

РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСА ТЕСТ-СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ КРОВИ И СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Трофимов Д.Ю.¹, Бурменская О.В.¹, Батенева Е.И.¹,
Алексеев Л.П.¹, Насонов Е.Л.², Александрова Е.Н.²,
Новиков А.А.²

¹ ЗАО «НПФ ДНК-Технология»

² ГУ Институт ревматологии РАМН, Москва

Резюме. Дисбаланс синтеза провоспалительных и противовоспалительных цитокинов играет ключевую роль в патогенезе ревматоидного артрита (РА), в том числе в эрозивном поражении суставов. Различия цитокинового профиля при РА достаточно хорошо изучены. Вместе с тем вопрос о связи цитокинового профиля с иммуновоспалительной активностью, прогрессированием и прогнозом РА требует дополнительного исследования. В связи с активным поиском новых мишеней для анти-цитокиновой терапии при РА оценка уровня цитокинов в периферической крови и синовиальной жидкости остается актуальной. Поэтому использование новых методов, основанных на технологиях определения уровня экспрессии мРНК генов цитокинов, является перспективным. Цель работы состояла в разработке тест-систем для количественного определения мРНК цитокинов: TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, IL-15, IL-10, IFN γ , IL-4, IL-2. В данной статье дана характеристика тест-систем, описаны принципы метода, приведено сравнение уровня экспрессии генов цитокинов в периферической крови и синовиальной жидкости при РА.

Ключевые слова: ОТ-ПЦР, цитокиновый профиль, мононуклеарные клетки, ревматоидный артрит.

Trofimov D. Yu., Burmenskaya O. V., Bateneva E. I., Alexeev L. P., Nasonov E. L., Alexandrova E. N., Novikov A. A.

DEVELOPMENT OF A REAL-TIME RT-PCR-BASED TEST PANEL FOR ASSESSMENT OF CYTOKINE PROFILE IN MONONUCLEAR CELLS FROM BLOOD AND SYNOVIAL FLUID IN RHEUMATOID ARTHRITIS

Адрес для переписки:

Александрова Елена Николаевна
ГУ Институт ревматологии РАМН
115522, Москва, Каширское шоссе, 34а.
Тел./факс: (499) 615-93-77.
E-mail: irramnlab@rambler.ru;
aleksandrovaen@irramn.ru

Abstract. An imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokine synthesis plays a crucial role in pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA), including erosive joint lesions. Differences in cytokine profiles of RA patients are sufficiently investigated. However, possible interrelations between cytokine profile, immune inflammation, RA progression, and the disease prognosis require further investigations. Due to active

search for novel targets in anti-cytokine therapy of RA, evaluation of cytokine levels in peripheral blood and synovial joint fluid remain quite relevant. Therefore, novel methods aimed to determine mRNA expressed by cytokine genes are thought to be promising. Our research was intended to develop test systems for quantitative determination of mRNAs for the following cytokines: TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, IL-15, IL-10, IFN γ , IL-4, IL-2. Present article concerns specificities of the developed test systems, description of their technical principles, as well as comparative studies of cytokine gene expression in peripheral blood and synovial joint fluid in RA patients. (*Med. Immunol.*, 2008, vol. 10, N 6, pp 563-570)

Введение

Ревматоидный артрит (РА) – системное аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся симметричным хроническим эрозивным артритом (синовитом) периферических суставов и системным воспалительным поражением внутренних органов. Несмотря на огромное число исследований, этиология и патогенез данного заболевания во многом остаются непонятными. Полагают, что ключевую роль в патогенезе РА могут играть цитокины. Традиционно РА рассматривают как модель антиген-специфической активации CD4⁺T-лимфоцитов по Th1-типу, характеризующемуся преобладанием синтеза интерлейкина-2 (IL-2), интерферона- γ (IFN γ) над продукцией IL-4 [1-3]. Дисбаланс Th1/Th2 ответа усиливает активацию макрофагов, дендритных клеток, В-лимфоцитов, что сопровождается гиперпродукцией провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухолей α – TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-15, IL-17, IL-18 и др.) и пониженной экспрессией противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10, растворимый антагонист рецептора IL-1, растворимые TNF α -рецепторы) [4-7].

