

35. Reddet R.R., Kefford R.F., Grant J.M. et al. // *CanCER Treatment Reports*. - № 1. - P. 19-23.
36. Rubin W. // *Arch Otolaryngol*. - 1973. - Vol. 97. - P. 135-138.
37. Rybak L.P. // *Aim. Rev. Parmacol. Toxicol*. - 1986. - Vol. 26. - P. 79-99.

38. Schwabe H.R., Heltman R., Mathew M. et al. // *Dutch Med Wochenschr*. - 1992. - Vol. 24. - №4. - P. 121-126.
39. Waters O.S., Ahmad M., Katsarkas A. et al. // *Ear Hear*. - 1991. - Vol. 12. - №2. - P. 91-102.

Анти-В-клеточная терапия - новый рубеж в лечении ревматоидного артрита

А.В.Гордеев, И.В.Пожаров

Ревматоидный артрит (РА) — аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся неуклонно прогрессирующим деструктивным поражением суставов и широким спектром внесуставных (системных) проявлений.

По данным Всемирной организации здравоохранения, РА уже давно превратился из медицинской в социально-экономическую проблему XXI века. Основанием для подобного вывода послужили следующие факты.

Ревматоидный артрит — широко распространенное заболевание. Им страдает более 1% населения Земли [1]. Через 12—15 лет от начала заболевания примерно 70% пациентов теряют трудоспособность, а треть становится полными инвалидами [19]. При этом 75% больных становятся инвалидами в допенсионном возрасте — женщины до 44 лет, а мужчины до 49 лет. Жизненный прогноз пациентов с РА столь же неблагоприятен, как и при онкологических заболеваниях (лимфогранулематоз IV стадии), инсулинзависимом сахарном диабете, инсульте и трехсосудистом поражении коронарных артерий. Средняя продолжительность жизни больных РА на 10—15 лет короче ожидаемых возрастных уровней, а 5-летняя выживаемость при системных вариантах этого заболевания не превышает 50% [17].

Абсолютно доказанным считается и другой неутешительный факт — при РА отмечено двухкратное увеличение смертности от инфаркта миокарда и инсульта по сравнению с общей популяцией, и более того показатели сердечно-сосудистой летальности больных РА оказались выше, чем в такой классической группе риска, как больные сахарным диабетом. Примечательно, что увеличение риска смертности от сердечно-сосудистых заболеваний прослеживается уже в дебюте РА, ассоциируется с тяжестью суставного синдрома и серопозитивностью по ревматоидному фактору, а не с классическими (гипертония, курение, гиперлипидемия, диабет и др.) факторами риска развития атеросклероза.

Экономический ущерб, причиняемый РА, сопоставим с затратами на лечение ишемической болезни сердца (включая операции АКШ) и опухолевых заболеваний. Так, по данным Национального института здоровья США, в 1995 году на заболевание суставов в этой стране потрачено 82,4 млрд долларов. В Западной Европе стоимость 1-го больного РА равняется 15 000 евро в год [24].

Поскольку этиология РА неизвестна — это делает невозможным проведение эффективной этиотропной терапии, нацеленной, в идеале, на излечение от страдания. Накопленные знания о механизмах развития воспаления и аутоиммунитета послужили основанием для разработки концепции ранней (не позднее трех месяцев от дебюта артрита) и агрессивной «патогенетической (базисной) терапии» — лечение цитостатическими препаратами (метотрексат, лефлуномид, циклофосфан), пришедшими в ревматологию, в основном, из онкологии со всеми их очевидными достижениями и не менее явными недостатками.

Сегодняшний прорыв в фармакотерапии РА связан с разработкой принципиально новых групп лекарственных средств

— «биологических» агентов, механизм действия которых связан с избирательным блокированием не только медиаторов воспаления (фактор некроза опухолей альфа, интерлейкины и др.), но и с возможностью избирательно «извлекать» из иммунопатогенеза РА конкретную популяцию В-лимфоцитов — CD20+. Другими словами, в последнем случае «мишенью» терапии РА становится всего лишь один конкретный тип клеток организма.

Разработка концепции анти-В-клеточной терапии [8, 20, 22] не только существенно расширила возможности лечения РА, но и аргументированно изменила представления о патогенезе данного заболевания. Существует несколько механизмов подавления В-лимфоцитов. Наиболее пристальное внимание в настоящее время отводится использованию моноклональных анти-CD20+ антител - ритуксимаба.

