

УДК 612.017.1-097.3:616.72-002.772

Е.А. Голикова, Ю.А. Лопатникова, Н.С. Шкаруба, А.Э. Сизиков, С.В. Сенников**TNF, РАСТВОРИМЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И АУТОАНТИТЕЛА К TNF У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ И УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ***НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)*

Исследовано содержание аутоантител к TNF в сыворотках крови больных ревматоидным артритом (РА) совместно с определением содержания растворимых рецепторов и самого медиатора TNF. Показано достоверное повышение содержания TNF и растворимых рецепторов к TNF I и II типов в сыворотках крови больных РА в стадии обострения и больных РА, ответивших на терапию, по сравнению с условно здоровыми донорами. При определении субклассов аутоантител показано достоверное увеличение относительного содержания аутоантител субклассов IgG2, IgG3 и IgG4 в сыворотках крови больных РА в стадии обострения по сравнению с условно здоровыми донорами, а также достоверное увеличение относительного содержания аутоантител субклассов IgG2 и IgG4 у больных РА в стадии обострения по сравнению с больными РА, ответившими на терапию. Таким образом, показано наличие аутоантител, растворимых рецепторов к TNF и самого цитокина в сыворотке условно здоровых доноров и больных РА, при этом учитывая достоверные изменения в относительном содержании подклассов аутоантител и содержании TNF и растворимых рецепторов, можно говорить о функциональной роли аутоантител и растворимых рецепторов к TNF и медиатора при патологии.

Ключевые слова: аутоантитела, фактор некроза опухоли, ревматоидный артрит

TNF, SOLUBLE RECEPTORS AND AUTOANTIBODIES TO TNF OF PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AND HEALTHY DONORS**E.A. Golikova, J.A. Lopatnikova, N.S. Shkaruba, A.E. Sizikov, S.V. Sennikov***Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk*

The content of autoantibodies to TNF in the sera of patients with rheumatoid arthritis (RA) in conjunction with the definition of soluble receptors and TNF was investigated. A significant increase in the content of TNF and I and II types soluble receptors to TNF in sera of RA patients in the acute stage and of responding to therapy RA patients compared with relatively healthy donors was demonstrated. In determining autoantibodies subclasses a significant increase in the relative content of subclasses IgG2, IgG3 and IgG4 autoantibodies in sera of RA patients in the acute stage compared with relatively healthy donors, as well as a significant increase in the relative content of subclasses IgG2 and IgG4 autoantibodies in RA patients in the acute stage compared with RA patients, responding to therapy were shown. Thus we have shown the presence of antibodies, soluble receptors to TNF and cytokine in the serum of relatively healthy donors and RA patients, herewith taking into account significant changes in the relative content of the subclasses of autoantibodies and in the content of TNF and soluble receptors we can talk about the functional role of the autoantibodies and soluble receptors to TNF in the pathology.

Key words: autoantibodies, tumor necrosis factor, rheumatoid arthritis

В последние годы в многочисленных работах сообщается об обнаружении в системной циркуляции в норме и при различных инфекционных и аутоиммунных заболеваниях аутоантител, специфичных к интерферонам (IFN- α , IFN- β , IFN- γ), некоторым интерлейкинам (IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12), факторам роста (GM-CSF, M-CSF, LIF, Oncostatin M, VEGF) и фактору некроза опухолей [7, 13], причем в некоторых случаях, продемонстрировано участие аутоантител в патогенезе заболеваний или предрасположенности к ним. Показано, что в дополнение к блокировке специфических функций цитокинов, аутоантитела могут играть важную роль в регуляции иммунного ответа в силу их способности к образованию иммунных комплексов с соответствующими цитокинами или антиидиотипическими антителами, представляя собой один из механизмов регуляции биологической активности цитокинов, наряду с растворимыми и мембраносвязанными рецепторами [13].