Отмеченные выраженные отличия цитокинового профиля при РА, с одной стороны, достаточно хорошо изучены с помощью методов иммуноферментного анализа (ИФА). С другой стороны, вопрос о связи цитокинового профиля с иммуновоспалительной активностью, прогрессированием и прогнозом РА требует дополнительного исследования. Использование новых методов, основанных на технологиях определения нуклеиновых кислот методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени является перспективным.

Исследование цитокинового профиля при ревматоидном артрите представляет интерес не только с точки изучения патогенеза заболевания, но и с точки зрения применения антицитокиновой терапии. Особенно актуальным является анализ экспрессии генов цитокинов и поиск новых мишеней для антицитокиновой терапии у пациентов с активным РА, не отвечающих на лечение биологическими ингибиторами TNF α или IL-1b. В качестве возможных мишеней для проведения такой терапии рассматриваются IL-6 [8],

IL-15 [9, 10], IL-18 [11], большие надежды возлагают на препараты, блокирующие IL-17 [12, 13].

Настоящая работа связана с разработкой тест-систем для количественного определения мРНК 10-ти наиболее значимых при РА цитокинов: TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, IL-15, IL-10, IFN γ , IL-4, IL-2. В ходе работы решались следующие задачи: подбор и синтез праймеров и флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов (зондов), оптимизация условий реакций, оценка специфичности и чувствительности метода, определение эффективностей амплификации, линейного диапазона систем и ошибок метода.

Количественное определение уровня экспрессии мРНК цитокинов проводили относительно мРНК нормировочного гена (housekeeping gene) гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы (HPRT1). Выбор данного гена был обусловлен тем, что он входит в списки наиболее популярных нормировочных генов, характеризуется невысоким уровнем экспрессии, а также его структурная организация и отсутствие протяженных гомологичных участков в псевдогенах дают возможность подбора праймеров и зондов, не отжигающихся на геномной ДНК. В дальнейшем запланировано использовать для нормировки несколько контрольных генов.

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 02.512.11.2092 от 9 апреля 2007 года ФЦП «Исследование и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы», направление – «Живые системы».

Материалы и методы

Материалом исследования была периферическая кровь (ПК) и синовиальная жидкость (СЖ) больных ревматоидным артритом. Взятие материала осуществляли в пробирки с ЭДТА в конечной концентрации 2 мг/мл. Объем исследования клинического материала составил 48 образцов, включая 24 образца ПК и 24 образца СЖ пациентов с РА. В работе использовали коммерческие реактивы фирмы ЗАО «НПФ ДНК-Технология».

Выделение лимфоцитов из цельной крови. Разделение клеточных элементов крови проводили путем центрифугирования в градиенте плотности фиколла-урографина (плотность 1,077 г/мл).

Выделение лимфоцитов проводили из 1 мл цельной крови. Полученные клетки ресуспендировали в 100 мкл физ. раствора.

Выделение клеток из синовиальной жидкости. 1 мл СЖ разводили 1 мл физиологического раствора, осаждение клеток проводили путем центрифугирования при 6000 об./мин. в течение 10 минут.

Выделение нуклеиновых кислот (РНК и ДНК). Для выделения нуклеиновых кислот использовали наборы «Проба НК» с модификацией (фенольная депротенинизация). Метод основан на лизисе образцов в 4М растворе гуанидинтиоционата, фенольной депротенинизации, осаждении нуклеиновых кислот изопропанолом в присутствии соосаждителя, с последующими отмывками этанолом и ацетоном. Объем образцов после выделения составил 50 мкл.

Обратная транскрипция. Реакцию обратной транскрипции ставили в объеме 40 мкл (в реакцию брали 33 мкл образца). В качестве праймеров для обратной транскрипции использовали специфические олигонуклеотиды. Реакцию проводили при температуре 40°C в течение 1 часа, с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°C в течение 15 минут. Для увеличения объемов образцов после ОТ кДНК разводили в 5 раз деионизованной водой.

