

ВЛИЯНИЕ СТАТИНОВ НА АНТИГЕНСПЕЦИФИЧЕСКУЮ АКТИВАЦИЮ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ – ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO*

Ширинский И.В., Ширинский В.С.

Государственное учреждение научно-исследовательский институт клинической иммунологии СО РАМН,
Лаборатория клинической иммунофармакологии, г. Новосибирск

Резюме. К числу кандидатных аутоантигенов, инициирующих развитие ревматоидного артрита (РА), относится коллаген II типа (СII). Показано, что статины обладают противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами. Механизмы действия статинов на индуцированную аутоантигенами активацию Т-лимфоцитов у больных РА остаются неясными. Целью настоящего исследования была оценка влияния мевастатина на СII и CD3-индуцированную активацию мононуклеаров периферической крови (МНК ПК) больных РА. МНК ПК, выделенные от больных активным (DAS28 – $6,6 \pm 0,64$) РА, были стимулированы антителами к CD3 (анти-CD3) или СII. В культуры добавлялись мевастатин в различных концентрациях, мевалоновая кислота, геранилгеранил пирофосфат (GGpp) и фарнезил пирофосфат (Fpp). Мевастатин в концентрации 10 μ M статистически значимо уменьшал СII-индуцированную пролиферацию МНК ПК и продукцию IFN γ . Эти эффекты мевастатина были частично обратимы при добавлении в культуры мевалоната кислоты, GGpp и Fpp. Мевастатин не оказывал влияния на стимулированную анти-CD3 стимуляцию МНК ПК. Заключается, что мевастатин способен ингибировать антигенспецифическую стимуляцию Т-лимфоцитов у больных РА благодаря снижению синтеза метаболитов мевалоновой кислоты.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктаза, статины, *in vitro*.

Shirinsky I.V., Shirinsky V.S.

EFFECTS OF STATINS UPON ANTIGEN-SPECIFIC LYMPHOCYTE ACTIVATION IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS: AN *IN VITRO* STUDY

Abstract. Collagen type II (Col II) is among the proposed candidate autoantigens initiating rheumatoid arthritis (RA). Statins have been shown to have anti-inflammatory and immunomodulating properties. Mechanisms of statin effects upon the autoantigen-induced T lymphocyte activation in RA patients are still unknown. The aim of present study was to evaluate the effects of mevastatin upon Col II- and anti-CD3-induced (PBMC) activation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from RA patients. PBMC from active RA patients (DAS28 – 6.6 ± 0.64) were stimulated with antibodies specific for either anti-CD3 or anti-Col II. The cultured cells were treated with mevastatin at different concentrations. Mevalonic acid, geranylgeranyl pyrophosphate (GGpp) and farnesyl pyrophosphate (Fpp) were added to cultures. Mevastatin at concentration of 10 μ M caused significant reduction of Col II-induced PBMC proliferation and of IFN γ production. These

mevastatin effects were partially reversible by addition of mevalonic acid, GGpp, and Fpp. Mevastatin did not influence the anti-CD3 induced PBMC activation. In conclusion, mevastatin is able to suppress antigen-specific T-cell stimulation in RA patients, due to decreased production of mevalonic acid metabolites. (*Med. Immunol.*, 2008, vol. 10, N 1, pp 77-80)

Адрес для переписки:

Ширинский Валерий Степанович
Лаборатория клинической иммунофармакологии
ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН.
630099, г. Новосибирск, Ядринцевская 14.
Тел./факс: 7 (383) 228-25-47.
E-mail: ishirinsky@mail.ru

Введение

Основным патогенетическим звеном ревматоидного артрита (РА) считается персистирующая активация Т-лимфоцитов, вызванная аутоантигенами [5]. К числу кандидатных аутоантигенов, способных инициировать иммунный ответ у больных РА, относится коллаген II типа (СII) [15]. Показано, что повышение уровня пролиферации Т-клеток в ответ на СII ассоциировано с активностью РА и выраженностью повреждения суставов [4].

Недавно открытые противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства ингибиторов 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазы (статинов) позволили использовать эти препараты при аутоиммунных заболеваниях [8, 12]. Механизмы действия статинов на индуцированную аутоантигенами активацию Т-лимфоцитов у больных аутоиммунными заболеваниями остаются неясными. Можно предположить, что действие статинов опосредовано уменьшением содержания метаболитов мевалоната.

Целью настоящего исследования была оценка влияния мевастатина на СII и CD3-индуцированную активацию мононуклеаров периферической крови (МНК ПК) больных активным РА.

