

БИОМАРКЕРЫ

THE INFLUENCE OF THERAPY WITH METHOTREXATE ON PHENOTYPE OF PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS

I.R. Kolosova¹, E.R. Polosukhina², A. Yu. Baryshnikov², G.V. Loukina¹, Ya.A. Sigidin¹

¹Institute of Rheumatology RAMS

*²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS**

ABSTRACT

Objective. To examine the influence of therapy with methotrexate on phenotype of peripheral blood leukocytes in rheumatoid arthritis (RA) patients.

Methods. Peripheral blood samples were obtained from 20 patients with active RA. All patients were treated with methotrexate in dosage of 7,5-15 mg/week.

Fluorescent flow cytometry on FACScan (Becton Dickinson) was used to assess the expression of antigens CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11b, CD16, CD18, CD20, CD25, CD26, CD50, CD54, CD56, CD71, CD95, HLA-DR, Pgp-170 on peripheral blood leukocytes before and after therapy.

Results. The therapy with methotrexate led to the decrease of expression of the antigens CD50 (from 75,2±15,0% to 58,7±24,5%, P<0,05), CD26 (from 24,3±14,6% to 15,7±12,2%, P<0,05) in lymphocytes and CD50 (from 71,7±24,6% to 56,2±24,3%, P<0,05) in granular leukocytes. The expression of other antigens remained unchanged.

Conclusion. The therapy with methotrexate led to the decrease of percentage of activated leukocytes.

ДИНАМИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА ЛЕЙКОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ТЕРАПИИ МЕТОТРЕКСАТОМ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

И.Р. Колосова¹, Е.Р. Полосухина², А.Ю. Барышников², Г.В. Лукина¹, Я.А. Сигидин¹

¹Институт ревматологии РАМН,

²Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН

РЕЗЮМЕ

Целью данного исследования явилась оценка динамики мембранного фенотипа лейкоцитов периферической крови (ПК) у больных ревматоидным артритом (РА) под влиянием терапии метотрексатом (МТ).

В исследование были включены 20 больных РА с высокой и умеренной клинико-лабораторной активностью заболевания. В качестве базисной терапии всем больным был назначен МТ в дозе 7,5-15 мг в неделю.

На лимфоцитах ПК исследовались уровни экспрессии дифференцировочных антигенов CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16, CD20; активационных антигенов CD25, CD26, CD71, HLA-DR, CD95; молекул адгезии CD11b, CD18, CD50, CD54, CD56; фактора множественной лекарственной устойчивости Pgp-170. На гранулоцитах ПК исследовались уровни экспрессии антигенов CD11b, CD18, CD50, CD54, CD95, Pgp-170.

Определение экспрессии исследуемых антигенов на лейкоцитах ПК проводилось иммунофлюоресцентным методом до лечения и через 6 месяцев терапии.

Под влиянием терапии МТ отмечалось снижение процента лимфоцитов, экспрессирующих антигены CD50 (с 75,2±15,0% до 58,7±24,5%, P<0,05) и CD26 (24,3±14,6% до 15,7±12,2, P<0,05) и гранулоцитов, экспрессирующих антиген CD50 (с 71,7±24,6% до 56,2±24,3%, P<0,05). Не было выявлено статистически значимой динамики экспрессии остальных исследуемых антигенов. Таким образом, терапия МТ уменьшает приток активированных лейкоцитов ПК в синовию, благодаря изменению иммунологического фенотипа этих клеток.

