Медицинская иммунология
2011, Т. 13, № 2-3, стр. 285-290
© 2011, СПб РО РААКИ

ВЛИЯНИЕ МЕВАСТАТИНА И БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА АКТИВАЦИЮ ВЭБ-СПЕЦИФИЧНЫХ CD4+ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ *IN VITRO*

Ширинский И.В.[1], Ширинский В.С.[1], Dinarello C.A.[2]

[1] *Лаборатория клинической иммунофармакологии учреждения Российской академии медицинских наук Научно-исследовательского института клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск*

[2] *Division of Infectious Diseases, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, United States*

Резюме. Изучалось влияние мевастатина, инфликсимаба, r-met-Hu-sTNF-RI и IL-1ra на антиген-индуцированную активацию ВЭБ-специфичных CD4+T-лимфоцитов у больных РА. Показано, что у больных РА, по сравнению со здоровыми людьми, содержание ВЭБ-специфичных CD4+T-лимфоцитов достоверно ниже. У здоровых доноров инфликсимаб, r-met-Hu-sTNF-RI и IL-1ra не влияли на активацию ВЭБ-специфичных CD4+ лимфоцитов. Добавление в культуры МНК ПК больных РА мевастатина, инфликсимаба, r-met-Hu-sTNF-RI или IL-1ra также не приводило к статистически значимым изменениям концентрации CD4+, IFNγ+ клеток. Таким образом, у больных РА выявляется снижение антиген-индуцированной активации ВЭБ-специфичных CD4+ лимфоцитов, а статины и биологические препараты не способствуют ее дальнейшему подавлению.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, вирус Эпштейна–Барр, лечение, статины, биологические препараты.

Shirinsky I.V., Shirinsky V.S., Dinarello C.A.

***IN VITRO* EFFECTS OF MEVASTATIN AND BIOLOGICAL PREPARATIONS UPON ACTIVATION OF EBV-SPECIFIC CD4+T LYMPHOCYTES FROM THE PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS**

Abstract. Present study concerned *in vitro* modifying effects of mevastatin, infliximab, r-met-Hu-sTNF-RI and IL-1ra upon antigen-induced activation of peripheral EBV-specific CD4+T-lymphocytes from the patients with rheumatoid arthritis (RA). When compared with healthy persons, the RA patients have shown significantly decreased concentrations of antigen-activated EBV-specific CD4+T-cells. In healthy donors, mevastatin, infliximab, r-met-Hu-sTNF-RI and IL-1ra did not influence the CD4+, IFNγ+ cell concentrations. Neither there were any effects of the abovementioned drugs upon the numbers of EBV-specific CD4+T-cell subset among cultured mononuclear cells from RA patients. Thus, the cells from RA patients exhibit a decreased *in vitro* antigen-induced activation of EBV-specific CD4+T-cells, whereas statins and biological agents do not promote suppression of EBV-specific activation of CD4+T-cells. ***(Med. Immunol., 2011, vol. 13, N 2-3, pp 285-290)***

Keywords: rheumathoid arthritis, Epstein–Barr virus, treatment, statins, biological drugs.

Адрес для переписки:
Ширинский Иван Валерьевич,
Лаборатория клинической иммунофармакологии НИИ клинической иммунологии СО РАМН
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: (383) 228-25-47.
Факс: (383) 228-25-47.
E-mail: ishirinsky@mail.ru

Введение

Важнейшим требованием к любому противовоспалительному или болезнь-модифицирующему препарату, используемому для лечения ревматоидного артрита (РА), является безопасность. Известно, что РА ассоци-

ирован с 2-5 кратным повышением риска развития неходжскинских лимфом [5]. В некоторых исследованиях было показано, что терапия ингибиторами TNFα и метотрексатом может приводить к еще большему повышению вероятности развития лимфом [20]. Одним из возможных механизмов увеличения риска развития лимфомы при использовании ингибиторов TNFα и метотрексата является подавление специфического иммунного ответа к вирусу Эпштейна–Барр (ВЭБ) и реактивация латентной ВЭБ-инфекции [7].

Ранее нами было показано, что применение симвастатина у больных с активным РА оказывает противовоспалительное, иммуномодулирующее и антиатерогенное действие [2, 16].

