

УДК 616.72-002.77-085.276:612.017:546.172.6-31

А.И. Дубиков¹, Е.Э. Медведь¹, Л.А. Белоголовых¹, И.Э. Гришина¹, О.А. Любарская¹, Е.А. Борисенко²

¹ Городская клиническая больница № 2 (г. Владивосток), ² Владивостокский государственный медицинский университет

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

Ключевые слова: ревматоидный артрит, оксид азота, цитокины, метотрексат.

Обследовано 94 пациента (87 женщин и 7 мужчин) с достоверным ревматоидным артритом в возрасте от 20 до 60 лет. Больные получали метотрексат в дозе 20 мг 1 раз в неделю внутримышечно. Проводили количественное определение интерлейкинов 1 β , 6, 10 и фактора некроза опухоли-альфа в сыворотке крови и синовиальной жидкости, а также спектрофотометрическое исследование метаболитов оксида азота в тех же средах и моче. Повышенное содержание цитокинов и метаболитов оксида азота обнаружено только в синовиальной жидкости и моче больных (за исключением интерлейкина-6). Лечение метотрексатом сопровождалось увеличением уровней интерлейкина-1, фактора некроза опухоли-альфа и метаболитов оксида азота в периферическом кровотоке. В синовиальной жидкости произошло многократное снижение концентрации этих показателей. Можно предполагать, что увеличение продукции метаболитов оксида азота клетками синовиальной среды сустава носит провоспалительный характер и имеет тесную взаимосвязь с цитокиновой дисрегуляцией, опосредуя аутоиммунное воспаление.

Введение. Патогенетическая терапия ревматоидного артрита (РА) представляет собой сложную задачу. Существующие представления о развитии аутоиммунного воспаления при РА отводят большую роль цитокиновому дисбалансу в патогенезе заболевания [1, 4, 5]. Активно изучается роль оксида азота в реализации воспаления при РА, но полученные данные носят крайне противоречивый характер и не позволяют конкретизировать патогенетическую роль этого соединения [6, 10]. Отсутствие целостной концепции патогенеза не позволяет решить вопрос о полном контроле над процессами деструкции костной ткани при РА. Кроме того, не до конца ясны механизмы реализации фармакодинамических эффектов базисных препаратов. К проблемам, связанным с фармакотерапией РА, относятся первичная резистентность, неудовлетворительные результаты применения ранее эффективных лекарственных средств, развитие побочных реакций [4]. В большинстве случаев не более одной трети больных могут продолжать лечение одним и тем же базисным препаратом более четырех лет [2], что диктует необходимость разработки новых методов фармакотерапии, дальнейшего исследования механизмов действия уже известных препаратов, определения маркеров для оценки эффективности лечения. Цель настоящей работы — оценить цитокиновый профиль и характер метаболизма оксида азота у больных РА и установить значение этих соединений в реализации фармакодинамических эффектов метотрексата.

Материал и методы. Обследовано 94 больных (87 женщин и 7 мужчин) в возрасте от 20 до 60 лет, диагноз

РА у которых соответствовал критериям Американской ревматологической ассоциации (1987). Во всех случаях зарегистрирован «классический» РА, активность которого сохранялась, несмотря на применение нестероидных противовоспалительных препаратов. Критерии включения пациентов в исследование: 1) признаки активной фазы заболевания; 2) наличие показаний для базисной терапии; 3) отсутствие противопоказаний для применения базисных средств; 4) отсутствие базисной терапии в течение двух предшествующих месяцев; 5) подобранная противовоспалительная терапия — прием внутрь нестероидных противовоспалительных средств в стабильной дозе в течение не менее чем 2 недель; 6) отсутствие нарушений когнитивных функций.

Больных условно разделили на 2 группы: с «ранним» РА (средняя длительность заболевания 18 мес.) и «поздним» РА (длительность заболевания более 3 лет) [11]. Наличие эрозий в костных структурах, образовавшихся по истечении 24 мес. от начала заболевания, определяло эрозивный вариант течения болезни [15]. Артрит был серопозитивен по ревматоидному фактору в 100% случаев. Для характеристики активности воспаления использовался комбинированный индекс активности болезни DAS 28 [14]: активность в 46,7% случаев оказалась средней, в 53,3% случаев — высокой. Длительность заболевания варьировала от 6 месяцев до 10 лет и более. Рентгенологическая стадия РА определялись по классификации Steinbroker [3]. Распределение больных здесь выглядело следующим образом: 1-я стадия — 2,30%, 2-я стадия — 27,35%, 3-я стадия — 46,25%, 4-я стадия — 24,10%. Недостаточность суставов оценивали по классификации Американской коллегии ревматологов (пересмотр 1992 г.): преобладали 2-й и 3-й функциональный классы недостаточности. В исследуемых группах исходно не было статистически значимых различий в клинических и демографических показателях. Контролем послужили результаты обследования 20 здоровых доноров.

