

Сравнение диагностической информативности определения мРНК некоторых гомеостатических и провоспалительных цитокинов в синовиальной оболочке больных ревматоидным артритом

Маслянский А.Л.¹, Жебрун Д.А.^{1,2}, Титов А.Г.¹,
Патрухин А.П.², Костарева А.А.¹, Гольцева И.С.¹, Тотолян Арег А.^{1,2}

¹ФГБУ «Северо-Западный Федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

²ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

¹197341 Санкт-Петербург,

ул. Аккуратова, 2;

²197101 Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

¹North-West Federal Medical Research Center, Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg, Russia;

²Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russia

²2, Akkuratov St., Saint Petersburg 197341; ²14 Mir St., Saint Petersburg 197101

Контакты: Алексей Леонидович Маслянский; esc_4@mail.ru

Contact: Aleksey Maslyansky; esc_4@mail.ru

Поступила 31.03.15

Проблема ранней диагностики ревматоидного артрита (РА) сохраняет свою актуальность, что связано с ограниченным потенциалом доступных биомаркеров и гетерогенностью заболевания. Хемокины и цитокины, продуцируемые синовиальной оболочкой больных, играют ведущую роль в патогенезе заболевания, что предполагает возможность их использования в качестве перспективных биомаркеров.

Цель исследования — сравнительное изучение относительной экспрессии мРНК гомеостатических хемокинов: фактора, продуцируемого стромальными клетками 1 (CXCL12/ФПСК1), хемоаттрактанта В-клеток (CXCL13/ХБК1), их рецепторов CXCR4 и CXCR5, провоспалительных хемокинов: макрофагального хемотаксического белка 1 (CCL2/МХБ1), хемокина, экспрессируемого и секретируемого Т-клетками при активации (CCL5/RANTES), интерлейкина (ИЛ) 8 (CXCL8/ИЛ8), ИЛ17 и сосудисто-эндотелиального фактора роста (СЭФР) в биоптатах синовиальной оболочки больных РА, остеоартрозом (ОА) и здоровых лиц, оценка диагностической информативности данных биомаркеров.

Материал и методы. Экспрессию мРНК оценивали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Группа РА включала 28 больных, медиана возраста — 47 [35; 54] лет, длительности заболевания — 8 [4; 12] лет, значение индекса DAS28 — 4,9 [3,9; 5,5], 16 больных были серопозитивны по ревматоидному фактору, 14 — по антителам к циклическому цитруллинированному пептиду. В группу ОА вошли 22 пациента с медианой возраста 70,5 [61; 74] года. Обследованы также 15 клинически здоровых лиц с медианой возраста 45 [28; 64] лет.

Результаты и обсуждение. У больных РА отмечалось значимое повышение уровней мРНК RANTES, ИЛ8 и ИЛ17, СЭФР, ХБК1 и CXCR5 в сравнении с группами больных ОА и здоровых лиц. У больных ОА уровень гомеостатических хемокинов ХБК1 и ФПСК1, обладающих В-клеточной хемоаттрактивной активностью, значимо превысил таковой в контрольной группе, что может указывать на их участие в патогенезе заболевания. Наиболее информативным в диагностике РА оказалось определение мРНК RANTES: площадь под кривой (ППК) — 0,91 [95% доверительный интервал (ДИ) 0,84–0,99], диагностическая чувствительность — 72,97% (95% ДИ 55,88–86,21%), диагностическая специфичность — 96,15% (95% ДИ 80,36–99,90%), отношение правдоподобия положительного результата (ОППР) — 18,95, отношение правдоподобия отрицательного результата (ОПОР) — 0,28 при диагностическом пороге 0,0350, а также мРНК ХБК1. Значение ППК ХБК1 составило 0,78 (95% ДИ 0,66–0,89), диагностическая чувствительность — 56,25% (95% ДИ 37,66–73,64%), диагностическая специфичность — 92,59% (95% ДИ 75,71–99,09%), ОППР — 7,59, ОПОР — 0,47 при диагностическом пороге 0,0184.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; остеоартроз; синовиальная оболочка; экспрессия; биомаркер; RANTES; CXCR5; цитокины; хемокины.

Для ссылки: Маслянский АЛ, Жебрун ДА, Титов АГ и др. Сравнение диагностической информативности определения мРНК некоторых гомеостатических и провоспалительных цитокинов в синовиальной оболочке больных ревматоидным артритом. Научно-практическая ревматология. 2016;54(1):10–15.