Одним из значимых цитокинов с широким спектром действия является фактор некроза опухоли (TNF), для которого показано увеличение содержания при различных состояниях [11]. Существует широкий спектр заболеваний, при которых роль TNF считается крайне важной [4, 12].

При ревматоидном артрите TNF продуцируется макрофагами синовиальной ткани, и в активной стадии заболевания достигается его максимальная концентрация. Основными патогенетическими эффектами TNF при РА являются увеличение продукции фактора дифференцировки остеокластов — лиганда остеопротегерина (RANKL), отвечающего за резорбцию костной ткани, а также индукция экспрессии молекул адгезии, металлопротеиназ, коллагеназ, хемокинов и простагландинов [3].

На сегодняшний день исследованию аутоантител к фактору некроза опухоли посвящено небольшое количество работ. Так, аутоантитела к TNF были обнаружены в сыворотках крови здоровых доноров, в большем количестве — в сыворотках

крови пациентов с туберкулезом, грамотрицательной бактериальной септициемией, кистозным фиброзом с хронической легочной инфекцией, рассеянным склерозом, а также с различными ревматическими заболеваниями [2, 8]. Вместе с тем, наличие аутоантител к TNF, их вклад в регуляцию биологической активности самого цитокина и участие в патогенетических процессах при различных заболеваниях изучены недостаточно. В связи с этим представляется актуальным исследовать содержание аутоантител к TNF в сыворотках крови больных ревматоидным артритом совместно с определением содержания растворимых рецепторов и самого медиатора TNF.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалась периферическая кровь 24 условно здоровых доноров, включенных в группу по результатам опроса и результатам латекс-теста на С-реактивный белок (ООО «Ольвекс диагностика»), в соответствии с методикой производителя. Результат считали отрицательным при концентрации СРБ в сыворотке крови < 6 мкг/мл.

Группа больных ревматоидным артритом составила 18 человек, находившихся на госпитализации в клинике ИКИ г. Новосибирск. Диагноз ревматоидного артрита верифицирован в соответствии с критериями ACR 1987 г. Активность РА определялась с помощью подсчета количества болезненных и припухших суставов из 28, определения СОЭ, оценки пациентом общего состояния здоровья по ВАШ (визуальной аналоговой шкале от 0 до 100 мм) и дальнейшего вычисления индекса DAS28. Все пациенты на момент поступления в клинику ИКИ имели высокую активность заболевания (DAS28 > 5.1). У каждого пациента была взята кровь для исследования в стадии обострения заболевания и после коррекции базисной терапии, включая добавление глюкокортикостероидов или биологических агентов (мабтера), при условии эффективности лечения (по критерию EULAR) и выявления положительной клинической и/или лабораторной динамики: изменение индекса DAS28 > 1.2 при исходном значении > 5.1 (далее – больные, ответившие на терапию).

Сыворотку получали центрифугированием цельной крови в течение 15 мин (3000 об./мин).

Определение компонентов системы TNF

Определение сывороточного содержания медиаторов проводили методом твердофазного ИФА. Уровень общего уровня TNF определяли с использованием набора альфа-TNF – ИФА – БЕСТ (Вектор-Бест, Россия). Уровень растворимых рецепторов TNF I и II типов определяли с помощью наборов Human soluble TNFR1 ELISA Kit и Human soluble TNF RII ELISA Kit (RayBioTech, Англия). Иммуноферментный анализ с использованием коммерческих тест систем проводили согласно инструкции производителя. Относительное содержание антител классов IgA, IgG, IgM и субклассов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 определяли с использова-