Материалы и методы

Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом, и все больные подписали форму добровольного информированного согласия. У двенадцати больных РА, удовлетворявших критериям Американской коллегии ревмато-

логов [1], оценивали уровень пролиферации в ответ на СII в семидневных культурах МНК ПК. Наличие пролиферативного ответа определялось, если индекс стимуляции был $\geq 1,5$. По результатам скрининга в исследование было включено четверо пациентов (все женщины, средний возраст $57,1 \pm 0,87$ лет, средняя продолжительность болезни $12,6 \pm 2,6$ лет) с активным РА со средним индексом активности болезни (disease activity score, DAS28 [10]) $6,6 \pm 0,64$ балла. У каждого больного было забрано по 16 мл венозной крови в обработанные гепарином пробирки (Vacuette, Greiner Labortechnik, Kremismünster, Austria). МНК ПК выделялись на градиенте плотности фиколл-верографин в соответствии с методом Boyum [2]. Далее МНК ПК (1×10^6 /мл) культивировали в среде RPMI-1640 (Sigma, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 10% фетальной сыворотки телят (Sigma, США) в присутствии 0, 0,1, 1 и 10 μ M мевастатина (Sigma, США) в течение трех дней для анализа продукции цитокинов и анти-CD3-индуцированной пролиферации и семи дней для учета СII-индуцированной пролиферации. Для стимуляции использовались моноклональные анти-CD3-антитела ICO-90 (анти-CD3, «Медбио-спектр», Москва) в концентрации 1 мкг/мл и человеческий СII (Chemicon, США) в концентрации 5 мкг/мл. Для оценки влияния изопреноидов на действие мевастатина в культуры вносились L-мевалонат (Sigma, США) в концентрации 100 μ M, геранил-геранил пирофосфат (GGPP) (MP Bio-medicals, США) в концентрации 10 μ M и фарнезил пирофосфат (FPP) (Sigma, США) в концентрации 10 μ M. Интенсивность пролиферации оценивали

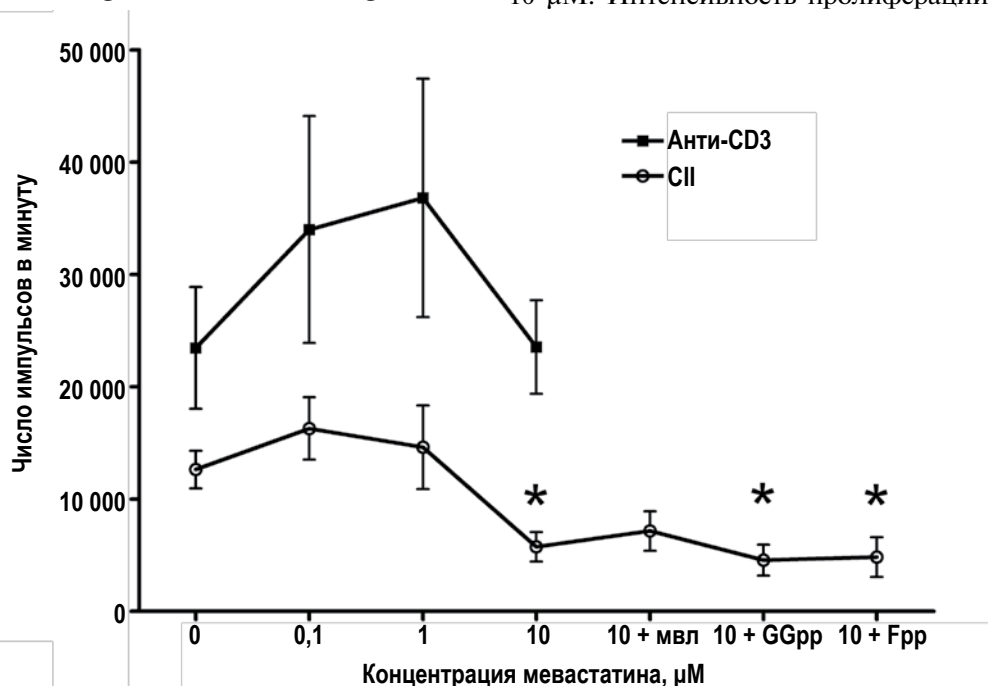


Рисунок 1. Влияние мевастатина в различных концентрациях на CD3 и СII-индуцированную пролиферацию МНК ПК при добавлении мевалоната (мвл), Fpp и GGpp

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с 0 μ M мевастатина.

по инкорпорации ^3H -тимидина (1 мКи/лунку), вносимого за 18 часов до окончания культивирования. Содержание $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-8 , IL-6 в супернатантах культур МНК ПК определялось методом ELISA с использованием реагентов фирмы «Вектор-Бест» в соответствии с инструкциями производителя. Достоверность различий оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Статистическая обработка материалов исследования и построение графиков проводилось с помощью программы GraphPad Prism 4, США.

