

5. Покровский В. В. Эпидемиология и профилактика ВИЧ-инфекции и СПИД. — М., 1996.
6. Fiscus S. A., Pilcher C. D., Miller W. C. et al. // J. Infect. Dis. — 2007. — Vol. 195. — P. 416—424.

7. Parekh B. S., McDougal J. S. // Indian J. Med. Res. — 2005. — Vol. 121, N 4. — P. 510—518.
8. Respass R., Cachafeiro A., Withum D. et al. // J. Clin. Microbiol. — 2005. — Vol. 43, N 1. — P. 506—508.

Поступила 14.01.08

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2009

УДК 616.5-002.525.2-031.81-078.33

А. В. Созина, Е. П. Иливанова, А. М. Шульман, М. А. Шульман, Т. Г. Шемеровская, С. В. Лапин, А. А. Тотолян

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ IL-1 β , IL-6, IFN- γ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ

НМЦ Минздравсоцразвития по молекулярной медицине на базе Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова, Ленинградская областная клиническая больница, областной ревматологический центр, ГУЗ городская больница № 25 — городской ревматологический центр, Санкт-Петербург

Системная красная волчанка (СКВ) является системным аутоиммунным заболеванием, характеризующимся нарушением регуляции иммунной системы, которое приводит к гиперпродукции Т- и В-лимфоцитов. Данные изменения приводят к повышению продукции аутоантител и образованию иммунных комплексов (ИК), которые обладают повреждающим действием, откладываясь в различных тканях и органах [8]. Дебют СКВ может быть различным и варьирует от незначительных проявлений до тяжелых полиорганных поражений. Клинические проявления данного заболевания крайне разнообразны, поэтому огромное значение имеет поиск потенциальных биомаркеров, которые могли бы отражать как риск вовлечения в иммунопатологический процесс различных органов, так и являться чувствительными индикаторами активности заболевания [7].

Так, наиболее изученными биомаркерами являются аутоантитела, прежде всего антинуклеарный фактор (АНФ), антитела к двуспиральной ДНК (дсДНК) и антитела к кардиолипину (КЛ), выявление которых помогает как при постановке диагноза, так и при оценке активности и тяжести течения СКВ [2, 4].

Цитокины также играют важную и многообразную роль в патогенезе СКВ, кроме того, их баланс способен определять активность заболевания. Роль ряда цитокинов, таких как IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, IFN- α и IFN- γ активно обсуждается в литературе [9, 12, 13].

Известно, что IFN- γ стимулирует клеточный иммунный ответ, что приводит к повышению продукции IL-6, который в свою очередь индуцирует продукцию аутоантител В-лимфоцитами, активируя тем самым гуморальный иммунный ответ [11]. Образующиеся при этом ИК способны стимулировать повышение синтеза IL-1 β , IL-6, IL-17 моноцитами, что приводит к различным повреждениям органов и тканей у больных СКВ [15]. Однако в литературе представлены противоречивые данные о связи концентрации данных биологических молекул с активностью и особенностью течения СКВ, а также о диапазоне концентрации цитокинов в сыворотке крови как больных, так и здоровых людей [16, 17].

Целью исследования было рассчитать нормальные значения IL-1 β , IL-6, IFN- γ в сыворотке крови, оценить зависимость концентрации этих цитокинов от уровня антител в сыворотке больных СКВ и определить возможность использования перечисленных цитокинов в качестве дополнительных лабораторных маркеров для оценки активности СКВ.

Материалы и методы. Нами был обследован 61 пациент с СКВ в возрасте от 18 до 75 лет, из них 4 мужчины и 57 женщин. В обследованную группу вошли пациенты, проходившие лечение в городском и областном ревматологических центрах Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Диагноз СКВ был подтвержден на основании пересмотренных критериев Американской Коллегии Ревматологов (1997) [6]. У всех больных были собраны данные анамнеза о течении заболевания и проведены общеклинические исследования (клинический анализ крови, биохимический анализ крови, общий анализ мочи). Также выполняли инструментальные исследования (ЭКГ, эхокардиографию, рентгенографию органов грудной клетки, ультразвуковое исследование органов брюшной полости) и консультации специалистов (окулист, невролог).