Введение. Ревматоидный артрит (РА) - хроническое системное воспалительное заболевание, характеризующееся развитием симметричного деструктивного полисиндромита. В основе патогенеза лежит происходящая в синовиальной мембране сустава иммунная реакция лимфоидных клеток на аутоантигены суставных тканей [3]. На начальных этапах иммунной реакции при РА отмечается преобладание CD4⁺-клеток и повышение индекса CD4⁺/CD8⁺ в синовиальной жидкости и периферической крови (ПК). Комплекс активных антигенных пептидов и молекул HLA 2 класса с рецептором CD4⁺- Т - лимфоцита является сигналом, «запускающим» всю последующую иммунную реакцию с выработкой цитокинов, активированием новых количеств макрофагов и лимфоцитов, мобилизацией нейтрофилов, продукцией специфических антител. Формирование комплекса рецептора лимфоцита (TCR-CD3) с антигенными пептидами и молекулой главного комплекса гистосовместимости служит одним из основных стимулов для дальнейших активационных процессов в иммунокомпетентных клетках. Часть из активационных молекул исходно отсутствует на поверхности лимфоцитов, и их экспрессия индуцируется в процессе обмена сигналами. Важными маркерами активации лимфоцитов является экспрессия рецепторов интерлейкина-2 (CD25), трансферрина (CD71), антигена CD95, опосредующего апоптоз. Последний появляется на поверхности клеток, свидетельствуя о предстоящем удалении лимфоцитов, выполнивших свою функцию. Недостаточно изучена роль фермента дипептидилпептидазы-4 (CD26), относящегося к сериновым экзопротеазам. Известно, что при РА выявляется значительное повышение экспрессии CD26 [13], коррелирующее с количеством сывороточного интерферона-гамма (IFN- γ), который способен значительно усиливать аутоиммунные процессы.

Важная роль в формировании иммунно-воспалительного ответа при РА принадлежит межклеточным взаимодействиям, которые осуществляются при участии молекул адгезии (селектинов, интегринов, их рецепторов).

Благодаря установлению слабых и обратимых связей с селектинами, осуществляется первый этап пере-

мещения лейкоцитов в очаг воспаления из кровотока. Молекулы β 1- β 2-интегринов (в нашем исследовании CD18, которая представляет собой β 2 интегринов и CD11b - α -субъединица β 2 интегринов), взаимодействуя с рецепторами интегринов CD54 (ICAM-1), CD50 (ICAM-3) и др., обеспечивают прочную адгезию лейкоцитов с другими клетками [4]. При использовании иммуноферментного метода исследования, в синовиальной жидкости при РА обнаруживаются повышенные уровни растворимых форм молекул ICAM-1, что, вероятно, обуславливает активность лимфоцитов синовиальной и высокий уровень контактных взаимодействий клеток, приводящих, в конечном итоге, к развитию деструктивных процессов. Иммунофлюоресцентным методом, в периферической крови выявляется как повышенная [8, 20], так и пониженная экспрессия ICAM-1 лимфоцитами [19, 28]. Можно предположить, что различия в результатах, с одной стороны, являются следствием разнородности исследуемых групп больных РА. С другой стороны, вероятно, повышенный уровень экспрессии ICAM-1 лимфоцитами ПК отражает наличие системности ревматоидного процесса вследствие миграции активированных лимфоцитов из суставной полости в кровяное русло при высокой активности заболевания. В пользу этого заключения свидетельствует значительное повышение концентрации циркулирующих молекул ICAM-1 и ICAM-3 в ПК при ревматоидном васкулите [30].

Антиревматическая терапия оказывает модулирующее влияние на мембранный фенотип лимфоцитов. В клинической практике из базисных препаратов предпочтение отдается метотрексату (МТ). Это обусловлено как удобством применения, так и в большей степени его высокой клинической эффективностью [3]. Он представляет собой аналог фолиевой кислоты и относится к группе антиметаболитов, то есть веществ, близких по химической структуре к естественным метаболитам организма и конкурирующих с ними за участие в биохимических процессах [3]. В реализации фармакологической активности МТ и его метаболитов важное место занимает ингибирующее влияние на дигидрофолатредуктазу (ДГФ). Однако в дальнейших исследованиях было показано, что механизм действия малых доз МТ в большей степени осуществляется за счет противовоспалительного действия, которое реализуется посредством связывания аденозиновых (A3) рецепторов. Связывание с A3 рецептором приводит к ингибированию синтеза основных провоспалительных цитокинов IFN- γ и ФНО- α [10], смещению соотношения Th-1/Th-2 в провоспалительную сторону [14]. В ранее проведенных исследованиях не отмечается изменения количества основных популяций лимфоцитов в периферической крови [1], а в синовиальной жидкости показано снижение количества CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD38⁺, CD68⁺-клеток [27]. Кроме того, наблюдается уменьшение экспрессии отдельных молекул адгезии (E-селектин и VCAM-1) [11] и активации (HLA-DR) [7].