COMPARISON OF THE DIAGNOSTIC INFORMATIVE VALUE OF DETERMINATION OF MRNA OF SOME HOMEOSTATIC AND PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN THE SYNOVIAL MEMBRANE OF PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Maslyansky A.L.¹, Zhebrun D.A.^{1,2}, Titov A.G.¹, Patrukhin A.P.², Kostareva A.A.¹, Goltseva I.S.¹, Totolyan Areg A.^{1,2}

The problem of the early diagnosis of rheumatoid arthritis (RA) remains relevant, which is associated with the limited potential of available biomarkers and the heterogeneity of the disease. Chemokines and cytokines produced by the synovial membrane of the patients play a leading role in the pathogenesis of the disease, suggesting that they may be used as promising biomarkers.

Objective: to comparatively investigate the relative mRNA expression of the homeostatic chemokines: stromal cell-derived factor 1 (SDF-1/CXCL12), B-cell-attracting chemokine-1 (BCA-1/CXCL13), their receptors CXCR4 and CXCR5, the proinflammatory chemokines: macrophage chemotactic protein-1 (MCP-1/CCL2), T cell expressed and secreted chemokine on activation (CCL5/RANTES), interleukin-8 (IL-8) (IL-8/CXCL8), IL-17, and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the synovial membrane biopsy specimens from patients with RA or osteoarthritis (OA) and from healthy individuals and to estimate the diagnostic informative value of these biomarkers.

Subjects and methods. The expression of mRNA was estimated using a real-time polymerase chain reaction assay. The RA group included 28 patients, their median age was 47 [35; 54] years; disease duration — 8 [4; 12] years; DAS28 — 4.9 [3.9; 5.5]; 16 and 14 patients were seropositive for rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, respectively. The OA group comprised 22 patients whose median age was 70.5 [61; 74] years. Fifteen clinically healthy individuals with a median age of 45 [28; 64] years were also examined.

Results and discussion. The RA group was noted to have significantly higher RANTES, IL-8, IL-17, VEGF, BCA-1, and CXCR5 mRNA levels than the OA group and healthy individuals. In the patients with OA, the level of the homeostatic chemokines BCA-1 and SDF-1, which had B-cell chemoattractant activities, was higher than that in the control group, which may suggest that they are implicated in the pathogenesis of the disease. The determination of RANTES mRNA expression was most informative in diagnosing RA: the area under the curve (AUC), 0.91 [95% confidence interval (CI), 0.84–0.99]; diagnostic sensitivity, 72.97% (95% CI, 55.88–86.21), diagnostic specificity, 96.15% (95% CI, 80.36–99.90); positive likelihood ratio (LR+), 18.95; negative likelihood ratio (LR-), 0.28 at a diagnostic threshold of 0.0350, so was CXCR5 mRNA. The AUC for BCA-1 was 0.78 (95% CI, 0.66–0.89); diagnostic sensitivity, 56.25% (95% CI, 37.66–73.64), diagnostic specificity, 92.59% (95% CI, 75.71–99.09); LR+, 7.59; LR-, 0.47 at a diagnostic threshold of 0.0184.

Key words: rheumatoid arthritis; osteoarthritis; synovial membrane; expression; biomarker; RANTES; CXCR5; cytokines; chemokines.

For reference: Maslyansky AL, Zhebrun DA, Titov AG, et al. Comparison of the diagnostic informative value of determination of mRNA of some homeostatic and proinflammatory cytokines in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice. 2016;54(1):10-15 (In Russ.).

doi: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2016-10-15>

Ревматоидный артрит (РА) относится к числу классических аутоиммунных заболеваний, при котором основной мишенью воспалительного процесса является синовиальная оболочка (СО) периферических суставов. Важной чертой СО больных РА считается активация нелимфангиогенеза с формированием элементов так называемой третичной лимфоидной ткани, ее гиперваскуляризация и гипертрофия/гиперплазия с развитием паннуса. Морфологическая картина СО при раннем РА не является достаточно надежным диагностическим ориентиром в связи с низкой специфичностью полученных находок. К тому же иммунологическая гетерогенность заболевания, существование его серонегативных форм на сегодняшний день не позволяют считать проблему лабораторной диагностики РА окончательно решенной [1].

Хемокины и цитокины играют ключевую роль в процессах активации лимфоидных клеток [интерлейкин 1 (ИЛ1), ИЛ6, ИЛ17], активации эндотелиальных клеток, экспрессии ими молекул адгезии, обеспечения миграции лейкоцитов в очаг воспаления (СХС-хемокины), индук-

ции лимфангиогенеза [лимфотоксин, ИЛ7, фактор, продуцируемый стромальными клетками 1 (CXCL12/ФПСК1), хемоаттрактант В-клеток 1 (CXCL13/ХБК1), CXCL16], стимуляции ангиогенеза [содержащие ELR-последовательность СХС-хемокины, макрофагальный хемотактический белок 1 (CCL2/МХБ1) и некоторые другие] у больных РА [2]. Кроме того, существенная роль в механизмах неоваскулогенеза у больных РА отводится сосудистому эндотелиальному фактору роста (СЭФР).