Определение уровня цитокинов IL-1 β , IL-6, IFN- γ в сыворотке крови больных СКВ проводили методом мультиплексного анализа белков с использованием коммерческих наборов и анализатора BIO-Plex (BIO-RAD, США). Для расчета диапазона нормальных значений изучаемых цитокинов были исследованы сыворотки 28 здоровых доноров крови, сопоставимых по полу и возрасту с группой пациентов. В группе здоровых границы нормы для каждого показателя определяли с учетом среднего значения ($\bar{X}$) и стандартного отклонения (σ) по формуле: $\bar{X} \pm 3\sigma$ [1]. Полученные результаты представлены в таблице.

Иммунологический анализ сыворотки крови больных включал определение специфических аутоантител: АНФ, антитела к дсДНК и КЛ [14].

Для выявления АНФ применяли метод непрямой иммунофлюоресценции в оригинальной модификации, с использованием в качестве субстрата клетки перевиваемой клеточной линии аденокарциномы гортани человека Нер-2 [3].

В лунки с монослоем культуры клеток Нер-2 вносили сыворотки больных в разведении 1:40. Отмывку проводили в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в течение 10 мин. Для выявления образовавшихся ИК исследуемые образцы инкубировали с кроличьей сывороткой против IgG человека, меченной ФИТЦ (DAKO, Дания) в течение 30 мин. После отмывки ФСБ в течение 10 мин срезы монтировали в глицерин, забуференный ФСБ (10:1, pH 8,2). Результат оценивали с помощью люминесцентного микроскопа (EUROStar, Германия). При обнаружении у больного АНФ описывали тип свечения и проводили определение конечного титра аутоантител. Для стандартизации данного метода была использована референтная сыворотка ВОЗ AF/CDC1, которая содержит 100 МЕ/мл с гомогенным типом свечения ядра, что соответствует разведению сыворотки 1:160 [10].

Для определения антител к IgG-антител дсДНК и IgG/IgM-антител к КЛ использовали коммерческие наборы для иммуноферментного анализа (Euroimmun, Германия). С целью стандартизации данного набора для выявления антител к дсДНК была использована референтная сыворотка ВОЗ Wo/80, которая содержит 100 МЕ/мл. Тест-система для определения антител к КЛ была откалибрована с помощью референтной сыворотки от E. N. Harris (Louisville) и специфического референтного IgG материала IRP 97/656 [5]. В качестве повышенных рассматривали значения для антител к дсДНК ≥ 50 МЕ/мл, анти-КЛ-IgG ≥ 30 GPL МЕ/мл и анти-КЛ-IgM ≥ 20 MPL МЕ/мл.

Полученные данные обрабатывали с помощью пакета статистических программ SPSS (версия 13.0).

Концентрация цитокинов в сыворотке здоровых доноров крови (n = 28)

Показатель	Концентрация цитокинов, пг/мл	
	$\bar{X} \pm 3\sigma$	Границы нормы
IL-1 β	0,055 $\pm$ 0,322	0—0,377
IL-6	3,470 $\pm$ 5,185	0—8,655
IFN- γ	0,779 $\pm$ 3,234	0—4,013

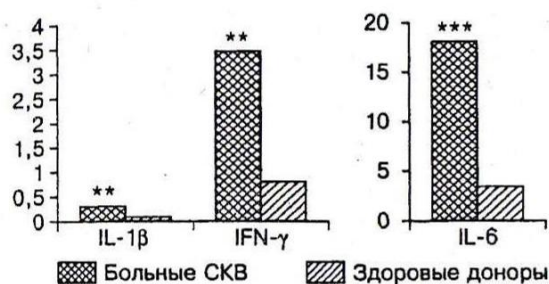


Рис. 1. Концентрация IL-1 β , IL-6, IFN- γ (в пг/мл) в сыворотках больных СКВ и здоровых доноров крови. ** — $p < 0,005$, *** — $p < 0,0005$.