Результаты

Пролиферация МНК ПК, вызванная добавлением СИ, была в 2-2,5 раза менее интенсивной, чем при стимуляции анти-CD3. Мевастатин в концентрациях 0,1 и 1 μM не влиял на СИ и анти-CD3-индуцированную пролиферацию МНК ПК. При увеличении концентрации препарата до 10 μM было зарегистрировано статистически значимое подавление пролиферации, вызванной СИ, но не антителами к CD3. Этот эффект мевастатина был частично обратим при добавлении мевалоновой кислоты, но не ее метаболитов (рис. 1).

Стимуляция МНК ПК СИ была ассоциирована с повышением содержания $\text{IFN}\gamma$ в супернатантах культур в среднем до 45 пг/мл. Внесение в культуры мевастатина в концентрациях 0,1 и 1 μM не действовало на синтез $\text{IFN}\gamma$. При повышении концентрации мевастатина до 10 μM СИ-стимулированная продукция $\text{IFN}\gamma$ тормозилась. Продукты метаболизма мевалоната FPP и GGPP предотвращали это действие препарата, не восстанавливая синтез $\text{IFN}\gamma$ до значений, достигнутых в контроле (рис. 2). Влияния мевастатина

на индуцированную СИ продукцию IL-6 , IL-8 и $\text{TNF}\alpha$ зарегистрировано не было.

Обсуждение

В настоящем исследовании показано ингибирующее действие мевастатина на вызванную СИ пролиферацию МНК ПК и синтез $\text{IFN}\gamma$, которое было частично обратимо при внесении в культуры изопреноидов.

Предполагается, что иммуномодулирующее действие статинов обусловлено двумя основными механизмами — подавлением прениляции белков и непосредственным взаимодействием статинов с биологически активными молекулами, например LFA-1 [3]. Прениляцией называется процесс присоединения к протеинам промежуточных продуктов метаболизма холестерина — FPP и GGPP. В результате прениляции молекула белка становится липофильной и приобретает способность интегрироваться в клеточную мембрану. Последнее необходимо для нормального функционирования ряда протеинов, участвующих в трансдукции внутриклеточного сигнала и играющих важную роль в активации лимфоидных клеток [9], презентации антигена [6] и хемотаксисе [11].

Наши результаты согласуются с данным экспериментальных работ, показавших снижение продукции $\text{IFN}\gamma$ *in vitro* МНК ПК мышей с СИ-индуцированным артритом при использовании симвастатина [7]. Недавно была продемонстрирована способность симвастатина подавлять $\text{TNF}\alpha$ -индуцированную активацию синовиальных фибробластов больных РА в результате снижения синтеза геранил-геранил пирофосфата и фарнезил пирофосфата [14]. В этой экспериментальной модели симвастатин уменьшал продукцию IL-6 ,

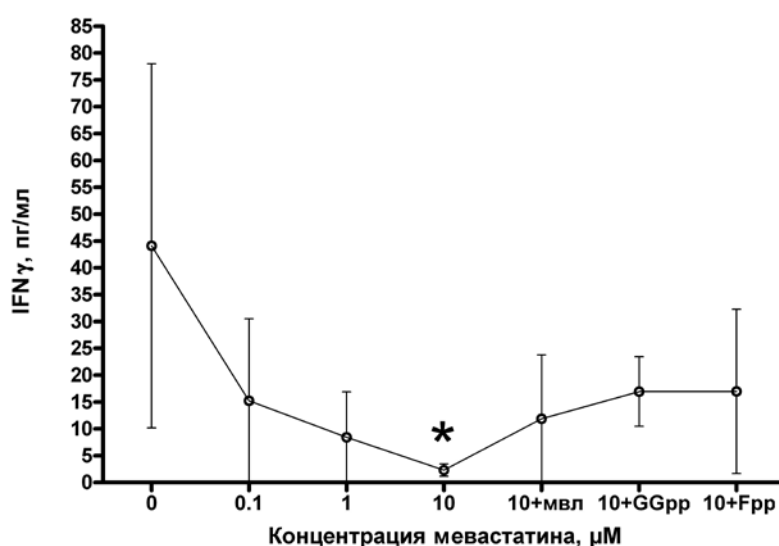


Рисунок 2. Влияние мевастатина в различных концентрациях на СИ-индуцированный синтез $\text{IFN}\gamma$ в культурах МНК ПК при добавлении мевалоната (мвл), Fpp и GGpp.

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с 0 μM мевастатина.

IL-8 и TNF α . В нашей работе выявлено подавление мевастатином синтеза IFN γ , но не провоспалительных цитокинов. Можно предположить, что различия в результатах обусловлены типом клеток и способом их стимуляции.