В связи с наличием клинико-лабораторной активности заболевания 63 больным была назначена базисная терапия метотрексатом в дозе 20 мг 1 раз в неделю внутримышечно. Оценка эффективности препарата проводилась через 6 месяцев после начала лечения с использованием индекса DAS 28. До лечения определяли содержание цитокинов в образцах сыворотки крови и пробах синовиальной жидкости методом твердофазного иммуноферментного анали-

за с использованием наборов BioSource International для интерлейкинов (IL) 1 β , 6, 10 и фактора некроза опухоли-альфа (TNF α). В тех же биологических жидкостях и моче спектрофотометрически определяли нитрат- и нитрит-ионы.

Информационное согласие было получено от всех пациентов. Работа утверждена независимым междисциплинарным этическим комитетом ВГМУ. Статистическая обработка полученных цифровых данных проводилась с использованием программы «Статистика 2».

Результаты исследования. При иммуноферментном анализе в синовиальной жидкости у больных РА было обнаружено существенное увеличение концентрации цитокинов (табл. 1). В то же время их уровень в сыворотке крови не превышал показателей здоровых доноров, за исключением IL-6. Обращало на себя внимание то, что значительно повышенная концентрация последнего в системном кровотоке и в синовиальной жидкости обеспечивалась в основном за счет группы «позднего» артрита. Это подтверждает тезис о роли IL-6 как мессенджера в хронизации воспалительного процесса при РА [12]. Повышение концентрации IL-1 в синовиальной жидкости обнаружено только на ранних стадиях заболевания. Уровень TNF α характеризовался высокими показателями, особенно в динамике у пациентов с «поздним» РА, имевшим длительный анамнез. В синовиальной жидкости обследованных обнаружено увеличение концентрации IL-10, которая еще больше повышалась на фоне успешной терапии (табл. 1,2).

Обнаружена статистически значимая обратная корреляционная связь ($r = -0,67$) уровня IL-10 и количественного показателя ревматоидного фактора. Этот факт позволяет объяснить более агрессивное течение серопозитивного варианта РА. Эрозивный артрит характеризовался более высокой концентрацией IL-10 в синовиальной жидкости. Кроме того, прослеживалась прямая корреляционная связь концентрации IL-10 с рентгенологической стадией артрита ($r=0,58$, $p<0,05$).

В сыворотке крови больных РА не выявлено повышения уровня метаболитов оксида азота (табл. 3). Другой паттерн экспрессии метаболитов этого соединения был обнаружен в синовиальной жидкости — их концентрация значительно превосходила контрольные показатели. Экскреция исследуемых метаболитов с мочой также была выше у больных РА. Эрозивный вариант артрита отличался более высоким содержанием нитритов на локальном уровне, что предполагает активное участие оксида азота в потенцировании деструктивных процессов при РА.

Метотрексат продемонстрировал большую эффективность при лечении «раннего» артрита. Влияние его на цитокиновый профиль носило разнонаправленный характер. Концентрация IL-1 и TNF α в сыворотке крови увеличилась, в то время как в синовиальной жидкости происходило ее значительное уменьшение. Интересно, что уровень TNF α возростал

Таблица 1

Цитокиновый профиль у больных РА, $M \pm m$

Цитокин		Содержание, пг/мл	
		контроль	РА
Сыворотка крови	IL-1	1,65 \pm 0,03	0,86 \pm 0,17
	IL-6	2,47 \pm 0,03	60,22 \pm 3,40 ¹
	IL-10	0,21 \pm 0,02	0,50 \pm 0,23
	TNF α	2,17 \pm 0,07	3,69 \pm 1,18
Синовиальная жидкость	IL-1	1,95 \pm 0,91	10,06 \pm 2,28 ¹
	IL-6	3,48 \pm 1,12	1431,77 \pm 110,96 ¹
	IL-10	1,11 \pm 1,02	7,26 \pm 1,18 ¹
	TNF α	4,12 \pm 2,03	150,59 \pm 15,61 ¹

¹ Различие с контролем статистически значимо ($p<0,05$).

