

Патогенетические аспекты реализации клинического эффекта при терапии ингибиторами фактора некроза опухоли у больных ранним ревматоидным артритом: в фокусе – оксидативный гомеостаз

В.Н. КОВАЛЕНКО, академик НАМН Украины, д. мед. н., профессор; Д.Г. РЕКАЛОВ

/ИИЦ «Институт кардиологии
имени академика Н.Д. Стражеско»
НАМН Украины, Киев/

Резюме

Патогенетичні аспекти реалізації клінічного ефекту при терапії інгібіторами фактора некрозу пухлини у хворих з раннім ревматоїдним артритом: у фокусі – оксидативний гомеостаз

В.М. Коваленко, Д.Г. Рекалов

Метою дослідження була оцінка динаміки показників, що характеризують вираженість оксидативної конформації білкових молекул у хворих з ревматоїдним артритом (РА) під впливом терапії. Показано, що динаміка параметрів, які характеризують активність процесів оксидації та антиокислювальних систем у пацієнтів з РА при різних схемах лікування, свідчить про достовірне зниження вільно-радикального окислення на фоні терапії інфліксимабом. Статистично значуще зниження рівня біомаркерів оксидативного стресу асоціюється з депресією рівня маркерів активності захворювання, що може бути одним із патогенетичних аспектів реалізації клінічного ефекту при терапії інгібіторами фактора некрозу пухлини-альфа у хворих на ранній ревматоїдний артрит.

Ключові слова: ревматоїдний артрит, інгібітори фактора некрозу пухлини- α , показник активності захворювання, метотрексат, інфліксимаб

Summary

Pathogenetic Aspects of Clinical Effect in Therapy of Tumour Necrosis Factor Inhibitors in Patients with Early Rheumatoid Arthritis: the Focus on Oxidative Homeostasis

V.N. Kovalenko, D.G. Rekalov

The purpose of the study was the evaluation of the dynamics that characterize the expressiveness of oxidative protein conformation of molecules in patients with early rheumatoid arthritis (RA) influenced by the base antirheumatic therapy. Shows that the dynamic parameters of activity of pathogenetic changes in patients with RA treatment schemes at various shows in fact reducing free-radical oxidation with regimens therapy of tumour necrosis factor inhibitors – α (α -antiTNF). Statistically significant decrease in oxidative stress biomarkers associated with disease activity markers of depression, which may be a pathogenetic aspects of clinical therapy with antiTNF- α in patients with early RA.

Key words: early rheumatoid arthritis, inhibitors of tumor necrosis factor- α , hydroxychloroquine

Ревматоидный артрит (РА) – наиболее распространенное хроническое воспалительное заболевание, приводящее уже на ранних стадиях к нарушению конгруэнтности суставов за счет эрозивного процесса, формирования паннуса, гиперпродукции синовиальной жидкости, воспаления связочно-мышечного аппарата, что уже в первые два года болезни приводит к нарушению, а затем и потере функции суставов с последующей инвалидизацией пациента [1]. Отсутствие сведений об этиологических факторах, вызывающих РА, не позволяет использовать этиотропную терапию. По мере выяснения механизмов патогенеза болезни возникает необходимость совершенствовать патогенетическую терапию.

Последняя декада прошлого века и особенно начало XXI столетия охарактеризовались революционными переменами в фармакотерапии РА – от достижений в понимании механизмов патогенеза болезни до изменения тактики лечения РА и создания новой группы препаратов – биологических агентов, действие которых направлено на блокирование провоспалительных цитокинов, их рецепторов, ко-стимуляторов, отдельных пулов клеток. Спектр этих препаратов к настоящему времени уже достаточно широк.

Однако если иммуносупрессивное влияние изучено в достаточной мере, патогенетические аспекты, за счет которых реализуется хондропroteкция, в том числе и модуляция оксидативного гомеостаза, исследованы недостаточно.

