

УДК 612.112.93:616.72-002+615.275.3

DOI: 10.14427/jipai.2015.2.6

Экспрессия гена FOXP3 и профиль цитокинов у больных ревматоидным артритом при лечении метотрексатом

¹ И.Е. Малышева, ¹ Л.В. Топчиева, ² О.Ю. Барышева, ¹ И.В. Курбатова, ² М.В. Выбач,
² Т.О. Волкова, ² Н.Н. Везикова, ² И.М. Марусенко, ² О.А. Васькова

¹ Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук (ИБ КарНЦ РАН), Петрозаводск, Россия

² Петрозаводский государственный университет (ПетрГУ), Петрозаводск, Россия

The expression of FOXP3 gene and cytokines levels in patients with rheumatoid arthritis under methotrexate therapy

¹ I.E. Malysheva, ¹ L.V. Topchieva, ² O.Y. Barysheva, ¹ I.V. Kurbatova, ² M.V. Vibach, ² T.O. Volkova,
² N.N. Vezikova, ² I.M. Marusenko, ² O.A. Vasykova

¹ Institute of Biology of Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences (IB KarRC RAS), Petrozavodsk, Russia

² Petrozavodsk State University (PetrSU), Petrozavodsk, Russia

Аннотация

Изучен уровень мРНК гена FOXP3 и содержание цитокинов (TNF α , IL6, IL10) у больных ревматоидным артритом с первично выявленной патологией и после лечения метотрексатом. Показано отсутствие значимых различий в уровне экспрессии мРНК гена FOXP3 в лейкоцитах периферической крови больных по сравнению с контрольной группой ($p > 0,05$). Установлены достоверные различия в содержании исследуемых цитокинов между контрольной группой и группами больных ревматоидным артритом в дебюте заболевания и на фоне базисной терапии метотрексатом.

Ключевые слова

Ревматоидный артрит, метотрексат, регуляторные Т-клетки, FOXP3, интерлейкины.

Ревматоидный артрит (РА) - хроническое иммуновоспалительное заболевание с преимущественным поражением суставов [1]. Важной составляющей патогенеза при РА является дисрегуляция функции иммунной системы, что индуцирует нарушение толерантности к собственным антигенам и развитие аутоиммунных реакций.

Summary

The mRNA rate of FOXP3 gene and cytokine levels (TNF α , IL6, IL10) in patients with rheumatoid arthritis diagnosed for the first time and after treatment with methotrexate were studied. The absence of significant differences in the level of FOXP3 expression in peripheral blood leukocytes of patients with rheumatoid arthritis compared to the control group ($p > 0.05$) was shown. We found the significant differences in the cytokine serum levels between the control group and patients with the onset of the disease, and with rheumatoid arthritis under methotrexate therapy.

Key words

Rheumatoid arthritis, methotrexate, regulatory T-cells, FOXP3, interleukins.

Известно, что значимая роль в подавлении аутоиммунного ответа принадлежит регуляторным Т-клеткам (Tregs), количество и функциональная активность которых снижается при различных аутоиммунных заболеваниях [2, 3]. Уровень супрессорной активности Tregs в значительной степени определяется экспрессией гена транс-

крипционного фактора forkhead box protein 3 (FOXP3), который необходим для нормального функционирования и развития Tregs [4].

Так показано, что у больных РА наблюдается снижение количества супрессорных клеток с активной экспрессией гена FOXP3 [5]. Возникает вопрос, какие внеклеточные и внутриклеточные факторы обуславливают снижение популяции регуляторных Т-клеток при развитии ревматоидного артрита? Одним из механизмов, участвующих в этом процессе, может быть нарушение баланса продукции про- и противовоспалительных цитокинов. Так, например, известно, что при ревматоидном артрите наблюдается повышение содержания провоспалительных: TNF α , IL6, IL1 β , IL17 [6,7] и снижение уровня противовоспалительных цитокинов: IL10, IL4 и др [8,9]. Повышенное содержание указанных провоспалительных цитокинов ассоциируется со снижением супрессорной функции Tregs [10,11]. Поэтому следует ожидать, что снижение уровня провоспалительных цитокинов может способствовать восстановлению супрессорной функции Tregs. В настоящее время одним из препаратов базисной терапии РА является метотрексат (MTX) [12]. В работе Ma L. и соавт. [13] отмечается положительное влияние терапии MTX на количество CD4+CD25+Foxp3+ Т-клеток, что может свидетельствовать о повышении их супрессорной активности. Кроме того, имеются работы, в которых показано, что MTX дозозависимо подавляет продукцию ряда цитокинов (TNF α , IL6, IL1 β , IL17 и др.) [6]. Поэтому можно предположить, что MTX регулирует супрессорную функцию Tregs через подавление продукции провоспалительных белков. Однако следует отметить, что работы, в которых показана связь изменения цитокинового статуса с восстановлением супрессорной функции этих клеток, малочисленны, а молекулярные механизмы коррекции патологического процесса при РА в условиях терапии метотрексатом до конца не выяснены.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении уровня экспрессии мРНК гена FOXP3 в лейкоцитах периферической крови и содержания провоспалительных (TNF α , IL6) и противовоспалительного (IL10) цитокинов в плазме крови больных РА до и после базисной терапии метотрексатом.

