

ПАТОГЕНЕЗ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Материалы конференции



Минск БГМУ 2010

*Сергиенко Т. Ф., Бакин А. В., Тарас Н. Б., Дрейчук П. А.,
Хлебко П. В., Пасюков В. В., Василевич А. С., Талако Т. М.,
Рябцева Т. В., Сирош О. П., Сорока Н. Ф.,
Смольникова В. В., Свирновский А. И.*

**ЛЕКАРСТВЕННАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ
ПАЦИЕНТОВ С СИСТЕМНЫМИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ
ЗАБОЛЕВАНИЯМИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ В ПРОЦЕССЕ
ДОЛГОСРОЧНОЙ ТЕРАПИИ ЛЕЙКЛАДИНОМ**

*Республиканский научно-практический центр гематологии
и трансфузиологии, лаборатория молекулярно-генетических
исследований гемобластозов и гемопатий;
Белорусский государственный медицинский университет,
2-я кафедра внутренних болезней*

Совершенствование методов воздействия на иммунный процесс происходит по двум направлениям: изменение режимов применения традиционных препаратов и внедрение в практику новых препаратов. Лейкладин является перспективным препаратом для применения при коллагенозах, однако введение его должно быть адекватным и контролируемым [1-3]. Цель работы заключалась в определении лекарственной чувствительности лимфоцитов периферической крови *in vitro* пациентов с аутоиммунными заболеваниями в процессе длительной терапии лейкладином.

Материалы и методы

Исследовали лимфоциты пациентов с коллагенозами: системной красной волчанкой (СКВ), ревматоидным артритом (РА), системным склерозом (СС) и первичным синдромом Шегрена (СШ). В исследование были включены пациенты, которые в комплексе с традиционной терапией (за исключением цитостатиков) получали следующую терапию: 0,1%-ный раствор лейкладина для инъекций из расчета 0,05 мг на кг массы тела пациента в сутки, который вводился в виде 2-часовой непрерывной внутривенной инфузии в течение 5 дней. Анализ проводился до начала терапии, на 3 и 21 дни после окончания введения лейкладина.

Лимфоциты выделяли центрифугированием на градиенте фиколл-верографина (плотность 1,077) и культивировали по стандартной методике. Для определения чувствительности лимфоциты пациентов культивировали с химиопрепаратами: дексаметазон — 5 мкг/мл, преднизолон — 30 мкг/мл, циклофосфан — 5 мкг/мл, лейкладин — 2 мкг/мл, метотрексат — 14 мкг/мл.

Субпопуляции лимфоцитов определяли с помощью проточной цитофлуориметрии после инкубации с антителами против CD3+, CD19+, CD4+, CD25+, CD8+, меченными флуоресцентными метками.

Чувствительность лимфоцитов периферической крови к химическим и физическим воздействиям определяли с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) теста.

Результаты и обсуждение

В связи с тем, что различий в ответе лимфоцитов на действие лейкладина показано не было для пациентов с различными заболеваниями, динамику чувствительности клеток к лейкладину исследовали без выделения групп образцов по нозологиям. Для образцов пациентов с системными воспалительными заболеваниями соединительной ткани не выявлено достоверных изменений различий ответа лимфоцитов в процессе получения терапии (рис. 1). Однако реакция клеток на лейкладин имела индивидуальные особенности не только среди пациентов с различными заболеваниями и внутри групп пациентов одной нозологии. Представленные данные свидетельствуют об отсутствии формирования устойчивости к лейкладину в процессе терапии этим препаратом в большинстве случаев, не исключая индивидуальную вариабельность ответа клеток пациента.

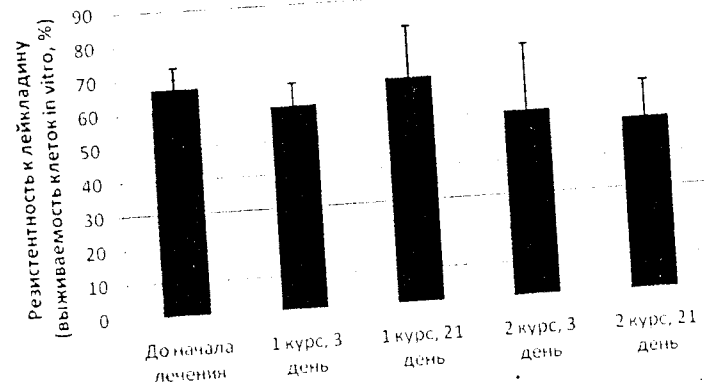


Рис. 1. Ответ лимфоцитов периферической крови на действие лейкладина in vitro в процессе терапии лейкладином (N = 17)

После проведения 3 курсов терапии лейкладином оценили изменения лекарственной чувствительности пациентов к другим лекарственным препаратам, используемым для лечения данных заболеваний (рис. 2).