нием сборного набора: рекомбинантный человеческий TNF (ООО «Центр инженерной иммунологии»), планшеты с высокоадсорбционной поверхностью Costar (США), реактивы фирмы Иммунотех (Москва): фосфатно-солевой буферный раствор, ТМБ раствор 1-компонентный и СТОП-раствор, а также моноклональные антитела к классам и субклассам иммуноглобулинов человека меченные пероксидазой хрена фирмы «Полигност» (Санкт-Петербург). Для работы со сборным набором ИФА для определения относительного содержания аутоантител был отработан метод с использованием имеющихся реактивов по оптимизации разведений сывороток и конъюгатов. Был выбран следующий протокол иммуноанализа: проводили сорбцию рекомбинантного белка TNF на поверхности лунки планшета для ИФА в дозе 40 мкг/мл, в объеме 100 мкл, инкубировали 2 часа при 37 °С, и затем 16 – 18 часов при 4 °С; блокирование сайтов неспецифического связывания осуществляли путем инкубации с 1 % БСА в течение 1 часа при 37 °С, с предварительной отмывкой планшета фосфатно-солевым буфером с 0,05 % Tween20; далее после каждой инкубации отмывали планшет пятикратно фосфатно-солевым буфером; после отмывки вносили сыворотки в объеме 100 мкл, с разведением 1:5; инкубировали планшет 2 часа при 37 °С; после отмывки вносили конъюгаты в объеме 100 мкл с разведением 1:100; инкубировали планшет 1 час при 37 °С; после отмывки вносили раствор ТМБ в объеме 100 мкл; инкубировали планшет 30 минут при 37 °С; вносили стоп раствор в объеме 100 мкл; проводили анализ на планшетном спектрофотометре при длине волны 450 нм с референс волной 620 нм. Анализ проводился с использованием спектрофотометров Anthos 2020.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе мы измерили содержание TNF, растворимых рецепторов и аутоантител к TNF в сыворотках крови 18 больных с РА в стадии обострения, 15 больных с РА, ответивших на терапию, и 24 условно здоровых доноров. Детектируемые уровни медиатора, растворимых рецепторов и аутоантител были обнаружены во всех исследованных группах.

Результаты определения содержания TNF и растворимых рецепторов к TNF (sTNFR) I и II типов в сыворотках крови больных ревматоидным артритом (РА) в стадии обострения, больных РА, ответивших на терапию, и условно здоровых доноров представлены в таблице 1. Нами было показано, что содержание TNF в сыворотках крови больных РА в стадии обострения и больных РА, ответивших на терапию, достоверно выше такового в сыворотках крови условно здоровых доноров, что подтверждает активное участие исследуемого цитокина в патогенезе данного заболевания. Несколькими группами исследователей ранее также сообщалось об обнаружении более высокого содержания TNF в сыворотке крови пациентов с РА, по сравнению с условно здоровыми донорами [9]. Также было показано, что концентрация данного цитокина

была выше в сыворотке крови больных с более активными формами РА, по сравнению с менее активными формами заболевания и обнаружена положительная корреляцию с длительностью заболевания [9, 11]. В нашей работе также показано недостоверное снижение уровня TNF у больных РА, ответивших на терапию, по сравнению с активной стадией заболевания.

Определено 2 типа растворимых рецепторов к TNF, клеточная продукция которых под действием TNF усиливается. При ревматоидном артрите данные рецепторы продуцируются не только локально синовиальными клетками, но также и циркулирующими клетками периферической крови [9].

Растворимые рецепторы регулируют функции TNF. С одной стороны, они (особенно sTNFR1) нейтрализуют TNF в системной циркуляции и ингибируют его биологическую активность, блокируя действие цитокина и конкурируя с рецепторами TNF на поверхности клеток, а также усиливают его паракринные эффекты [11]. С другой стороны, комплексы рецепторов с TNF можно рассматривать в качестве своеобразного пула связанного рецептора, из которого он постепенно высвобождается [10].

TNF практически не определяется в сыворотке крови здоровых людей. При различных патологических состояниях, таких как граммотрицательный сепсис и не бактериальные инфекции подобные малярии, содержание sTNFR1 и sTNFR2 может повышаться на порядок. Менее значимое повышение содержания растворимых рецепторов показано при онкологии, вирусных инфекциях и аутоиммунных заболеваниях. Уровень sTNFR1 повышен в сыворотке пациентов с онкологическими заболеваниями, сердечной недостаточностью, хронической почечной недостаточностью, системной склеродермией и в бронхо-альвеолярном лаваже пациентов, страдающих респираторным дистресс-синдромом взрослых, а также коррелирует со степенью тяжести паразитемии и малярии у человека [5].

