

## СОСТОЯНИЕ TH2 КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ С И БЕЗ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОГО ПОРАЖЕНИЯ ЛЕГКИХ

Бестаев Д.В., Новиков А.А., Насонов Е.Л.

*ФГБНУ "НИИР им. В.А. Насоновой", г. Москва, Россия, e-mail: revmatolog@inbox.ru*

При ревматоидном артрите (РА) важной особенностью активации CD4+ Т-клеток является поляризация иммунного ответа по Th1-типу с преобладанием синтеза провоспалительных цитокинов над противовоспалительными Th2-цитокинами. Воспалительные медиаторы вносят значительный вклад в процесс инициации и прогрессирования легочного фиброза у больных РА с интерстициальным поражением легких (ИПЛ), при этом цитокины, продуцируемые Th1 и Th2-клетками обнаруживают противоположную активность в процессах фиброгенеза. Целью исследования являлось изучение уровней цитокинов, характеризующих Th2 – иммунный ответ у больных ревматоидным артритом с и без ИПЛ. Уровень ИЛ4, ИЛ5, ИЛ10, ИЛ13 сыворотки крови у больных РА с и без ИПЛ, а также здоровых доноров определяли с помощью мультиплексной технологии xMAP на анализаторе Bio-Plex200 (Bio-Rad, США). У больных РА с ИПЛ обнаружилась гиперсекреция Th2-цитокинов, которая определяет функциональное напряжение Th2-клеточного иммунитета. Возможно, дисрегуляция цитокинового обмена является ведущим фактором в патогенезе ИПЛ при РА.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, ИПЛ, Th2-клеточный иммунитет, технологии xMAP, анализатор Bio-Plex200.

## THE STATE OF TH2 CELLULAR IMMUNITY IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS WITH AND WITHOUT INTERSTITIAL LUNG DISEASE

Bestaev D.V., Novikov A.A., Nasonov E.L.

*V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, e-mail: revmatolog@inbox.ru*

Important feature of CD4+ T-cells activation in rheumatoid arthritis (RA) is the polarization of the immune response to the Th1-type pro-inflammatory cytokine synthesis with predominance of Th2-inflammatory cytokines. Inflammatory mediators contribute significantly to the process of initiation and progression of pulmonary fibrosis in RA patients with interstitial lung disease (ILD), the cytokines, which are produced by Th1 and Th2-cells reveal opposite fibrogenesis activity. The aim of the study was to investigate the levels of cytokines characterizing Th2 - immune response in patients with rheumatoid arthritis with and without ILD. The level of IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 in RA patients with and without ILD and healthy donors were determined by multiplex technology xMAP on Bio-Plex200 analyzer (BIO-Rad, USA). Hypersecretion of Th2-cytokines in patients with RA-ILD was revealed, which determines the functional stress of Th2-cell-mediated immunity. Perhaps, cytokine dysregulation exchange is the leading factor in the pathogenesis of RA-ILD.

Keywords: rheumatoid arthritis, interstitial lung disease, Th2-cell immunity, xMAP technology, Bio-Plex200 analyzer.

Ревматоидный артрит (РА) – аутоиммунное ревматическое заболевание неизвестной этиологии, при котором отмечается деструкция костной и хрящевой ткани суставов, формирование деформаций, а также широкий спектр системных проявлений (СП) [1]. По современным представлениям, развитие иммунопатологического процесса при РА характеризуется активацией клеток иммунной системы (Т- и В-лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, фибробласты), синтезом широкого спектра цитокинов, индуцирующих воспаление, деструкцию хряща и костной ткани. При РА выявляется дисбаланс между гиперпродукцией провоспалительных и противовоспалительных цитокинов с преобладанием синтеза первых над вторыми [1,2].

В иммунопатогенезе многих заболеваний существенную роль играет функциональная активность различных субпопуляций Т-клеток (Th1 и Th2 типов). Th1-клетки ответственны за клеточный иммунитет и участвуют в патогенезе аутоиммунных заболеваний, Th2-клетки поддерживают гуморальный иммунитет и развитие аллергических заболеваний [2].

