

rheumatoid arthritis (RA).

Results and discussion. *The synovial fluid levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , OPG, and RANKL were studied in 54 RA patients who were seropositive for rheumatoid factor and cyclic citrullinated peptide. Differences were found in the levels of the study cytokines in patients with a varying duration of the disease.*

Conclusion. *Rituximab was observed to be highly effective in correcting cytokine parameters in early RA.*

Key words: *proinflammatory cytokines, rituximab, rheumatoid arthritis*

Ревматоидный артрит (РА) относится к числу наиболее распространенных и тяжелых заболеваний суставов. Распространенность РА составляет 0,6–1,4% населения, заболевание характеризуется упорным прогрессирующим течением, сложными патогенетическими механизмами, гетерогенностью клинико-иммунологических форм. В отсутствие адекватного лечения инвалидизация пациентов может наступить в первые годы заболевания. Так, в первые 3 года болезни трудоспособность утрачивают примерно 35% больных, а через 5 лет – более половины [1].

При этом на стандартную терапию базисными противовоспалительными препаратами (БПВП) удовлетворительно отвечают только 50–60% больных [2]. Таким образом, около половины пациентов оказываются резистентными к БПВП. Возможности лечения РА значительно расширились с появлением генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП).

Внедрение ГИБП в клиническую практику позволяет не только купировать симптомы заболевания, но и сдерживать развитие эрозивного процесса в суставах, улучшать функциональный статус и качество жизни пациента, увеличивать продолжительность жизни до популяционного уровня [3]. Среди широкого спектра ГИБП, применяющихся для лечения РА, важное место занимает ритуксимаб (РТМ). Он представляет собой химерные моноклональные антитела к мембранному CD 20 антигену В-клеток, вызывающие деплецию различных субпопуляций В-клеток, играющих фундаментальную роль в иммунопатогенезе РА и других аутоиммунных заболеваний [2]. Результаты рандомизированных плацебоконтролируемых исследований (РПКИ) свидетельствуют о высокой клинической эффективности РТМ при РА [4]. Достоинством ГИБП служит селективное воздействие на определенные звенья иммунопатогенеза РА. Важно отметить, что РА является гетерогенным с точки зрения патогенетических механизмов заболеванием. В последние годы большое внимание уделяется изучению действия интерлейкинов на клетки, участвующие в костеобразовании, и иммунокомпетентные клетки, причастные к регуляции остеогенеза. Значительный прогресс в понимании остеокластогенеза, процессов костной резорбции при РА был достигнут с открытием новых членов семейства фактора некроза опухоли (ФНО), их лигандов и рецепторов (рецептор активации ядерного фактора каппа В – RANK; лиганд RANK – RANKL; остеопротегерин – ОПГ), являющихся молекулярными посредниками многих регуляторов и играющих ключевую роль в формировании, дифференцировке и активности остеокластов [5]. Изучение влияния ГИБП на указанные звенья патогенеза РА является актуальным направлением исследований, поскольку может способствовать оптимизации терапии.

Цель – изучение динамики содержания ОПГ, RANKL и провоспалительных цитокинов: интерлейкинов (ИЛ) 1 β и 6, ФНО α – в синовиальной жидкости у больных РА под влиянием терапии РТМ.