ПЦР. Праймеры и зонды для ПЦР были подобраны с учетом структур экзонов и интронов таким образом, чтобы исключить отжиг на матрице геномной ДНК цитокинов и HPRT1. Это позволило не использовать дополнительный этап обработки нуклеиновых кислот ДНК-азой. ДНК-зонды, использовавшиеся для детекции продуктов амплификации генов цитокинов и HPRT1, были помечены FAM. Реакции амплификации цитокинов и HPRT1 ставили в разных пробирках. Для повышения чувствительности и специфичности ПЦР был применен «горячий старт», который обеспечивался использованием парафина. Оптимальную температуру отжига праймеров и зондов подбирали экспериментально с использованием режима «градиент температур», для всех тест-систем температура была унифицирована и составила 62°C.

Амплификацию осуществляли в режиме реального времени в объеме 35 мкл по следующей программе: 1 цикл – 80°C 30 с, 94°C 1 мин.; 50 циклов – 94°C 10 с, 62°C 20 с, использовали приборы «ДТ-322» и «ДТ-964» производства фирмы ЗАО «НПФ ДНК-Технология». Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 62°C.

Дополнительный контроль прохождения реакции осуществляли методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Основные формулы. Уровень экспрессии мРНК генов цитокинов измеряли в относительных единицах, определяемых методом сравнения индикаторных циклов на основе математического анализа формы кривой амплификации (Cp) цитокина и HPRT1, по формуле 1:

$$\frac{[IL]}{[HPRT1]} = \frac{E_{HPRT1}^{Cp1}}{E_{IL}^{Cp2}},$$

где E – эффективность амплификации (см. формула 2); Cp1 – значение индикаторного цикла в образце для HPRT1; Cp2 – значение индикаторного цикла в образце для цитокина.

Уровень экспрессии фактически отражает представленность транскрипта в сравнении с нормировочным геном.

Эффективность амплификации (E) – величина, характеризующая прирост матрицы на каждом цикле. Теоретически на каждом цикле происходит удвоение ДНК, т.е. E = 2.

На практике эффективность амплификации определяется экспериментально по формуле 2:

$$E = 10^{-(1/slope)},$$

где slope – разница в значениях Cp при 10-кратном разведении образца (угловой коэффициент уравнения линейной зависимости Cp от логарифма (lg) концентрации матрицы).

Помимо этого E может быть выражена в % по формуле 3:

$$E(\%) = (10^{-(1/slope)} - 1) \times 100\%.$$

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием методов непараметрического анализа. Исследованные количественные показатели представляли в виде Me (L-H), где Me – медиана, L – нижний квартиль, H – верхний квартиль. Для сопоставления двух групп по количественным признакам использован U-критерий Манна–Уитни. Различие групп полагали статистически значимым при P < 0,05. Обработку полученных результатов проводили в программном пакете StatSoft Statistica 6.0.

Определение аналитических характеристик тест-систем для исследования уровня экспрессии генов цитокинов.

Были исследованы следующие параметры, характеризующие тест-систему:

- аналитическая специфичность метода;
- аналитическая чувствительность амплификации;
- эффективность амплификации;
- линейный диапазон;
- ошибка метода (коэффициент вариации нормированных значений).