Отдельной проблемой лечения РА является вторичная неэффективность терапии, которая развивается после лечения несколькими базисными препаратами [3].

Таблица 1

Клиническая характеристика больных

Число больных	20	
Пол	М	3
	Ж	17
Средний возраст больных (годы)	51 \pm 12	
Средняя длительность заболевания (годы)	9,9 \pm 8,6	
Активность РА, степень (n)	2	16
	3	4
Рентгенологическая стадия (n)	2	12
	3	5
	4	3
Функциональная недостаточность (n)	1	8
	2	12
Наличие РФ (n)	13	
Системные проявления РА (n)	9	

В 1995г. Jorgensen et al. [16] предложил гипотезу участия гликопротеина-P (Pgp-170), продукта гена множественной лекарственной резистентности, в развитии лекарственной неэффективности при РА путем активирования повышенного выброса химических веществ из клеток. В связи с этим мы решили исследовать экспрессию Pgp-170 на лейкоцитах ПК, а также проанализировать возможное влияние МТ на экспрессию этого гликопротеина.

Таким образом, изучение влияния МТ на функционально существенные поверхностные молекулы лейкоцитов ПК больных РА представляет определенный интерес. Оно позволит расширить представления о механизмах действия МТ и получить дополнительные данные о патогенезе РА.

Материалы и методы. В открытое контролируемое исследование экспрессии активационных антигенов при РА были включены 20 больных с достоверным РА, согласно критериям Американской коллегии ревматологов, с высокой и умеренной клинико-лабораторной активностью заболевания. Клиническая характеристика больных, включенных в исследование, представлена в таблице 1. Все больные не менее 3 месяцев до начала и в период наблюдения продолжали получать фоновую нестероидную противовоспалительную терапию, преимущественно диклофенак в средних терапевтических дозах. Предшествующая базисная терапия отменялась не позже чем за 1 месяц до начала исследования вследствие неэффективности или непереносимости.

Всем больным в качестве базисной терапии был назначен метотрексат в дозе 7,5-15мг в неделю. Контрольную группу составили 18 здоровых доноров (средний возраст 53±16 лет). Для оценки эффективности проводимой терапии использовали следующие критерии: выраженность боли в суставах по 10-сантиметровой визуальной аналоговой шкале (ВАШ), выраженность утомляемости по ВАШ, длительность утренней скованности (в мин.), число припухших суставов, число болезненных суставов, индекс припухлости, сила сжатия кисти (в кПа), раздельная оценка тяжести состояния врачом и пациентом по градациям 1 - практически здоров, 2- минимальные изменения, 3 - умеренные, 4- средней тяжести, 5 - тяжелое состояние, СОЭ, уровни фибриногена, серомукоида и С-реактивного белка, ревматоидный фактор по данным латекс-теста, раздельная оценка лечебного эффекта врачом и пациентом по следующим градациям: значительное улучшение, улучшение, незначительное улучшение, без перемен, ухудшение. Для оценки переносимости используемых препаратов определяли уровень гемоглобина, количество лейкоцитов и тромбоцитов периферической крови, лейкоцитарную формулу, содержание в сыворотке крови билирубина, аспарагиновой и аланиновой трансаминаз, креатинина; проводили также общие анализы мочи.

Определение экспрессии поверхностных антигенов лейкоцитов на поверхности лейкоцитов осуществлялось с использованием моноклональных антител серии ИСО (НПЦ «МедбиоСпектр») при помощи прямой и

непрямой реакций иммунофлюоресценции. Определение экспрессии антигена Pgp-170 проводилось с использованием моноклональных антител UIC2 («Immunotech»).

На лимфоцитах ПК исследовались уровни экспрессии дифференцировочных антигенов CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16, CD20; активационных антигенов CD25, CD26, CD71, HLA-DR, CD95; молекул адгезии CD11b, CD18, CD50, CD54, CD56; фактора множественной лекарственной устойчивости Pgp-170. На гранулоцитах ПК исследовались уровни экспрессии: антигенов CD11b, CD18, CD50, CD54, CD95, Pgp-170.