Ритуксимаб (MabThera®, Hoffmann-La Roche Ltd.) — генно-инженерные химерные антитела к CD20+, содержащие человеческий IgG1Fcк—постоянные регионы и непостоянные легкие и тяжелые цепи мышинового анти-CD20+ (IDEC-2B8), реагирующие с человеческими CD20+. Однократное введение препарата приводит к транзиторному снижению уровня CD20+ клеток, длящееся до 6 месяцев, после чего в течение последующих 9—12 месяцев происходит нормализация уровня В-клеток.

Теоретические предпосылки к применению анти-CD20 антител у больных РА

Несмотря на интенсивные исследования, до сих пор не определен конкретный фактор, индуцирующий воспалительный каскад в синовиальной мембране больных РА, приводящий к гиперплазии синовиоцитов, инфильтрации мононуклеарными клетками, неоангиогенезу, формированию паннуса и, в конечном итоге, разрушению суставов. Гистологическая картина хронического воспаления синовиальной мембраны обладает значительной гетерогенностью, что затрудняет интерпретацию выявленных изменений. Наиболее постоянной гистологической находкой является диффузная лимфоцитарная инфильтрация, которая в определенном проценте случаев (~10%) принимает вид организованных фолликулоподобных структур, основным компонентом которых являются активированные В-лимфоциты. Определены три основных подтипа В-клеток: дифференцированные плазматические клетки, окружающие фолликулярные структуры; зрелые CD20+ В-лимфоциты, тесно взаимодействующие с CD4+Т-хелперными клетками, и активированные В-лимфоциты, формирующие подобие герминативного центра лимфатических узлов, которые про-лиферируют в сеть фолликулярных дендритных клеток. Это позволило ряду исследователей рассматривать синовиальную мембрану больных РА в качестве третичного лимфоидного органа. Удаление В-клеток за счет связывания с анти-CD20-антителами не только само по себе предотвращает образование герминативных центров, но также тормозит В-клеточное программирование стромальных клеток

(и их последующее образование в экстрафолликулярные дендритные клетки) и таким образом образование новых герминативных центров в синовиальной ткани [13].

Кроме того, активация Т-лимфоцитов, ключевого компонента патогенеза РА, напрямую зависит от присутствия В-лимфоцитов [20, 22]. В то же время сами Т-лимфоциты могут способствовать активации В-клеток, вероятно, посредством выработки цитокинов (IL-6, фактор активирующий В-лимфоциты и др.), стимулирующих выживание и функционирование В-лимфоцитов [21], что обуславливает эффективность сочетанной терапии с препаратами, подавляющими активность Т-лимфоцитов. Сопричастность В-лимфоцитов в поддержании ревматоидного воспалительного процесса сводится к следующему:

1. Функционирование в качестве антигенпрезентирующих клеток, вырабатывающих костимулирующие сигналы CD4+, благодаря которым осуществляется их распределение и эффекторные функции.

2. Продуцирование в синовиальной мембране провоспалительных цитокинов, в том числе TNF- α , IL-6, IL-10.

3. Синовиальная оболочка больных РА содержит избыточное количество В-лимфоцитов, продуцирующих ревматоидный фактор. Известно, что серопозитивный РА ассоциирован с более агрессивным течением заболевания, более частым развитием внесуставных проявлений, большей частотой инвалидизации и увеличением смертности пациентов.

Степень вовлечения каждого из этих механизмов напрямую зависит от пула В-клеток: в периферической крови превалирует антителозависимая цитотоксичность, в то время как комплементзависимый лизис клеток происходит в основном в лимфоидных органах.

Исследования J.C. Edwards с соавт. [7, 8] демонстрируют уменьшение активности аутоиммунных процессов, происходящее одновременно с падением уровня В-лимфоцитов в периферической крови, несмотря на то, что уровень иммуноглобулинов сыворотки оставался в пределах нормальных значений. Это доказывает, что В-лимфоциты играют также антителонезависимую роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний вообще и при РА в частности. Еще одним возможным механизмом снижения числа В-лимфоцитов в периферической крови может быть блокада неизвестного аутоантитела, прямо или косвенно участвующего в формировании иммунных комплексов, без вовлечения иммуноглобулинов. Отсутствие периферических В-лимфоцитов, определяемых стандартными методиками, не всегда коррелирует с клинической эффективностью терапии анти-CD20-антителами и позволяет прогнозировать эффективность повторных курсов. Тем не менее, результаты недавних исследований показывают, что сохранение активности В-клеток в синовиальной ткани [5], а также обнаружение с помощью проточной цитофлуометрии преплазматических клеток [6] позволяет прогнозировать обострение РА.

