

## Диагностическое значение цитокинов при системной красной волчанке

Е. Ю. Гусев, Д. В. Иванов, Л. А. Соколова, Л. Н. Камкина

Кафедра внутренних болезней №2 ГОУ ВПО УГМА Росздрава, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург

### Diagnostic value of cytokines in systemic lupus erythematosus

E. U. Gusev, D. V. Ivanov, L. A. Sokolova, L. N. Kamkina

#### Резюме

Значение мониторинга системы цитокинов определяется корреляцией их концентраций с активностью патологического процесса, что позволяет заподозрить обострение заболевания раньше, чем проявятся его клинические признаки и лабораторные критерии. Эта информация позволит врачу своевременно корректировать терапию, и контролировать результаты лечения.

Цель исследования — оценить диагностическое значение показателей маркеров системной воспалительной реакции у больных СКВ.

Обследовано 49 больных СКВ. В контрольную группу вошли 50 здоровых доноров. В плазме крови пациентов определялись уровни острофазных белков, цитокинов,  $\beta_2$ -микроглобулина, рецептора к IL-2. Исследования проводились методом иммунохемилюминесценции на анализаторе «Immulite 1000». Уровень цитокинемии рассчитывался по методу В. А. Черешнева. Проведенное исследование показало, что наибольшей чувствительностью, специфичностью и диагностической значимостью обладают IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ .

Интегральный коэффициент цитокинемии является важным диагностическим параметром, отражающим воспалительную реакцию при СКВ. Данный параметр обладает высокими значениями чувствительности, специфичности и диагностической эффективности.

**Ключевые слова:** системная красная волчанка, цитокины, воспаление.

#### Summary

The cytokine system monitoring importance is determined by correlation of their concentration with activity of pathological process, that allows to suspect an aggravation of disease earlier, than its clinical attributes and laboratory criteria will be shown. This information will allow the doctor to correct the therapy timely, and to supervise results of treatment.

The purpose of research — to estimate diagnostic importance of system inflammatory markers by SLE patients.

49 SLE patients are examined. The control group included 50 healthy donors. In blood plasma of patients were tested levels cytokines, sIL-2R and  $\beta_2$ -microglobuline. Researches were carried out on the analyzer «Immulite 1000». The cytokinemia level was assigned on V.A.Chereshnev's method. Our research has shown, that the greatest sensitivity, specificity and the diagnostic importance have IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ .

The integral cytokinemia level is the important diagnostic parameter reflecting inflammatory reaction by SLE patients. This parameter has high importance of sensitivity, specificity and diagnostic efficiency.

**Key words:** systemic lupus erythematosus, cytokines, inflammation.

Цитокины являются индуцибельными белками, формирующими регуляторную сеть при развитии иммунной и воспалительной реактивности. основополагающие принципы функционирования цитокинов не определяются причинным фактором тканевого повреждения. Между тем, при системных аутоиммунных заболеваниях имеются некоторые особенности в соотношении и активности различных медиаторов воспаления [1, 2]. Клиническое значение мониторинга системы цитокинов определяется корреляцией их концентраций с активностью патологического процесса, показателями белков острой фазы воспаления, что позволяет

заподозрить обострение процесса гораздо раньше, чем проявятся его клинические признаки и общепринятые клинико-лабораторные критерии [3, 4, 5]. Таким образом, знание о состоянии цитокиновой системы больного позволит врачу своевременно корректировать терапию, контролировать результаты лечения, сохранить функцию пораженных органов, а значит, повысить качество жизни пациента. К тому же появившиеся в последнее время возможности непосредственно влиять на концентрацию некоторых провоспалительных цитокинов также обуславливают необходимость мониторинга маркеров хронической системной воспалительной реакции [3, 5, 1, 2].

Системная красная волчанка (СКВ) характеризуется вовлечением в воспалительный про-

Е. Ю. Гусев — доктор медицинских наук;

Л. А. Соколова — доктор медицинских наук, профессор.