В исследовании Leung B.P. et al. было показано, что симвастатин уменьшает антигенспецифический иммунный ответ *in vitro* и *in vivo* у мышей с СП-индуцированным артритом [7]. Это соответствует полученным нами результатам у больных РА. Преимущественное действие статинов на антигенспецифическую стимуляцию Т-лимфоцитов может быть объяснено влиянием статинов на экспрессию МНС II [6].

В отличие от данных Yokota K. et al., в нашей экспериментальной модели подавление мевастатином СП-индуцированной активации Т-лимфоцитов было лишь частично обратимо при добавлении изопrenoидов. Можно предположить, что действие статинов на антигенспецифическую стимуляцию Т-лимфоцитов больных активным РА обусловлено не только снижением прениляции, но и другими механизмами, например блокадой LFA-1 [13].

Таким образом, результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что мевастатин способен ингибировать антигенспецифическую стимуляцию Т-лимфоцитов у больных РА благодаря снижению синтеза метаболитов мевалоновой кислоты. Подавление прениляции белков при использовании статинов или специфических антагонистов изопrenoидов может быть эффективным подходом к лечению РА и других аутоиммунных заболеваний.

Благодарности

Авторы благодарят к.м.н. Иванову И.П. за техническую помощь в работе.

Список литературы

1. Arnett F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A., McShane D.J., Fries J.F., Cooper N.S., Healey 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.
2. Boyum A. Isolation of leucocytes from human blood. A two-phase system for removal of red cells with methylcellulose as erythrocyte-aggregating agent // *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* — 1968. — Vol. 97. — P. 9-29.
3. Greenwood J., Steinman L., Zamvil S.S. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation // *Nat. Rev. Immunol.* — 2006. — Vol. 6. — P. 358-370.
4. Kim W.U., Kim K.J. T cell proliferative response to type II collagen in the inflammatory process and joint damage in patients with rheumatoid arthritis // *J. Rheumatol.* — 2005. — Vol. 32. — P. 225-230.
5. Koopman W.J., Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology. — Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. — P. 1091-1094.

6. Kwak B., Mulhaupt F., Myit S., Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator // *Nat. Med.* — 2000. — Vol. 6. — P. 1399-1402.

7. Leung B.P., Sattar N., Crilly A., Prach M., McCarey D.W., Payne H., Madhok R., Campbell C., Gracie J.A., Liew F.Y., McInnes I.B. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis // *J. Immunol.* — 2003. — Vol. 170. — P. 1524-1530.

8. McCarey D.W., McInnes I.B., Madhok R., Hampson R., Scherbakov O., Ford I., Capell H.A., Sattar N. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial // *Lancet.* — 2004. — Vol. 363. — P. 2015-2021.

9. Neuhaus O., Strasser-Fuchs S., Fazekas F., Kieseier B.C., Niederwieser G., Hartung H.P., Archelos J.J. Statins as immunomodulators: comparison with interferon-beta 1b in MS // *Neurology.* — 2002. — Vol. 59. — P. 990-997.

10. Prevoo M.L., van't Hof M.A., Kuper H.H., van Leeuwen M.A., van de Putte L.B., van Riel P.L. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* — 1995. — Vol. 38. — P. 44-48.

11. Veillard N.R., Braunersreuther V., Arnaud C., Burger F., Pelli G., Steffens S., Mach F. Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages // *Atherosclerosis.* — 2006. — Vol. 188. — P. 51-58.

12. Vollmer T., Key L., Durkalski V., Tyor W., Corboy J., Markovic-Plese S., Preiningerova J., Rizzo M., Singh I. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis // *Lancet.* — 2004. — Vol. 363. — P. 1607-1608.

13. Weitz-Schmidt G., Welzenbach K., Brinkmann V., Kamata T., Kallen J., Bruns C., Cottens S., Takada Y., Hommel U. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site // *Nat. Med.* — 2001. — Vol. 7. — P. 687-692.

14. Yokota K., Miyazaki T., Hirano M., Akiyama Y., Mimura T. Simvastatin inhibits production of interleukin 6 (IL-6) and IL-8 and cell proliferation induced by tumor necrosis factor-alpha in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis // *J. Rheumatol.* — 2006. — Vol. 33. — P. 463-471.

15. Yoshida M., Tsuji M., Kurosaka D., Kurosaka D., Yasuda J., Ito Y., Nishizawa T., Yamada A. Autoimmunity to citrullinated type II collagen in rheumatoid arthritis // *Mod. Rheumatol.* — 2006. — Vol. 16. — P. 276-281.

поступила в редакцию 30.05.2007
принята к печати 13.07.2007