Таблица 2

Цитокиновый профиль у больных РА на фоне лечения метотрексатом, $M \pm m$

Цитокин		Содержание при РА, пг/мл	
		до лечения	после лечения
Сыворотка крови	IL-1	0,69 \pm 0,16 ¹	1,77 \pm 0,73
	IL-6	80,59 \pm 35,17	53,96 \pm 27,17
	IL-10	0,25 \pm 0,17	0,31 \pm 0,24
	TNF α	3,40 \pm 1,47	31,94 \pm 8,37 ^{1,2}
Синовиальная жидкость	IL-1	11,12 \pm 3,36	0,65 \pm 0,12 ²
	IL-6	1446,76 \pm 124,84 ¹	1820,34 \pm 23,65 ¹
	IL-10	7,68 \pm 1,43	43,80 \pm 2,62 ^{1,2}
	TNF α	164,51 \pm 18,45 ¹	25,50 \pm 3,76 ^{1,2}

¹ Разница статистически значима ($p<0,05$) по сравнению с контролем (см. табл. 1).

² Разница с показателями до лечения статистически значима.

только за счет «эрозивного» РА. Лечение метотрексатом сопровождалось повышением уровня метаболитов оксида азота в периферическом кровотоке, в то время как в синовиальной жидкости произошло значительное снижение этих показателей (табл. 4). Ранний артрит характеризовался более выраженной регрессией количества нитратов на локальном уровне.

Обсуждение полученных данных. Наше исследование показало, что у больных ревматоидным артритом существенное различие в уровне цитокинов и метаболитов оксида азота в сравнении со здоровыми донорами имеет место лишь в синовиальной жидкости (за исключением IL-6). Хотя повышение концентрации TNF α в системном кровотоке не отразилось на противовоспалительной эффективности метотрексата, оно наряду с увеличением уровня IL-1 может быть связано с развитием вторичной резистентности к метотрексату. Повышение концентрации IL-10 в полости сустава на фоне лечения, по-видимому, направлено на урегулирование дисбаланса между Т-хелперами 1-го и 2-го типов и цитокинами [9].

Особый интерес представляет динамика уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови под влиянием метотрексата. Известно, что этот препарат реализует свой противовоспалительный эффект посредством

Таблица 3
Метаболиты оксида азота у больных РА, М±т

Метаболит		Содержание, мкМ/мл	
		контроль	РА
Сыворотка крови	NO ²⁻	1,30±0,11	2,46±0,33
	NO ³⁻	1,17±0,08	1,13±0,24
	NO ^x	2,47±0,10	3,54±0,48 ¹
Моча	NO ²⁻	1,12±0,31	9,19±1,25
	NO ³⁻	0,58±0,09	15,06±3,0 ¹
	NO ^x	1,71±0,12	24,25±3,07 ¹
Синовиальная жидкость	NO ²⁻	1,08±0,07	9,35±1,34 ¹
	NO ³⁻	0,58±0,04	8,64±3,56
	NO ^x	1,66±0,11	17,99±3,41 ¹

¹ Различие с контролем статистически значимо (p<0,05).

Таблица 4
Метаболиты оксида азота при лечении метотрексатом, М±т

Метаболит		Содержание, мкМ/мл	
		до лечения	после лечения
Сыворотка крови	NO ²⁻	2,44±0,68	3,33±0,59
	NO ³⁻	1,13±0,28	2,01±0,58
	NO ^x	3,49±0,54	5,35±0,95
Моча	NO ²⁻	9,31±1,66 ¹	14,21±1,07 ¹
	NO ³⁻	15,55±3,75 ¹	20,34±2,23 ¹
	NO ^x	24,86±4,01 ¹	34,45±1,75 ¹
Синовиальная жидкость	NO ²⁻	7,94±1,46 ¹	2,56±0,54 ²
	NO ³⁻	12,22±6,21 ¹	0,23±0,02
	NO ^x	20,16±4,47 ¹	2,79±1,23 ²

¹ Разница статистически значима (p<0,05) по сравнению с контролем (см. табл. 3).

² Разница с показателями до лечения статистически значима.

аденозина, который при взаимодействии со своими рецепторами становится мощным эндогенным противовоспалительным медиатором [8]. В ходе последних клинических исследований обнаружено, что аденозин индуцирует выработку оксида азота эндотелиальными клетками [13]. Другие авторы также доказали, что аденозининдуцированная вазодилатация вызывается повышением нитроксидпродукции эндотелием [7]. В своих выводах авторы упомянутых работ указывают, что эндотелиальная пуриnergическая рецепторная стимуляция может прямо индуцировать продукцию оксида азота в артериях, что оказывает кардиопротективный эффект.