Регистрация клинических показателей и забор крови проводились до начала лечения и после предполагаемой полной реализации клинического эффекта метотрексата - через 6 месяцев терапии.

Статистическая обработка результатов проводилась на персональном компьютере с использованием программного пакета Statistica 5.1. Применялись непараметрические методы (ранговая корреляция по Спирмену, тест Манна-Уитни, Уилкоксона, точный критерий Фишера), для описания распределения данных были использованы средняя величина (М) и стандартное отклонение (SD).

Результаты и обсуждение. На первом этапе мы исследовали особенности фенотипа лейкоцитов ПК больных РА по сравнению с группой здоровых доноров. При оценке иммунологического фенотипа лимфоцитов мы обнаружили значимое уменьшение количества CD8+лимфоцитов (больные - 22,4±6,5% и здоровые - 29,0±9,0%, P<0,05) (таблица 3) и тенденцию к увеличению иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8) у больных РА.

Кроме того, на лимфоцитах ПК больных РА выявлено уменьшение экспрессии β2-интегринов, антигена CD18 (больные - 71,0±19,0%, здоровые - 81,0±13,0%, P<0,05). Количество CD11b⁺-лимфоцитов оставалось в пределах нормальных значений, однако наблюдалось уменьшение экспрессии антигена

Таблица 2
Динамика клинических и лабораторных показателей активности РА под влиянием терапии метотрексатом

Клинические и лабораторные показатели	До лечения	После лечения
Боль, по ВАШ (0-10 см).	6,5±1,3	4,3±2,8**
Утренняя скованность (мин.)	117,0±160,9	86,9±118,8
Число припухших суставов	7,4±4,1	2,7±2,8***
Число болезненных суставов	15,8±7,8	7,1±7,2***
Индекс припухлости	9,0±4,1	2,7±2,8***
Сила сжатия правой кисти (кПа)	64,7±37,7	96,0±47,5**
Сила сжатия левой кисти (кПа)	70,6±50,2	92,0±50,5
Утомляемость, по ВАШ (0-10 см).	6,7±2,0	5,6±2,2
Тяжесть состояния (оценка больного)	3,5±0,6	2,4±1,0**
Тяжесть состояния (оценка врача)	3,5±0,6	2,4±1,0***
Фибриноген (ммоль/л)	4,1±1,3	4,0±0,8
Серомукоид (Ед)	0,46±0,2	0,35±0,1*
СОЭ (мм/ч)	34,8±12,4	25,0±13,5
С-реактивный белок (мг%)	1,7±1,6	1,0±1,0*
Ревматоидный фактор (log титра)	2,0±0,5	1,7±0,9

*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

CD50 (больные - 75,2±15,0%, здоровые - 83,5±11,3%, $P < 0,05$) и тенденция к снижению экспрессии антигена CD54 (таблица 3).

Наши результаты совпадают с данными большинства исследователей [5, 19, 28], которые обнаружили уменьшение экспрессии этих адгезивных молекул лимфоцитами ПК у больных РА [5, 19] или не выявили значимых отличий по сравнению с донорами [28]. Однако, в ранее проведенных исследованиях с использованием иммуноферментного метода, была обнаружена повышенная концентрация циркулирующих молекул адгезии ICAM-1 в ПК. Можно полагать, что часть растворенных форм молекул адгезии имеет эндотелиальное происхождение.

При исследовании фенотипа гранулоцитов в группах больных РА и здоровых доноров значимых различий не было выявлено. По данным литературы, экспрессия антигенов CD11b, CD18 на гранулоцитах ПК при РА не изменена. Кроме того, обнаруживается повышение уровней экспрессии этих антигенов на гранулоцитах, выделенных из синовиальной жидкости [12].