Важной особенностью активации CD4 Т-клеток при РА является поляризация иммунного ответа по Th1-типу с преобладанием синтеза провоспалительных цитокинов (ИЛ 12, ИФН  $\gamma$ , ФНО  $\alpha$ , ИЛ1  $\beta$ , ИЛ 7, ИЛ 17, ИЛ 18) над противовоспалительными Th2-цитокинами (ИЛ 4, ИЛ 5, ИЛ 10, ИЛ 13) [1,2]. Th1-цитокины инициируют каскад иммунопатологических реакций, приводящих к воспалению и костной деструкции. Роль Th2-иммунного ответа в развитии РА не ясна. Получены данные о транзитном повышении концентрации Th2-цитокинов ИЛ 4 и ИЛ 13 в синовиальной жидкости больных ранним РА. Полагают, что Th2-цитокины могут препятствовать апоптозу синовиоцитов под действием оксида азота и тем самым способствовать персистенции заболевания [3].

Применение передовых технологий, таких как мультиплексный анализ цитокинов, дает возможность изучения цитокинового профиля, новых механизмов патогенеза РА и его СП [4]. Изучение роли цитокинов в развитии СП при РА является актуальной задачей в связи с разработкой и внедрением в терапевтическую практику антагонистов их провоспалительного действия – генно-инженерных биологических препаратов [5].

К СП РА относится интерстициальное поражение легких (ИПЛ). В зависимости от метода радиологического исследования легких (обзорной рентгенографии или компьютерной томографии высокого разрешения (КТВР)) выявляемость ИПЛ при РА колеблется от 5 до 70 % [6].

Развитие легочного фиброза (ЛФ) у больных РА с ИПЛ является актуальной проблемой патологии легких. Существует мнение о ключевой роли воспаления на начальном этапе развития ЛФ. Воспалительные медиаторы вносят значительный вклад в процесс инициации и прогрессирования ЛФ, при этом цитокины, продуцируемые Th1 и Th2-клетками, обнаруживают противоположную активность в процессах фиброгенеза. В литературе обсуждается важность оценки цитокинового профиля при ИПЛ, ассоциированного с РА. Изучение уровней цитокинов позволяет получать информацию о соотношении процессов активации Т-хелперов 1-го и 2-го типов, прояснить их роль в процессах фиброгенеза легких, прогнозировать дальнейшее течение и исход заболевания, а также оптимизировать терапию [7].

Таким образом, **цель нашего исследования** – изучение уровней цитокинов, характеризующих Th2 – иммунный ответ у больных РА с и без ИПЛ.

**Материал и методы.** В исследование были включены 15 больных РА с признаками ИПЛ (первая группа), 15 пациентов РА без поражения легких (вторая группа), последовательно поступивших на лечение в клинику ФГБНУ «НИИР им. В.А. Насоновой» и 15 здоровых доноров – третья группа. Диагноз РА ставился на основании критериев Американской коллегии ревматологов – ACR - 1987. Все обследуемые были сопоставимы по полу и возрасту. Большинство больных были женского пола, среднего возраста с длительным течением РА, серопозитивными по ревматоидному фактору (РФ), антителам к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП), имели высокую воспалительную активность, II-III рентгенологическую стадию, преимущественно II функциональный класс. Активность РА определялась по индексу DAS28.

Клиническая характеристика больных представлена в таблице 1.

**Таблица 1**

Клиническая характеристика больных РА с и без ИПЛ

Параметр	Больные РА с ИПЛ n=15	Больные РА без ИПЛ n=15	P
Пол: мужчины/женщины, n	4/11	4/11	
Возраст, лет, M± σ	50,4 ± 9,4	49,8 ± 10,1	НД
Длительность РА, лет, M± σ	12,6 ± 8,3	11,9 ± 7,4	НД
Внесуставные проявления РА:			
ревматоидные узлы, n	3(20%)	2(13%)	НД
полиневропатия, n	2(13%)	2(18%)	
синдром Шегрена, n	2(13%)	1(7%)	
<b>DAS28: M± σ</b>	5,53 ± 1,33	5,34 ± 1,52	НД
<b>Стадия РА; n</b>			
I	2 (13%)	2(13%)	НД
II	7 (47%)	8(53%)	НД
III	5 (33%)	4(27%)	НД
IV	1(7%)	1(7%)	НД
<b>ФК; n</b>			
I	9	10	
II	5	4	
III	1	1	
Серопозитивные по РФ, n	12(80%)	11(73%)	НД
Серопозитивные по АЦЦП, n	13(87%)	12(80%)	НД

