

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ В ЛОКАЛЬНОМ И СИСТЕМНОМ ВОСПАЛЕНИИ ПРИ РЕАКТИВНОМ АРТРИТЕ

Е. В. Кундер

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

С целью уточнения роли основных цитокинов в развитии локального и системного воспаления при реактивном артрите (РеА) проведен сравнительный анализ содержания TNF α , IL-1 α , IFN γ , IL-8, IL-4 и IL-10 в сыворотке крови и синовиальной жидкости иммуноферментным методом у 120 пациентов с РеА и 69 здоровых лиц. Выявлено достоверное преобладание ($p < 0,05$) сывороточных концентраций TNF α , IL-1 α , IFN γ , IL-8 и IL-4 у здоровых лиц по сравнению с пациентами с РеА. Обнаружены статистически незначимые ($p > 0,05$) различия между сывороточными концентрациями IL-10 у пациентов с РеА и здоровых лиц. При РеА установлено статистически высокозначимое ($p < 0,001$) превышение содержания в синовиальной жидкости по сравнению с сывороточными концентрациями IL-1 α , IL-4 и IL-10, что подтверждает более значимую роль указанных цитокинов в развитии локального, чем системного воспалительного процесса при данном заболевании.

Ключевые слова: реактивный артрит, цитокины, сыворотка крови, синовиальная жидкость

Дисбаланс Th1/Th2 цитокиновой продукции при реактивном артрите (РеА) является объектом многочисленных научных исследований, результаты которых достаточно противоречивы. Большинство авторов убедительно доказывают преобладание при данной патологии Th1 цитокинов (TNF α , IFN γ и др.) [4,5,10,12]. Однако высказывается мнение и о том, что имеет место относительная противовоспалительная поляризация цитокинового спектра с преобладанием, в первую очередь, IL-4, IL-5 и IL-10. При этом исследователи утверждают, что уровень Th1 (IFN γ и IL-1 α) цитокинов у пациентов с РеА равен или ниже, чем у здоровых лиц [5,12,13,14].

При РеА наблюдается ослабление антибактериального Th1 цитокинового ответа (продукция ИФН- γ , IL-2 и IL-12), необходимого для элиминации триггерных агентов. С другой стороны доминирующий Th1 ответ (продукция IL-4 и IL-10) содействует персистенции бактерий в суставах [14]. Патогенез данного Th1/Th2 дисбаланса при РеА является недостаточно изученным, однако наиболее вероятно, что его причиной являются некоторые генетические факторы, например полиморфизм генов цитокинов [11].

Существуют значительные сложности в оценке цитокинового статуса при различных заболеваниях [8]. Флюктуации уровней цитокинов в сыворотке крови могут быть связаны с коротким периодом их жизни, с гетерогенным распределением в организме, варьированием в зависимости от стадии заболевания, а также индивидуальных особенностей пациента [2]. Регуляция продукции цитокинов является сложной и комплексной, существуют вариации локальной тканевой экспрессии цитокинов у пациентов с разной активностью воспаления. Известно, что высокие концентрации провоспалительных цитокинов в очагах воспаления (синовиальной ткани, в энтезах) не всегда сопровождаются их повышенным содержанием в сыворотке крови. Таким образом, отсутствие достоверных различий между сывороточными концентрациями основных провоспалительных цитокинов у пациентов с РеА в группе здоровых лиц не исключает их локальной роли при изучаемой патологии [13].

Нами проведен сравнительный анализ содержания основных про- и противовоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 α , IFN γ , IL-8, IL-4 и IL-10) в сыворотке крови и синовиальной жидкости у пациентов с РеА с целью уточнения их роли в развитии системного и локального воспаления при данном заболевании.