При сравнении уровней экспрессии фактора множественной лекарственной устойчивости на лейкоцитах ПК больных РА и здоровых доноров были получены следующие результаты. Мы обнаружили тенденцию к преобладанию лимфоцитов и гранулоцитов, экспрессирующих молекулу Pgp-170, у больных РА. Корреляционный анализ не выявил статистически значимых связей экспрессии Pgp-170 с другими лейкоцитарными антигенами. Не было обнаружено связей уровня экспрессии Pgp-170 с клинико-лабораторными особенностями РА, предшествующей терапией, демографическими особенностями больных. О возможном участии

Pgp-170 в патологическом процессе при РА может свидетельствовать обнаружение прямой связи между уровнем экспрессии Pgp-170 лимфоцитами ПК и уровнем фибриногена ($R=0,54$). Наши результаты совпадают с данными других ученых [16, 18], которые получили подобные результаты. Не было найдено литературных данных об экспрессии Pgp-170 гранулоцитами ПК.

Известно, что базисные препараты, одним из которых является метотрексат, индуцируют клиническую ремиссию и предупреждают повреждение суставов и тканей при РА. Наряду с противовоспалительными, МТ обладает иммуносупрессивными свойствами, однако тонкие механизмы его действия остаются неясными. В связи с этим, на следующем этапе нашей работы, мы исследовали динамику лейкоцитарного фенотипа под влиянием терапии МТ. Мы наблюдали статистически значимую положительную динамику большинства основных клинических показателей (боль в суставах, число припухших, число болезненных суставов, индекс припухлости, сила сжатия правой кисти, тяжесть состояния по оценке врача и больного) и лабораторных (серомукоид, С-реактивный белок) показателей активности РА (таблица 2). Терапия оказалась эффективной у 60% пациентов: значительное улучшение наблюдалось у 40%, улучшение - у 10%, незначительное - у 10%. Эффект от лечения отсутствовал у 25% больных, ухудшение зафиксировано у 15% больных. Переносимость метотрексата была удовлетворительной. Спектр и частота побочных реакций в нашем исследовании не отличались от таковых в других исследованиях [1].

Мы показали, что терапия МТ не оказывает влияния на экспрессию дифференцировочных антигенов, таких как CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD20⁺, что коррелирует с данными литературы [17]. А при исследовании биоптатов синовиальной Balsa A. et al. [7] и Dolhain R. et al. [11] выявили уменьшение инфильтрации синовиальной ткани CD4⁺- CD8⁺- лимфоцитами на фоне терапии МТ.

Также мы обнаружили, что под влиянием терапии МТ отмечается значимое снижение процента лимфоцитов ПК, экспрессирующих молекулу адгезии ICAM-3 (CD50) с 75,2±15,0% до 58,7±24,5%, $P < 0,05$. Ранее было показано, что МТ подавляет экспрессию E-селектина и VCAM-1 [10]. Таким образом, на фоне лечения МТ уменьшается приток новых порций лимфоцитов в воспаленную синовию, за счет его влияния на экспрессию отдельных адгезивных молекул.

Кроме того, мы обнаружили, что под влиянием терапии метотрексатом уменьшается экспрессия активационного антигена CD26 с 24,3±14,6% до 15,7±12,2%, $P < 0,05$ (таблица 3). Мы предполагаем, что способность МТ модулировать цитокиновый профиль осуществляется отчасти посредством влияния на экспрессию фермента дипептидилпептидазы 4 (CD26).

При изучении влияния терапии МТ на экспрессию отдельных антигенов на гранулоцитах ПК у исследуемой группы больных РА мы выявили значительное уменьшение экспрессии рецептора для интегринов, антигена CD50 (ICAM-3) с 71,7±24,6% до 56,2±24,3%, $P < 0,05$. Статистически достоверной динамики экспрес-

Таблица 3

Характеристика иммунологического фенотипа лимфоцитов здоровых лиц и больных РА (до и после лечения МТ)