Клиническое применение

В отличие от других «биологических» препаратов, ритуксимаб (MabThera®, Roche) первоначально не разрабатывался для лечения неонкологических больных. Тем не менее, появившиеся в начале его использования единичные сообщения об исчезновении признаков РА у пациентов с CD20+ В-клеточными неходжкинскими лимфомами, прошедших курс лечения анти-CD20+ антителами по поводу основного заболевания, а также накапливающиеся параллельно с ними случаи эффективности препарата у больных с иными аутоиммунными заболеваниями, заставили провести целую серию открытых исследований, охвативших несколько десятков больных РА [7, 15, 18], показавших возможность эффективного применения ритуксимаба. Однако лишь только через несколько лет после завершения ряда многоцентровых рандомизированных клинических исследований (РКИ),

представленных в данной статье, ритуксимаб получил признание в качестве препарата для базисной терапии РА.

В настоящее время клиническая и лабораторная оценка эффективности любой базисной терапии РА проводится по критериям, предложенным Американским колледжем ревматологов (American College of Rheumatology — ACR), и традиционно выражается в процентах улучшения показателей активности артрита от исходного уровня. Так ACR20 соответствует не менее чем 20% снижению показателей клинической и лабораторной активности РА. Также выделяют показатели ACR50 и ACR70, определяющие снижение активности РА на 50% и 70% соответственно.

Многоцентровое рандомизированное двойное слепое контролируемое исследование, проведенное J. Edwards с соавт. [10], впервые доказало эффективность направленного селективного подавления В-лимфоцитов моноклональными анти-CD20-антителами у 161 пациента с активным РА, торпидным к лечению метотрексатом (не менее 10 мг/нед.). Анализ эффективности терапии ритуксимабом к 48-й неделе лечения по критериям ACR продемонстрировал достоверную клиническую эффективность единственного курса препарата. Также необходимо отметить достоверную прибавку клинической эффективности на фоне сочетанного приема с метотрексатом (MT), в отсутствии нарастания частоты нежелательных реакций, коррелирующую с динамикой лабораторных показателей (табл.1).

Анализ динамики лабораторных показателей на фоне приема ритуксимаба показал достоверную корреляцию

Таблица 1
Результаты лечения ритуксимабом больных РА, резистентных к традиционной базисной терапии, к 48-й неделе лечения [14]

	Метотрексат (n=40)		Ритуксимаб (1,0x2) (n=40)		Ритуксимаб + ЦФ (n=41)		Ритуксимаб + MT (n=40)	
	24 нед.	48 нед.	24 нед.	48 нед.	24 нед.	48 нед.	24 нед.	48 нед.
ACR20	38%	20%	65%	33%	76%	49%	73%	65%
ACR50	13%	5%	13%	15%	41%	27%	43%	35%
ACR70	5%	0%	15%	10%	15%	10%	23%	15%

MT - метотрексат; ЦФ - циклофосфамид

между динамикой клинической картины заболевания и лабораторными маркерами воспаления. Максимум изменений — в группе сочетанного применения ритуксимаба и MT, показавшей наибольшую клиническую эффективность (табл. 2.)

В этом же исследовании не нашли подтверждения высказывавшиеся ранее предположения о снижении эффективности препарата при проведении повторных курсов в связи с образованием антихимерных антител. Несмотря на их выявление у 4,3% пациентов, достоверные различия в клинической эффективности не были обнаружены.