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ С БАЗОЙ ДАННЫХ

Ген	Англ. символ	Название	Локализация гена	МРНК				Адресация ДНК	Наличие псевдогенов
				Адресация основной формы	Адресация вариантов альтернативного сплайсинга	Число экзонов	Какие варианты определяет система		
TNF α	TNF	фактор некроза опухолей альфа	6p21.3	NM_000594.2	нет	4	NM_000594.2	NC_000006.10	нет
IL-1 β	IL1B	интерлейкин-1 бета	2q14	NM_000576.2	нет	7	NM_000576.2	NC_000002.10	нет
IL-6	IL6	интерлейкин-6	7p21	NM_000600.1	нет	5	NM_000600.1	NC_000007.12	нет
IL-10	IL10	интерлейкин-10	1q31-q32	NM_000572.2	нет	5	NM_000572.2	NC_000001.9	нет
IL-17	IL17A	интерлейкин-17	6p12	NM_002190.2	нет	3	NM_002190.2	NC_000006.10	нет
IFN γ	IFNG	интерферон-гамма	12q14	NM_000619.2	нет	4	NM_000619.2	NC_000012.10	нет
IL-15	IL15	интерлейкин-15	4q31	NM_172174.1 (вариант 1)	NM_172175.1 (вариант 2 со-держит делецию 2-4 экзонов); NM_000585.2 (вариант 3 содержит делецию149-624 в 1 экзоне)	8	NM_172174.1 NM_172175.1 NM_000585.2	NC_000004.10	нет
IL-4	IL4	интерлейкин-4	5q31.1	NM_000589.2 (вариант 1)	NM_172348.1 (вариант 2 со-держит делецию 2 экзона)	4	NM_000589.2	NC_000005.8	нет
IL-8	IL8	интерлейкин-8	4q13-q21	NM_000584.2	нет	4	NM_000584.2	NC_000004.10	нет
IL-2	IL2	интерлейкин-2	4q26-q27	NM_000586.3	нет	4	NM_000586.3	NC_000004.10	нет
HPRT1	HPRT1	гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза	Xq26.1	NM_000194.1	нет	9	NM_000194.1	NC_000023.9	HPRT1, HPRT2, HPRT3, HPRT4

Результаты и обсуждение

Подбор праймеров и зондов осуществляли путем анализа последовательностей ДНК и мРНК генов цитокинов базы данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). При подборе праймеров и зондов учитывали структурную организацию генов, кодирующих мРНК цитокинов, чтобы исключить отжиг на геномной ДНК цитокинов; наличие псевдогенов; варианты альтернативного сплайсинга (табл. 1).

Подготовку образцов и постановку ПЦР осуществляли согласно методике. Дополнительный контроль прохождения реакции осуществляли методом электрофореза (например, TNF α – рис. 1, IL-15 – рис. 2). Для контроля отсутствия амплификации на геномной ДНК ставили ПЦР с образцами, не прошедшими реакцию обратной транскрипции (ОТ). Ни в одном случае не было отмечено наличия сигнала в образцах без ОТ. В некоторых случаях на электрофореграмме наблюдали наличие полос, не соответствующих по электрофоретической подвижности специфическому фрагменту, что может быть связано со случайной неспецифической амплификацией.

Определение аналитической специфичности метода. Разработанная тест-система позволяет определить относительную концентрацию цитокинов и не дает положительного результата на геномной ДНК человека.

Определение аналитической чувствительности амплификации. Аналитическая чувствительность тест-системы – это минимальное количество матрицы в образце, которое может быть определено при использовании данного метода. Она зависит от эффективности выделения РНК, реакций обратной транскрипции и амплификации. Было сделано допущение, что эффективность выделения РНК и обратной транскрипции близка к 1 (или 100%), т.е. к теоретически ожидаемой. В данной работе была проведена оценка аналитической

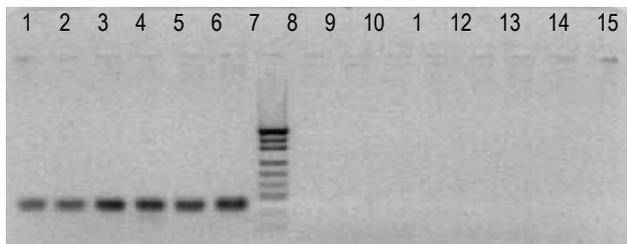


Рисунок 1. Электрофореограмма продуктов амплификации TNF α (длина ампликона – 81 п.н.)

Треки 1-6 – образцы, прошедшие реакцию ОТ;

Трек 7 – маркер длин фрагментов (pUC*);

Треки 8-10 – образцы без реакции ОТ;

Треки 14, 15 – отрицательные контроли.

*pUC – молекулярный маркер длины фрагментов, сверху вниз: 500, 404, 331; 242, 190, 147, 110, 67 п.н.