Цель исследования: оценить динамику показателей, характеризующих выраженность оксидативной конформации белковых молекул у больных с РА под влиянием терапии ингибиторами фактора некроза опухоли- α (ФНО- α).

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 50 пациентов в возрасте старше 18 лет с ранним РА (продолжительность симптомов заболевания – не более 12 месяцев) или подозрением на наличие РА, которые имели минимум один припухший сустав, продолжительность симптомов заболевания – не менее 6 недель (суставной синдром носил устойчивый характер с тенденцией к хронизации) и соответственно требовали назначения метотрексата (MT) в качестве базисного препарата.

Всем пациентам проводили общеклинический анализ крови, в частности определяли скорость оседания эритроцитов (СОЭ), уровень С-реактивного белка (СРБ). Для оценки ревматоидного фактора (РФ) использовали иммунотурбидиметрический метод, уровень антител к циклическому цитруллинированному пептиду (анти-ЦЦП) оценивали иммуноферментным методом (ELISA). Радиологическое исследование суставов проводилось с целью оценки уровня повреждения суставов с использованием метода Larsen [21]: оценивали 8 проксимальных межфаланговых суставов, 2 сустава большого пальца, 10 метакарпофаланговых и суставы запястья.

Степень суставных изменений оценивали по шкале:

- 0 – норма;
- 1 – небольшие нарастания ткани;
- 2 – эрозия костей с деструкцией менее 25% суставной поверхности;
- 3 – разрушено 26–50% суставной поверхности;
- 4 – разрушено 51–75% суставной поверхности;
- 5 – более 75% суставной поверхности разрушено.

В начале исследования определялась активность заболевания по интегральному показателю активности (DAS28), и соответственно только пациенты с уровнем $DAS \geq 3,2$ были включены в данное исследование. Критерии исключения из исследования: поражение суставов вследствие травматического повреждения, вовлечение в процесс только дистальных межфаланговых суставов кистей, подозрение или подтвержденный диагноз септического артрита или подагры, тяжелое течение сопутствующей патологии и противопоказания для приема МТ.

Всем пациентам была инициирована терапия МТ в дозе 10 мг в неделю с последующим ее повышением каждые 2 недели на 5 мг в неделю до достижения целевой дозы 20 мг в неделю. С целью профилактики развития побочных явлений в результате приема МТ всем пациентам назначалась фолиевая кислота в дозе 5 мг в неделю. Для пациентов, принимающих глюкокортикоиды (ГК), необходимым условием был прием стабильной дозы ГК в течение 4 недель до включения в исследование, а также в течение всего периода исследования (включены были пациенты, принимавшие низкие дозы ГК, эквивалентные <10 мг преднизолона в сутки). Подписание информированного согласия на участие в исследовании было обязательным. Эффективность и переносимость МТ оценивали через 3 месяца терапии.

Все пациенты были разделены на 2 подгруппы: первая – 30 человек, которые получали МТ; вторая – 20 человек, принимавшие ингибитор ФНО- α инфликсимаб. В случае недостаточной эффективности проводимой терапии пациент выводился из исследования, его данные не учитывались. Далее пациентам первой группы назначали: а) комбинированную терапию сульфасалазином и гидроксихлорохином; б) дополнительно – ингибитор ФНО- α (инфликсимаб, адалимумаб). В случае непереносимости или развития побочных явлений МТ заменяли другим препаратом базисной терапии, преимущественно назначали лефлуномид.

Активность заболевания оценивали на основании интегрального показателя активности заболевания DAS28, учитывая значение СОЭ. У пациентов, у которых данный показатель отсутствовал по той или иной причине, во внимание принималось значение СРБ. Функциональный статус пациентов оценивался на основании значения индекса HAQ. Для мониторинга общего объективного статуса, а также контроля развития побочных явлений пациентам проводился регулярный контроль общего анализа крови, мочи. Нозологическая принадлежность суставного синдрома уточнялась при каждом последующем визите.