Опубликованы результаты исследования — DANCER (Dose-ranging Assessment International Clinical Evaluation of Rituximab in RA), включившего 465 пациентов с серопозитивным по РФ умеренно тяжелым и тяжелым РА, резистентным к традиционной базисной терапии, в том числе к ингибиторам TNF α — 27–32% больных [9], которые убедительно продемонстрировали достоверную клиническую эффективность препарата в отсутствии приема кортикостероидов. Также было установлено, что комбинированная терапия MT и ритуксимаба оказалась достоверно эффективнее монотерапии MT и носила дозозависимый эффект (табл. 3). Эффективность повторных курсов введения препарата была аналогична эффекту, наблюдавшемуся после первого курса [16]. Средний интервал между необходимостью

Таблица 2
Динамика лабораторных показателей на фоне приема ритуксимаба (РТ)
[14]

	МТ (n=40)	РТ (n=40)	P (с МТ)	РТХ + ЦФ (n=41)	P (с МТ)	РТ + МТ (n=40)	P (с МТ)
РФ	2.15	-16.86	<0.0001	-19.99	<0.0001	-18.21	<0.0001
Анти-ССР	-0.04	-14.16	<0.0001	-12.19	<0.0001	-10.11	<0.0001
IL-6	-3.82	-22.86	0.0303	-32.5	0.0008	-35.79	0.0006
СРБ	-5.94	-28.3	0.0818	-31.44	0.0016	-36.33	0.0052
SAA	2.08	-15.16	0.0013	-21.84	0.0005	-30.56	<0.0001

Забор анализов происходил на 0, 4, 16, 24 неделе, с последующим расчетом медианы от 0 до 24 недели, %.

РФ — ревматоидный фактор; Анти-ССР — антитела к циклическим цитрулинированным пептидам; СРБ — С-реактивный белок; SAA — сывороточный а-протеин.

Таблица 3
Результаты лечения ритуксимабом больных РА, резистентных к традиционной базисной терапии, к 24-й неделе лечения в исследовании DANCER [17]

	Метотрексат (n=149)	Ритуксимаб (500x2) (n=124)	Ритуксимаб (1000x2) (n=192)
ACR20 (p < 0,0001)	28%	54%	55%
ACR50 (p < 0,001)	33%	13%	34%
ACR70 (p < 0,05)	13%	5%	20%

повторных курсов введения препарата имел отчетливый дозозависимый эффект и варьировал от 24 до 48 недель.

Схожие данные получены и в других исследованиях, в том числе в недавно опубликованных предварительных результатах РКИ — REFLEX (Randomized Evaluation of Long-term Efficacy of Rituximab in RA), включившего в себя 520 пациентов, устойчивых к терапии ингибиторам TNFa [3]. Представленные данные продемонстрировали, что 37% пациентов сохраняли клиническую ремиссию заболевания более 48 недель с момента проведения первого курса ритуксимаба. Анализ эффективности терапии к 24-й неделе лечения показал статистически значимый ответ по всем критериям ACR. Интересно, что эффективность ритуксимаба зависела не только от дозы, но и от количества использовавшихся ранее различных ингибиторов TNFa (табл. 4). Результаты исследования продемонстрировали

Таблица 4
Результаты лечения ритуксимабом больных РА, резистентных к блокаторам TNFa в исследовании REFLEX [15]

Кол-во ингибиторов TNFa	ACR, %	Метотрексат (n=201)	Ритуксимаб (n=298)
1	Число пациентов	121	179
	ACR20	21%	58%
	ACR50	7%	30%
	ACR70	1%	14%
2	Число пациентов	80	119
	ACR20	14%	42%
	ACR50	3%	22%
	ACR70	3%	10%

Ответ по критериям ACR к 24-й неделе в зависимости от количества ранее использовавшихся ингибиторов TNFa.

отсутствие рентгенологического прогрессирования деструкции суставов у 61 % пациентов на протяжении не менее 56 недель. Для сравнения — в группе плацебо (МТ) этот показатель был равен 52% [16]. Аналогично исследованию DANCER, авторами не получено данных, свидетельствующих о снижении эффективности повторных курсов ритуксимаба.

При «прямом» сравнении ритуксимаба (взяты средние значения по данным РКИ) с другими базисными противоревматическими препаратами, включая ингибиторы TNFa, можно отметить, что несмотря на изначально более тяжелый контингент больных, включенных в рандомизированные клинические исследования, эффективность ритуксимаба по крайней мере не уступает традиционной терапии РА (рисунок).