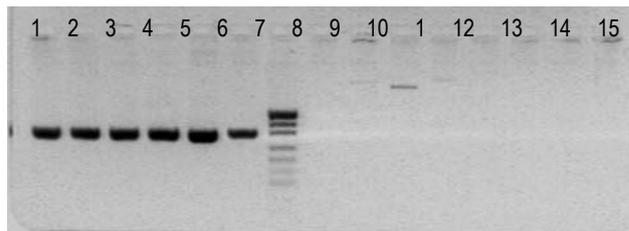


Рисунок 2. Электрофореограмма продуктов реакции IL-15 (длина ампликона – 329 п.н.)

чувствительности амплификационной части теста как минимально определяемое количество кДНК в амплификационной пробирке (коп./амп.).

Определение концентрации кДНК в стоковом растворе проводили методом количественного анализа. В качестве калибраторов использовали разведения плазмиды (pGemTeasy) с фрагментами кДНК цитокинов. Данные плазмиды были откалиброваны по pGemTeasy со вставкой вирусного гепатита В (HBV), в свою очередь откалиброванной относительно стандартов NIBSC для HBV (серия 97/746).

Оценку аналитической чувствительности проводили путем разведений образца с определенной концентрацией кДНК цитокина (стоковый раствор), который титровали с шагом в 10 раз при высоких концентрациях, далее ближе к обрыву положительных результатов с шагом в 2 раза. В соответствии с выполненными разведениями определяли концентрацию матрицы, при которой во всех амплификационных пробирках (не менее 10 воспроизведений) получен положительный результат. Определенная таким образом концентрация рассматривалась как аналитическая чувствительность метода.

Аналитическая чувствительность составила от 3 до 10 копий кДНК цитокинов на амплификационную пробирку, или от 180 до 600 копий на 1 мл цельной крови (табл. 2).

Определение эффективности амплификации. Для определения Е последовательно готовили 10-кратные разведения кДНК, проводили амплификацию, автоматически получали калибровочные «стандартные» кривые и значения эффективности амплификации. Исследование было проведено в серии экспериментов. Эффективность амплификации и для большинства тест-систем составила 95-99%, за исключением IL-4 (92%) (табл. 2).

Определение линейного диапазона тест-системы. Линейный диапазон оценивали по разведениям плазмид со вставками цитокинов, а также по разведениям концентрированных образцов РНК, полученных из 10 мл цельной крови. Далее строили калибровочные прямые зависимости логарифма концентрации цитокинов (\log_{10} или lg) от экспериментально полученных

ТАБЛИЦА 2. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТ-СИСТЕМ

Тест	Линейный диапазон, коп./амп.		Аналитическая чувствительность, коп./амп.	Кoeffициент вариации Cv, %	Эффективность амплификации, %
	Верхняя граница	Нижняя граница			
TNF α	10 ⁸	не более 50	5,4 \pm 3,2	20	96-99
IL-1 β			3,2 \pm 1,9	17	95-97
IL-6			3,6 \pm 2,2	27	95-96
IL-10			3,2 \pm 1,9	23	97-98
IL-17			3,9 \pm 2,3	50	97-98
IFN γ			3,3 \pm 2,0	4	95-98
IL-15			3,0 \pm 1,8	8	95-96
IL-4			4,5 \pm 2,7	9	92
IL-8			10,0 \pm 6,0	19	97-98
IL-2			4,9 \pm 2,9	18	95-98
HPRT1			4,4 \pm 2,6		95-96

значений индикаторного цикла (Cp) (например, для IL-17 рис. 3).

Область линейной зависимости среднего значения Cp от lg концентрации цитокина составила линейный диапазон тест-системы. Помимо линейной зависимости учитывали и значение среднего квадратичного отклонения (σ) Cp. По нашим данным, приемлемым можно считать значение σ для Cp не более 0,5 цикла, далее ошибка количественного определения существенно возрастает.