Материал и методы. Обследовано 54 пациента с серопозитивным по ревматоидному фактору и антителам к циклическому цитруллинированному пептиду РА, с умеренной и высокой активностью. Длительность заболевания составляла от 9 мес до 2 лет, средний возраст больных 36,2 \pm 6,5 года. Группа контроля включала 20 здоровых лиц в возрасте 38,5 \pm 4,3 года. Критериями включения пациентов в исследование явились: серопозитивный РА с умеренной и высокой степенью активности; наличие показаний и отсутствие противопоказаний к применению БПВП; наличие информированного согласия пациента о включении в исследование. Критериями исключения пациентов из исследования явились: минимальная активность РА; инфекционные процессы любой локализации; сахарный диабет. Диагноз РА устанавливался в соответствии с критериями ACR/EULAR (2010). Общая активность РА и функциональный класс (ФК) регистрировались в соответствии с классификацией РА, принятой на пленуме Ассоциации ревматологов России в 2007 г. Количественная оценка активности РА проводилась с использованием индекса DAS 28 (Disease Activity Score) [6]. Для оценки эффективности терапии использовались критерии EULAR, основанные на динамике индекса DAS 28. Определение показателей цитокинового статуса, уровня ОПГ, RANKL в синовиальной жидкости проводилось до начала лечения, спустя 4 и 16 нед после курса терапии. Синовиальную жидкость получали при пункции коленных суставов. Все больные были рандомизированы на две группы: первую группу (n=18) составили пациенты с ранним РА (длительность заболевания до 12 мес), вторую (n=36) – больные с развернутой стадией РА (длительностью от 1 года до 2 лет). РТМ вводили внутривенно капельно по 1000 мг/сут в соответствии с рекомендуемой схемой (0-я, 2-я недели) на фоне приема метотрексата в дозе 12,5 \pm 2,5 мг/нед. Уровень ОПГ в синовиальной жидкости определяли иммуноферментным методом (Biomedica, Австрия), содержание RANKL изучали методом иммуноферментного анализа (sRANKL, Biomedica, Австрия), концентрацию ИЛ 1 β , ИЛ 6, ФНО α в синовиальной жидкости больных РА оценивали с помощью тест-систем Pro Con (НПО «Протеиновый контур», Санкт-Петербург). Статистический анализ проводился с использованием программы Statistica 6.0. Применялись методы описательной статистики: параметрические и непараметрические.

Результаты и обсуждение. Исследование исходного уровня провоспалительных цитокинов в синовиальной жидкости больных РА показало достоверное увеличение их содержания в сравнении с показателями здоровых людей (табл. 1, 2). При длительности болезни менее 12 мес (ранний РА) имел место более высокий уровень ФНО α , ИЛ 1 β , а концентрация ИЛ 6 была ниже, чем при развернутой стадии РА (см. табл. 1, 2). Известно, что ИЛ 1 β и ФНО α могут инициировать воспаление и разрушение костной и хрящевой ткани [7]. Под влиянием ИЛ 1 β хондроциты вырабатывают собственные провоспалительные медиаторы, а также повышенное количество оксида азота, приводящего к гибе-

Таблица 1

Влияние терапии на показатели цитокинового статуса в синовиальной жидкости больных с ранним ревматоидным артритом ($M \pm SD$)

Группы обследованных	№ п/п	Показатели				
		ФНО α , пг/мл	ИЛ 1 β , пг/мл	ИЛ 6, пг/мл	ОПГ, пмоль/л	RANKL, пмоль/л
Группа контроля (n=20)	1	35,2 \pm 4,6	16,1 \pm 6,3	6,2 \pm 0,9	20,2 \pm 3,6	12,2 \pm 1,9
Больные РА с длительностью заболевания до 12 мес (n=18):						
до лечения	2	498,4 \pm 13,7* ¹	354,7 \pm 12,3* ¹	298,5 \pm 9,1* ¹	97,3 \pm 4,1* ¹	168,9 \pm 6,6* ¹
через 4 нед	3	256,2 \pm 11,4* ¹⁻²	213,5 \pm 7,8* ¹⁻²	202,7 \pm 6,7* ¹⁻²	46,4 \pm 2,8* ¹⁻²	64,0 \pm 4,3* ¹⁻²
через 16 нед	4	42,1 \pm 3,8* ²⁻³	19,8 \pm 4,1* ²⁻³	10,7 \pm 2,8* ²⁻³	24,1 \pm 1,4* ²⁻³	16,4 \pm 2,7* ²⁻³

Примечание. Здесь и в табл. 2: звездочкой отмечены достоверные различия ($p < 0,05$), цифры рядом со звездочкой обозначают, по отношению к показателям какой группы эти различия достоверны.