Уровень продуктов окислительной модификации белка – альдегидфенилгидразонов (АФГ) и кетонфенилгидразонов (КФГ) определяли как исходно (спонтанная активность), так и после стимулирования двухвалентным железом (металл-индуцированная модификационная деструкция протеиновых молекул в условиях интенсификации генерации свободных радикалов). Степень окислительной модификации белков (ОМБ) в плазме крови определяли по методу B. Halliwell. Метод основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов. Для инициации окислительной модификации белка использовали среду Фентона: 0,1 М фосфатный буфер (pH 7,4), Fe^{2+} (10^{-3} М) и H_2O_2 (3×10^{-4} М). Для определения окислительной модификации белка проводили предварительное их осаждение с помощью 20% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Для работы брали два образца биопробы: для спонтанной и для металл-индуцированной регистрации окислительной модификации белка.

Эффективность терапии МТ оценивали, начиная с 3-го месяца исследования, на основании расчета критериев ответа EULAR (van Gestel A.M. et al., 1996). Согласно выбранным критериям «хорошими ответчиками» были пациенты, которые достигали улучшения показателя активности заболевания $DAS28 > 1,2$; при этом в течение наблюдения показатель $DAS28$ находился в пределах $\leq 2,4$. «Без ответа» считались пациенты, у которых было достигнуто значение показателя $DAS28 < 0,6$ ($> 0,6$, но $< 1,2$) при интегральном значении $DAS28 > 3,7$. Все остальные варианты ответа на терапию считали «умеренным».

Анализ нормальности распределения оценивали по критериям Колмогорова–Смирнова (D) и Lilliefors, а также Shapiro-Wilk (W), последнему отдавалось предпочтение. Также в качестве критериев согласия оценивали величину асимметрии и эксцесса распределения данных. В случае, если невозможно было отбросить нулевую гипотезу о статистически значимых различиях распределения переменных от нормальных, использовали непараметрические либо параметрические методы анализа данных. При анализе влияния лечения на исследуемые параметры в случае нормального распределения переменных использовали процедуру однофакторного дисперсионного анализа повторных изменений с последующим использованием Newman-Keuls или Games-Howell, учитывая множественность сравнений; в тех случаях, когда распределение исследуемых переменных не соответствовало нормальному закону, использовали непараметрический аналог дисперсионного анализа повторных изменений – критерий Friedman. В случае двух групп проводили сравнение с помощью критерия Wilcoxon. Сравнение групп по качественному признаку, а также при исследовании частот встречаемости показателей проводили при помощи критерия χ^2 с анализом таблиц сопряженности. Анализируя влияние различных факторов на исследуемые параметры в процессе терапии, динамику показателей в зависимости от исходных (начальных) значений, использовали процедуру многофакторного дисперсионного анализа повторных изменений и ковариационный анализ. Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5), а также «SPSS 16.0», «Microsoft Excel 2003». Отдельные статистические процедуры и алгоритмы реализованы в виде специально написанных макросов в соответствующих программах. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Таблиця. Динамика параметров, отражающих уровень оксидативного стресса и активность заболевания, на фоне терапии биологическими агентами $M \pm m$ (95% доверительный интервал)

Показатель	Метотрексат		Инфликсимаб	
	Исходно	После терапии	Исходно	После терапии
С-реактивный белок	9,48±0,62 (8,24–10,71)	7,61±0,39 (6,83–8,39)	9,55±0,61 (8,34–10,76)	6,81±0,52 (5,76–7,86)
Ревматоидный фактор	88,11±6,14 (75,84–100,38)	75,59±4,86 (65,87–85,31)	100,9±8,94 (83,03–118,77)	60,57±6,27 (48,02–73,11)
АФГ спонтан.	0,16±0,01 (0,14–0,17)	0,14±0,01 (0,11–0,15)	0,17±0,01 (0,15–0,2)	0,1±0,01 (0,09–0,11)
АФГ стимулир.	0,2±0,02 (0,16–0,24)	0,17±0,02 (0,14–0,19)	0,22±0,02 (0,18–0,26)	0,13±0,01 (0,11–0,16)
КФГ спонтан.	0,1±0,01 (0,08–0,12)	0,07±0,01 (0,05–0,09)	0,15±0,03 (0,1–0,2)	0,07±0,01 (0,04–0,1)
КФГ стимулир.	0,13±0,01 (0,11–0,15)	0,09±0,01 (0,07–0,12)	0,18±0,02 (0,14–0,23)	0,1±0,01 (0,08–0,12)

Примечания: АФГ – альдегидфенилгидразоны, КФГ – кетонфенилгидразоны.