По общим для всех тест-систем данным, область линейного диапазона составила от 15 до 38 цикла значений Cp, что соответствует концентрациям от 10-50 до 108 копий на амплификационную пробирку (табл. 2). Как было показано, главным ограничивающим фактором является не столько отклонение от линейности, а значение

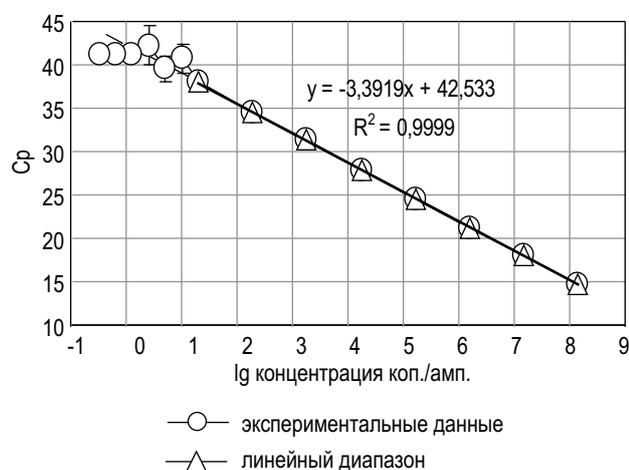


Рисунок 3. Линейный диапазон IL-17

среднего квадратичного отклонения, превышающее 0,5 цикла.

Определение ошибки метода. Ошибку относительной экспрессии цитокинов определяли в пределах одного эксперимента при физиологически нормальной концентрации цитокинов в плазме крови условно здорового пациента. Исследование одного образца было выполнено многократно ($n = 11$), начиная со стадии выделения лимфоцитов.

В каждом случае считали относительную экспрессию мРНК цитокина (формула 1). Для полученных значений уровня экспрессии мРНК цитокинов определяли коэффициент вариации (Cv).

Значения коэффициентов вариации нормированного по HPRT1 значения уровня экспрессии цитокинов составили от 4 до 50% (табл. 2). Cv зависел от представленности транскрипта в образце. Для IL-1 β и IL-8 характерен самый высокий уровень экспрессии (1-100 единиц относительно HPRT1), далее в порядке убывания IL-15, TNF α , IFN γ (0,1 единица), IL-4, IL-2, IL-10, IL-6 (10^{-2} - 10^{-3}), IL-17 (10^{-4}). Значение коэффициента вариации для IL-1 β , IL-8, IL-15, TNF α , IFN γ , IL-4 не превысило 20%, IL-6, IL-10, IL-2 – 30%, для IL-17 значение порогового цикла вышло за границы линейного диапазона тест-системы и Cv составил 50%. Поэтому в качестве способа снижения ошибки метода может быть предложен вариант с увеличением объема образцов.

Определение цитокинового профиля в ПК и СЖ у пациентов с РА. Для апробации тест-системы на клиническом материале были обследовано 24 пациента с диагнозом РА (материал