Таблица 2

Влияние терапии на показатели цитокинового статуса в синовиальной жидкости больных при развернутой стадии ревматоидного артрита ($M \pm SD$)

Группы обследованных	№ п/п	Показатели				
		ФНО α , пг/мл	ИЛ 1 β , пг/мл	ИЛ 6, пг/мл	ОПГ, пмоль/л	RANKL, пмоль/л
Группа контроля (n=20)	1	35,2 \pm 4,6	16,1 \pm 6,3	6,2 \pm 0,9	20,2 \pm 3,6	12,2 \pm 1,9
Больные РА с длительностью заболевания до 12 мес (n=18):						
до лечения	2	426,5 \pm 14,8* ¹	288,4 \pm 14,7* ¹	334,5 \pm 13,1* ¹	88,6 \pm 8,8* ¹	268,3 \pm 11,4* ¹
через 4 нед	3	305,4 \pm 10,2* ¹⁻²	229,0 \pm 8,3* ¹⁻²	273,6 \pm 4,7* ¹⁻²	47,6 \pm 4,9* ¹⁻²	106,5 \pm 7,8* ¹⁻²
через 16 нед	4	58,0 \pm 13,2* ¹⁻³	58,6 \pm 12,2* ¹⁻³	71,6 \pm 9,8* ¹⁻³	35,4 \pm 2,6* ¹⁻³	22,8 \pm 3,8* ¹⁻³

ли хрящевых клеток. ФНО α и ИЛ 1 β обладают синергической и самоиндуцирующей активностью, потенцируют развитие синовиита с лейкоцитарной инфильтрацией сустава. Эти цитокины усиливают экспрессию молекул адгезии (ICAM 1, VCAM 1) на мембранах эндотелия сосудов синовиальной оболочки, индуцируют синтез хемотаксических факторов, стимулируют продукцию фактора роста фибробластов, вызывая тем самым прогрессирование деструкции суставов [8]. ИЛ 1 β и ФНО α являются мощными индукторами синтеза ИЛ 6, который потенцирует эффекты ключевых медиаторов воспаления в синовиальной оболочке, запуская деструктивные процессы в суставах, стимулирует остеокластогенез и вместе с другими цитокинами (ИЛ 1 β и ФНО α) способствует развитию костной и хрящевой деструкции сустава, прогрессированию заболевания [9]. Одним из установленных в последние годы свойств цитокинов провоспалительного действия является способность индуцировать дисбаланс в системе трансмембранных рецепторов RANKL/RANK/ОПГ, обеспечивающих процессы межклеточного взаимодействия в костной ткани [10]. В нашей работе выявлено повышение уровня ОПГ (91,7 \pm 5,2 пмоль/л) в синовиальной жидкости больных РА в сравнении с контрольной группой (20,2 \pm 3,6 пмоль/л; $p < 0,05$). Наиболее высокое его содержание отмечалось при длительности заболевания менее 12 мес (97,3 \pm 4,1 пмоль/л; $p < 0,05$). Определение RANKL показало высокую концентрацию данного цитокина в синовиальной жидкости больных с ранним РА (168,9 \pm 6,6 пмоль/л; $p < 0,05$), которая, однако, была достоверно ниже в сравнении с уровнем RANKL при развернутой стадии заболевания (268,3 \pm 11,4 пмоль/л; $p < 0,05$). RANKL – трансмембранный лиганд, являющийся мощным индуктором остеокластогенеза. К настоящему времени получены данные о присутствии RANKL на поверхности клеток, выделенных из паннуса больных РА. При этом в нормальной синовиальной оболочке экспрессия

RANKL отсутствует. Под влиянием RANKL в остеокласты трансформируются синовиальные макрофаги, что потенцирует процессы резорбции костной ткани [5]. ОПГ – гликопротеин, широко экспрессированный в различных тканях, является мощным ингибитором костной резорбции. ОПГ действует на RANKL как «ложный» рецептор, ингибируя таким образом формирование остеокластов и резорбцию костной ткани. Баланс RANKL/ОПГ фактически определяет количество резорбированной костной ткани [11].

Проведенное в нашей работе определение концентрации ОПГ и RANKL в синовиальной жидкости показало преимущественное повышение уровня ОПГ при раннем РА (см. табл. 1), у больных с развернутой стадией заболевания в большей степени увеличивалось содержание RANKL (см. табл. 2).

Корреляционный анализ определил наличие прямых взаимосвязей между уровнем ОПГ и содержанием в сыворотке крови ИЛ 1 β , ФНО α , ИЛ 6 ($r = 0,56$, $p < 0,05$; $r = 0,69$, $p < 0,05$; $r = 0,35$, $p < 0,05$ соответственно). Выявлена достоверная зависимость между ИЛ 6, ИЛ 1 β , ФНО α и RANKL ($r = 0,46$; $r = 0,64$; $r = 0,51$ соответственно), установленные корреляционные зависимости, вероятно, отражают один из механизмов прогрессирования РА.