Что касается нежелательных реакций, связанных с применением ритуксимаба, исследование R. F. van Vollenhoven с соавт. [23], объединившее

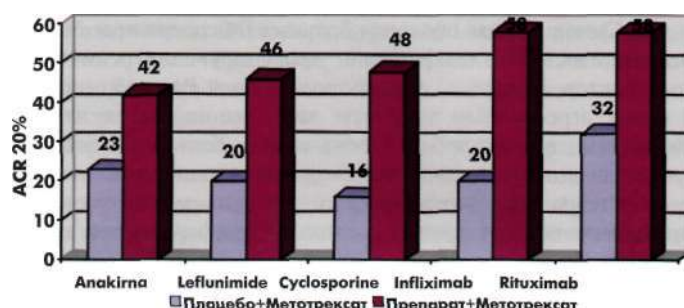


Рис. Сравнение прибавки клинической эффективности базисных противоревматических препаратов в сравнении с метотрексатом (ACR20) в РКИ*

* по James R. O'Dell [22], с изменениями.

1039 пациентов, получавших препарат, 839 из которых прослежены на протяжении не менее 1 года, показало, что на протяжении всего периода наблюдения (1669 пациентов/лет) нежелательные реакции возникали у 88% пациентов: абсолютное большинство из которых было связано с развитием инфузионного симптомокомплекса и варьировало от легкой до умеренной степени выраженности (I—II ст. согласно Common Toxicity Criteria, CTC), уменьшаясь от курса к курсу (71%, 64%, 55% — 2—4 курсы, соответственно). Предварительное введение кортикостероидов (100 мг. в преднизолоновом эквиваленте) позволило существенно уменьшить частоту нежелательных реакций в рамках инфузионного симптомокомплекса и в настоящее время является стандартом терапии. Серьезные нежелательные реакции отмечались у 26% пациентов, в группе плацебо — у 22%. Инфекции, требовавшие в/в введения антибиотиков, отмечались у 7% пациентов, по сравнению с 3% в группе плацебо. Не было зафиксировано ни одного случая обострения туберкулезного процесса, также не отмечено увеличения риска возникновения онкологических заболеваний.

Заключение

Исходя из результатов проведенных исследований, эффективность применения анти-CD20 у пациентов с РА в настоящее время не вызывает сомнения. Суммируя результаты представленных выше исследований (табл. 5), показатели эффективности терапии (по 1000 мг 2 раза в 1 и 15 день) ритуксимабом (de facto ставшая стандартной), в сочетании с МТ оказались следующими: ACR20 - 58±7%; ACR50 - 36±2%; ACR70- 15,5±1,5%.

Несмотря на отсутствие окончательных результатов некоторых исследований, уже сейчас можно с уверенностью констатировать, что ритуксимаб занял достойное место

**Сравнительный анализ эффективности терапии ритуксимабом
к 48-й неделе лечения [14, 15, 17]**

Таблица 5

	Метотрексат (10—25 мг/нед.)			Ритуксимаб (1000 мг.х 2)+Метотрексат		
	Edwards J..	DANCER	REFLEX	Edwards J.	DANCER	REFLEX
ACR20	20%	45%	33%	65%	59%	51%
ACR50	5%	20%	8%	35%	38%	34%
ACR70	0%	8%	4%	15%	17%	14%
DAS28-ремиссия	-	5%	4%	-	10%	12%

в базисной терапии РА, являясь своеобразным «тылом» для наиболее тяжелой категории пациентов, торпидных к лечению не только метотрексатом и/или лефлуномидом, но и ингибиторами TNFα.

Литература

1. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatology Guidelines: Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* - 2002. - Vol. 46. - P. 328-346.
2. Breedveld F.C., Agarwal S., et al. *ACR.* - 2006.
3. Cohen, et al. *ACR.* - 2005 (Abstract 1830).
4. Cooper N.J. Economic burden of rheumatoid arthritis: a systematic review. *// Rheumatology.* — 2000. — Vol. 39. — P. 28—33.
5. Dass S., Rawston A.C. et al. - *ACR 2006.*
6. Dass S., Coulthard. L. et al. - *ACR 2006.*
7. Edwards J.C., Cambridge G. *// Rheumatology (Oxford).* — 2001. - Vol. 40. - P. 205-211.
8. Edwards J.C., Szczepanski L., Szechinski J. et al. *// N. Engl. J. Med.* - 2004. - Vol. 350. - P. 2572-2581.
9. Emery P., Fillipowicz—Sosnowska A., Szczepanski L. et al. *// EULAR.* - 2005; June 8-11, 2005, Viena, Austria, OP008. <http://ard.bmjournals.com/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=jimmunol&resid=175/4/2579>

bmjournals.com/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=jimmunol&resid=175/4/2579

10. Emery P., Szczepanski L., Szechinski J. et al. *//Arthritis Rheum.* - 2003. - Vol. 48 (Suppl). - P. S439.

11. Fleischmann R.M., Emery P., Ellipowicz-Sosnowska A. et al. *// Ann. Rheum. Dis.* - 2005. - Vol. 64 (Suppl III). - P. 434.