К настоящему времени опубликовано лишь небольшое число исследований, посвященных сравнению профиля экспрессии гомеостатических и провоспалительных хемокинов и цитокинов СО при различных ревматических заболеваниях. В то же время оценка данного профиля не только позволяла бы охарактеризовать патогенетические механизмы воспалительного процесса, но и привела бы к выявлению цитокиновых паттернов, характеризующихся определенной диагностической информативностью.

Соответственно, целью нашего исследования служила оценка диагностической значимости экспрессии мРНК некоторых провоспалительных и гомеостатических хемокинов, ИЛ17 и СЭФР в СО больных РА.

Материал и методы

Было обследовано 65 человек, включая 28 больных РА (основная группа), 22 больных первичным остеоартрозом (ОА) с преимущественным поражением коленных суставов (КС; группа сравнения), а также 15 здоровых лиц (контрольная группа; табл. 1).

У большинства пациентов с РА отмечался резистентный к терапии синовит КС, служивший показанием для выполнения артроскопической синовэктомии. У больных ОА преимущественно выполняли операцию эндопротезирования КС. Группа контроля была представлена пациентами, имевшими в анамнезе травматическое повреждение КС. Соотношение мужчин и женщин внутри оцениваемых групп достоверно не различалось. Больные группы сравнения были значимо старше, чем пациенты с РА и лица из группы контроля ($p < 0,05$). Возраст больных основной и контрольной групп значимо не различался.

Всеми пациентами было подписано информированное согласие на участие в данном исследовании. Протокол исследования получил одобрение независимого этического комитета НИИЭМ имени Пастера.

Основным критерием включения в исследование явилось планируемое по медицинским показаниям плановое оперативное вмешательство (ревизионная/диагностическая артроскопия, артроскопическая синовэк-

Таблица 1 Клиническая характеристика больных

Показатель	Значение
<i>Группа РА (n=28)</i>	
Возраст, годы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	47 [35; 54]
Длительность заболевания, годы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	8 [4; 12]
Соотношение мужчины/женщины, n	4/24
Индекс DAS28, баллы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	4,9 [3,9; 5,5]
Рентгенологическая стадия заболевания по Steinbrocker, n:	
I	0
II	15
III	7
IV	6
РФ(+), n	16
АЦЦП(+), n	14
Получали преднизолон ≤ 10 мг/сут, n	10
Получали метотрексат 7,5–25 мг/нед, n	24
<i>Группа первичного ОА (n=22)</i>	
Возраст, годы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	70,5 [61; 74]
Длительность заболевания, годы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	13 [3; 17]
Соотношение мужчины/женщины, n	5/17
Индекс Лекена, баллы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	7,5 [5; 10]
<i>Группа контроля (n=15)</i>	
Возраст, годы, Ме [25-й; 75-й перцентили]	45 [28; 64]
Соотношение мужчины/женщины, n	10/5

мия, эндопротезирование КС). В группах больных РА и ОА дополнительным критерием включения было соответствие классификационным критериям данного заболевания Американской коллегии ревматологов/Европейской антиревматической лиги (ACR/EULAR) 2010 г. (для РА) и критериям ACR, предложенным R. Altman и соавт. [3] (для ОА). Критериями исключения являлись: наличие сопутствующего заболевания, способного, по мнению исследователей, оказать влияние на экспрессию цитокинов/хемокинов клетками СО; интраартикулярное введение глюкокортикоидов в исследуемый сустав менее чем за 6 мес до планируемой биопсии; использование генно-инженерных биологических препаратов в срок менее чем за 5 периодов полувыведения (антицитокиновые препараты) либо 6 мес (ритуксимаб) до планируемой биопсии и/или высоких доз глюкокортикоидов менее чем за 1 мес до планируемой биопсии. У больных группы контроля критериями исключения служили: признаки синовита исследуемого КС; повышение острофазовых показателей – СОЭ и уровня С-реактивного белка (СРБ); отклонение от нормы по данным рентгенологического обследования КС (сужение суставной щели и/или остеофиты); выявление макроскопически определяемых изменений СО по данным артроскопии. В процессе дообследования, в связи с выявлением субклинических проявлений ОА, объем данной группы уменьшился с 21 (изначально) до 15 пациентов.