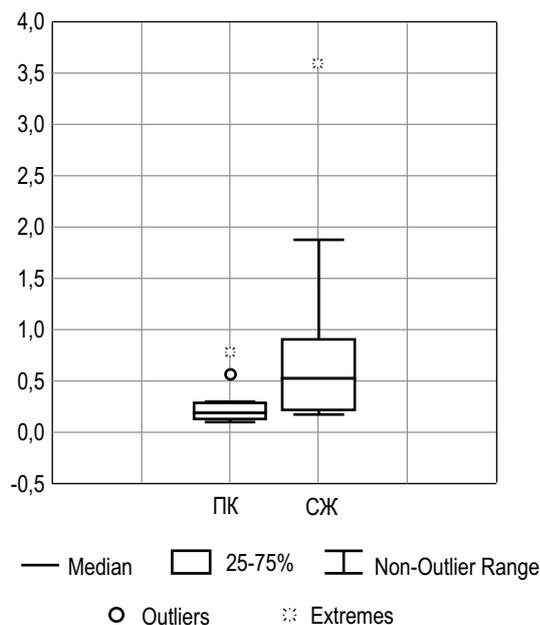


Рисунок 4. Нормированные значения уровня экспрессии мРНК гена TNF

исследования – ПК и СЖ). Диагноз был поставлен в соответствии с рекомендациями Американской ассоциации ревматологов [14]. Работая с данным материалом, мы преследовали цель отработки методики выделения РНК, постановки ОТ, проверки тест-систем и оптимизации условий реакции. Прежде всего была введена корректировка в метод выделения РНК. Синовиальная жидкость содержит большое количество белка, в связи с этим пришлось внести изменение в методику выделения РНК: дополнительно ввести этап фенольной депротеинизации. После лизиса в 4 М растворе гуанидинтиоционата в образец добавляли равный объем фенола и 1/5 часть объема смеси хлороформ/изоамиловый спирт в соотношении 24/1. После центрифугирования отбирали супернатант и еще раз проводили депротеинизацию фенолом. Далее следовали методике.

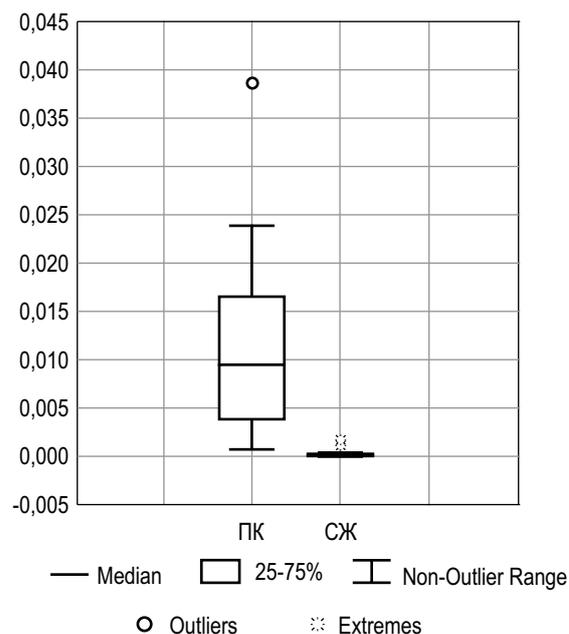


Рисунок 5. Нормированные значения уровня экспрессии мРНК гена IL-4

Уровень экспрессии мРНК генов цитокинов определяли по формуле 1 (см. Материалы и методы). Сопоставление результатов исследования уровня экспрессии мРНК генов цитокинов в синовиальной жидкости и мононуклеарных клетках крови в представленных образцах (табл. 3) показало, что в СЖ достоверно выше содержание мРНК TNF α ($p < 0,001$) (рис. 4), IL-17 ($p < 0,05$), IL-10 ($p < 0,001$); достоверно ниже: IL-15 ($p < 0,001$), IL-4 ($p < 0,001$) (рис. 5), IL-2 ($p < 0,001$).

Заключение

На основе метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени разработаны и охарактеризованы тест-системы для определения уровня экспрессии мРНК цитокинов. Для метода характерна высокая чувствительность (3-10 копий на амплификационную пробирку) и специфичность (отсутствие амплификации на геномной ДНК),

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МРНК ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ В ПК И СЖ

Цитокин	Ме		L		H	
	ПК	СЖ	ПК	СЖ	ПК	СЖ
TNF α	$1,7 \times 10^{-1}$	$5,0 \times 10^{-1}$	$1,4 \times 10^{-1}$	$2,7 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$	$8,3 \times 10^{-1}$
IL-1 β	4,8	4,7	3,2	0,9	7,2	11,6
IL-6	$1,2 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-3}$
IL-10	$3,5 \times 10^{-3}$	$5,5 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-2}$	$7,4 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-1}$
IL-17	$1,2 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$	$8,5 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-4}$	$8,1 \times 10^{-4}$
IFN γ	$1,2 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-1}$	$8,0 \times 10^{-2}$	$5,2 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-1}$	$4,1 \times 10^{-1}$
IL-15	$2,5 \times 10^{-1}$	$9,7 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-1}$	$7,9 \times 10^{-2}$	$3,3 \times 10^{-1}$	$1,6 \times 10^{-1}$
IL-4	$9,3 \times 10^{-3}$	$6,8 \times 10^{-5}$	$3,9 \times 10^{-3}$	$3,9 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-4}$
IL-8	39,5	36,0	15,5	5,5	57,7	258,3
IL-2	$7,8 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-3}$	$5,1 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-2}$	$5,9 \times 10^{-3}$

широкий линейный диапазон (не менее 7 Ig). Тест-системы адаптированы и могут быть использованы в научных целях для исследований цитокинового профиля в периферической крови и синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом.