цесс многих внутренних органов и систем, включая почки, сердце, сосуды, легкие, головной мозг [6, 7]. В ее патогенезе задействованы элементы иммунной и макрофагальной системы, эндотелия микрососудов и другие клетки мезенхимального происхождения, а также системы гемостаза и комплемента плазмы крови [4, 3, 5, 4, 10, 7, 1]. Продуцируемые медиаторы межклеточного взаимодействия выходят в кровоток и активируют все новые и новые клетки по всему организму. Таким образом, СКВ является аутоиммунным заболеванием с выраженными проявлениями системной воспалительной реакции (СВР).

**Цель исследования** — оценить диагностическое значение показателей цитокинов, белков острой фазы и других маркеров системной воспалительной реакции у больных СКВ.

### Материалы и методы исследования

Обследовано 49 больных СКВ, находившихся на лечении в городском ревматологическом центре ГКБ №40 (3 мужчин и 46 женщин, средний возраст  $43,55 \pm 1,7$  лет). С третьей степенью активности — 7 человек, со 2 — 12, с 1 — 29, 0 — 1. У всех пациентов наблюдались кожные высыпания, артриты выявлены у 47 пациентов, серозиты — у 33, поражение почек — у 25, патология ЦНС — у 14, гематологические нарушения — у 40. Хроническое течение наблюдалось у 16 человек, подострое — у 30, острое — у 3. В контрольную группу вошли 50 здоровых доноров (мужчин 25, женщин 25; средний возраст  $34,12 \pm 1,5$  лет). Диагноз СКВ устанавливался на основании диагностических критериев Американской ревматологической ассоциации 1982 г. В плазме крови пациентов определялись уровни острофазных белков: С-реактивного белка (СРБ) и липополисахаридсвязывающего белка (ЛПСБ), цитокинов (IL-1 $\beta$ , 6, 8, 10 и TNF $\alpha$ ),  $\beta_2$ -микроглобулина, растворимого рецептора к IL-2. Исследования проводились методом иммунохемилюминесценции на автоматическом анализаторе «Immulite 1000» с использованием реактивов фирмы «DPC»

(США). Уровень цитокинемии рассчитывался по методу В. А. Черешнева (соавторы: 12 Е. Ю., Юрченко Л.Н., Зотова Н. В., Дронишинец Н. Н.) «Способ определения интегрального индекса развития системной воспалительной реакции при критических состояниях человека», приоритетная справка №2005108368 от 24.03.2005. Характеристика уровней цитокинемии приведена в табл. 1.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программных пакетов Microsoft Excel и Statistica 6.0, SPSS 12 для Windows. Достоверность различий рассчитывалась по критерию Манна-Уитни. Рассчитывался коэффициент корреляции Спирмана. Результаты считались достоверными при  $p < 0,05$ . Для определения информативности тестов использовали логистическую регрессию и ROC-анализ. Количественным выражением значимости показателей при проведении ROC-анализа является площадь под кривой, чем она больше, тем больше диагностическая ценность метода. Для интерпретации данных ROC-кривой использовалась шкала, представленная в табл. 2.

### Результаты исследования и их обсуждение

Системная красная волчанка характеризуется хроническим течением системной воспалительной реакции с развитием острофазного ответа и цитокинемии, активацией иммунокомпетентных клеток и гранулоцитов. Гиперпродукция цитокинов при СКВ, характеризующаяся повышением уровня интерлейкинов-1 $\beta$ , 6, 8, 10, TNF $\alpha$  и растворимого рецептора IL-2 (IL-2R) в периферической крови, сопровождается повышением содержания в плазме  $\beta_2$ -микроглобулина, что подтверждается нашими данными, представленными в табл. 3.