После проведения интраоперационной биопсии полученные фрагменты СО подлежали немедленному замораживанию в жидком азоте, в дальнейшем их хранение осуществлялось при температуре -700°C . Из полученных фрагментов экстрагировалась РНК (метод гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции с использованием тризола согласно инструкции производителя – TRIzol Reagent; Invitrogen). После проверки качества выделенной РНК (биоанализатор Agilent 2100, чипы RNA Nano Chips, Agilent Technologies Inc.) проводили обратную транскрипцию (реагента Revertaid; Fermentas). Далее на кДНК выполнялась количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени (Applied Biosystems 7500) с использованием реагентов производства Синтол. Последовательности праймеров и зондов, а также условия реакции представлены в опубликованных нами ранее работах [4]. При обработке

и представлении данных использовался метод подсчета относительной экспрессии мРНК исследуемых цитокинов (метод ΔCt), нормализация проводилась по эндогенным референсным генам: глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназе и гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе.

В данной работе мы исследовали экспрессию мРНК гомеостатических хемокинов CXCL12/ФПСК1, CXCL13/ХВК1, их рецепторов CXCR4 и CXCR5, провоспалительных хемокинов CCL2/МХБ1, выделяемого Т-клетками при активации хемокина CCL5/RANTES и CXCL8/ИЛ8, ИЛ17 и важнейшего регулятора неоваскулогенеза – СЭФР.

Анализ результатов проводился с помощью программного обеспечения Graph Pad Prism 5.0 для Windows 5.03 (GraphPad Software Inc., США) и Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Проводилась оценка распределения на нормальность. При выявлении ненормального характера распределения результаты описывались в виде медианы [25-го; 75-го перцентилей]. Для сравнения количественных значений в нескольких группах использован метод ANOVA Краскелла–Уоллеса; апостериорные сравнения выполнены с помощью теста Данна. Корреляционный анализ выполнен методом ранговой корреляции Спирмена. При проведении ROC-анализа для каждого изучаемого биомаркера строилась кривая операционной характеристики, рассчитывалась площадь под кривой (ППК), определялся диагностический порог (ДП), рассчитывались показатели специфичности, чувствительности, отношение правдоподобия положительного (ОППР) и отрицательного (ОПОР) результатов лабораторного теста. Различия между группами считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Значения экспрессии мРНК изученных хемокинов/цитокинов во фрагментах СО больных РА и ОА в сравнении с нормальными значениями представлены в табл. 2.

У больных РА отмечалось значимое повышение уровней мРНК RANTES, ИЛ8 и ИЛ17, но не МХБ1 в сравнении как с группами больных ОА, так и с условно здоровыми лицами.

При анализе экспрессии гомеостатических хемокинов, к числу которых относятся прежде всего ФПСК1

Таблица 2 Относительная экспрессия изучавшихся показателей в СО больных РА и ОА в сравнении с контролем, Ме [25-й; 75-й перцентили]

Показатель	Группа контроля (n=15)	Больные ОА (n=22)	Больные РА (n=28)	Значимость различий		
				больных РА в сравнении с контролем	больных ОА в сравнении с контролем	больных РА в сравнении с больными ОА
CCL2/МХБ1	0,98 [0,63; 3,12]	1,16 [0,82; 2,92]	2,00 [0,92; 10,38]	>0,05	>0,05	>0,05
CCL5/RANTES	0,01 [0,00; 0,03]	0,02 [0,00; 0,04]	0,22 [0,09; 0,31]	<0,0001	>0,05	<0,0001
CXCL8/ИЛ8	0,03 [0,02; 0,12]	0,04 [0,01; 0,1]	0,25 [0,05; 0,78]	<0,001	>0,05	<0,05
ИЛ17	0,0002 [0,0000; 0,0010]	0,0001 [0,0000; 0,0006]	0,0032 [0,0004; 0,0132]	<0,01	>0,05	<0,01
CXCL12/ФПСК1	4,2 [1,13; 8,78]	7,17 [2,04; 17,1]	11,1 [3,83; 22,10]	<0,05	<0,05	>0,05
CXCL13/ХВК1	0,00 [0,00; 0,05]	0,02 [0,00; 0,22]	0,09 [0,05; 0,38]	<0,0001	>0,05	0,052
СЭФР	0,05 [0,03; 0,07]	0,04 [0,03; 0,06]	0,1 [0,05; 0,22]	<0,05	>0,05	<0,01
CXCR4	0,39 [0,14; 0,53]	0,58 [0,39; 0,74]	0,72 [0,36; 1,49]	<0,05	>0,05	>0,05
CXCR5	0,00004 [0,00004; 0,0001]	0,00006 [0,00003; 0,0001]	0,0003 [0,0001; 0,0004]	<0,0001	>0,05	<0,001