Заключение

Дисбаланс цитокинов при РА проявляется только на локальном уровне. Влияние метотрексата на цитокиновый профиль и уровень метаболитов оксида азота различается и на локальном, и на системном уровнях. Эволюция ревматоидного артрита характеризуется различной картиной цитокинового профиля синовиальной жидкости. Можно предполагать, что увеличение продукции метаболитов оксида азота клетками синовиальной среды сустава носит провоспалительный характер и имеет тесную взаимосвязь с цитоки-

новой дисрегуляцией, опосредуя аутоиммунное воспаление.

Литература

1. Агеев В.А., Алекберова З.С., Габибов А.Г. и др. // Тер. архив. - 2004. - № 12. - С. 83-87.
2. Насонов Е.Л. // РМЖ. - 2004. - Т. 12, № 20. - С. 64-73.
3. Насонова В.А., Лайне В. Ревматоидный артрит. — М.: Медицина, 1983.
4. Чичасова Н.В. // Заседание московской школы ревматологов. — 2003. — № 1. — С. 2—6.
5. Aita T., Harada S., Kawashima M. et al. // Rheum. Intern. - 2001. - Vol. 20, No. 2. - P. 49-54.
6. Beri Alpina, Gupta Anju, Singh Surjit et al. // Rheum. Intern. - 2004. - Vol. 24, No. 5. - P. 264-266.
7. Bottcher M., Buus N., Hermansen F. et al. // Circulation. - 2001. - Vol. 104. - P. 2305-2310.
8. Chan Edwin S.L., Bruce N. Cronstein // Arthritis Res. — 2002. - No. 4. - P. 10-18.
9. Constantin A., Loubet-Lescoulie P., Lambert N. // Arthritis Rheum. - 1998. - Vol. 41. - P. 48-57.
10. Hirai Y., Migita K. // Life Sci. - 2001. - Vol. 68. - P. 913-912.
11. Nell V.P. // Rheum. (Oxford). - 2004. - Vol. 43, No. 7. - P. 906-914.
12. Nishimoto N., Kishimoto T. // Curr. Opin. Pharmacol. — 2004. - No. 4. - P. 386-391.
13. Steinert J. R., Wheeler-Jones C.P.D., Wyatt A.W. et al. // Faseb. J. - 2002. - Vol. 16. - P. 1584-1594.
14. Van't Hof M.A., Kuper H.H., Prevoe M.L.L. et al. // Arthr. Rheum. - 1995. - No. 38. - P. 44-48.
15. Vencovsky J., Machacek S. // Ann. Rheum. Dis. — 2003. - Vol. 62, No. 5. - P. 427-430.

Поступила в редакцию 04.06.2008.

INFLUENCE OF METOTREXATE ON CYTOKINE STRUCTURE AND METABOLISM OF THE NITROGEN OXIDE AT PATIENTS WITH THE RHEUMATOID ARTHRITIS

A.I. Dubikov I, E.E. Medved' I, L.A. Belogolovyh I, I.E. Grishina I O.A. Lyubarskaya I, E.A. Borisenko²

¹ City Hospital No. 2 (Vladivostok), ² Vladivostok State Medical University

Summary — 94 patients (87 women and 7 men) with authentic rheumatoid arthritis in the age from 20 till 60 years are surveyed. Patients received metotrxate in a doze of 20 mg once a week intramuscularly. The quantitative definition of IL 1β, 6, 10 and the tumor necrosis alpha- factor in blood and synovial liquid and also spectrophotometric research of the nitrogen oxide metabolites in the same environments and urine. The increased content of the cytokines and nitrogen oxide metabolites is revealed only in synovial liquid and urine of patients (except IL6). Treatment by metotrxate was accompanied by increase in IL1 level, the tumor necrosis alpha-factor and nitrogen oxide metabolites in a peripheral blood. In synovial liquid there was a repeated decrease in concentration of these parameters. It is possible to assume, that the increase in production of the nitrogen oxide metabolites by synovial cells of a joint has some proinflammatory character and has close interrelation with cytokine dysregulation and auto immune inflammation. **Key words:** rheumatoid arthritis, nitrogen oxide, cytokine, metotrexate.