Материалы и методы

В исследование включено 57 человек (38 женщин и 19 мужчин, которые были разделены на три группы: I группа – контроль (здоровые

доноры) (n=25, ср. возраст — 50,92 \pm 2,19 года), II группа - больные ревматоидным артритом в дебюте заболевания, до начала базисной терапии (n=7, ср. возраст — 54,25 \pm 7,59 года) и III группа - больные ревматоидным артритом (n=25, ср. возраст — 54,60 \pm 1,77 года), которые получали в течение 4 недель базисную терапию метотрексатом в дозе 15-22,5 мг/нед. Критерии исключения из исследования: наличие достоверного диагноза другого ревматического заболевания до начала исследования, наличие сахарного диабета, выраженные нарушения функции внутренних органов (почечная, печеночная, сердечная недостаточность), а также перенесенные в последний месяц инфекционно-воспалительные заболевания, курение табака, беременность и лактация, алкогольная зависимость, индекс массы тела \geq 30 кг/м.

Диагноз ревматоидного артрита устанавливался в соответствии с критериями Американской коллегии ревматологов (ACR) 1987 г. Материалом служили пробы периферической крови. Забор венозной крови осуществлялся утром натощак. Информационное согласие было получено от всех пациентов. Работа утверждена Этическим комитетом ГБУЗ «Республиканская больница им. В.А. Баранова».

Тотальную РНК из клеток крови выделяли на колонках «Ахуэрег Multisource Total RNA Miniprep Kit» (Ахуэрег). Для удаления остатков ДНК раствор тРНК обрабатывали ДНКазой (Сибэнзим) (1 е.а.) при 37°С в течение 30 мин. Синтез кДНК осуществляли с помощью набора «MMLV RT kit» («Евроген», Москва). Экспрессию гена FOXP3 оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе iCycler iQ5 (Био-Рад). Для амплификации использовали наборы «qPCRmix-HS SYBR» и праймеры производства фирмы «Евроген» (Москва). Последовательность праймеров для ПЦР-РВ указана в работе Genre J. и соавт. [14]. Для каждого исследуемого образца реакцию ПЦР-РВ ставили не менее трех раз. Ген GAPDH использовали в качестве референсного гена. Уровень экспрессии гена FOXP3 рассчитывали относительно уровня экспрессии референсного гена GAPDH.

Относительный уровень экспрессии (ОУЭ) определяли по формуле:

$ОУЭ = 2^{-\Delta Ct}$, где ΔCt - разница между значениями пороговых циклов для референсного и таргетного генов.

Содержание изучаемых цитокинов определяли в плазме крови методом неконкурентного

иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов фирмы «Вектор-Бест», Россия.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ Statgraphics 2.1. Достоверность различий изучаемых показателей между группами оценивали с помощью непараметрического критерия U Вилкоксона-Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

Результаты

Уровень экспрессии гена FOXP3 у больных РА с первично выявленной патологией и у пациентов при лечении метотрексатом достоверно не отличался от контроля: $0,198 \pm 0,029$, $0,242 \pm 0,036$ и $0,229 \pm 0,035$ ($p > 0,05$). Однако, следует отметить тенденцию к повышению количества транскриптов данного гена у больных РА на фоне терапии метотрексатом, по сравнению с группой больных РА в дебюте заболевания: $0,242 \pm 0,036$ и $0,198 \pm 0,029$ соответственно, ($p > 0,05$).