и ХВК1, повышенная экспрессия мРНК ФПСК1 была обнаружена в СО как больных РА, так и пациентов с ОА, при этом показатели больных основной группы и группы сравнения значимо отличались от показателей контрольной группы, но не отличались друг от друга. Уровень относительной экспрессии мРНК ХВК1 оказался значимо повышен у больных РА по сравнению как с ОА, так и с контролем. Хотя абсолютные значения данного показателя в группе ОА превышали таковые в контроле, различия не достигали степени значимых. При этом выраженность относительной экспрессии рецептора для ФПСК1, CXCR4, у больных РА оказалась повышенной в сравнении с контролем, однако она не отличалась от таковой в группе ОА.

Экспрессия мРНК для рецептора ХВК1, CXCR5, у больных РА оказалась значимо большей, чем у лиц из группы контроля и пациентов с ОА. Различия между группой ОА и группой контроля оказались незначимыми.

Наконец, относительная экспрессия РНК СЭФР клетками СО больных РА значимо превышала таковую как при ОА, так и в контроле. Значимых различий между контролем и ОА по данному показателю не было.

Возможность использования показателей экспрессии мРНК RANTES, ИЛ8, ИЛ17, ХВК1 и СЭФР в биоптатах СО в качестве потенциальных биомаркеров для проведения дифференциальной диагностики между ОА и РА оценивалась с помощью ROC-анализа. В ряде случаев ОА протекает с явлениями вторичного синовита, что может создать определенные сложности для дифференциальной диагностики с дебютом РА.

Клиническая информативность биомаркера прежде всего определяется такими его характеристиками, как диагностическая специфичность (ДС), чувствительность (ДЧ), ДП, ППК. В связи с этим мы рассчитывали данные характеристики кандидатных биомаркеров с помощью ROC-анализа. Для определения уровней ДП были построены ROC-кривые биомаркеров, показавшихся перспективными на предварительном этапе анализа. Установленные значения ДП, ППК, параметры ДЧ и ДС и расчетная посттестовая вероятность заболевания для каждого из анализируемых маркеров представлены в табл. 3.

Среди изучавшихся показателей наибольший интерес в качестве диагностических маркеров РА могут представлять такие хемокины, как CCL5/RANTES, CXCL13/ХВК1 и его рецептор CXCR5. Следует отметить,

что по диагностической информативности они сопоставимы с общепризнанными серологическими маркерами РА: ХВК1 – с ревматоидным фактором (РФ), а RANTES – с аутоантителами к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП).

Уровни экспрессии мРНК данных молекул в СО больных РА не различались значимо в группах пациентов, серонегативных и серопозитивных по РФ и АЦЦП, что дало возможность рассматривать их в качестве диагностических маркеров, независимо от серологического профиля.

Обсуждение

Согласно современным представлениям, среди провоспалительных цитокинов, участвующих в развитии синовита, ведущую роль играют фактор некроза опухоли α и ИЛ6. Однако продукция ИЛ1, ИЛ17, ИЛ8, а также МХБ1 и RANTES также оказывает значимое влияние на миграцию клеток (нейтрофилов, моноцитов/макрофагов, Т-лимфоцитов) в очаг воспаления и течение патологического процесса [5, 6]. У больных РА формирование структур третичной лимфоидной ткани в составе пораженной СО является установленным фактом, и представление об участии В-лимфоцитов в патогенезе заболевания также разделяют большинство исследователей [7–9].

При изучении локальной и системной продукции ФПСК1 и ХВК1 было установлено, что больные серопозитивным РА характеризуются повышением уровня ХВК1 в сыворотке крови, в то время как уровень экспрессии данного белка клетками СО коррелировал как с выраженностью системного воспаления, так и с интенсивностью локального воспалительного процесса и содержанием РФ [10]. Уровни ФПСК1 также были повышены в сыворотке синовиальной жидкости, СО больных РА и коррелировали с уровнем АЦЦП [11, 12].