Оценка эффективности терапии (по DAS 28) показала, что спустя 4 нед после курса РТМ при развернутой стадии РА у 20 (58,7%) больных отмечалась низкая активность заболевания (DAS 28 $< 3,2$); у 6 (17,6%) пациентов была достигнута ремиссия (DAS 28 $< 2,6$), умеренная активность (3,2 $<$ DAS 28 $< 5,1$) сохранялась у 8 (23,7%) больных. При раннем РА у 8 (44,5%) из 18 обследованных больных была достигнута низкая активность, у 10 (55,5%) пациентов – ремиссия.

Спустя 4 нед после проведенной терапии РТМ установлено, что снижение среднего значения ФНО α в синовиальной жидкости у больных с длительностью РА менее 12 мес составило 48,6% ($p < 0,05$), ИЛ 1 β – 39,8% ($p < 0,05$), ИЛ 6 – 32,1% ($p < 0,05$); уровень ОПГ в синовиальной жид-

кости уменьшился на 52,3% ($p < 0,05$), RANKL — на 62,1% ($p < 0,05$). При развернутой стадии РА уменьшение среднего уровня ФНО α , ИЛ 1 β , ИЛ 6 составило 28,4; 20,6 и 18,2% соответственно. Содержание ОПГ в этой группе больных снизилось на 46,3% ($p < 0,05$), RANKL — на 60,3% ($p < 0,05$).

У больных с ранним РА уровень ИЛ 1 β , ИЛ 6, ФНО α через 16 нед после терапии РТМ, достоверно не отличался от контроля; концентрация ОПГ, RANKL у больных этой группы также не превышала контрольных значений.

Спустя 16 нед после курса лечения при развернутой стадии РА отмечено увеличение количества больных с низкой активностью (DAS 28 $< 3,2$) до 73,6% (25 человек), ремиссия заболевания (DAS 28 $< 2,6$) установлена у 8 (23,5%) больных, умеренная активность заболевания ($3,2 < \text{DAS 28} < 5,1$) сохранялась у 1 (2,9%) пациента. При раннем РА спустя 16 нед после лечения РТМ ремиссия заболевания была определена у 15 (83,4%) больных, низкая активность (DAS 28 $< 3,2$) — у 3 (16,6%) больных.

Спустя 16 нед после проведенной терапии у больных с длительностью РА более 12 мес снижение среднего значения ФНО α составило 86,4% ($p < 0,05$), ИЛ 1 β — 79,5% ($p < 0,05$), ИЛ 6 — 78,6% ($p < 0,05$), ОПГ — 60,1% ($p < 0,05$), RANKL — 91,5% ($p < 0,05$). Дисперсионный анализ выявил большую эффективность терапии РТМ при раннем РА (критерий $\chi^2 = 10,51$; $p < 0,05$) в сравнении с развернутой стадией заболевания. Таким образом, полученные результаты показали, что у больных РА имеет место существенное различие в содержании цитокинов, ОПГ и RANKL в синовиальной жидкости по сравнению со здоровыми донорами. Наиболее высокое содержание исследуемых цитокинов было определено в синовиальной жидкости у больных с развернутой стадией РА, что, по-видимому, связано с прогрессированием заболевания, формированием паннуса, увеличением зоны поражения синовиальной оболочки, хрящевой и костной ткани, измененные клетки которых являются активными продуцентами данных медиаторов [10]. При этом следует отметить, что при раннем РА (длительность заболевания менее 12 мес) зафиксирована наиболее высокая концентрация в сыворотке крови ФНО α , ИЛ 1 β , у больных с развернутой стадией заболевания — ИЛ 6, содержание которого достоверно превышало его уровень при раннем РА. Таким цитокинам, как ФНО α , ИЛ 1 β , вырабатываемым в процессе иммунного взаимодействия макрофагов и лимфоцитов в синовиальной мембране, принадлежит ведущая роль в дальнейшем акти-