Учитывая способность статинов уменьшать антигенспецифическую стимуляцию лимфоцитов [1], можно предположить, что статины снижают ВЭБ-специфичный иммунный ответ. Теоретически такое свойство статинов может делать небезопасным их длительное применение у больных РА.

Целью исследования являлось изучение влияния мевастатина и биологических препаратов на активацию ВЭБ-специфичных Т-хелперов здоровых и больных РА *in vitro*.

Материалы и методы

Для оценки влияния мевастатина и биологических препаратов для лечения РА на активацию ВЭБ-специфичных Т-хелперов у трех здоровых доноров и четырех больных РА забиралось по 20 мл венозной крови. МНК ПК выделялись на градиенте плотности фиколл-верографин и культивировались (1×10^6/мл) в полной среде, дополненной 10 ЕД/мл рекомбинантного IL-2 в течение 18 часов, в присутствии 10 μM мевастатина (Sigma, США), 5 мкг/мл химерных моноклональных антител к TNFα (инфликсимаб, Schering-Plough, США), 5 мкг/мл рекомбинантной пегилированной формы натурального растворимого рецептора TNF p55 тип I (r-met-Hu-sTNF-RI, Amgen, США) и 10 мкг/мл рекомбинантной, негликозилированной формы антагониста рецептора IL-1 (IL-1ra, анакинра, Amgen США). Для антиген-специфической стимуляции в культуры вносился экстракт ВЭБ-инфицированных клеток (Advanced Biotechnologies, США) в концентрации 10 мкг/мл. Через 1 час инкубирования в культуры добавлялся брефелдин А (Calbiochem, США) в конечной концентрации 5 мкг/мл.

После 18 часов культивирования МНК ПК отмывались в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР), содержащем 0,1% NaN3 и окрашивались в течение 15 мин конъюгированными с FITC антителами к CD4 (Медбиоспектр, Россия). Далее клетки фиксировались 1% параформальдегидом. Пермеабилизация проводилась 0,2% раствором Твина-20. Далее клетки дважды отмывали и инкубировали с PE-конъюгированными антителами к IFNγ или PE-конъюгированными IgG2a (изотипический контроль)(BD Bioscience, США) в течение 20 мин. После клетки двукратно отмывали, ресуспендировали в 1% параформальдегиде и анализировали на проточном цитометре FACS Calibur (BD Biosciences, США). В каждой пробе анализировалось как минимум 500 000 событий. Лимфоцитарный гейт устанавливался в соответствии с характеристиками прямого и бокового светорассеяния. Квадранты на скатерограммах флюоресценции устанавливались по образцам, окрашенным антителами изотипического контроля. Концентрация ВЭБ-специфичных Т-хелперов оценивалась как содержание $CD4^+$, $IFN\gamma^+$ лимфоцитов на 500 000 $CD4^+$ лимфоцитов.

При статистическом анализе использовался непараметрический критерий Манна–Уитни.

Результаты

На рисунке 1 представлены результаты сравнения содержания ВЭБ-специфичных $CD4^+$ лимфоцитов у здоровых людей и больных РА. Показано, что у сопоставимых по возрасту и полу здоровых лиц по сравнению с больными РА регистрировалось достоверно большее содержание ВЭБ-специфичных $CD4^+$ лимфоцитов.

Далее проводилась оценка влияния биологических препаратов в сравнении с плацебо на содержание ВЭБ-специфичных Т-хелперов здоровых людей. Было обнаружено, что IL-1ra, TNF-RI, инфликсимаб и мевастатин не влияют на ВЭБ-индуцированный синтез IFNγ в $CD4^+$ лифмоцитах ПК (рис. 2).

Таким образом, у больных РА установлено уменьшение содержания ВЭБ-специфичных $CD4^+$ лимфоцитов по сравнению со здоровыми людьми, что может быть одним из механизмов, приводящих к повышенному риску активации латентной ВЭБ инфекции и развития неходж-