ОА традиционно рассматривается как первично-дегенеративное заболевание суставов. В то же время имеется достаточно данных, указывающих на участие воспалительного процесса в патогенезе ОА, прежде всего более тяжелых его форм [13]. В последние годы продемонстрирована роль ИЛ17 как одного из медиаторов патогенеза ОА [14]. Данные о спектре хемокинов, вовлеченных в патогенез ОА, достаточно немногочисленны и противоречивы. Так, содержание МХБ1 у больных РА и ОА не раз-

Таблица 3 Параметры диагностической значимости изучавшихся показателей

Параметр	Анализируемый биомаркер					
	ИЛ17	CXCL8/ИЛ8	CCL5/RANTES	CXCL13/ХВК1	СЭФР	CXCR5
ППК (95% ДИ)	0,8232 (0,715–0,9314)	0,7438 (0,6164–0,8712)	0,9153 (0,8448–0,9858)	0,7789 (0,6605–0,8973)	0,7658 (0,6423–0,8894)	0,8218 (0,7106–0,9330)
ДП	0,0002195	0,0350	0,0350	0,0184	0,03085	0,0000604
ДЧ маркера при выбранных параметрах порогового значения, % (95% ДИ)	60,0 (40,60–76,34)	48,65 (31,92–65,60)	72,97 (55,88–86,21)	56,25 (37,66–73,64)	32,35 (17,39–50,53)	45,45 (28,11–63,65)
ДС маркера при выбранных параметрах порогового значения, % (95% ДИ)	89,29 (71,73–97,73)	84,62 (65,13–95,64)	96,15 (80,36–99,90)	92,59 (75,71–99,09)	92,31 (74,87–99,05)	96,00 (79,65–99,90)
ОППР теста	5,60	3,16	18,95	7,59	4,2	11,36
ОПОР теста	0,45	0,61	0,28	0,47	0,73	0,57

Примечание. ДИ – доверительный интервал.

личалось, а содержание ИЛ8 и RANTES оказалось значительно более высоким у больных РА, что соответствует и нашим результатам [15]. С другой стороны, ИЛ8, МХБ1 и RANTES синтезируются хондроцитами больных ОА, что было показано с помощью как иммуногистохимических методов, так и ПЦР [16]. Это может указывать на участие данных молекул в механизмах развития ОА. При изучении хемокинов, являющихся хемоаттрактантами для В-лимфоцитов, у больных ОА авторами было зафиксировано значимое повышение уровня ФПСК1. Однако оно было существенно менее выраженным, чем в группе больных РА [17]. Роль локальной экспрессии ХВК1 у больных ОА изучена хуже. Экспрессия РНК данного хемокина в биоптатах СО была выявлена у всех 7 пациентов с РА, но только у одного из 5 больных ОА (у 2 из 8 — с помощью иммуногистохимии). По данным итальянских исследователей, изучавших продукцию ХВК1 стромальными клетками костного мозга и остеобластами, при ОА она была существенно выше, чем при посттравматическом поражении суставов [18].

Согласно полученным нами данным, группа больных РА характеризовалась повышением относительного уровня экспрессии RANTES, ИЛ8 и ИЛ17 в сравнении с больными ОА и с группой здоровых лиц.

Отсутствие значимых различий между больными ОА и группой контроля в уровнях экспрессии мРНК CXCL13/ХВК1 и его рецептора CXCR5, провоспалительных хемокинов CCL2/МХБ1, CCL5/RANTES и CXCL8/ИЛ8, ИЛ17 и СЭФР может быть объяснено следующим образом. Контрольная группа была сформирована из пациентов, ранее перенесших травматическое повреждение КС, у которых на момент обследования имеющиеся клинические, рентгенологические и артроскопические данные обследования не позволяли диагностировать ОА. Однако подобный анамнез в сочетании с динамикой уровня изучаемых цитокинов/хемокинов позволил предполагать возможность доклинической стадии ОА, во всяком случае, у части этих пациентов. С другой стороны, количественные различия уровней CCL5/RANTES, CXCL13/ХВК1, CXCR4 и CXCR5 между группой больных ОА и контролем, возможно, не достигли статистической значимости в связи с ограниченным объемом обследованной популяции, поскольку нами были зафиксированы однонаправленные тенденции в сторону более выраженной экспрессии данных молекул в СО больных ОА.

Единственным достоверным различием между больными ОА и контролем явилось более высокое содержание ФПСК1 при ОА. Повышение относительной экспрессии мРНК данного хемокина у больных тяжелым ОА и значительно более низкое — у лиц с травматическим поражением суставов в анамнезе, в отсутствие клинической картины ОА, позволяет предположить, что прогрессирование ОА может сопровождаться развитием аутоиммунных (В-клеточных) механизмов повреждения, обуславливающим утяжеление патологического процесса.