Для каждого показателя определялись чувствительность, специфичность и диагностическая эффективность (табл. 4). Наиболее высокими значениями чувствительности, специфичности и диагностической эффективности характеризовались показатели IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ . Интегральным методом выражения чув-

Таблица 1. Характеристика уровней цитокинемии

Уровень 0	Уровень нормы;
Уровень 1	Маргинальный, практически исключает развитие острого, но не хронического СВ*
Уровень 2	Некритический, пограничные состояния для развития острого СВ, типичен для хронического СВ
Уровень 3	Условно критический, с высокой вероятностью развития острого СВ, при хронических процессах подтверждает наличие СВ
Уровень 4	Критический, при острых процессах определяет высокий риск развития полиорганной недостаточности (ПОН) и других осложнений, ассоциированных с СВ, при хронических процессах характеризует субкомпенсированное развитие СВ и встречается только при отдельных заболеваниях.
Уровень 5	Абсолютно критический, позволяет диагностировать критическое для жизни состояние, для хронического СВ нетипичен (особые, исключительные случаи).

Примечание. \* — Системное воспаление.

Таблица 2. Экспертная шкала значений площади под ROC-кривой (AUC\*)

Интервал AUC	Диагностическая значимость
0,9–1,0	отличная
0,8–0,9	очень хорошая
0,7–0,8	хорошая
0,6–0,7	средняя
0,5–0,6	неудовлетворительная

Примечание. \* – Площадь под кривой.

ствительности и специфичности является построение характеристической кривой (ROC-кривой), которая позволяет визуально оценить диагностическую значимость тестов и сравнивать информативность показателей между собой. Количественным выражением значимости показателей является площадь под кривой, чем она больше, тем больше диагностическая ценность метода. Данные о площадях под ROC кривыми для каждого теста приведены в табл. 5. По данным ROC-анализа наибольшей диагностической значимостью вновь обладают показатели IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ .

Одним из наиболее мощных флогогенных факторов при СКВ является TNF $\alpha$  [20]. К системным эффектам TNF $\alpha$  относятся пирогенность (в результате прямого действия на гипоталамус), понижение кровяного давления, стимуляция синтеза острофазных белков гепатоцитами, активация нейтрофилов и усиление продукции ими тромбосана A2, свободных ра-

дикалов кислорода, повышение проницаемости сосудистой стенки и усиление прокоагулянтной (усиление продукции тканевого фактора) и ослабление антикоагулянтной (ослабление экспрессии поверхностного тромбомодулина) активности эндотелиальных клеток, что, наряду с эффектами IL-8, ведет к аккумуляции нейтрофилов и микротромбообразованию [8, 11–16]. Кроме того, TNF $\alpha$  усиливает продукцию макрофагами IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 и других провоспалительных медиаторов [5, 9, 11, 12, 16,17], о чем свидетельствует наличие достоверных корреляционных связей между TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  ( $r=0,472$   $p=0,0048$ ), IL-6 ( $r=0,582$   $p=0,00001$ ), IL-8 ( $r=0,558$ ,  $p=0,00003$ ).

Повышение уровня IL-8 в кровотоке указывает на системную активацию нейтрофилов и эндотелиоцитов, которые секретируют IL-8 с такой же интенсивностью как и фагоциты (другие цитокины, как правило, — с меньшей), что ведет к выбросу лизосомальных ферментов и «дыхательному взрыву» [18, 19]. IL-8, относящийся к классу хемокинов, вызывает хемотаксис нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов и других клеток в очаг воспаления, повышает сродство иммунокомпетентных клеток к эндотелиоцитам посредством регуляции экспрессии молекул адгезии на этих клетках и активирует тромбоциты и эндотелиоциты [18, 19]. Выявленная корреляционная взаимосвязь между уровнями IL-8 и IL-1 $\beta$  ( $p=0,000000004$   $r=0,81$ ), IL-6 ( $p=3,91 \times 10^{-14}$ ,  $r=0,84$ ), TNF $\alpha$  ( $p=0,00003$ ,  $r=0,558$ ) подтверждает стимулирую-