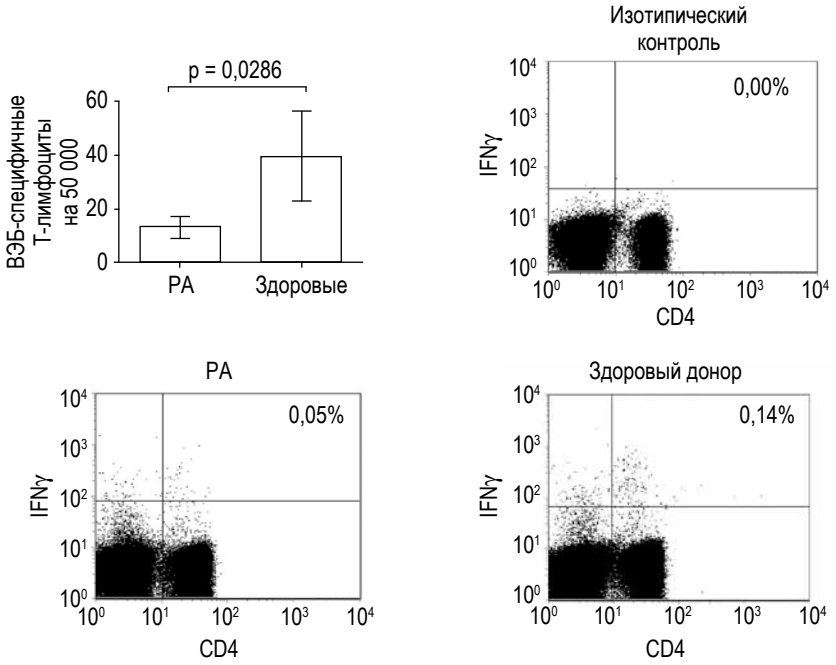

Рисунок 1. Сравнение содержания ВЭБ-специфичных CD4⁺ лимфоцитов у больных РА и здоровых людей

Примечание. Представлены репрезентативные графики изотипического контроля, больных РА и здоровых людей.