У больных РА выявлено значимое повышение относительной экспрессии ХВК1 и его рецептора CXCR5 в сравнении с ОА и контролем. Уровни экспрессии ФПСК1 и его рецептора CXCR4 у этих пациентов значимо превышали таковые группы контроля, но не больных ОА. Таким образом, больные РА характеризовались максимально выраженной локальной активацией системы цито-

кинов (ИЛ17), изучаемых СС- и СХС-хемокинов (RANTES, ИЛ8), а также максимально выраженной экспрессией В-клеточных хемотаксических хемокинов — стимуляторов лимфангиогенеза, что сопровождалось повышением экспрессии рецепторов ФПСК1 и ХВК1. Мы полагаем, что это может способствовать повышению биологической активности данных молекул и отражает важнейшую роль В-клеточного звена иммунной системы в патогенезе РА.

В нашей работе экспрессия СЭФР была обнаружена у всех исследованных больных основной группы (РА), группы сравнения (ОА) и контроля. Однако если больные РА характеризовались максимально выраженным уровнем относительной экспрессии СЭФР, значимо превышающим таковой у больных ОА и в контроле, то между ОА и контролем значимых различий выявить не удалось. Однако мы не можем исключить наличие у лиц контрольной группы доклинической стадии ОА. Выявленные различия между РА и ОА в уровне экспрессии СЭФР хорошо соотносятся с имеющимися данными литературы. У больных РА СЭФР СО относится к числу основных проангиогенных цитокинов, вовлеченных в процесс формирования паннуса и, соответственно, опосредующих процессы деструкции. Были выявлены взаимосвязи между сывороточным уровнем данного цитокина и параметрами активности РА [19].

При ОА отмечалось повышение содержания СЭФР в хрящевой ткани и биоптатах СО [20]. При этом у больных ОА экспрессия СЭФР коррелировала с интенсивностью воспалительной инфильтрации СО, и была отмечена способность данного цитокина индуцировать выработку матриксных металлопротеиназ.

Выявленные различия хемокинового/цитокинового профиля биоптатов СО позволили нам рассчитать параметры ДЧ и ДС исследованных биомаркеров. Было показано, что при установленном ДП наибольшее значение для подтверждения диагноза РА имеют RANTES, ХВК1 и CXCR5. При использовании описанных групп сравнения и контроля их диагностическая информативность не уступала традиционно применяемым серологическим маркерам.

Заключение

В настоящей работе при исследовании СО больных РА отмечалось значимое повышение экспрессии мРНК RANTES, ИЛ8, ИЛ17, ХВК1 и рецептора CXCR5, в сравнении с больными ОА и контрольной группой. Уровень экспрессии мРНК ФПСК1 у больных РА и ОА значимо не различался, но существенно превышал содержание этого показателя у лиц группы контроля. Эти данные указывают на уникальность спектра хемокинов и цитокинов, экспрессируемых в СО при РА.

Повышенная относительная экспрессия мРНК RANTES (ДП 0,0350), ХВК1 (ДП 0,0184) и CXCR5 (ДП 0,0000604) в биоптатах СО является биомаркером РА, характеризующимся высокими ДЧ и ДС. Эти показатели могут быть использованы в качестве дополнительных признаков для дифференциальной диагностики РА и ОА, осложненного вторичным синовитом.

У больных ОА выявлен повышенный уровень относительной экспрессии мРНК ФПСК1 в СО, что потенциально может свидетельствовать об участии аутоиммунного компонента (В-клеточного звена) в его патогенезе.