Определение растворимых рецепторов к TNF I и II типов в нашей работе, показало преобладание содержания рецептора II типа по сравнению с содержанием рецептора I типа во всех исследованных группах, что согласуется с литературными данными [11]. Также нами было определено, что содержание рецепторов к TNF обоих типов в сыворотках крови больных РА в стадии обострения и больных РА, от-

ветивших на терапию, достоверно выше таковых в сыворотках крови условно здоровых доноров, что говорит об активном вовлечении растворимых рецепторов к TNF в протекание патологических процессов при РА и подтверждается литературными данными [6].

Существуют сведения о корреляции между концентрациями TNF и его растворимых рецепторов, говорящие о том, что стимулы, увеличивающие уровень TNF, также могут индуцировать и «выброс» TNF-рецепторов в системную циркуляцию. Другие исследования говорят о том, что появление этих двух типов рецепторов в системной циркуляции происходит независимо. В конечном счете, появление растворимых рецепторов в ответ на повышение концентрации TNF может являться механизмом, благодаря которому предотвращается немедленное связывание TNF его поверхностными клеточными рецепторами, что защищает клетки от эффектов TNF и способствует локализации воспалительной реакции [6]. Однако повышенной продукции растворимых рецепторов в синовиальной оболочке сустава может оказаться недостаточно, чтобы нейтрализовать патологические эффекты TNF при РА.

В нашей работе была получена положительная корреляция между содержанием TNF и растворимым рецептором к TNF II типа у больных РА, ответивших на терапию. При этом в сыворотках крови больных РА в стадии обострения заболевания содержание рецептора к TNF I типа положительно коррелирует с содержанием рецептора к TNF II типа. Что совместно с полученными в нашей работе данными о более высоком, по сравнению с рецептором I типа, содержанием в сыворотке больных РА рецептора II типа к TNF может указывать преимущественную реализацию эффектов медиатора посредством данного рецептора в патогенезе РА. Данное предположение согласуется с данными о том, что у больных ревматоидным артритом происходит преимущественное повышение растворимого рецептора II типа [5]. С другой стороны при сравнении групп больных с РА и условно здоровых доноров видно, что концентрация рецептора I типа возрастает намного активнее, чем рецептора II типа, что в свою очередь может указывать на то, что TNFR1 более активно реагирует на воспалительный процесс при РА, нейтрализуя TNF в системной циркуляции и ингибируя его биологическую ак-

Таблица 1

Содержание TNF и растворимых рецепторов к TNF I и II типов в сыворотке крови больных ревматоидным артритом в стадии обострения, больных ревматоидным артритом, ответивших на терапию, и условно здоровых доноров

Группа	TNF (пг/мл)	sTNFR1 (пг/мл)	sTNFR2 (пг/мл)
Больные РА в стадии обострения	2,190 ± 0,638*	1529,015 ± 159,113*	3051,021 ± 195,251**
Больные РА, ответившие на терапию	1,55 ± 0,915*	1566,206 ± 185,804*	3240,903 ± 410,364**
Условно здоровые доноры	0,216 ± 0,127	132,554 ± 26,428	1620,887 ± 169,241#

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с условно здоровыми донорами; # – достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с содержанием TNF RI (пг/мл).