Результаты и обсуждение. При сравнении средних значений концентрации цитокинов в группе здоровых доноров и пациентов СКВ мы обнаружили значительно повышенные концентрации IL-1 β , IL-6 и IFN- γ в сыворотках больных СКВ (рис. 1).

Клиническая выраженность СКВ является следствием иммунопатологических реакций, включающих гиперактивацию В-лимфоцитов и продукцию ими широкого спектра аутоантител, которая стимулируется воздействием ряда цитокинов, в том числе IL-6 [12]. Мы оценили зависимость концентрации цитокинов от уровня антител в сыворотке больных СКВ. Была установлена взаимосвязь между продукцией цитокинов и присутствием в сыворотке АНА. Обнаружено повышенное содержание IFN- γ у больных с наличием высокого содержания антител к дсДНК ($3,646 \pm 1,392$ vs. $0,680 \pm 0,252$, $p = 0,032$ тест Манна-Уитни; $r = 0,340$, $p = 0,030$). Также у пациентов с уровнем антител к дсДНК > 50 МЕ/мл было выявлено повышенное содержание IL-1 β ($0,308 \pm 0,119$ vs. $0,126 \pm 0,096$, $p = 0,025$ тест Манна-Уитни; $r = 0,390$, $p = 0,012$). Концентрация IL-6 среди пациентов, серопозитивных по АНФ, была повышена более чем в 2,5 раза ($19,47 \pm 3,104$ vs. $7,077 \pm 4,345$, $p = 0,037$ тест Манна-Уитни). Различий в концентрации цитокинов среди больных с высоким уровнем антител к КЛ (IgG и IgM) обнаружено не было. В целом, у серопозитивных пациентов концентрации провоспалительных цитокинов были выше по сравнению с серонегативными. Это соответствует данным литературы об индукции цитокинов под действием аутоантител *in vitro* и позволяет предположить наличие взаимосвязи между этими показателями [11].

Увеличение IL-6 может быть связано с активацией антиген-презентирующими клетками (АПК) аутореактивных Т-лимфоцитов, которые в свою очередь стимулируют В-лимфоциты к продукции аутоантител. Синергичное увеличение АНФ и IL-6, а также антител к дсДНК и IL-1 β скорее всего можно объяснить активацией плазматоцитных дендритных клеток (pDCs) накапливающимися в результате нарушенного фагоцитоза ИК. Активированные pDCs продуцируют IL-1 β , IL-6, IL-10, стимулируя тем самым аутореактивные В-лимфоциты к дифференцировке в плазматические клетки и продукции аутоантител. Увеличение IFN- γ сочетанно с антителами к дсДНК возможно при усиленной презентации АПК аутоантигенов Т-лимфоцитам. В результате данного процесса происходит активация аутореактивных В-клеток, их дифференцировка в плазматические клетки и синтез аутоантител, в том числе антител к дсДНК. Накопившиеся хроматинсодержащие ИК, связываясь с TLR9 и Fc γ RIIa, способны активировать pDCs, в результате чего те начинают продуцировать IFN- α и IFN- β , что приводит к активации презентации аутоантигенов АПК [16, 18].

Для того чтобы сопоставить уровень цитокинов в сыворотке крови с другими клиническими и лабораторными показателями активности при СКВ, была определена частота встречаемости патологических значений цитокинов (выше расчетной границы нормы). Это позволило сопоставить число случаев увеличения уровней цитокинов в сыворотке крови с патологическими результатами других тестов. Наиболее часто отмечалось увеличение концентраций IL-6, уровень которого в сыворотке крови был повышен у 51% больных СКВ, в то время как частота повышенных показателей других цитокинов значительно уступала IL-6 по встречаемости. Частота обнаружения патологических значений IL-6 при СКВ сопоставима со встречаемостью таких традиционных клинических маркеров активности, как повы-

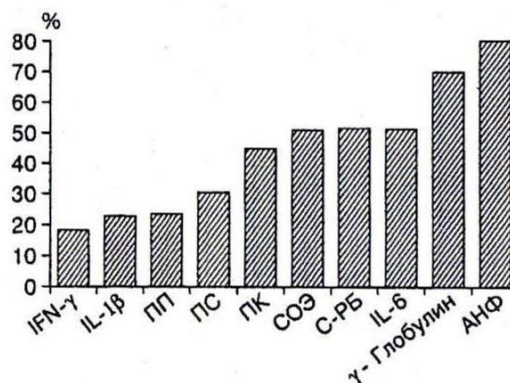


Рис. 2. Частота (в %) встречаемости показателей клинико-лабораторной активности у больных СКВ ($n = 61$).