Работа была выполнена при частичной поддержке грантом Федерального агентства по науке и инновациям № 02.512.11.2092.

Список литературы

1. Насонов Е.Л., Гукасян Д.А., Насонова М.Б. Иммунопатология ревматоидного артрита и остеопороз: новые данные // Остеопороз и остеопатии. – 2000. – № 2. – С. 4-7.
2. Abbas A.K., Murphy K.M., Sher A. Functional diversity of T helper lymphocytes // Nature. – 1996. – Vol. 383. – P. 787-793.
3. Arnett F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A., McShane D.J., Fries J.F., Cooper N.S., Healy L.A., Kaplan S.R., Liang M.H., Luthra H.S. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis // Arthritis Rheum. – 1988. – Vol. 31. – P.315-324.
4. Dolhain R.J., van der Heiden A.N., ter Haar N.T., Breedveld F.C., Miltenburg A.M. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patient with rheumatoid arthritis // Arthritis Rheum. – 1996. – Vol. 39. – P. 1961-1969.
5. Gracie J.A., Forsey R.J., Chan W.L., Gilmour A., Leung B.P., Greer M.R., Kennedy K., Carter R., Wei X.Q., Xu D., Field M., Foulis A., Liew F.Y., McInnes I.B. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis // J Clin Invest. – 1999. – Vol. 104. – P. 1393-1401.
6. Gaffen S.L. Biology of recently discovered cytokines: Interleukin-17 – a unique inflammatory cytokine with roles in bone biology and arthritis // Arthritis Res Ther. – 2004. – Vol. 6. – P. 240-247.
7. Kim K-W., Cho M-L, Park M-K., Yoon C.H., Park S.H., Lee S.H., Kim H.Y. Increased interleukin-17 production via a phosphoinositide 3-kinase/Akt and nuclear factor kB-dependent pathway in patients with rheumatoid arthritis // Arthritis Res Ther. – 2005. – Vol. 7. – P. 139-148.
8. McInnes I.B., Gracie J.A., Harnett M., Harnett W., Liew F.Y. New strategies to control inflammatory synovitis: interleukin 15 and beyond // Ann Rheum Dis. – 2003. – Vol. 62. – P. 51-54.
9. McInnes I.B., Gracie J.A. Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis // Immunol Today. – 1998. – Vol. 19. – P. 75-79.
10. Miosses P., van den Berg W. Th1/Th2 cytokine balance in arthritis // Arthritis Rheum. – 1997. – Vol. 40. – P. 2105-2115.
11. Morita Y., Yamamura M., Kawashima M., Harada S., Tsuji K., Shibuya K., Maruyama K., Makino H. Flow cytometric single-cell analysis of cytokine production by CD4⁺ T cell in synovial tissue and peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis // Arthritis Rheum. – 1998. – Vol. 41. – P. 1669-1676.
12. Park J.Y., Pillinger M.H. Interleukin-6 the pathogenesis of rheumatoid arthritis // Bull NYU Hosp Joint Dis. – 2007. – Vol. 65. – P. 4-10.
13. Simon A.K., Seipelt E., Sieper J. Divergent T-cell cytokine patterns in inflammatory arthritis // Proc Natl Acad Sci USA. – 1994. – Vol. 91. – P. 8562-8566.
14. Van Roon J.A., van Roy J.L., Duits A., Lafeber F.P., Bijlsma J.W. Proinflammatory cytokine production and cartilage damage due to rheumatoid synovial T-helper-1 activation is inhibited by interleukin-4 // Ann Rheum Dis. – 1995. – Vol. 54. – P. 836-840.

поступила в редакцию 21.05.2008

принята к печати 01.10.2008