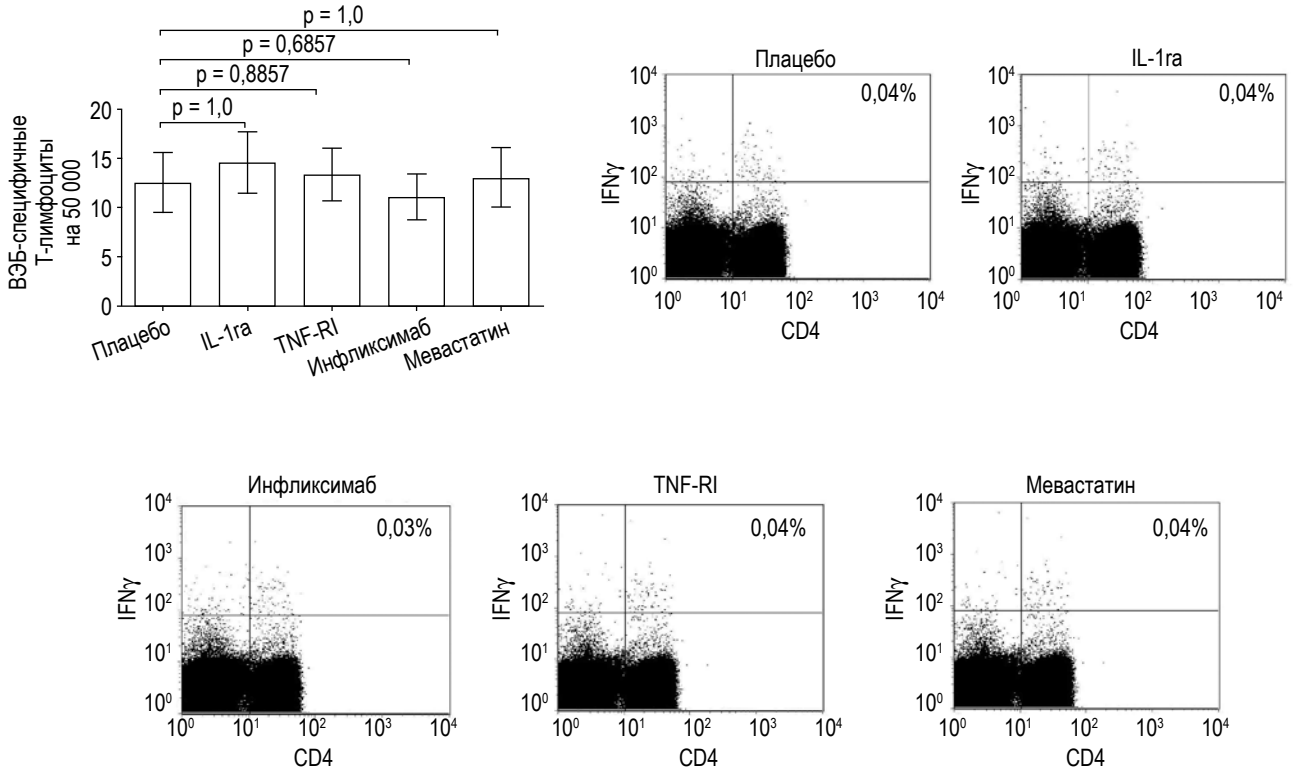

Рисунок 2. Влияние IL-1ra, инфликсимаба, TNF-RI и мевастатина на активацию ВЭБ-специфичных CD4⁺ лимфоцитов у здоровых людей

Примечание. Представлены репрезентативные графики содержания ВЭБ-специфичных CD4⁺ лимфоцитов при добавлении плацебо, IL-1ra, TNF-RI и мевастатина.

скинских лимфом. Мевастатин, IL-1ra, TNF-RI и инфликсимаб не оказывают влияния на ВЭБ-индуцированную активацию Т-хелперов.

Обсуждение

РА ассоциирован с рядом заболеваний, способствующих повышению смертности и развитию инвалидности. Одним из таких заболеваний, является неходжкинская лимфома. Существует несколько факторов, которые могут приводить к повышению риска лимфомы при РА [5]:

• препараты, использующиеся для лечения РА;

• общие для лимфом и РА генетические факторы;

• общие для лимфом и РА факторы внешней среды;

• факторы, связанные с патогенезом РА (повышение продукции антител и системное воспаление).

Наиболее вероятным механизмом, приводящим к развитию лимфом у больных РА, является ятрогенная иммуносупрессия или подавление функции иммунной системы, вызванное самим заболеванием [5].

Лимфомы, развивающиеся у иммунокомпроментированного хозяина, как правило ассоциированы с ВЭБ [15]. Жизненный цикл ВЭБ состоит из латентного состояния и репликации. Для поддержания латентного статуса ВЭБ в организме большую роль играют ВЭБ-специфичные Т-хелперы.

В ряде исследований продемонстрировано уменьшение ответа Т-лимфоцитов периферической крови больных РА на стимуляцию различными антигенами или митогенами [13, 17]. Аллель HLA-DRB1*0404, предрасполагающий к развитию РА, ассоциирован со снижением содержания Т-лимфоцитов, специфичных к антигену ВЭБ gp110, который является гликопротеином репликативной фазы и играет важную роль в контроле за ВЭБ-инфекцией [6]. У пациентов с РА выявляется большее число копий вируса в лимфоцитах периферической крови, чем у здоровых людей. Таким образом, наши данные согласуются работами, продемонстрировавшими прямые или косвенные признаки снижения анти-ВЭБ специфичного клеточного иммунитета у больных РА.

В некоторых исследованиях показано, что терапия болезнь-модифицирующими препаратами может повышать риск развития лимфом [3, 9]. С появлением биологических препаратов для лечения РА появились данные, свидетельствующие о возможном повышении частоты развития неходжкинских лимфом при использовании антагонистов TNFα [12].

Каковы потенциальные механизмы, приводящие к повышению риска ризвития лимфом у пациентов, получающих ингибиторы TNFα? Роль TNFα в карциногенезе неоднозначна. Так, в высоких дозах TNFα обладает мощным противоопухолевым действием [11], а в низких – может играть роль эндогенного стимулятора опухолевого роста [14].

Поскольку значение TNFα в развитии опухолей неясно, для изучения механизмов влияния ингибиторов TNFα на риск развития лимфом можно эстраполировать данные, касающиеся других состояний с повышенным риском развития злокачественных опухолей, например СПИДа и иммуносупрессии после трансплантации. Одним из возможных факторов, предрасполагающих к развитию опухолей у этих пациентов, является нарушение Т-клеточного репертуара и снижение специфического ответа Т-лимфоцитов на некоторые онкогенные вирусы [10], в частности ВЭБ.