Результаты и их обсуждение

Результаты, полученные при исследовании уровня продукции свободных радикалов и активности процессов их элиминации, продемонстрировали достоверное снижение значений как спонтанной, так и индуцированной, окислительной деструкции белков плазмы крови по уровню фенилгидразонов (регресс АФГ составил 44% и 51%, а КФГ – уменьшение в 1,6 и 1,8 раза соответственно) во 2-й группе больных РА по сравнению с показателями до лечения. Аналогичные показатели для 1-й группы составили 29% и 21% для базальной модификационной изменчивости протеинов альдегидной и кетонной фракций и 24% и 22% соответственно – при стимулировании двухвалентным железом. Исходя из представленной динамики антиоксидантных свойств проводимой терапии, можно сделать вывод, что дополнительное введение в индивидуальную схему лечения препарата инфликсимаба способствует не только существенной нормализации параметров ОМБ, но и восстановлению антиокислительного потенциала крови, о чем свидетельствует достоверная динамика показателя АФГ (+76% для второй группы, в то время как для первой рассматриваемое значение составило всего +31%). Причем терапия во второй группе характеризовалась более выраженным снижением именно показателя КФГ как инициальных, так и препарат-зависимых величин, что свидетельствует о том, что инфликсимаб способствует реверсии в большей степени именно патологической активации поздних биомаркеров оксидативного стресса при РА. Причем этот процесс был сопряжен с достоверным снижением лабораторных маркеров активности заболевания (таблица).

Более того, для подтверждения целесообразности и статистической обоснованности аддитивного назначения иммуномодуляторов при РА были сопоставлены показатели разных групп после лечения не только по отношению к исходным значениям, но и между собой при помощи ковариационного анализа для исключения возможного влияния первоначальных величин на величину различий в зависимых выборках. Оказалось, что помимо более выраженной процентной разницы в параллельных рядах в пользу 2-й группы отмечено достоверное снижение параметров окислительной деструкции белковых молекул базальной и металл-индуцированной альдегидной фракции фенилгидразонов на

19,75% и 19,67%, а также исходной и железостимулированной кетонной фракции на 35,15% и 32,26% соответственно. Как было указано ранее, отмечено достоверное повышение антиокислительного резерва в 1,4 раза при сравнении с больными РА 1-й группы. Важно, что уменьшился разброс данных средних значений показателей. Приведенные данные свидетельствуют о значимом восстановлении резервно-адаптационных возможностей организма с повышением устойчивости к патологической активации генерации свободных радикалов в условиях оксидативно-антиоксидантного дисбаланса и гипоксии при включении в схему стандартной терапии инфликсимаба.

С клинической точки зрения интересен анализ отдельных клинико-демографических показателей в группах пациентов с различными уровнями ответа на терапию МТ. Выявление принципиальных значимых различий проводилось методом мультивариантной логистической регрессии, с учетом целого ряда демографических и клинических характеристик пациентов были выявлены предикторы степени ответа пациента на терапию МТ в соответствии с рекомендациями EULAR. Полученные результаты представлены на основании подсчета отношения шансов – odd-ratio (95% ДИ).

Многофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями (MANOVA) показал, что снижение показателей РФ, антиЦП и уровня оксипролина достоверно ассоциируется со снижением процессов окислительной модификации белковых молекул. Таким образом, можно отметить, что в условиях костно-хрящевой деструкции при РА применение инфликсимаба оказывает супрессивное влияние на процессы пероксидации и генерации свободнорадикального окисления биомолекул с последующей активацией дистрофических и деструктивных изменений клеточных мембран, что является вероятным патогенетическим аспектом рациональной стратегии при РА.