По данным ИФА установлено, что содержание провоспалительного цитокина TNF α в плазме крови было значимо ($p < 0,001$) выше у больных РА в дебюте заболевания (Табл. 1).

На фоне терапии метотрексатом концентрация указанного цитокина в плазме крови больных РА снижалась и достоверно не отличалась от уровня контрольных значений ($p > 0,05$). Содержание в плазме крови другого провоспалительного цитокина IL6 было значительно повышено у больных РА до базисной терапии метотрексатом (Табл. 1). Тенденция к снижению концентрации данного цитокина отмечена у больных РА на фоне терапии MTX (Табл. 1). В ходе проведенных нами исследований было установлено, что концентрация противовоспалительного цитокина

IL10 в плазме крови больных РА до начала терапии значимо не отличалась от значений в контрольной группе (Табл. 1). Содержание данного цитокина у больных РА достоверно повышалось при лечении метотрексатом ($p < 0,05$).

Нами проведен корреляционный анализ (по Спирмену) по результатам которого была выявлена умеренная отрицательная корреляция между уровнем экспрессии гена FOXP3 и содержанием TNF α ($r = 0,339$, $p = 0,0487$) и IL6 ($r = 0,581$, $p = 0,0490$) в плазме крови больных РА на фоне терапии метотрексатом.

Обсуждение результатов

Показано, что в группе больных, у которых впервые был поставлен диагноз ревматоидный артрит, по сравнению с контрольной группой снижен уровень транскриптов гена FOXP3, что может косвенно свидетельствовать о подавлении супрессорной функции Т-регуляторных клеток при развитии данного заболевания. Отсутствие различий уровня экспрессии изучаемого гена у больных РА принимающих MTX и здоровых РА доноров позволяет предположить, что метотрексат способствует восстановлению супрессорной функции регуляторных Т-лимфоцитов. Эти данные согласуются с данными литературы, в которых показано, что при проведении терапии с использованием метотрексата у больных РА и при ряде других патологий (острый коронарный синдром, воспалительные заболевания кишечника), наблюдалось увеличение количества CD4+CD25+FOXP3+ Т-клеток [15,13,16].

Одним из возможных механизмов восстановления супрессорной функции Т-регуляторных клеток у пациентов, принимающих метотрексат, может быть его влияние на уровень провоспалительных факторов в организме. Так из данных литературы известно, что у больных, принимающих данный препарат, снижается количество клеток, способных продуцировать фактор некроза опухоли альфа (TNF α) [17]. Как показано в

Таблица 1. Содержание цитокинов в плазме крови у больных ревматоидным артритом и в контрольной группе

Показатель	Содержание цитокинов в плазме крови (пг/мл)		
	Контроль, n=25	Больные РА до начала терапии, n=7	Больные РА на фоне терапии MTX, n=25
TNF α	$3,84 \pm 0,41$	$7,12 \pm 0,95^{**}$	$3,62 \pm 0,99$
IL6	$4,74 \pm 0,98$	$17,24 \pm 3,14^*$	$6,61 \pm 1,44$
IL10	$4,16 \pm 0,58$	$4,09 \pm 0,93$	$6,94 \pm 0,88^*$

Примечание. * - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$); ** - достоверные отличия от контроля ($p < 0,001$)

нашем исследовании, уровень данного провоспалительного цитокина в плазме крови пациентов с РА на фоне терапии метотрексатом достоверно снижен по сравнению с больными, которым еще не назначалась какая-либо терапия. Содержание другого провоспалительного цитокина – интерлейкина 6 в плазме крови больных РА с дебютом заболевания было также значительно выше, чем у пациентов, принимающих МТХ. Известно, что у больных РА увеличение содержания этого цитокина способствует хроническому течению данного заболевания. IL6 вовлечен в регуляцию баланса уровня Th17 и Tregs клеток, которые оказывают разнонаправленный эффект на процессы воспаления. Увеличение количества Th17 клеток способствует усилению этого процесса. Tregs клетки оказывают супрессорное влияние на повышенную активность Th17 клеток и, следовательно, на воспаление [18]. Показано, что IL6 совместно с TGFβ стимулирует генерацию провоспалительных Th17 клеток и оказывает ингибирующее влияние на дифференцировку регуляторных Т-клеток. Причем основной механизм действия IL6 на этот процесс - супрессия транскрипционной активности гена FOXP3 [18].