Существуют доказательства того, что ингибиторы TNFα могут приводить к апоптозу Т-лимфоцитов, взаимодействуя с мембранной формой TNFα. Трансмембранный TNFα экспрессируется на активированных нормальных Т-лимфоцитах [4] в количестве около 270 на клетку [8]. Van den Brande et al показали, что инфликсимаб связывается с мембраным TNFα и посредством реверсивной передачи сигнала индуцирует апоптоз в лимфоцитах ПК *in vitro* [18]. Можно предположить, что этот эффект инфликсимаба при длительном применении подавляет антиген-специфическую активацию ВЭБ-специфичных Т-лимфоцитов и приводит к ограничению репертуара Т-лимфоцитов.

В проведенной работе показано, что активация ВЭБ-специфичных $CD4^+$ лимфоцитов *in vitro* не уменьшалась под действием статинов и биологических препаратов для лечения РА, что может свидетельствовать об отсутствии их влияния на риск развития лимфом. Это подтверждается результатами недавно проведенного крупномасштабного эпидемиологического исследования, не показавшего повышенной частоты развития лимфом у 10815 больных РА, получавших антагонисты TNFα [19]. Полученные данные так-

же косвенно свидетельствуют об отсутствии реверсивной передачи сигнала внутрь клетки при связывании ингибиторов TNFα с трансмембранной формой TNFα на поверхности ВЭБ-специфичных $CD4^+$ лимфоцитов.

Список литературы

1. Ширинский И.В., Желтова О.И., Соловьева Н.Ю., Ширинский В.С. Влияние статинов на пролиферацию лимфоцитов при ревматоидном артрите // Аллергология и иммунология. – 2007. – № 4. – С. 380-383.

2. Ширинский И.В., Желтова О.И., Соловьева Н.Ю., Ширинский В.С., Козлов В.А. Эффективность и безопасность симвастатина при ревматоидном артрите – открытое контролируемое исследование // Медицинская иммунология. – 2007. – № 4-5. – С. 477-482.

3. Asten P., Barrett J., Symmons D. Risk of developing certain malignancies is related to duration of immunosuppressive drug exposure in patients with rheumatic diseases // J. Rheumatol. – 1999. – Vol. 26. – P. 1705-1714.

4. Aversa G., Punnonen J., de Vries J.E. The 26-kD transmembrane form of tumor necrosis factor alpha on activated CD4+ T cell clones provides a costimulatory signal for human B cell activation // J. Exp. Med. – 1993. – Vol. 177. – P. 1575-1585.

5. Baecklund E., Askling J., Rosenquist R., Ekbom A., Klareskog L. Rheumatoid arthritis and malignant lymphomas // Curr. Opin. Rheumatol. – 2004. – Vol. 16. – P. 254-261.

6. Balandraud N., Roudier J., Roudier C. Epstein–Barr virus and rheumatoid arthritis // Autoimmun Rev. – 2004. – Vol. 3. – P. 362-367.

7. Feng W.H., Cohen J.I., Fischer S., Li L., Sneller M., Goldbach-Mansky R., Raab-Traub N., Delecluse H.J., Kenney S.C. Reactivation of latent Epstein–Barr virus by methotrexate: a potential contributor to methotrexate-associated lymphomas // J. Natl. Cancer Inst. – 2004. – Vol. 96. – P. 1691-1702.

8. Hober D., De Groote D., Vanpouille N., Dehart I., Shen L., Wattre P., Maniez-Montreuil M. Tumor necrosis factor receptor expression in HIV-1-infected CD4+ T cells // Microbiol. Immunol. – 1994. – Vol. 38. – P. 1005-1008.

9. Jones M., Symmons D., Finn J., Wolfe F. Does exposure to immunosuppressive therapy increase the 10 year malignancy and mortality risks in rheumatoid arthritis? A matched cohort study // Br. J. Rheumatol. – 1996. – Vol. 35. – P. 738-745.

10. Knowles D.M. Etiology and pathogenesis of AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma // Hematol. Oncol. Clin. North Am. – 2003. – Vol. 17. – P. 785-820.

11. Lejeune F.J., Ruegg C., Lienard D. Clinical applications of TNF-alpha in cancer // Curr. Opin. Immunol. – 1998. – Vol. 10. – P. 573-580.

12. Mariette X., Tubach F., Bagheri H., Bardet M., Berthelot J.M., Gaudin P., Heresbach D., Martin A., Schaeverbeke T., Salmon D., Lemann M., Hermine O., Raphael M., Ravaud P. Lymphoma in patients treated with anti-TNF: results of the 3-year prospective French RATIO registry // Ann. Rheum. Dis. – Vol. 69. – P. 400-408.