Таблица 3. Уровни исследуемых показателей в основной и контрольной группах

Показатель	Группа	M $\pm$ m	min	max	Референтные значения	p
СРБ	СКВ	0,702 $\pm$ 0,141	0,02	5,26	до 1 мг/дл	0,014
	контроль	0,252 $\pm$ 0,033	0,01	0,96		
ЛПСБ	СКВ	26,767 $\pm$ 5,56	8,2	96,2	до 20 мкг/мл	0,0000062
	контроль	9,266 $\pm$ 0,820	4,1	23,6		
IL-6	СКВ	548,629 $\pm$ 275,619	2	12560	ю 5 пг/мл	8,007 $\times 10^{-17}$
	контроль	2,104 $\pm$ 0,061	2	4,6		
IL-8	СКВ	2096,629 $\pm$ 746,408	5	35350	ю 10 пг/мл	2,628 $\times 10^{-17}$
	контроль	5,656 $\pm$ 0,216	5	12		
TNF $\alpha$	СКВ	159,263 $\pm$ 40,056	4	1654	до 8 пг/мл	2,224 $\times 10^{-16}$
	контроль	4,396 $\pm$ 0,142	4	9,7		
IL-2R	СКВ	1208,187 $\pm$ 314,218	99,8	9107	до 700 ед/мл	0,000001
	контроль	315,561 $\pm$ 15,780	173	553		
IL-1 $\beta$	СКВ	35,032 $\pm$ 18,689	5	618	до 5 пг/мл	0,0000009
	контроль	5	5	5		
IL-10	СКВ	7,098 $\pm$ 0,872	5	34,5	до 5 пг/мл	0,00005
	контроль	менее 5				
$\beta_2$ -микроглобулин	СКВ	2993,167 $\pm$ 273,776	1040	6920	до 2000 нг/мл	3,485 $\times 10^{-17}$
	контроль	1508,4 $\pm$ 51,902	1132	1996		

Таблица 4. Чувствительность и специфичность исследуемых показателей

Показатель	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	ДЭ* в %
СРБ	71,9	61,2	64,6
ЛПСБ	84,6	79,4	80,85
IL-6	95,3	85,7	89,90
IL-8	97,8	90,7	93,94
TNF $\alpha$	100	94,3	96,97
IL-2R	87	77,6	80,56
IL-1 $\beta$	100	71,4	76,47
IL-10	100	58,8	64,65
$\beta_2$ -микроглобулин	88	68	78

Примечание. \* — Диагностическая эффективность.

Таблица 5. Значения площадей под ROC-кривыми для исследуемых показателей

Показатель	Площадь под кривой	Диагностическая значимость
IL-10	0,643	средняя
СРБ	0,643	средняя
IL-1 $\beta$	0,706	хорошая
$\beta_2$ микроглобулин	0,793	хорошая
IL-2R	0,838	очень хорошая
ЛПСБ	0,896	очень хорошая
IL-6	0,959	отличная
TNF	0,967	отличная
IL-8	0,979	отличная

ющее действие этого хемокина на лейкоциты и иммунную систему. IL-8 стимулирует пролиферацию эндотелиоцитов и васкуляризацию. Воздействие этого фактора на эндотелиальные клетки, в свою очередь, запускает каскад патологических реакций, ведущих к активации калликреин-кининовой системы и гемокоагуляции [8, 18].