12. James R. O'Dell *// N. Engl. J. Med.* - 2004. - Vol. 350. - P. 2591-2602.

13. Jimenez-Boj E., Redlich K., Turk B. et al. *//J. Immunol.* - 2005. - Vol. 175. - P. 2579-2588.

14. Kremer J.M. et al. *ACR.* - 2006.

15. Leandro M.J., Edwards J.C.W., Cambridge G. *// Ann. Rheum. Dis.* — 2000. — Vol. 61. - P. 883-888.

16. Pavelka K., Emery P., Fillipowicz—Sosnowska A. et al. *Efficacy and safety following repeated course of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis. EULAR 2005; June 8— 11, 2005, Viena, Austria, SAT0080.*

17. Pinkus T., Callahan L.F. *// J. Rheumatol.* - 1986. - Vol. 13. - P. 841-845.

18. Reyes-Salinas A., Carrillo-Véquez S.M., Rodriguez-Falcyn M., Saavedra-Salinas M.A. *// Ann. Rheum. Dis.* — 2005. — Vol. 64 (Suppl III). - P. 472.

19. Scott D.L., Symmons D.P., Coulton B.L., Popert A.J. *// Lancet.* - 1987. № 1. - P. 1108-1111.

20. Silverman G.J., Carson D.A. *//Arthritis Res. Ther.* — 2003, (Suppl 4). - P. S1-S6.

21. Takemura S., Klimiuk P.A., Braun A. et al. *//J. Immunol.* — 2001. - Vol. 167. - P. 4710-4718.

22. Tsokos G.C. *// N. Engl. J. Med.* - 2004. - Vol. 350, - P. 2546-2548.

23. Van Vollenhoven R.F., Emery P. et al. *ACR.* - 2006.

24. Yelin E., Wanke L.A. *//Arthritis Rheum.* - 1999. - Vol. 42. - P. 1209-1218.

Метод анализа экспрессии генов в разработке лекарственных средств из лекарственного растительного сырья

А.И. Иванов, С.А. Коростелев, Л.А. Кумышева

ФГУП «Межбольничная аптека» УД Президента РФ, Московская медицинская академия им И.М. Сеченова

В последние годы известно большое количество разнообразных молекулярных механизмов, реализующих функцию клеток. Оценка влияния веществ на такие молекулярные механизмы позволяет прогнозировать их биологические свойства. В свою очередь такие молекулярные механизмы регулируются активностью тех или иных генов. Поэтому методы молекулярной биологии, расшифровка генов и понимание их функции позволили не только определить механизм развития многих заболеваний, сформировать новые подходы к диагностике, методам их лечения, но и использовать аналогичные методы для оценки эффективности, безопасности и качества лекарственных средств, в том числе и производимых из растительного сырья.

Безусловными предпосылками к возможности такого подхода для оценки лекарственных растительных средств является развитие таких направлений, как геномика, протеомика и биоинформатика, благодаря которым расшифрованы строение отдельных генов, определена структура и функция кодируемых

ими белков и метаболических процессов, связанных с ними. Генетическим профилем клетки определяется ее фенотип, функционирование и ответ на воздействие окружающей среды. Активность генов, экспрессируемых клеткой, очень динамична и быстро отвечает на внешние стимулы. Таким образом, с помощью анализа экспрессии генов возможно не только лучшее понимание молекулярных механизмов функционирования клетки, биохимических процессов и функции, но и оценка их динамики под влиянием внешних факторов, в том числе лекарственных средств.

Теоретической основой анализа генной экспрессии является обнаруженное еще в начале 50-х годов Уотсоном и Криком явление комплементарности нуклеотидных оснований. Это свойство дает возможность определить нуклеотидную последовательность в ДНК на основании гибридизации с известной комплементарной ей пробой. Впервые практическая возможность определения специфических полинуклеотидов из ДНК, разделенных методом гель-электрофореза, была показана