Таблица 2

Относительное содержание аутоантител к TNF по классам и субклассам в сыворотке крови больных ревматоидным артритом в стадии обострения, больных РА, ответивших на терапию, и условно здоровых доноров. Результаты получены в иммуноферментном анализе, и представлены в условных единицах оптической плотности (OD)

Группа	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgG	IgM
Больные РА в стадии обострения	0,056 ± 0,003	0,099 ± 0,010*	0,118 ± 0,013*	0,067 ± 0,009*	0,484 ± 0,050	1,794 ± 0,128	1,605 ± 0,109
Больные РА, ответившие на терапию	0,057 ± 0,005	0,071 ± 0,006#	0,090 ± 0,010	0,040 ± 0,005#	0,415 ± 0,046	1,837 ± 0,168	1,587 ± 0,104
Условно здоровые доноры	0,055 ± 0,005	0,070 ± 0,006	0,081 ± 0,007	0,042 ± 0,005	0,534 ± 0,046	1,691 ± 0,160	1,423 ± 0,054

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с условно здоровыми донорами; # – достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с больными РА в стадии обострения.

тивность, посредством блокады действия цитокина и конкуренции растворимого рецептора I типа с рецепторами TNF на поверхности клеток.

Также в нашей работе было измерено относительное содержание аутоантител к TNF. На сегодняшний день исследованию аутоантител к фактору некроза опухоли посвящено небольшое количество работ. Так, аутоантитела к TNF альфа были обнаружены в сыворотках крови здоровых доноров, в большем количестве - в сыворотках крови пациентов с грамтрицательной бактериальной септициемией, кистозным фиброзом с хронической легочной инфекцией, а также с различными ревматическими заболеваниями [8].

Результаты определения относительного содержания аутоантител классов IgA, IgG, IgM и субклассов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 в сыворотках крови больных РА в стадии обострения, больных РА, ответивших на терапию, и условно здоровых доноров, полученные в нашей работе, представлены в таблице 2. Для определения относительных значений использовали условные единицы оптической плотности, получаемые на спектрофотометре Anthos 2020. Достоверных отличий в относительном содержании классов IgA, IgG, IgM между исследованными группами получено не было. Было показано, что относительное содержание субклассов IgG2, IgG3 и IgG4 в сыворотках крови больных РА в стадии обострения достоверно выше такового в сыворотках крови условно здоровых доноров, при этом относительное содержание субклассов IgG2 и IgG4 достоверно выше в сыворотках крови больных РА в стадии обострения по сравнению с данными, полученными для больных РА, ответивших на терапию, что может говорить о том, что уровни данных субклассов могут быть ассоциированы с тяжестью течения РА и, соответственно, с патогенезом рассматриваемой патологии. Также в нашей работе была обнаружена положительная корреляция между относительным содержанием субклассов IgG2 и IgG4 у больных РА в стадии обострения и больных РА, ответивших на терапию, что дополнительно указывает на важность аутоантител к TNF субклассов IgG2 и IgG4 при протекании РА. Можно предположить, что аутоантитела данных подклассов регулируют иммунные реакции при РА путем депонирования TNF посредством образова-

ния иммунных комплексов и увеличения длительности его существования в системной циркуляции аналогично роли растворимых рецепторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения нашей работы показано достоверное повышение содержания TNF и растворимых рецепторов к TNF I и II типов в сыворотках крови больных РА в стадии обострения и больных РА, ответивших на терапию, по сравнению с условно здоровыми донорами. При определении субклассов аутоантител показано достоверное увеличение относительного содержания аутоантител субклассов IgG2, IgG3 и IgG4 в сыворотках крови больных РА в стадии обострения по сравнению с условно здоровыми донорами, а также достоверное увеличение относительного содержания аутоантител субклассов IgG2 и IgG4 у больных РА в стадии обострения по сравнению с больными РА, ответившими на терапию. Таким образом, показано наличие аутоантител, растворимых рецепторов к TNF и самого цитокина в сыворотке условно здоровых доноров и больных РА, при этом учитывая достоверные изменения в относительном содержании подклассов аутоантител и содержании TNF и растворимых рецепторов, можно говорить о функциональной роли аутоантител и растворимых рецепторов к TNF и медиатора при патологии.