вировании клеток и развитии острого воспалительного процесса в суставе [12]. Повышение содержания ФНО α и ИЛ 1 β является основным стимулом для агрессивной пролиферации синовиальных клеток. Гиперпродукция ИЛ 1 β , ИЛ 6 и особенно ФНО α приводит к дисбалансу в системе трансмембранных рецепторов и их лигандов RANKL/RANK/ОПГ, что сопровождается гиперэкспрессией RANKL, являющегося мощным индуктором костной резорбции. ОПГ служит противовесом для RANKL, соотношение RANKL/ОПГ является главной детерминантой развития и прогрессирования костно-деструктивных изменений в суставах. Экспрессия ОПГ и RANKL в тканях суставов при РА повышена [13], что, вероятно, связано с их участием в процессах деструкции костной ткани. При небольшой длительности РА преобладает продукция ОПГ, который выполняет функцию управляющего сигнала по отношению к RANKL. ОПГ является свободно перемещающимся рецептором, способным связывать RANKL и предотвращать их активизирующее взаимодействие с RANK, направленное на стимуляцию резорбционной активности остеокластов [11]. На этой стадии процесс может блокироваться или тормозиться ОПГ. Прогрессирование заболевания, формирование паннуса при развернутой стадии РА сопряжено с гиперпродукцией ИЛ 1 β , ФНО α и особенно ИЛ 6, способных стимулировать экспрессию RANKL различными клетками, снижать продукцию ОПГ; таким образом развивается дисбаланс в системе иммунных медиаторов, что способствует активации остеокластов и деструкции костной ткани [5]. Выявленные в нашем исследовании различия в содержании изучаемых цитокинов у больных с различной длительностью РА, по всей видимости, обусловлены их свойствами, установленными в экспериментальных моделях, на которых было показано, что ФНО α в большей степени ответствен за острое воспаление суставов, ИЛ 1 β — за клеточную инфильтрацию и деструкцию хряща, а ИЛ 6 способствует хронизации процесса, стимулируя остеокластогенез, деструкцию костной и хрящевой ткани [12].

Отмечалась высокая клиническая эффективность терапии РТМ, что подтверждает результаты исследований других авторов [14].

Наиболее благоприятные результаты наблюдались при раннем РА, что указывает на целесообразность раннего применения РТМ, поскольку позволяет рассчитывать на достижение ремиссии и улучшение прогноза заболевания.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- Насонов Е.Л. Ревматоидный артрит как общемедицинская проблема. *Терапевт* 2004;5:5–7.
- Насонов Е.Л., Чичасова Н.В. Рациональная терапия ревматоидного артрита. М., 2010;223 с.
- Насонов Е.Л., Каратеев Д.Е. и др. Современные стандарты фармакотерапии ревматоидного артрита. *Клин фармакол и тер* 2005;14(1):72–5.
- Потанин Т.К. Ревматоидный артрит. Новые данные о старой болезни. М., 2007;68 с.
- Шостак Н.А., Тимофеев В.Т. Кардиоваскулярные нарушения и остеопороз у больных ревматоидным артритом. *Здоровье Украины* 2009;24:26–8.
- Prevoe M.L.L., van Hoff A., Kuper H.N. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. *Arthr Rheum* 1995;38:44–52.
- Tracey D., Klareskog L., Sasso E.H. et al. Tumor necrosis factor antagonists mechanisms of actions: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2008;117:244–79.
- Бадюкин В.В. Избранные лекции по клинической ревматологии. Под ред. В.А. Насоновой, Н.В. Бунчука. М., 2003;82–90.
- Antoni C., Krueger G.G., de Vlam K. et al. Infliximab improves signs and symptoms of psoriatic arthritis: results of IMPACT 2 trial. *Ann Rheum Dis* 2005;64:197–200.
- Насонова В.А. Ревматология. М.: Медицина, 2008;457 с.
- Pettit A.R., Walsh N.C., Manning C. et al. RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2006;45:1068–76.
- Сигидин Я.А., Лукина Г.В. Биологическая терапия в ревматологии. 2-е изд., доп. М.: Практическая медицина, 2009;302 с.
- Lee C.K., Lee E.Y., Chung S.M. Effects of disease modifying antirheumatic drugs and antiinflammatory cytokines on human osteoclastogenesis through interaction with receptor activator of nuclear factor Kappa B ligand. *Arthr Rheum* 2004;50(12):3831–43.
- Насонов Е.Л. Применение ингибиторов фактора некроза опухоли при РА: место этанерцепта. *Науч-практич ревматол* 2008;5:1–20.

Поступила 15.04.2011