При ревматоидном артрите помимо увеличения в плазме крови провоспалительных факторов отмечается снижение противовоспалительных цитокинов, в частности интерлейкина 10. В нашем исследовании мы не обнаружили достоверных отличий в содержании данного белка в плазме крови здоровых доноров и больных РА в дебюте данного заболевания. Однако у больных, принимающих метотрексат, уровень IL10 в плазме крови оказался достоверно выше, чем в других группах исследования. Эти данные позволили нам высказать предположение, что МТХ может способствовать повышению уровня IL10 у больных РА. Данный препарат оказывает

положительный эффект на супрессорную активности Tregs, скорее всего за счет увеличения количества CD4+CD25+FOXP3+ Т-клеток, которые способны продуцировать противовоспалительные цитокины, такие как IL10 и TGFβ [19,20,21]. Поэтому повышение содержания IL10 можно связать с положительным эффектом МТХ на популяцию Т-регуляторных лимфоцитов.

Согласно литературным данным, провоспалительный цитокин TNFα способен стимулировать продукцию другого фактора воспаления - IL6 [22]. Повышенное содержание указанных интерлейкинов способствует снижению уровня противовоспалительных белков, в частности IL10 [23]. По данным литературы, на фоне проведения соответствующей антиревматической терапии с использованием МТХ, у больных наблюдается снижение уровня провоспалительных цитокинов [8, 23], что согласуется с данными по содержанию TNFα и IL6, полученными в нашем исследовании.

По результатам исследования можно предположить, что изменение баланса цитокинов при развитии ревматоидного артрита может влиять на функциональную активность иммунной системы и в частности, Т-регуляторных клеток. Об этом свидетельствует тот факт, что повышение содержания провоспалительных цитокинов (TNFα, IL6) в плазме крови больных РА, принимающих МТХ сопровождалось снижением уровня транскриптов гена, кодирующего транскрипционный фактор FOXP3, являющегося молекулярным маркером этой популяции клеток.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств гранта Правительства РФ №11.G31.34.0052. и федерального бюджета на выполнение государственного задания: Тема № 0221-2014-0008.

Литература

1. Насонов ЕЛ. Лечение ревматоидного артрита: современное состояние проблемы. Русс. Мед. Журн. 2006; 14: 573-577.
2. Ярилин АА., Донецкова АД. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3/ Иммунология. 2006; 3: 176-188.
3. Endharti AT., Okuno Y., Shi Z. et al. CD8+CD122+ regulatory T cells (Tregs) and CD4+ Tregs cooperatively prevent and cure CD4+ cell-induced colitis. J. Immunol. 2011; 186(1):41-52.
4. Tavakoli NN., Hambly BD., Sullivan DR., Bao S. Forkhead box protein 3: Essential immune regulatory role/ The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2008; 40: 2369-2373.
5. Han GM., O'Neil-Andersen NJ., Zurier RB., Lawrence DA. CD4CD25 high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. Cell Immunol. 2008; 253: 92-101.
6. Li Y., Giang L., Zhang S. et al. Methotrexate attenuates the Th/IL-17 levels in peripheral blood mononuclear cells from healthy individuals and RA patients. Rheumatol. Int. 2012; 32: 2415-2422.
7. van Adelsfort JM., van Roon JA., Noordegraaf M. et al. Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4+,CD25+ regulatory T cell mediated suppression in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2007; 56: 732-742.
8. Дубиков А.И., Медведь Е.Э., Белоголовых Л.А., Гришина И.Э., Любарская О.А., Борисенко Е.А. Влияние метотрексата

сата на цитокиновый профиль и метаболизм оксида азота у больных ревматоидным артритом. Тихоокеанский мед. журн. 2008; 4: 54-56.

9. Rudwalek M., Yin Z., Siegert S. et al. Response to methotrexate in early rheumatoid arthritis is associated with a decrease of T cell derived tumour necrosis factor alpha, increase of interleukin 10, and predicted by the initial concentration of interleukin 4. *Ann. Rheum. Dis.* 2000; 59: 311-314.

10. Ma Y., Yuan X., Deng L. et al. Imbalanced Frequencies of Th17 and Treg Cells in Acute Coronary Syndromes Are Mediated by IL-6-STAT3 Signaling. *PLoS One.* 2013; 8(8): e72804.