Работа поддержана грантом ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 гг. (Госконтракт П1305).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кричевская О.А., Ключкина, Н.Г., Александрова Е.Н. Фактор некроза опухоли α и его растворимые рецепторы при ревматических заболеваниях: клиническое и патогенетическое значение // Науч.-практ. ревматология. – 2005. – № 2. – С. 43 – 46.
2. Лопатникова Ю.А., Аутеншлюс А.И., Голикова Е.А., Киреев Ф.Д. и др. Аутоантитела к ФНО-альфа в норме и при патологии // Мед. акад. журн. – 2010. – Т. 10, № 5. – С. 212.
3. Новиков А.А., Александрова Е.Н., Диагтроптова М.А., Насонов Е.Л. Роль цитокинов в патогенезе ревматоидного артрита // Науч.-практ. ревматология. – 2010. – № 2. – С. 71 – 82.

4. Aggarwal B.B., Natarajan K. Tumor necrosis factors: developments during last decade // *Eur. Cytokine Netw.* — 1996. — Vol. 7. — P. 93–124.
5. Cañete J.D., Albaladejo C., Hernandez M.V., Lainez B. et al. Clinical significance of high levels of soluble tumour necrosis factor- α receptor-2 produced by alternative splicing in rheumatoid arthritis: a longitudinal prospective cohort study // *Rheumatology (Oxford)*. — 2011. — Vol. 50, N 4. — P. 721–728.
6. Cope A.P., Aderka D., Doherty M., Engelmann H. et al. Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases // *Arthritis Rheum.* — 1992. — Vol. 35. — P. 1160–1169.
7. de Lemos Rieper C., Galle P., Hansen M.B. Characterization and potential clinical applications of autoantibodies against cytokines // *Cytokine & Growth Factor Reviews.* — 2009. — Vol. 20. — P. 61–75.
8. Fomsgaard A., Svenson M., Bendtzen K. Autoantibodies to tumour necrosis factor alpha in healthy humans and patients with inflammatory diseases and gram-negative bacterial infections // *Scand. J. Immunol.* — 1989. — Vol. 30, N 2. — P. 219–223.
9. Klimiuk P.A., Sierakowski S., Latosiewicz R., Cylwik J.P. et al. Circulating tumour necrosis factor α and soluble tumour necrosis factor receptors in patients with different patterns of rheumatoid synovitis // *Ann Rheum Dis.* — 2003. — Vol. 62. — P. 472–475.
10. Pennica D., Lam V.T., Mize N.K., Weber R.F. et al. Biochemical properties of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. Characterization of ligand binding, internalization, and receptor phosphorylation // *J. Biol. Chem.* — 1992. — Vol. 267, N 29. — P. 21172–21178.
11. Robak T., Gladalska A., Stepiec H. The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis // *Eur. Cytokine Netw.* — 1998. — Vol. 9, N 2. — P. 145–154.
12. Tracey K.J., Czura C., Ivanova S. Mind over immunity // *The FASEB J.* — 2001. — Vol. 15. — P. 1575–1576.
13. Watanabe M., Kanji U., Kazuhide N., Bruce C. et al. High avidity cytokine autoantibodies in health and disease: Pathogenesis and mechanisms // *Cytokine & Growth Factor Reviews.* — 2010. — Vol. 10, N 3. — P. 28.

Сведения об авторах

Голикова Елена Алексеевна – младший научный сотрудник лаборатории регуляции иммунорезонанса, аспирант (630060, г. Новосибирск, ул. Экваторная, д. 2, кв. 164; тел.: (383) 222-19-10)

Лопатникова Юлия Анатольевна – старший научный сотрудник, кандидат биологических наук ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН

Шкаруба Надежда Сергеевна – врач-ревматолог отделения ревматологии ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН

Сизиков Алексей Эдуардович – заведующий отделением ревматологии ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН, кандидат медицинских наук

Сенников Сергей Витальевич – заведующий лабораторией молекулярной иммунологии ФГБУ «НИИ Клинической иммунологии» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор