)
МБВ 1 α	55,76 (26,37–226,08)	23,75 (18,19–48,85)	26,70 (18,36–51,13)	23,79 (12,90–26,37)
МБВ 1 β	797,02 (232,60–1003,70)	315,24 (129,56–786,03)	308,35 (225,64–748,02)	134,13 (119,76–315,24)
ТФР-ВВ	42 491,1 (36 493,05–60 538,8)	42 491,1 (42 491,1–58 640,2)	42 491,1 (42 491,1–50 562,8)	42 491,1 (23 287,9–55 233,9)
ФНО α	405,14 (0,01–2359,50)	41,09 (0,01–235,59)	85,26 (41,09–391,21)	0,01 (0,01–22,30)
ВЭФР	1703,76 (465,72–6382,78)*	321,62 (101,00–632,21)	496,32 (239,50–871,75)	214,44 (100,36–447,33)

ИФН γ , МХБ 1; на 24-й — ИЛ 1 β , 1 α , 2, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 15, ФРФ 2, ГМ-КСФ, ИФН γ , ФНО α , на 40-й — ИЛ 9 (табл. 4).

В группе с отсутствием клинического ответа на 8-й неделе снижалась концентрация ГМ-КСФ, на 40-й — ИЛ 2 и МБВ 1 β , также на 8-й неделе отмечено повышение уровня ИЛ 8 (табл. 5).

В качестве возможных ранних предикторов ответа (на 40-й неделе) можно выделить повышение уровня (пкг/мл) ИЛ 17: наличие ответа ($n=13$) — 39,60 (16,08–111,60) / отсутствие ответа ($n=8$) — 16,0 (7,1–24,96) МБВ 1 β : 254,67 (231,7–911,80) / 182,60 (133,7–229,02) соответственно на 8-й неделе после инфузии РТМ.

При сравнении базальных уровней цитокинов в группах с различным клиническим ответом на 8-й и 40-й неделях у ответивших на лечение обнаружено более чем трехкратное повышение концентраций ИЛ 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 17, ИФН γ , ВЭФР и ИЛ 8 соответственно (табл. 6).

Данные, касающиеся влияния РТМ на уровень цитокинов у пациентов с РА, немногочисленны. При оценке динамики изменения цитокинового профиля М. Blom и соавт. [11] с помощью мультиплексной суспензионной технологии обнаружили в сыворотках больных ($n=16$) снижение концентрации ИЛ 4, 15, ГМ-КСФ, ИФН γ , ФНО α , ИЛ 1 β , 17, 12, 13, 7, а также повышение уровня МХБ 1 в первые 24 нед лечения РТМ, что совпадает с нашими результатами, за исключением возросшего уровня МХБ 1. Дополнительно к этому в нашем исследовании отмечено снижение содержания ИЛ 1 α , 2, 9, 10 и ФРФ 2. S. Fabre и соавт., используя технологию протеомных биочипов, при изучении панели цитокинов у 46 больных РА на фоне терапии РТМ показали, что на 12-й неделе после введения препарата концентрация МХБ 1

и эпидермального ростового фактора (EGF) в сыворотках ответивших на лечение ($n=29$) значительно превышает таковую у больных с отсутствием эффекта терапии ($n=17$) [12]. Кроме того, выявлено достоверное снижение сывороточного уровня ИЛ 6 в группе ответивших на лечение и ИЛ 8 — в группе больных РА, не отвечающих на проводимую терапию. В нашем исследовании на 8-й неделе после инфузии в группе с наличием клинического эффекта показано снижение уровней ИЛ 6, МХБ 1; на 24-й неделе при сохранении низких значений ИЛ 6 также отмечен повышенный уровень МХБ 1. М. Blom и соавт. рассматривают кратковременное повышение концентрации МБВ 1 β через 2 ч и снижение уровня ИЛ 6 через 6 ч после первой инфузии препарата в качестве возможных предикторов хорошего ответа на терапию РТМ [11]. R.M. Thurling и соавт. обнаружили достоверную связь между снижением концентрации ИЛ 6, 15, ИФН γ , ФНО α , ИЛ 22, 23, хемокинов: CXCL3, CCL12, CCL19 — через 4 нед после курса РТМ и клиническим эффектом через 24 нед. По нашим данным, о возможном развитии клинического ответа через 40 нед может свидетельствовать повышение уровней ИЛ 17 и МБВ 1 β на 8-й неделе после введения препарата [13]. В настоящее время отсутствуют данные об идентификации базального цитокинового профиля, который мог бы служить предиктором эффективности терапии РТМ. Согласно результатам нашей работы, в качестве кандидатных маркеров будущего хорошего клинического ответа можно рассматривать повышение базального уровня следующих цитокинов: ИЛ 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 15, 17, ИФН γ и ВЭФР.

Таким образом, мультиплексный анализ цитокинового профиля может являться важным инструментом для изучения иммунопатогенетических механизмов и оценки эффективности лечения РА с использованием ГИБП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Насонов Е.Л., Соловьев С.К. Перспективы применения моноклональных антител к В-лимфоцитам (ритуксимаб) при воспалительных ревматических заболеваниях. Науч-практич ревматол 2007;1:4–8.
2. Browning J.L. B cell move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. Nature Rev 2006;5:564–76.
3. Насонов Е.Л. Перспективы применения моноклональных антител к В-лимфоцитам (ритуксимаб) при ревматоидном артрите. Клин фармакол тер 2006;1–5:55–8.
4. Dörner T. Crossroads of B cell activation in autoimmunity: rationale of targeting B cells. J Rheumatol 2006;77:3–11.
5. Wilk E., Witte T., Marquardt N. et al. Depletion of functionally active CD20+ T cells by rituximab treatment. Arthr Rheum 2009;12(60):3563–71.
6. Yamamoto A., Sato K., Miyoshi F. et al. Analysis of cytokine production patterns of peripheral blood mononuclear cells from a rheumatoid arthritis patient successfully treated with rituximab. Mod Rheumatol 2010;2:183–7.
7. Brennan F., McInnes I. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. J Clin Invest 2008;118(11):3537–45.
8. Bansard C., Lequerre T., Daveau M. et al. Can rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and biologics be predicted? Rheumatology (Oxford) 2009;48(9):1021–8.
9. Kingsmore S. Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. Nat Rev Drug Discov 2006;5(4):310–20.
10. Олюнин Ю.А. Оценка эффективности терапии ревматоидного артрита. Международные индексы оценки активности, функционального статуса и качества жизни больных ревматическими заболеваниями. М., 2007;3–12.
11. Blom M., Wenink M., Huijbens R. et al. Altered Circulating Cytokine Pattern after Administration of Rituximab is Correlated with Response to Therapy in Rheumatoid Arthritis. Arthr Rheum 2008;58(19):450.
12. Fabre S., Guisnet C., Tatem L. et al. Protein biochip array technology to monitor rituximab in rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol 2009;155(3):395–402.
13. Thurling R.M., Boumans M.J.H., Vos K. et al. Early changes in serum levels of cytokines and chemokines are predictive of the response to Rituximab treatment in rheumatoid arthritis. Arthr Rheum 2009;60(Suppl.):630.

Поступила 06.07.2011