*НД – статистическая недостоверность различий*

Уровень ИЛ 4, ИЛ 5, ИЛ 10, ИЛ 13 сыворотки крови у больных РА с и без ИПЛ, а также здоровых доноров определяли с помощью мультиплексной технологии xMAP на анализаторе Bio-Plex200 (Bio-Rad, США).

Для выявления признаков ИПЛ у больных РА проводилась компьютерная томография высокого разрешения на спиральном компьютерном томографе GE «Light Speed VCT» (с толщиной среза 0,65 мм).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft, США), включая общепринятые методы параметрического и непараметрического анализа. При сравнении параметров с нормальным распределением применялся парный t-тест для независимых выборок. Для параметров, распределение которых отличалось от нормального, при сравнении двух групп использовали критерий Манна – Уитни, а при сравнении трех и более групп – критерий Краскела – Уоллеса, результаты представлены в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом (ИР) [25-й; 75-й процентиля]. Корреляционный анализ проводили по методу Спирмена. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** В результате проведенного исследования выявлено статистически достоверное повышение концентраций ИЛ 5, ИЛ 10 у больных РА с и без ИПЛ по сравнению со здоровыми донорами (табл. 2). Концентрация ИЛ4 у пациентов РА с ИПЛ оказалась выше, чем у обследуемых из других групп, однако статистической достоверности разница достигала только по сравнению со здоровыми донорами ( $p = 0,04$ ). У больных РА с и без ИПЛ концентрация ИЛ 13 оказалась ниже, чем у здоровых доноров ( $p > 0,05$ ) (табл.2).

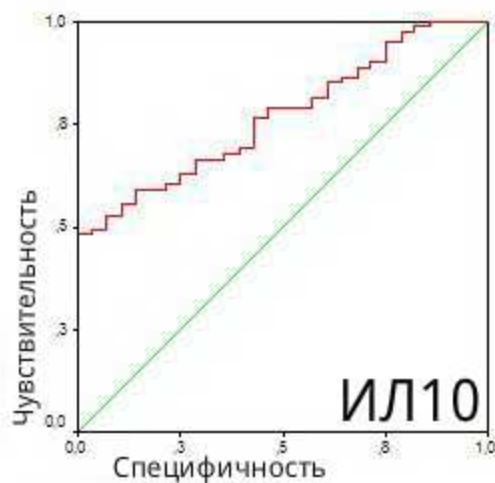
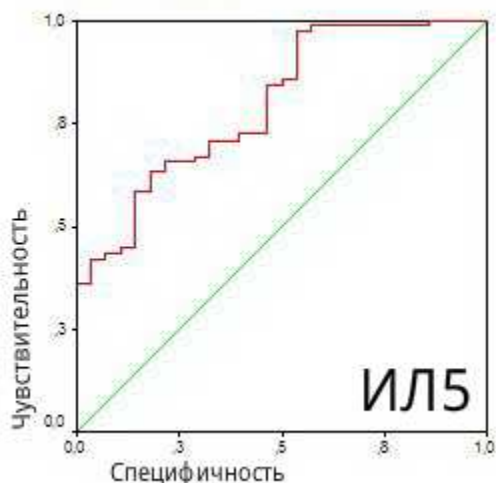
**Таблица 2**

Концентрация цитокинов в сыворотках крови у больных РА с и без ИПЛ и здоровой контрольной группы, Me [25-й; 75-й процентиля], пг/мл