CD-маркер	Здоровые N=18	Больные РА до лечения	Больные РА после лечения
CD3	65,6±11,4	61,8±11,7	58,7±15,6
CD4	35,2±10,2	36,0±10,7	31,9±11,3
CD5	61,3±10,8	55,5±14,1	46,1±18,4
CD7	58,6±14,1	51,7±14,8	48,3±13,4
CD8	29,0±9,0	22,4±6,5	20,3±8,6
CD4/8	1,3±0,6	1,6±1,0	2,1±1,0
CD11b	20,2±9,9	22,2±11,2	22,3±18,9
CD16	11,1±6,2	13,0±1,9	12,0±9,4
CD18	81,0±13,0	71,0±19,0	55,9±25,1
CD20	8,1±3,2	7,1±5,7	6,6±3,2
CD25	4,9±5,1	4,9±4,6	3,4±3,7
CD26	25,2±12,2	24,3±14,6	15,7±12,2*
CD50	83,5±11,3	75,2±15,0	58,7±24,5*
CD54	9,3±6,6	8,2±8,0	6,5±4,6
CD56	5,8±3,5	5,1±4,7	5,3±5,0
CD71	3,7±3,4	4,6±4,7	3,8±4,3
CD95	25,6±12,3	27,2±17,4	15,0±15,7
HLA-DR	9,1±2,9	9,1±4,2	8,2±4,7
Pgp170	2,5±1,9	17,1±24,8	23,3±27,3

* $P < 0,05$ – при сравнении результатов до и после терапии метотрексатом.

Таблица 4
Характеристика фенотипа гранулоцитов здоровых лиц и больных РА (до и после лечения МТ)

CD-маркер	Здоровые N=18	Больные РА до лечения	Больные РА после лечения
CD11b	65,2±20,1	62,3±25,2	57,7±25,1
CD16	77,6±16,7	70,5±20,7	68,6±21,1
CD18	78,9±17,3	74,9±19,7	59,0±21,7
CD50	83,3±10,9	71,7±24,6	56,2±24,3*
CD54	1,7±1,2	4,3±8,8	3,8±4,5
CD95	4,6±5,9	8,4±10,6	3,3±3,8
Pgp170	2,2±1,8	6,8±7,2	16,1±22,7

*- P<0,05 в группе больных РА при сравнении показателей до и после терапии МТ.

сии других исследуемых молекул адгезии выявлено не было (Таблица 4). Наши результаты дополняют данные Storgaard M и соавт. [27], которые показали, что терапия МТ не влияет на экспрессию антигенов CD18, CD11b на нейтрофилах ПК при РА.

Таким образом, можно полагать, что в результате терапии МТ уменьшается интенсивность межклеточных взаимодействий лейкоцитов и их приток в синовию. Возможно, этот процесс осуществляется опосредованно, путем изменения цитокинового баланса, так как известно, что МТ оказывает ингибирующее влияние на синтез таких цитокинов, как интерлейкин-1, фактор некроза опухоли альфа, IFN-γ и др.

Далее результаты терапии МТ были проанализированы в зависимости от показателя системы множественной лекарственной резистентности Pgp-170. В группе больных РА наблюдалась тенденция к увеличению экспрессии Pgp-170 на лимфоцитах ПК и в большей степени на гранулоцитах ПК, однако, статистически значимой динамики этого антигена под влиянием терапии МТ не было выявлено. Была обнаружена отрицательная корреляционная связь между экспрессией Pgp-170 гранулоцитами ПК после лечения и эффектом терапии МТ (R=-0,50, P<0,05). Ранее проводившиеся исследования влияния МТ на экспрессию Pgp-170 выделенными лимфоцитами in vitro [33] также не обнаружили значимой динамики уровня экспрессии этого антигена. Можно полагать, что МТ не является субстратом для Pgp - транспортного канала, а резистентность к лечению этим препаратом при РА обусловлена другими факторами.

Мы попытались выявить причины отсутствия терапевтического эффекта у части больных РА. Проведенный корреляционный анализ позволил выявить обратную корреляцию между уровнем экспрессии молекулы главного комплекса гистосовместимости HLA-DR на лимфоцитах до лечения и эффектом терапии МТ (R=-0,47, P<0,05). Таким образом, можно полагать, что повышенные уровни экспрессии HLA-DR являются прогностически неблагоприятным фактором при назначении терапии МТ.

Выводы. Особенностью фенотипа лейкоцитов периферической крови больных РА является более низкое по сравнению со здоровыми количество CD8+ - позитивных лимфоцитов и относительное преобладание CD4+ клеток. Было выявлено уменьшение процента CD18+ и CD50+ -позитивных лимфоцитов. Полученные результаты соответствуют имеющимся представлениями о патогенезе заболевания и могут быть объяснены тем, что лимфоциты, экспрессирующие молекулы адгезии, активно мигрируют в зоны ревматоидного воспаления, в результате чего обнаруживается относительное уменьшение процента этих клеток в периферической крови.