Хронизация аутоиммунной агрессии сопровождается высоким уровнем IL-6 [4, 8]. Этот цитокин участвует в развитии резистентности Т-клеток к апоптозу, тем самым, поддерживая персистенцию патологического процесса. IL-6 способствует дифференцировке В-лимфоцитов в плазматические клетки и аутоантителообразованию, стимулирует синтез острофазных белков в печени, активирует гемопоэз [4, 8]. Уровень данного цитокина повышается при обострении патологического процесса. Высокий уровень IL-6, как и еще других провоспалительных цитокинов — TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , по-видимому, связано с активацией стромальных, прежде всего, сосудистых макрофагов [3, 4, 20]. Имеется достоверная корреляция между значением уровня IL-6 и IL-1 $\beta$  ( $p=0,0000006$ ,  $r=0,739$ ), IL-8 ( $p=3,91 \times 10^{-14}$ ,  $r=0,84$ ), IL-10 ( $p=0,018$ ,  $r=0,33$ ), TNF $\alpha$  ( $p=0,00001$ ,  $r=0,58$ ), IL-2R ( $p=0,028$ ,  $r=0,39$ ).

При этом следует отметить то, что, несмотря на высокую степень отличий концентраций отдельных значений от их нормативных показателей, использовать эмпирические значения этих показателей для мониторинга выраженности феномена СВР малоэффективно ввиду хаотичности изменений уровня отдельных цитокинов. Это отчасти характеризует и высокая степень ненормальности распределения цитокинов в крови при статистическом исследовании. С другой стороны использование интегрального показателя цитокинемии позволяет определить у конкретного больного качественный уровень СВР, определяющий принятие того или иного клинического решения.

Степень выраженности системного воспаления оценивалась по уровню цитокинемии. В группе больных СКВ большинство (38,8% — 19 чел.) имело 4-й уровень цитокинемии, 28,6% (14 чел.) — 3-й уровень, 18,4% (9 чел.) имели 0-й. В контрольной группе уровень цитокинемии не превышал нормального значения. Различия между уровнем цитокинемии в группе больных и здоровых доноров были достоверны ( $Z=8,657$   $p=4,863$ ).

Анализ уровня цитокинемии показал, что этот показатель обладает высокой чувствительностью (100%), специфичностью (92,2%) и ди-

агностической эффективностью (98,9%). Площадь под ROC-кривой — 0,959.

Таким образом, проведенное исследование показало, что наибольшей чувствительностью, специфичностью и диагностической значимостью при системной красной волчанке обладают IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ . Именно эти цитокины имеют наибольшее активирующее действие на иммунный ответ, коррелируя между собой, с концентрациями других цитокинов, белков острой фазы, данные показатели наиболее полно отражают активность патологического процесса при СКВ.

Интегральный коэффициент цитокинемии является важным диагностическим параметром, отражающим воспалительную реакцию при СКВ, который обладает высокими значениями чувствительности, специфичности и диагностической эффективности, его мониторинг позволит врачу контролировать интенсивность воспалительного процесса и своевременно оценивать эффективность проведенной терапии.