Цитокин	Гр.1 Здоровые	Гр.2 Больные РА без поражения легких	Гр.3 Больные РА с ИПЛ	P		
				гр.1/гр.2	гр.1/гр.3	гр.2/гр.3
<b>ИЛ4</b>	2,4 [0,2; 5,6]	3,6 [2,4; 5,4]	4,8 [3,3; 6,7]	0,2	<b>0,04</b>	0,5
<b>ИЛ5</b>	1,6 [0,3; 5,2]	8,5 [3,9; 19,2]	8,7 [2,3; 20,9]	<b>0,002</b>	<b>0,0001</b>	1,0
<b>ИЛ10</b>	12,9 [5,6; 43,6]	354 [18,7; 1002,8]	1161,2[774,2; 1632,]	<b>0,0007</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,008</b>
<b>ИЛ13</b>	16,2 [8,6; 21,4]	7,3 [4,9; 15,7]	6,9 [5,7; 15,2]	0,1	0,4	1,0

Для определения чувствительности и специфичности Th2-цитокинов у больных РА с ИПЛ проведен ROC-анализ. Построение ROC-кривой дало возможность оценить диагностическую значимость показателей и сравнить их информативность между собой. Наиболее значимые показатели чувствительности и специфичности у больных с ИПЛ при РА обнаружили ИЛ 5, ИЛ 10 (табл. 3).

Площадь под ROC-кривой оказалась следующей: у ИЛ 5-0,78[ДИ95 % 0,70-0,87], ИЛ 10-0,76 [ДИ95 % 0,66-0,84] (рисунок).



*ROC-кривые для цитокинов*

Специфичность и чувствительность ИЛ 5 составила 55 и 86 %, а ИЛ 10 – соответственно 63 и 70 % (табл. 3).

**Таблица 3**

Данные ROC-анализа Th2-цитокинов у больных РА с ИПЛ

Цитокин	Чувствительность %	Специфичность %	Точка разделения	Площадь под ROC-кривой	P
<b>ИЛ5</b>	86	55	2,34	0,78 [ДИ95% 0,70-0,87]	0,001
<b>ИЛ10</b>	70	63	23,90	0,76 [ДИ95% 0,66-0,84]	0,001

Проведен корреляционный анализ базальных концентраций цитокинов с клинико-лабораторными проявлениями у пациентов РА с ИПЛ (табл. 4).

**Таблица 4**

Корреляционный анализ базальных уровней цитокинов и клинико-лабораторных проявлений ИПЛ при РА (коэффициент корреляции Пирсона –  $r$ ) ( $p < 0,05$ )

АНАЛИЗИРУЕМЫЙ ПРИЗНАК	КОРРЕЛЯЦИИ
<b>DAS28</b>	нет
<b>ДЛИТЕЛЬНОСТЬ</b>	нет
<b>СИСТ. ПР.</b>	ИЛ10 (-0,5)
<b>СРБ мг/л</b>	нет
<b>R-СТАД</b>	<b>ИЛ 13(0,5)</b>
<b>РФ МЕ/мл</b>	<b>ИЛ 5(0,5)</b>
<b>АЦЦП ед/мл</b>	ИЛ4 (-0,6)
<b>КТВР</b>	нет

Обнаружены статистически значимые положительные корреляции: ИЛ 13 с рентгенологической стадией РА, ИЛ 5 с РФ и обратные корреляции ИЛ 4 с АЦЦП, ИЛ 10 с системными проявлениями РА. При этом не было выявлено статистически достоверной корреляции уровней цитокинов и индекса активности РА DAS28.

Th-2 цитокины ИЛ 4, И 5 и ИЛ 13 вовлечены в процесс фиброзирование при различных системных воспалительных заболеваниях, в том числе при РА [8]. ИЛ4 способствует продукции фибробластами проколлагенов и фибронектина. ИЛ4 служит фактором хемотаксиса для фибробластов, стимулирует их пролиферацию и продукцию ими цитокинов. По выраженности стимулирующего влияния на синтез фибробластами коллагена ИЛ 4 не уступает трансформирующему фактору роста  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ), цитокину, обладающему мощным профиброзным действием. ИЛ 5 может способствовать фиброзообразованию в легких посредством рекрутирования эозинофилов, вырабатывающих TGF  $\beta 1$ , тромбоцитарный фактор роста и ИЛ 13. Повышенные уровни ИЛ 13 выявляются в жидкости бронхоальвеолярного лаважа больных идиопатическим фиброзом легких. Экспрессия как ИЛ 13, так и его рецептора первого типа ИЛ 13R $\alpha 1$  коррелирует с тяжестью заболевания. В дополнение к экспрессии рецептора сигналинга ИЛ 13, фибробласты экспрессируют рецептор ИЛ 13R $\alpha 2$ , который подавляет ИЛ13/ИЛ13R $\alpha 1$ -индуцируемый ответ, включая ЛФ [9,10]. Наше исследование выявило активацию Th-2 иммунного ответа. Уровни ИЛ 4, ИЛ 5 у больных РА с ИПЛ оказались выше, чем у обследуемых в других группах, и в то же время концентрация ИЛ 13 оказалась ниже у больных РА с и без ИПЛ, по сравнению со здоровыми лицами. Низкие уровни ИЛ 13, вероятно, связаны с гиперэкспрессией рецептора ИЛ 13R $\alpha 2$ , которую может индуцировать ИФН $\gamma$ .

Проведение ROC-анализа позволило выделить значимые Th2-цитокины у больных РА с ИПЛ. Наиболее важными из цитокинов, обладающими высокой чувствительностью и специфичностью, оказались ИЛ 5, ИЛ 10.

**Заключение.** Таким образом, у больных РА с ИПЛ обнаруживается гиперсекреция Th2-цитокинов, которая определяет функциональное напряжение Th2-клеточного иммунитета. Возможно, дисрегуляция цитокинового обмена является ведущим фактором в патогенезе ИПЛ при РА. Выявленная активация регуляторов «гуморального» антигенспецифического иммунного ответа свидетельствует о необходимости проведения исследований по изучению эффективности и безопасности анти-В-клеточной терапии у больных РА с ИПЛ.

#### Список литературы

1. Насонов Е.Л., Каратеев Д.Е., Балабанова Р.М. Ревматоидный артрит. Насонов Е.Л., Насонова В.А. // Ревматология. Национальное руководство. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – С. 290-331.
2. McInnes I, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis // *New Engl JMed.* – 2012. – №365. – Vol. 23. – 2205-19.
3. Raza K., Falciani F., Curnov S.J. et al. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin // *Arhr Res Ther.* – 2005. – Vol.7. – P. 784-795.
4. Fiocco U., Sfriso P., Oliviero F. et al. Co-stimulatory modulation in rheumatoid arthritis: the role of (CTLA4-Ig) abatacept. // *Autoimmun Rev.* – 2008. – № 8. – P. 76-82.
5. Новиков А.А., Александрова Е.Н., Насонов Е.Л. Протеомные исследования в ревматологии // *Научно-практическая ревматология.* – 2012. – 50(6). – С. 56-62.
6. Brennan F., McInnes I. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis // *J Clin Invest* 2008. – №118. – Vol.11. – P. 3537-45.
7. Mori S., Cho I., Koga Y., et al. Comparison of pulmonary abnormalities on high-resolution computed tomography in patients with early versus longstanding rheumatoid arthritis // *J Rheumatol.* – 2008. – Vol. 35. – P. 1513–1521.
8. Wynn T.A. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm // *Nat. Rev. Immunol.* – 2004. – Vol.4. – P. 583–594.
9. Jakubzick C., Choi E.S., Joshi B.H. et al. Therapeutic attenuation of pulmonary fibrosis via targeting of IL-4- and IL-13-responsive cells // *J. Immunol.* – 2003. – № 171. – P.2684-2693.
10. Fulkerson P.C., Fischetti C.A., Rothenberg M.E. Eosinophils and CCR3 regulate interleukin-13 transgene-induced pulmonary remodeling // *Am. J. Pathol.* – 2006. – № 169. – P. 2117-2126.

**Рецензенты:**

Белов Б.С., д.м.н., ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой, г. Москва;

Сатыбалдыев А.М., д.м.н., ФГБНУ НИИР им. В.А. Насоновой, г.Москва.