11. Weikamp. JH., Koyama T., Rock MT. et al. Necrotising enterocolitis is characterised by disrupted immune regulation and diminished mucosal regulatory (FOXP3) effector (CD4, CD8) T cell ratios. *Gut.* 2013; 62: 73-82.

12. Braun J., Rau R. An update on methotrexate. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2009; 21(3): 216-23.

13. Ma L., Liu B., Jiang Z., Jiang Y. Reduced numbers of regulatory B cells are negatively correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 2014; 33: 187-195.

14. Genre J., Errante PR., Kokron CM., Toledo-Barros M., Câmara NO., Rizzo LV. Reduced frequency of CD4(+) CD25(HIGH)FOXP3(+) cells and diminished FOXP3 expression in patients with Common Variable Immunodeficiency: a link to autoimmunity. *Clin. Immunol.* 2009; 132(2): 215-221.

15. Guidi L., Felice C., Procoli A et al. FOXP3+ T Regulatory Cell Modifications in Inflammatory Bowel Disease Patients Treated with Anti-TNF α Agents. *Biomed. Res. Int.* 2013; doi: 10.1155/2013/286368.

16. Meng K., Zhang W., Zhong Y. et al. Impairment or Circulating CD4CD25(+)GARP(+) Regulatory T Cells in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Physiol Biochem.* 2014; 33(3): 621-632.

17. Gerards AH., de Lathouder S., de Groot ER., Dijkmans BA., Aarden LA. Inhibition of cytokine production by methotrexate. *Rheumatology (Oxford).* 2003; 42: 1189-1196.

18. Ryba-Stanisławowska M., Skrzypkowska M., Myśliwska J., Myśliwiec M. The serum IL-6 profile and Treg/Th17 peripheral cell populations in patients with 1 type diabetes. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013:205284.

19. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R. et al. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006; 212: 8-27.

20. Xingiang S., Fei L., Nan L. et al. Therapeutic efficacy of experimental rheumatoid arthritis with low-dose methotrexate by increasing partially CD4+CD25+Treg cells and inducing Th1 to Th2 shift in both cells and cytokines. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2010; 64(7): 463-471.

21. Huang Z., Yang B., Shi Y. et al. Anti-TNF- α therapy improves Treg and suppresses Teff in patients with rheumatoid arthritis. *Cellular Immunology.* 2012; 279:25-29.

22. Lukaszewicz M., Mroczo B., Szmitkowski M. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2007; 117(5-6): 247-251.

23. Sun XY., Su Y., Ren LM., Han L., Li ZG. [Therapeutic effect and impact on cytokine production by methotrexate in rheumatoid arthritis]. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2006; 38(4): 356-359.

Сведения об авторах:

Ирина Евгеньевна Малышева, к.б.н., с.н.с. Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Карельского научного центра Российской академии наук (ИБ КарНЦ РАН), 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11; факс: (8142) 769810, e-mail: i.e.malyшева@yandex.ru

Людмила Владимировна Топчиева, к.б.н., в.н.с. Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Карельского научного центра Российской академии наук (ИБ КарНЦ РАН), 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11; факс: (8142) 769810, e-mail: topchieva67@mail.ru

Ольга Юрьевна Барышева, д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», 185910, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33, тел. (8142) 764445, e-mail: olvar@karelia.ru

Ирина Валерьевна Курбатова, к.б.н., м.н.с. Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Карельского научного центра Российской академии наук (ИБ КарНЦ РАН), 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11; факс: (8142) 769810, e-mail: irina7m@yandex.ru

Мария Викторовна Выбач, клинический ординатор кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», 185910, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33, тел. (8142) 764445, e-mail: hosptherapy@mail.ru

Татьяна Олеговна Волкова, д.б.н., профессор кафедры молекулярной биологии, биологической и органической химии ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», 185910, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33, тел. (8142) 784697, e-mail: VolkovaTO@yandex.ru

Наталья Николаевна Везикова, д.м.н., профессор, зав. кафедрой госпитальной терапии ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», 185910, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33, тел. (8142) 764288, e-mail: vezikov23@mail.ru

Ирина Михайловна Марусенко, д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», 185910, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33, тел. (8142) 764445, e-mail: imarusenko@yandex.ru

Ольга Александровна Васькова, ассистент кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет», 185910, г. Петрозаводск, пр. Ленина, 33, тел. (8142) 764445, e-mail: olga-ptz@inbox.ru

Поступила 10.04.2015 г.