Выводы

1. Оценка изменения параметров, характеризующих интенсивность процессов оксидации и активность антиокислительных систем у пациентов с РА при различных схемах лечения свидетельствует о достоверном снижении свободно-радикального окисления у больных с РА на фоне терапии инфликсимабом.
2. Статистически значимое снижение уровня биомаркеров оксидативного стресса ассоциируется с депрессией уровня маркеров активности заболевания, что может быть одним из патогенетических аспектов реализации клинического эффекта при терапии ингибиторами фактора некроза опухоли- α у больных ранним ревматоидным артритом.

Литература

1. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis. 2002 Update // Arthritis Rheumatism. – 2002. – Vol. 46. – P. 328–346.
2. Насонов Е. Л. Лечение ревматоидного артрита. Клинические рекомендации. – М., 2006. – 118 с.
3. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress // Am. J. Med. – 2000. – Vol. 109. – P. 33–44.

4. Keat A., Barkham N., Bhalla A. et al. BSR guidelines for prescribing TNF-alpha blockers in adults with ankylosing spondylitis. Report of a working party of the British Society for Rheumatology // *Rheumatology (Oxford)*. – 2005. – Vol. 44. – P. 939–947.
5. Keystone E.C., Kavanaugh A.F., Sharp J.T. et al. Radiographic, clinical and functional outcomes of treatment with adalimumab in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy // *Arthr. Rheum.* – 2004. – Vol. 50. – P. 1400–1411.
6. Khanna D., McMahon M., Furst D.E. Anti-tumor necrosis factor therapy and heart failure // *Arthritis Rheum.* – 2004. – Vol. 50. – P. 1040–1050.
7. Cemerski S., van Meerwijk J.P., Romagnoli P. Oxidative-stress-induced T lymphocyte hyporesponsiveness is caused by structural modification rather than proteasomal degradation of crucial TCR signaling molecules // *Eur. J. Immunol.* – 2003. – Vol. 33. – P. 2178–2185.
8. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress // *Clin. Chim. Acta.* – 2003. – Vol. 329. – P. 23–38.
9. Hagfors L., Leanderson P., Skoldstam L. et al. Antioxidant intake, plasma antioxidants and oxidative stress in a randomized, controlled, parallel, Mediterranean dietary intervention study on patients with rheumatoid arthritis // *Nutr. J.* – 2003. – Vol. 2. – P. 5. – doi: 10.1186/1475-2891-2-5.
10. Heliövaara M., Knekt P., Aho K. et al. Serum antioxidants and risk of rheumatoid arthritis // *Ann. Rheum. Dis.* – 1994. – Vol. 53. – P. 51–53.
11. Henrotin Y.E., Bruckner P., Pujol J.P. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage // *Osteoarthritis Cartilage*. – 2003. – Vol. 11. – P. 747–755.
12. Paredes S., Girona J., Hurt-Camejo E. et al. Antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis: association with inflammatory markers // *J. Rheumatol.* – 2002. – Vol. 29. – P. 2271–2277.
13. Rees M.D., Hawkins C.L., Davies M.J. Hypochlorite and superoxide radicals can act synergistically to induce fragmentation of hyaluronan and chondroitin sulfates // *Biochem. J.* – 2004. – Vol. 381. – P. 175–184.
14. Rees M.D., Hawkins C.L., Davies M.J. Hypochlorite-mediated fragmentation of hyaluronan, chondroitin sulfates, and related N-acetyl glycosamines: evidence for chloramide intermediates, free radical transfer reactions, and site-specific fragmentation // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – Vol. 125. – P. 13719–13733.
15. Taysi S., Polat F., Gul M. et al. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis // *Rheumatol. Int.* – 2002. – Vol. 21. – P. 200–204.