Материалы и методы

Всего обследовано 120 пациентов с РеА, а также 69 здоровых лиц – доноров Витебской областной станции переливания крови (контрольная группа). Пациенты находились на стационарном лечении в ревматологическом отделении УЗ «Витебская областная клиническая больница». Диагноз РеА устанавливался с использованием предварительных Международных критериев (4th International Workshop on Reactive Arthritis, Berlin 1999) [3]. Средний возраст пациентов составил 37,90 \pm 8,96 лет, (95%ДИ: 36,28-39,52), средний возраст здоровых лиц был равен 41,64 \pm 8,27 (95%ДИ: 39,65-43,62). Различий по полу и возрасту в сравниваемых группах не выявлено ($p > 0,05$). Полиартрит был установлен у 34 пациентов (28,33%), олигоартрит – у 45 (37,50%), сакроилеит – у 39 (32,50%), спондилит – у 22 (18,33%), ахиллобурсит – у 73 (60,83%), энтезопатии – у 86 пациентов (71,66%). Активность 1 степени наблюдалась у 49 пациентов (40,83%), 2 степени – у 32 (26,67%), 3 степени – у 39 (32,50%). Рентгенологическая I стадия была установлена у 50 пациентов (41,67%), 2 – у 66 (55,00%), 3 стадия – у 4 (3,33%). Функциональная недостаточность 1 степени наблюдалась у 117 пациентов (97,50%), 2 степени – у 3 (2,50%).

У всех пациентов с РеА установлена анамнестическая связь с урогенитальной инфекцией. Изолированная хламидийная инфекция диагностирована у 98 пациентов (81,67%), хламидийная инфекция и трихомониаз – у 12 (10,00%), хламидийная инфекция, трихомониаз и уреоплазменная инфекция – у 10 (8,33%).

Средняя длительность болезни пациентов с РеА составила 0,5 года (Min 0,05 Max 8,0) (95%ДИ: 0,49-0,8) (25% 0,15 75% 1,0), средняя длительность терапии НПВП была равна 0,1 года (Min 0,0 Max 8,0) (25% 0,0 75% 0,1).

Из общего числа обследованных пациентов синовииты коленных суставов выявлены у 14 пациентов с РеА (9 мужчин и 5 женщин). Средний возраст пациентов составил 34,93 \pm 7,16 года (95%ДИ: 30,79-39,06). Средняя длительность суставного синдрома в данной группе пациентов равнялась 0,63 \pm 0,48 года (95%ДИ: 0,12-1,14). Полиартрит был выявлен у 4 пациентов, олигоартрит – у 10, сакроилеит – у 2, спондилит – у 4, ахиллобурсит – у 7, энтезопатии – у 12 пациентов. Активность 1 степени наблюдалась у 7 пациентов, 2 степени – у 2, 3 степени – у 5 пациентов. Рентгенологическая I стадия была установлена у 9 пациентов, 2 – у 5 пациентов. Функциональная недостаточ-

ность 1 степени наблюдалась у 13 пациентов, 2 степени – у 1 пациента. У всех пациентов данной группы установлена анамnestическая связь с урогенитальной инфекцией. Изолированная хламидийная инфекция диагностирована у 10 пациентов, хламидийная инфекция и трихомоноз – у 3, хламидийная инфекция, трихомоноз и уреapлазменная инфекция – у 1 пациента. Все пациенты получали терапию НПВП, средняя длительность которой составила $0,18 \pm 0,14$ года (95%ДИ: 0,0-0,28).

Цельную негепаринизированную кровь для определения сывороточных концентраций цитокинов забирали из локтевой вены в количестве 15 мл утром натощак на следующий день после поступления пациентов в стационар и в день сдачи крови донорами на станции переливания крови. Синовиальную жидкость получали в ходе артрoцентеза коленных суставов у пациентов с синовитами. Определение концентраций цитокинов (TNF β , IL-1 ν , IFN γ , IL-4, IL-8 и IL-10) в сыворотке крови и в синовиальной жидкости проводилось твердофазным иммуноферментным методом с использованием наборов реагентов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург, Россия).

Результаты и обсуждение

Результаты определения концентраций цитокинов в сыворотке крови:

Сывороточные концентрации TNF β у здоровых лиц (0,00 (Min 0,00 Max 84,00)) оказались выше ($p=0,031$), чем у пациентов с РеА (0,00 пг/мл (Min 0,00 Max 46,80)). Установлено статистически значимое ($p=0,024$) превышение сывороточной концентрации IL-1 ν у здоровых лиц (57,12 (Min 0,00 Max 697,38) (95%ДИ: 17,31-98,16)) по сравнению с пациентами с РеА (10,85 (Min 0,00 Max 1164,10) (95%ДИ: 4,00-26,04)). Также более высокими ($p=0,031$) у здоровых лиц (71,36 (Min 1,86 Max 1030,20) (95%ДИ: 32,92-94,94)) по сравнению с пациентами с РеА (34,24 (Min 0,00 Max 3604,44) (95%ДИ: 6,95-52,13)) оказались сывороточные концентрации ИФН- γ . Установлены статистически высокосignимые различия ($p<0,0001$) между сывороточными концентрациями IL-8 у пациентов с РеА (64,34 (Min 0,00 Max 909,70) (95%ДИ: 6,94-100,80)) и у здоровых лиц (581,36 (Min 0,00 Max 1540,80) (95%ДИ: 367,18-694,92)). Не выявлено различий ($p=0,076$) между сывороточными концентрациями IL-10 у здоровых лиц и у пациентов с РеА. Статистически высокосignимыми ($p<0,001$) оказались различия между сывороточными концентрациями IL-4 у здоровых лиц 0,00 пг/мл (Min 0,00 Max 283,40) и пациентов с РеА 0,00 пг/мл (Min 0,00 Max 26,1).

Результаты анализа взаимосвязи между сывороточными концентрациями цитокинов, клиническими и лабораторными данными:

При РеА установлена взаимосвязь ($p<0,05$) между сывороточной концентрацией TNF β и количеством CD8 $^+$ Т-лимфоцитов ($r=-0,32$), величиной иммунорегуляторного индекса ($r=0,34$), сывороточной концентрацией IFN γ и количеством CD8 $^+$ Т-лимфоцитов ($r=-0,33$), концентрацией IL-8 в сыворотке крови и сывороточной концентрацией фибрина ($r=0,52$), сывороточной концентрацией IL-10 и концентрацией фибриногена А в сыворотке крови ($r=0,50$).

Результаты сравнительного анализа концентраций цитокинов в сыворотке крови и в синовиальной жидкости:

Не установлено различий ($p=0,14$) между концентрациями TNF β в синовиальной жидкости и в сыворотке крови у пациентов с РеА. Установлены статистически высокосignимые различия ($p=0,0025$) между концентрациями

IL-1 в синовиальной жидкости и сыворотке крови у пациентов с РеА. Не установлено различий между концентрациями IL-8 в сыворотке крови и в синовиальной жидкости у пациентов с РеА ($p=0,45$). Установлены статистически высокосignимые различия ($p<0,001$) между концентрациями IL-10 в сыворотке крови и в синовиальной жидкости у пациентов с РеА. Установлены статистически высокосignимые различия между концентрациями IL-4 в сыворотке крови и в синовиальной жидкости у пациентов с РеА ($p<0,0001$).

Результаты сравнительного анализа концентраций TNF β , IL-1 ν , IFN γ , IL-4, IL-8 и IL-10 в синовиальной жидкости и сыворотке крови у 14 пациентов с РеА представлены в таблице.

Таблица
Результаты сравнительного анализа концентраций TNF α , IL-1 β , IFN γ , IL-4, IL-8 и IL-10 в синовиальной жидкости и сыворотке крови у 14 пациентов с реактивным артритом

Исследуемый материал	Медиана	Размах (min-max)	95% ДИ для медианы	25-75 перцентили
	Концентрации TNF α , пг/мл			
Синовиальная жидкость	0,00	0,00-268,10	0,00-79,55	0,00-62,60
Сыворотка крови	0,00	0,00-34,23	0,00-0,00	0,00-0,00
Концентрации IL-1 β , пг/мл				
Синовиальная жидкость	127,40	0,00-496,95	37,09-264,26	78,43-201,4
Сыворотка крови	0,00	0,00-315,8	0,00-42,40	0,00-36,90
Концентрации IFN γ , пг/мл				
Синовиальная жидкость	337,94	0,00-2697,66	3,49-992,47	14,77-546,00
Сыворотка крови	50,21	0,00-1422,85	0,00-230,98	0,00-226,76
Концентрации IL-8, пг/мл				
Синовиальная жидкость	296,41	83,50-581,40	132,56-550,61	170,95-451,20
Сыворотка крови	17,73	16,37-797,23	121,12-537,70	129,60-404,56
Концентрации IL-10, пг/мл				
Синовиальная жидкость	27,00	0,00-315,95	2,98-110,60	12,60-78,60
Сыворотка крови	0,00	0,00-20,40	0,00-8,48	0,00-0,00
Концентрации IL-4, пг/мл				
Синовиальная жидкость	25,55	0,00-103,21	10,75-72,43	12,80-62,50
Сыворотка крови	0,00	0,00-9,30	0,00-1,85	0,00-0,06

Оценка содержания различных цитокинов в сыворотке крови и в непосредственных очагах воспаления имеет несомненное значение для изучения патогенетических и иммунорегуляторных механизмов при РеА.

Результаты современных исследований, касающихся продукции и роли ключевых про- и противовоспалительных цитокинов при данном заболевании во многом противоречивы [5,14]. Основными причинами разногласий являются молекулярные особенности цитокинов. Являясь короткоживущими медиаторами, цитокины не находятся в системном кровотоке долгое время. Кроме того, концентрация цитокинов в крови зависит от длительности и стадии заболевания, проводимого лечения и т.д. Существуют также определенные технические сложности определения концентраций цитокинов, связанные, в частности, с вариabельностью метода иммуноферментного анализа.

Результаты исследований, посвященных изучению ци-

токинового статуса при различных заболеваниях, убедительно свидетельствуют о том, что содержание отдельных цитокинов в циркуляции непостоянно и не отражает динамики цитокинового ответа в непосредственных очагах воспалительного процесса [12,13].

Обнаруженные нами низкие сывороточные концентрации TNF β у пациентов с РеА, с одной стороны, могут быть связаны со значительными вариациями сывороточных концентраций данного цитокина. Однако факт патогенетической значимости TNF β в развитии воспаления при РеА является несомненным и подтверждается выявленными взаимосвязями между сывороточной концентрацией TNF β и числом CD8⁺ Т-лимфоцитов, величиной иммунорегуляторного индекса при РеА. С другой стороны, низкие концентрации TNF β в системном кровотоке никоим образом не исключают локальной роли данного цитокина в развитии артрита, сакроилеита, спондилита, энтезопатий и других проявлений РеА. Отсутствие различий между концентрациями TNF β в сыворотке крови и в синовиальной жидкости у пациентов с РеА связано, по-видимому, со значительной вариабельностью значений внутри группы. Однако у отдельных пациентов с РеА концентрация TNF β в синовиальной жидкости в 100 и более раз превышала сывороточные концентрации. При определении сывороточных концентраций TNF β обращали на себя внимание некоторые пациенты, имеющие высокое содержание TNF β в сыворотке крови. У всех этих пациентов имелись выраженные клинические признаки заболеваний (полиартрит, синовит, сакроилеит), определялась высокая активность воспаления с учетом лабораторных данных (СОЭ и С-реактивного белка), отмечалась недостаточная эффективность проводимой терапии.

При РеА содержание IL-1 ν в сыворотке крови у пациентов с РеА оказалось ниже, чем у здоровых лиц. Кроме того, выявлена значительная вариация концентраций IL-1 ν внутри групп. Полученные результаты согласуются с данными других исследований сывороточных концентраций IL-1 ν у пациентов с РеА [4,12]. Несмотря на низкие сывороточные концентрации IL-1 ν при изученных заболеваниях, данный цитокин играет важную патогенетическую роль в развитии локального воспаления при РеА. Нами установлено превышение концентраций IL-1 ν в синовиальной жидкости пациентов с РеА по сравнению с сывороточной концентрацией.

Содержание IFN γ в сыворотке крови при РеА оказалось ниже, чем у здоровых лиц. Выявлена значительная вариация концентраций IFN γ среди обследованных лиц. Полученные результаты согласуются с литературными данными [4,12], свидетельствующими о низкой информативности определения сывороточной концентрации IFN γ при РеА. Отсутствие статистически значимых различий между концентрациями IFN γ в сыворотке крови и в синовиальной жидкости у пациентов с РеА, вероятно, обусловлено существенной вариабельностью признака внутри групп и небольшого числа наблюдений, однако у одних и тех же пациентов обнаружены существенные различия между данными показателями, что свидетельствует о роли IFN γ в развитии локального воспалительного процесса.

В нашем исследовании выявлено снижение сывороточных концентраций IL-8 при РеА по сравнению с группой здоровых лиц. Известно, что, вызывая миграцию в очаг воспаления нейтрофилов и базофилов, IL-8 способствует их дегрануляции и выделению супероксида [1]. При РеА нами установлена обратная зависимость между сывороточной концентрацией IL-8 и также изученной нами

СОД активностью IgG на 1 мл сыворотки крови. Вероятно, эта зависимость подтверждает протективное значение IgG, обладающих СОД активностью.

Согласно литературным данным, имеется зависимость между уровнем IL-8 при воспалительных артропатиях и содержанием реактантов острой фазы воспаления (С-реактивного белка и гаптоглобина) [12]. При РеА нами обнаружена связь концентрации IL-8 и сывороточной концентрации фибрина, что подтверждает возможность использования IL-8 в качестве фактора, отражающего активность воспаления. Отсутствие различий между концентрациями IL-8 в сыворотке крови и в синовиальной жидкости пациентов с РеА согласуется с результатами других исследований, в результате которых установлено снижение концентрации IL-8 в синовиальной жидкости при различных вариантах артритов [9].

Нами выявлено снижение сывороточных концентраций IL-10 у пациентов с РеА, что согласуется с результатами других исследований [6]. Выявленное преобладание содержания IL-10 в синовиальной жидкости у пациентов с РеА по сравнению с сывороточными концентрациями также совпадает в результатами исследований данного цитокина [6,9] и подтверждает значение IL-10 в развитии локального воспалительного ответа. Определение сывороточной концентрации IL-10, вероятно, является полезным для оценки и мониторинга активности воспалительного процесса при РеА, что доказывает наличие прямой взаимосвязи между содержанием данного цитокина в сыворотке крови и сывороточной концентрацией фибриногена А.

Нами выявлены низкие концентрации IL-4 в сыворотке крови при РеА, а также обнаружены значительные вариации сывороточных концентраций IL-4 у пациентов с РеА, что согласуется с литературными данными [6]. Несмотря на то, что в целом содержание данного цитокина при изученных заболеваниях оказалось ниже, чем у здоровых лиц, у отдельных пациентов обнаружены довольно высокие сывороточные концентрации IL-4, на порядок превышающие средние значения в контрольной группе.

В синовиальной жидкости у пациентов с РеА содержание IL-4 статистически значимо превышало сывороточные концентрации данного цитокина. Принимая во внимание способность IL-4 поддерживать выживание триггерных микроорганизмов и персистенцию их антигенов, оказывать антагонистическое воздействие на бактерицидный эффект TNF β и IFN γ процесс [7], можно сделать вывод, что повышенная локальная продукция IL-4 может пролонгировать выживание бактериальных триггерных агентов, а также персистенцию их антигенов, и посредством этого поддерживать воспалительный процесс.

Выводы

1. У пациентов с РеА концентрации TNF β ($p=0,031$), IL-1 ν ($p=0,024$), IFN γ ($p=0,031$), IL-8 и IL-4 ($p<0,0001$) снижены по сравнению со значениями данных показателей у здоровых лиц.
2. При РеА установлено статистически высокозначимое превышение содержания в синовиальной жидкости по сравнению с сывороточными концентрациями IL-1 ν ($p=0,0025$), IL-10 ($p<0,001$), IL-4 ($p<0,0001$), что подтверждает более значимую роль указанных цитокинов в развитии локального, чем системного воспалительного процесса при данном заболевании.

Список использованной литературы

1. Воробьев, А.А. Иммунология и аллергология / А.А. Воро-

бьев, А.С. Быков, А.В. Караулов. – Москва: Практическая медицина, 2006. – 288 стр.

2. Al-Haresh, A.M. Tumor necrosis factor- β polymorphism and the HLA-Cw*602 allele in psoriatic arthritis / A.M. Al-Haresh, J. Proctor, S.M. Jones // *Rheumatology*. – 2002. – Vol. 41. – P. 525–530.

3. Braun, J. On the difficulties of establishing a consensus on the definition of and diagnostic investigations for reactive arthritis. Results and discussion of a questionnaire prepared for the 4th International Workshop on Reactive Arthritis / J. Braun, G. Kingsley, D. van der Heijde // *J. Rheumatol.* – 2000. – Vol. 27, № 9. – P. 2185–2192.

4. Chou, C.T. Cytokine production from peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis and their first-degree relatives / C.T. Chou, A.P. Huo, H.N. Chang // *Arch. Med. Res.* – 2007. – Vol. 38, № 1. – P. 190–195.

5. Cratacos, J. Serum cytokines (IL-6, TNF- α , IL-1 β and IFN- γ) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity / J. Cratacos, A. Collado, X. Filella // *Br. J. Rheumatol.* – 1994. – Vol. 33. – P. 927–931.

6. Cucittini, F.M. Serum IL-4, IL-10 and IL-6 levels in inflammatory arthritis / F.M. Cucittini, K.A. Byron, D. Maher // *Rheumatol. Int.* – 1995. – Vol. 14, № 5. – P. 201–206.

7. Huppertz, H. Effect of cytokines on invasion and survival of *Yersinia* in primary human fibroblasts / H. Huppertz, J. Heesemann // *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*. – 1999. – Vol. 187, № 3. – P. 157–164.

8. Keller, C. Cytokines in the seronegative spondyloarthropathies and their modification by TNF blockade: a brief report and literature review / C. Keller, A. Webb, J. Davis // *Ann. Rheum. Dis.* – 2003. – Vol. 62. – P. 1128–1132.

9. Ribbens, C. Increased synovial fluid levels of interleukin-12, sCD25 and sTNF-R11/sTNF-R1 ratio delineate a cytokine pattern characteristic of immune arthropathies / C. Ribbens, B. Andre, O. Kaye // *Eur. Cytokine Netw.* 2000 – 11, № 4. – P. 669–676.

10. Ritchlin, C. Patterns of cytokine production in psoriatic synovium / C. Ritchlin, S.A. Haas-Smith, D. Hicks // *J. Rheumatol.* – 1998. – Vol. 25. – P. 1544–1552.

11. Sibia, J., Limbach F.X. Reactive arthritis or chronic infectious arthritis? / J. Sibia, F.X. Limbach // *Ann. Rheum. Dis.* – 2002. – Vol. 61. – P. 580–587.

12. Sonel, B. Serum levels of IL-1 β , TNF- α , IL-8 and acute phase proteins in seronegative spondyloarthropathies / B. Sonel, H. Tutkan, N. Duzgun // *Joint. Bone Spine.* – 2002. – Vol. 69. – P. 463–467.

13. Toussiro, E. Serum levels of IL-1 β , TNF- α , soluble IL-2 receptor and soluble CD8 in seronegative spondyloarthropathies / E. Toussiro, P. Lafforgue, J. Boucraut // *Rheumatol. Int.* – 1994. – Vol. 13. – P. 175–180.

14. Yin, Z. Crucial role of interleukin-10/interleukin-12 balance in the regulation of the type 2 T helper cytokine response in reactive arthritis / Z. Yin, J. Braun, L. Neure // *Arthritis Rheum.* – 1997. – Vol. 40, № 10. – P. 1788–1797.

Role of cytokines in systemic and local inflammation in reactive arthritis

E.V. Kunder

Educational Establishment «Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education»

The aim of the study is to define the role of pro- and anti-inflammatory cytokines in the development of systemic and local inflammation in reactive arthritis (ReA). We compared the concentrations of TNF β , IL-1 β , IFN γ , IL-8, IL-4 and IL-10 measured with ELISA in sera and synovial fluid in 120 ReA patients and 69 healthy volunteers. The serum levels of TNF β , IL-1 β , IFN γ , IL-8 and IL-4 in controls were higher ($p < 0,05$) than in patients with ReA. There were no differences ($p > 0,05$) in serum concentrations of IL-10 between patients with ReA and healthy persons. The concentrations of IL-1 β , IL-4 and IL-10 in synovial fluid of ReA patients were significantly higher ($p < 0,001$) than in their sera. The detection of high concentrations of IL-1 β , IL-4 and IL-10 in synovial fluid in patients with ReA confirms the role of these cytokines in the development of local inflammation in ReA.

Key words: reactive arthritis, cytokines, blood serum, synovial fluid.

Поступила 29.08.2012