Наше исследование позволило дополнить знания о механизмах действия метотрексата. Мы обнаружили, что терапия этим препаратом оказывает влияние на межклеточные взаимодействия посредством уменьшения экспрессии рецептора для интегрина ICAM-3, уменьшая тем самым участие лейкоцитов в иммунно-воспалительных реакциях. Важной находкой явилось снижение уровня экспрессии дипептидилпептидазы-4 (CD26) на лимфоцитах под влиянием терапии МТ.

Кроме того, было выявлено, что исходный уровень экспрессии молекулы HLA-DR на лимфоцитах может оказывать влияние на результаты терапии метотрексатом при РА. При наиболее высокой экспрессии этих молекул, свидетельствующей об активном представлении антигенов (и аутоантигенов) иммунокомпетентным клеткам, клинический эффект был наименьшим.

Не было определено четкой зависимости результатов терапии МТ от показателя системы множественной лекарственной резистентности - Pgp-170. Можно предположить, что, либо МТ не является субстратом для этого транспортного канала, либо его функция проявляется при наличии дефектов других транспортеров, участвующих в выбросе различных веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Насонов Е.Л. 50 лет применения метотрексата в ревматологии. // Русский Медицинский журнал, 2000, № 8-9, С. 372-376.
2. Насонов Е.Л., Самсонов М.Ю. и соавт. Растворимые молекулы адгезии (P-селектин, ICAM-1 и ICAM-3) при ревматоидном артрите. // Тер. архив, 1999, № 5, С. 17-20.
3. Сигидин Я.А., Лукина Г.В. Базисная (патогенетическая) терапия ревматоидного артрита. Novartis pharma services Inc., Москва, 2000 - 100 с.
4. Ярилин А.А. Основы иммунологии: Учебник. - «Медицина», Москва, 1999 - 608 с.
5. Ярилина А.А. Роль молекул адгезии в патогенезе ревматоидного артрита. // Научно-практическая ревматология, 2000, № 1, С. 61-69.
6. Afeltra A., Galeazzi M., Sebastiani G. et al. Coexpression of CD69 and HLA-DR activation markers on synovial fluid T lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis: a three-color cytometric analysis. // Int. J.Exp.Pathol. 1997, 78, № 5, P. 331-336.
7. Balsa A., Gamallo C., Martin-Mola E. et al. Histologic changes in rheumatoid synovitis induced by naproxen and methotrexate. // J. Rheumatol., 1993, 20, № 9, P. 1472-1477.
8. Carthy D., Taylor M.J., Bernhagen J. et al. Leucocytes integrin and CR1 expression on peripheral blood leucocytes of patients with rheumatoid arthritis. // Ann. Rheum. Dis., 1992, 51, № 3, P. 307-312.