Прозрачность исследования

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каратеев ДЕ, Александрова ЕН, Демидова ИВ и др. Антицитруллиновые антитела и данные магнитно-резонансной томографии суставов кисти у больных ранним артритом. *Терапевтический архив*. 2008;80(10):72-6 [Karateev DE, Aleksandrova EN, Demidova IV, et al. Anticitrullin antibodies and data of magnetic resonance imaging of hand joints in patients with early arthritis. *Terapevticheskii arkhiv*. 2008;80(10):72-6 (In Russ.)].
2. Жебрун ДА, Тотолян АА, Маслянский АЛ и др. Синтез ангиогенных и ангиостатических СХС-хемокинов и их рецепторов в синовиальной оболочке при ревматоидном артрите. Цитокины и воспаление. 2014;13(2):39-44 [Zhebrun DA, Totolyan AA, Maslyanskiy AL, et al. Synthesis of endogenous angiostatic and CXC chemokines and their receptors in synovium in rheumatoid arthritis. *Tsitokiny i vospalenie*. 2014;13(2):39-44 (In Russ.)].
3. Altman R, Asch E, Bloch D, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum*. 1986;29(8):1039-49. doi: 10.1002/art.1780290816
4. Жебрун ДА, Маслянский АЛ, Титов АГ и др. Определение мРНК ангиогенных и ангиостатических хемокинов и их рецепторов в синовиальной оболочке методом количественной ПЦР в реальном времени. Медицинская иммунология. 2013;15(6):525-34 [Zhebrun DA, Maslyanskiy AL, Titov AG, et al. Determination of mRNA of angiogenic and angiostatic chemokines and their receptors in the synovium by quantitative real-time PCR. *Meditsinskaya immunologiya*. 2013;15(6):525-34 (In Russ.)]. doi: /10.15789/1563-0625-2013-6-525-534
5. Corsiero E, Bombardieri M, Manzo A, et al. Role of lymphoid chemokines in the development of functional ectopic lymphoid structures in rheumatic autoimmune diseases. *Immunol Lett*. 2012;145(1-2):62-7. doi: 10.1016/j.imlet.2012.04.013
6. Kokebie R, Aggarwal R, Lidder S, et al. The role of synovial fluid markers of catabolism and anabolism in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and asymptomatic organ donors. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(2):R50. doi: 10.1186/ar3293
7. Маслянский АЛ, Лапин СВ, Мазинг АВ и др. Диагностическая значимость серологических маркеров ревматоидного артрита. Научно-практическая ревматология. 2012;50(5):20-4 [Maslyanskiy AL, Lapin SV, Mazing AV, et al. Diagnostic value of serological markers of rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2012;50(5):20-4 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2012-1175
8. Маслянский АЛ, Мазуров ВИ, Зоткин ЕГ и др. Анти-B-клеточная терапия аутоиммунных заболеваний. Медицинская иммунология. 2007;9(1):15-34 [Maslyanskiy AL, Mazurov VI, Zotkin EG, et al. Anti-B-cell therapy of autoimmune diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology*. 2007;9(1):15-34 (In Russ.)]. doi: 10.15789/1563-0625-2007-1-15-34
9. Humby F, Bombardieri M, Manzo A, et al. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS Med*. 2009;6(1):e1. doi: 10.1371/journal.pmed.0060001
10. Bugatti S, Manzo A, Vitolo B, et al. High expression levels of the B cell chemoattractant CXCL13 in rheumatoid synovium are a marker of severe disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(10):1886-95. doi: 10.1093/rheumatology/keu163
11. Grassi F, Cristino S, Toneguzzi S, et al. CXCL12 chemokine up-regulates bone resorption and MMP-9 release by human osteoclasts: CXCL12 levels are increased in synovial and bone tissue of rheumatoid arthritis patients. *J Cell Physiol*. 2004;199(2):244-51. doi: 10.1002/jcp.10445
12. Hansen IB, Ellingsen T, Hornung N, et al. Plasma level of CXC-chemokine CXCL12 is increased in rheumatoid arthritis and is independent of disease activity and methotrexate treatment. *J Rheumatol*. 2006;33(9):1754-9.
13. Loeuille D, Chary-Valckenaere I, Champigneulle J, et al. Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis Rheum*. 2005;52(11):3492-501. doi: 10.1002/art.21373
14. Chen B, Deng Y, Tan Y, et al. Association between severity of knee osteoarthritis and serum and synovial fluid interleukin 17 concentrations. *J Int Med Res*. 2014;42(1):138-44. doi: 10.1177/0300060513501751
15. Hampel U, Sesselmann S, Iserovich P, et al. Chemokine and cytokine levels in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fluid. *J Immunol Methods*. 2013;396(1-2):134-9. doi: 10.1016/j.jim.2013.08.007
16. Borzi RM, Mazzetti I, Macor S, et al. Flow cytometric analysis of intracellular chemokines in chondrocytes in vivo: constitutive expression and enhancement in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett*. 1999;455(3):238-42. doi: 10.1016/S0014-5793(99)00886-8
17. Kanbe K, Takagishi K, Chen Q. Stimulation of matrix metalloproteinase 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cell-derived factor 1 and CXC chemokine receptor 4. *Arthritis Rheum*. 2002;46(1):130-7. doi: 10.1002/1529-0131(200201)46:1<130::AID-ART10020>3.0.CO;2-D
18. Lisignoli G, Cristino S, Toneguzzi S, et al. IL1beta and TNFalpha differently modulate CXCL13 chemokine in stromal cells and osteoblasts isolated from osteoarthritis patients: evidence of changes associated to cell maturation. *Exp Gerontol*. 2004;39(4):659-65. doi: 10.1016/j.exger.2003.09.030
19. Lee SS, Joo YS, Kim WU, et al. Vascular endothelial growth factor levels in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2001;19(3):321-4.
20. Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, et al. Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(8):2173-7. doi: 10.1002/art.11094