ПП — поражение почек, ЛС — поражение суставов, ПК — поражение кожи.

шенные уровни СОЭ, С-реактивного белка (С-РБ) и со встречаемостью поражений кожных покровов (рис. 2).

Таким образом, полученные данные позволяют рекомендовать исследование концентраций IL-6 сыворотки крови как дополнительного маркера активности заболевания в комбинации с традиционными показателями острофазового ответа при СКВ.

Коллектив авторов благодарит за техническую помощь в выполнении данной работы официального представителя компании "Euroimmun" на территории РФ ЗАО "Аналитика" в лице генерального директора М. И. Прищепы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лапин С. В., Тополян А. А. Иммунологическая лабораторная диагностика ревматических заболеваний: Пособие для врачей. — СПб., 2006.
2. Созина А. В. Клинико-иммунологические взаимосвязи при системной красной волчанке и других диффузных болезнях соединительной ткани: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб., 2007.
3. Созина А. В., Неустроева Ю. А., Тихомирова Т. А., Лапин С. В. // Мед. иммунол. — 2007. — Т. 9, № 1. — С. 69–76.
4. Bootsma H., Spronk P., Derksen R. et al. // Lancet. — 1995. — Vol. 345, N 8965. — P. 1595–1599.
5. Harris E. N., Charavi A. E., Asherson R. A. et al. // Eur. J. Rheumatol. Inflamm. — 1984. — Vol. 7, N 1. — P. 5–8.
6. Hochberg M. C. // Arthr. and Rheum. — 1997. — Vol. 40. — P. 1725.
7. Illei G. G., Lipsky P. E. // Curr. Rheumatol. Rep. — 2004. — Vol. 6, N 5. — P. 382–390.
8. Kotzin B. L. // Cell. — 1996. — Vol. 85, N 3. — P. 303–306.
9. Meyers J. A., Mangini A. J., Nagai T. et al. // Cytokine. — 2006. — Vol. 35, N 5–6. — P. 235–246.
10. Molden D. P., Nakamura R. M., Tan E. M. // Am. J. Clin. Pathol. — 1984. — Vol. 82, N 1. — P. 57–66.
11. Ogawa N., Itoh M., Goto Y. // Clin. Exp. Immunol. — 1992. — Vol. 89, N 1. — P. 26–31.
12. Ripley B. J., Goncalves B., Isenberg D. A. et al. // Ann. Rheum. Dis. — 2005. — Vol. 64, N 6. — P. 849–853.
13. Ronnelid J., Tejde A., Mathsson L. et al. // Ann. Rheum. Dis. — 2003. — Vol. 62, N 1. — P. 37–42.
14. Sinico R. A., Bollini B., Sabadini E. et al. // J. Nephrol. — 2002. — Vol. 1. — P. 20–27.
15. Stuart R. A., Littlewood A. J., Maddison P. J., Hall N. D. // Clin. Exp. Rheumatol. — 1995. — Vol. 13, N 1. — P. 17–22.
16. Sun K. H., Yu C. L., Tang S. J., Sun G. H. // Immunology. — 2000. — Vol. 99, N 3. — P. 352–360.
17. Theofilopoulos A. N., Baccala R., Beutler B., Kono D. H. // Annu. Rev. Immunol. — 2005. — Vol. 23. — P. 307–336.
18. Viillard J. F., Pellegrin J. L., Ranchin V. et al. // Clin. Exp. Immunol. — 1999. — Vol. 115, N 1. — P. 189–195.

Поступила 14.02.08