9. *Cogalgi S, Taysi S. Sialic acid, intercellular adhesion molecule-1 and rheumatoid arthritis: a study on the erythrocyte membrane. // Clin. Chem. Lab. Med., 2002, 40, № 4, P. 356-360.*
10. *Cutolo M., Sulli A., Pizzorni C. et al. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. // Ann. Rheum. Dis., 2001, 60, P. 729-735.*
11. *Dolhain R., Tak P., Dijkmans B. et al. Methotrexate reduces inflammatory cell numbers, expression of monokines and of adhesion molecules in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. // Br. J. Rheumatol., 1998, 37, № 5, P. 502-508.*
12. *Gendt C., Clerck L., Bridts C. et al. Relationship between interleukin-8 and neutrophil adhesion molecules in rheumatoid arthritis. // Rheumatol. Int., 1996, № 16, P. 169-173.*
13. *Gerli R., Muscat C., Bertotto A. et al. CD26 surface molecule involvement in T cell activation and lymphokine synthesis in rheumatoid and other inflammatory synovitis. // Clin. Immunol. Immunopathol., 1996, 80, № 1, P. 31-37.*
14. *Hildner K., Finotto S, Becker C. et al. Tumor necrosis factor (TNF) production by T cell receptor-primed T lymphocytes is a target for low dose methotrexate in rheumatoid arthritis. // Clin. Exp. Immunol., 1999, 118, № 1, P. 137-146.*
15. *Isomaki P., Aversa G., Cocks B. et al. Increased expression of signaling lymphocytic activation molecule in patients with rheumatoid arthritis and its role in the regulation of cytokine production in rheumatoid synovium. // J. Immunol., 1997, 159, № 6, P. 2986-2993.*
16. *Jorgensen C., Sun. R., Rossi J.F. et al. Expression of multidrug resistance gene in human rheumatoid synovium. // Rheumatol. Int., 1995, 15, № 2, P. 83-86.*
17. *Lacki J., Mackiewicz S., Wiktorowicz U. et al. Lymphocyte phenotype studies of rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz), 1994, 42, № 4, P. 287-290.*
18. *Llorente L., Richaud-Patin Y., Diaz-Borjon A., et al. Increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from rheumatoid arthritis patients might influence disease outcome. // Joint Bone Spine, 2000, 67, P. 30-39.*
19. *Macey M., Wilton J., Carbon R. et al. Leucocyte activation and function-associated in inflammatory disease. // Agent Action, 1993, 38, P.39-40.*
20. *Mason J.C. Karahi P., Hascard D.O. Detection of increased levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in some patients with rheumatoid arthritis but not in patients with systemic lupus erythematosus. // Arthritis Rheum., 1993, 36, P. 519-527.*
21. *Masuco-Hongo K., Sekine T., Ueda S. et al. Long-term persistent accumulation of CD8+ T cells in synovial fluid of rheumatoid arthritis. // Ann. Rheum. Dis., 1997, 56, № 10, P. 613-621.*
22. *Mizokami A., Eguchi K., Kawakami A. et al. Increased population of high fluorescence 1F7 (CD26) antigen on T cells in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. // J. Rheumatol., 1996, 23, № 12, P. 2022-2026.*
23. *Muscat C., Bertotto A., Agea E. et al. Expression and functional role of 1F7 (CD26) antigen on peripheral blood and synovial fluid T cells in rheumatoid arthritis patients. // Clin. Exp. Immunol., 1994, 98, № 2, P. 252-256.*
24. *Panayi G.S. T-cell-dependent pathways in rheumatoid arthritis. // Current opinion in Rheumatology., 1997, № 9, P. 236-240.*
25. *Paulus H., Egger M., Ward J. et al. Analysis of improvement in individual rheumatoid arthritis patients treated with disease-modifying antirheumatic drugs, based on the findings in patients treated with placebo. // Arthritis Rheum., 1990, 33, P. 477- 484.*
26. *Sfikakis P., Charalambopoulos D., Vaiopoulos G. et al. Circulating P- and L-Selectin and T-Lymphocyte Activation in Patients with Autoimmune Rheumatic Diseases. // Clin. Rheumatol., 1999, 18, P. 28-32.*
27. *Storgaard M., Jensen M., Stengaard-Pedersen K. et al. Effects of methotrexate, sulphasalazine and aurothiomalate on polymorphonuclear leucocytes in rheumatoid arthritis. // Scand. J. Rheum., 1996, 25, P. 168-173.*
28. *Takahashi H., Soderstrom K., Nilsson E. et al. Integrins and other adhesion molecules on lymphocytes from synovial fluid and peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. // Eur. J. Immunol., 1992, 22, № 11, P. 2879-2885.*
29. *Tanaka S., Murakami T., Horikawa H. et al. Suppression of arthritis by inhibitors of dipeptidylpeptidase 4. // Int. J. Immunopharmacol., 1997, 19, P. 15-24.*
30. *Voskuyl A., Martin S., Melchers I. et al. Levels of circulating intercellular adhesion molecule-1 and -3 but not circulating endothelial leucocytes adhesion molecule are increased in patients with rheumatoid vasculitis. // Br. J. of Rheumatol., 1995, 34, P. 311-315.*
31. *Yudoh K., Matsuno H., Nakazawa F. et al. Increased expression of multidrug resistance of P-glycoprotein on Th1 cells correlates with drug resistance in rheumatoid arthritis. // Arthritis Rheum., 1999, 42, № 9, P. 2014-2018.*