13. Nissinen R., Leirisalo-Repo M., Peltomaa R., Palosuo T., Vaarala O. Cytokine and chemokine receptor profile of peripheral blood mononuclear cells during treatment with infliximab in patients with active rheumatoid arthritis // Ann. Rheum. Dis. – 2004. – Vol. 63. – P. 681-687.

14. Orosz P., Echtenacher B., Falk W., Ruschoff J., Weber D., Mannel D.N. Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor // J. Exp. Med. – 1993. – Vol. 177. – P. 1391-1398.

15. Paludan C., Munz C. CD4+ T cell responses in the immune control against latent infection by Epstein–Barr virus // Curr Mol Med. – 2003. – Vol. 3. – P. 341-347.

16. Shirinsky I.V., Zheltova O.I., Solovyova N.Y., Kozlov V.A., Shirinsky V.S. Changes in disease activity, cytokine production, and proliferation of peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis after simvastatin treatment // Scand. J. Rheumatol. – 2009. – Vol. 38. – P. 23-27.

17. Siebert F., Kalden J.R., Fink P., Fricke M., Deicher H. The effect of serum and allogeneic antiglobulin preparations on the mitogenic reactivity of peripheral blood lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis // Z. Rheumatol. – 1978. – Vol. 37. – P. 286-295.

18. Van den Brande J.M., Braat H., van den Brink G.R., Versteeg H.H., Bauer C.A., Hoedemaeker I., van Montfrans C., Hommes D.W., Peppelenbosch M.P., van Deventerм S.J. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease // Gastroenterology. – 2003. – Vol. 124. – P. 1774-1785.

19. Wolfe F., Michaud K. The effect of methotrexate and anti-tumor necrosis factor therapy on the risk of lymphoma in rheumatoid arthritis in 19,562 patients during 89,710 person-years of observation // Arthritis Rheum. – 2007. – Vol. 56. – P. 1433-1439.

20. Wolfe A., Michaud K. Lymphoma in rheumatoid arthritis: the effect of methotrexate and anti-TNF therapy in 18 572 patients // Arthritis Rheum. – 2003. – Vol. 48 (suppl.). – P. 242.

поступила в редакцию 05.05.2010
отправлена на доработку 10.05.2010
принята к печати 17.05.2010

Опечатки

Редакция приносит свои извинения Ивану Валерьевичу Ширинскому и Валерию Степановичу Ширинскому в связи с ошибкой, допущенной в публикации статьи упомянутых авторов «ВЛИЯНИЕ ТЕРАПИИ СИМВАСТАТИНОМ НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АТЕРОСКЛЕРОЗА У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ» в предыдущем номере журнала «Медицинская иммунология» (2011, Т. 13, № 1, стр. 101-104). Резюме данной статьи просим считать ошибочным и публикуем ниже правильный вариант.

Резюме. Известно, что у больных ревматоидным артритом (РА) из-за раннего развития и быстрого прогрессирования атеросклероза повышен риск развития сердечно-сосудистых заболеваний и ассоциированной с ними смертности. Ранее нами были продемонстрированы противовоспалительное и липидкорригирующее действие симвастатина при активном РА. Целью данного исследования являлось изучение содержания в сыворотке периферической крови больных РА иммунологических маркеров атеросклероза – СРБ и IL-6 в динамике при лечении симвастатином. Показано, что прием симвастатина приводит к снижению изучаемых параметров. Изменения уровня СРБ отрицательно коррелировали с изменениями содержания холестерина антиатерогенных фракций липопротеинов сыворотки крови. Полученные данные являются еще одним доказательством антиатерогенного действия статинов при аутоиммунных заболеваниях.

Abstract. Rheumatoid arthritis patients has an increased risk of cardiovascular disease and mortality due to early development and accelerated progression of atherosclerosis. We previously showed anti-inflammatory and lipid-lowering effects of simvastatin in active RA. The aim of this study was to evaluate changes in immunological markers of atherosclerosis – CRP, IL-6 in RA patients treated with simvastatin. It was shown that simvastatin treatment leads to decrease in serum IL-6 and CRP. Changes in CRP levels negatively correlated with changes in concentrations of anti-atherogenic lipoproteins. Our findings represent additional evidence that statins possess anti-atherogenic properties in autoimmune diseases.