## Литература

1. Черешнев В. А. Гусев Е. Ю., Л. Н. Юрченко. Системное воспаление. Миф или реальность? Вестник российской академии наук. 2004; 7(3). 219-227.
2. Белоусов Ю. Б. Роль воспаления в клинике внутренних болезней. Русский медицинский журнал. 2001; 12(9): 12-25.
3. Глазанова Т. В., Бубнова Л. Н., Мазуров В. И. Способность иммунокомпетентных клеток периферической крови больных ревматоидным артритом и системной красной волчанкой к синтезу цитокинов с про- и противовоспалительными функциями — IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IFN $\gamma$  и IL-10. Цитокины и воспаление. 2002; 1: 2-12.
4. Жибурт Е.Б., Серебряная Н.Б., Каткова И.В., Дьякова В.В. Цитокины в кроветворении, иммуногенезе и воспалении. Терра Медика Нова. 1996; 3: 20-26.
5. Насонова В. А. Системные заболевания соединительной ткани: этиология и патогенез. Врач. 2000; 9: 3-5.
6. Ройт, А., Бростофф Д. Иммунология. М.: Мир; 2000. Гусев Е.Ю., А.В. Осипенко. Иммунология системного воспаления. Иммунология Урала. 2001; 1: 4-8.
7. Гусев Е. Ю., А. В. Осипенко. Иммунология системного воспаления. Иммунология Урала. 2001; 1: 4-8.
8. Иванова С. М., Вейко Н. Н., Рязанцева Т. А., Сперанский А.И. Аутоиммунные нарушения, интерлейкины 10, 4, 6 и фактор некроза опухоли  $\alpha$  у больных системной красной волчанкой. Клиническая лабораторная диагностика. 2004; 3: 21-39.
9. Ильина Н. И., Гудима Г. О. Иммуноопосредованные воспалительные заболевания. Объединяющая концепция. Российский аллергологический журнал. 2005; 1: С.3-6.
10. Bodmer J., Schneider P. The molecular architecture of the TNF superfamily. TRENDS in biochemical Sciences. 2002; 1: 19-27.
11. Белецкий И. П., Мошникова А. Б., Прусакова О. В. Пути передачи цитотоксического сигнала рецепторами семейства TNF-Rs. Биохимия. 2002; 3(67): 377-395.
12. Дубиков А. И. Белоголовых Л. А., Медведь Е. Э. Апоптоз как механизм развития аутоиммунного воспаления в коленном суставе человека. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004; 138 (12): 641-644.
13. Маянский Н. А. Каспазозависимый механизм апоптоза нейтрофилов: апоптогенный эффект туморонекротического фактора  $\alpha$ . Иммунология. 2002; 1: 15-17.
14. Attisano L. Warna J.L. Signal Transduction by the TGF- $\alpha$  Superfamily. Science. 2002; 296: 1646-1647.
15. Зубанова С. Г., Окулов В. Б. Молекулярные механизмы действия фактора некроза опухоли  $\alpha$  и трансформирующего фактора роста  $\beta$  в процессе ответа макрофага на активацию. Иммунология. 2001; 5: 18-21.
16. Симбирцев А. С. Биология семейства интерлейкина-1 $\beta$  человека. Иммунология. 1998; 12: 9-16.
17. Симбирцев А. С. Интерлейкин 8 и другие хемокины. Иммунология. 1999; 4: 9-14.
18. Симбирцев А. С. Интерлейкин 8 и другие хемокины. Иммунология. 1999; 4: 9-14.
19. Baggiolini M. Chemokine. Die gelben Hefte. 2001; 41: 37-43.
20. Ковальчук Л. В., Соболев Б. Н., Ганковская Л. В., Юдин А. А. Анализ молекулярного взаимодействия в системе IL-1 $\beta$  — IL-1RA — IL-1R. Иммунология. 2001; 1: 6-10.

## Рецензия

на статью Гусева Е.Ю., Иванова Д.В., Соколовой Л.А., Камкиной Л.Н.

### «Диагностическое значение цитокинов при системной красной волчанке»

Актуальность исследования не вызывает сомнений и обусловлена, как в научном, так и в практическом аспекте важностью разработки критериев оценки системной воспалительной реакции при хронических аутоиммунных заболеваниях. Цитокины — класс эндогенных полипептидных медиаторов межклеточного взаимодействия, регулирующие ряд физиологических функций. Они могут быть выделены в самостоятельную систему регуляции, наряду с нервной и эндокринной.

При хронических аутоиммунных заболеваниях цитокины обуславливают повреждение тканей, нарушение проницаемости сосудистой стенки, патологию системы гемостаза, процес-

сы экссудации, что выражается в появлении сыпи, болей, недостаточности функции органов. Однако, при оценке активности заболевания используются клинические симптомы и стандартные лабораторные данные, которые являются лишь следствием действия цитокинов. Это подчеркивает необходимость мониторинга системы цитокинов для оценки активности патологического процесса у пациентов.

Целью исследования, результаты которого представлены в данной статье, явилось определение диагностической значимости показателей цитокинов, белков острой фазы и других маркеров системной воспалительной реакции при системной красной волчанке.