При действии лейкладина формирования множественной лекарственной устойчивости не выявлено. Изменения чувствительности к глюкокортикоидам и метотрексату in vitro не установлено. После окончания введения лейкладина клетки стали более чувствительны к хлорамбуцилу ($p < 0,05$). Однако при изучении индивидуальной реакции клеток пациентов на препараты изменения были высоковариабельны. Так, некоторые разницы не изменили своей чувствительности или произошла сенсibili-

зация одних образцов к действию химиопрепаратов in vitro, в то время как другие приобрели устойчивость ко всем исследованным агентам.

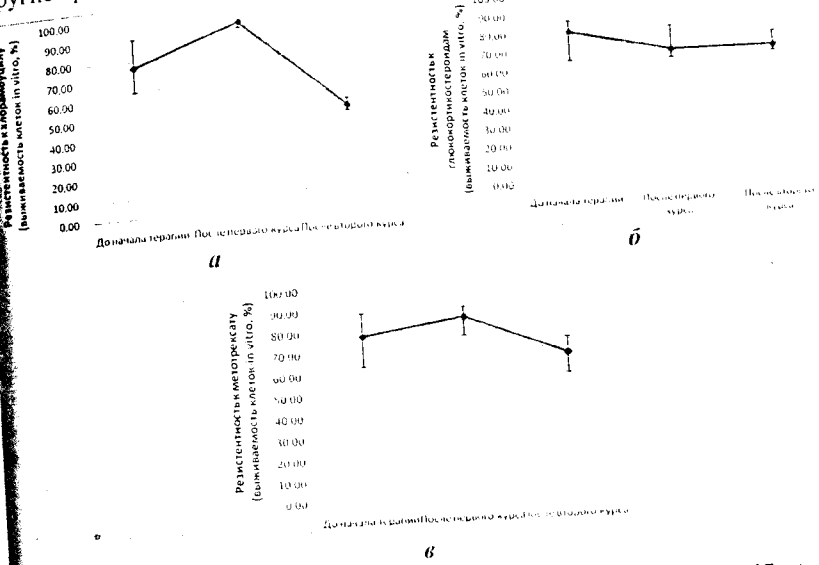


Рис. 2. Динамика чувствительности клеток in vitro к хлорамбуцилу (N = 17, а), глюкокортикоидам (N = 33, б) и метотрексату (N = 17, в) в процессе лечения пациентов лейкладином

Для выявления возможности формирования перекрестной лекарственной устойчивости к лейкладину и другим препаратам рассчитывали коэффициенты корреляции Спирмана между количеством погибших клеток при действии лейкладина и других химиопрепаратов (табл. 1). При коэффициенте корреляции выше 0,7 возможно развитие перекрестной устойчивости, при его значениях 0,49 и ниже — отсутствие тесной корреляционной связи. Установили, что формирование перекрестной лекарственной устойчивости маловероятно для исследованных клеток пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

Отсутствие выраженных изменений чувствительности клеток при действии лекарственных препаратов in vitro при статистическом анализе всех образцов и высокая вариабельность данных у некоторых из них дает основание рекомендовать использование определения лекарственной чувствительности in vitro для мониторинга развития множественной лекарственной резистентности у пациентов с системными воспалительными заболеваниями соединительной ткани в процессе терапии пациентов лейкладином.

Таблица
Перекрестная резистентность клеток к химиопрепаратам при системных воспалительных заболеваниях соединительной ткани

Корреляция между ответом на лейкокладин и	N	Коэффициент корреляции Спирмана
Циклофосфаном	39	0,17
Дексаметазоном	38	-0,13
Преднизолоном	37	-0,01
Флударабелом	40	0,35 *
Метотрексатом	37	-0,21
Лейкераном	15	-0,33
Спонтанным апоптозом	9	-0,07

Примечание: * — достоверно с уровнем значимости $p < 0,05$.

Исследовали наличие возможной связи между лекарственной чувствительностью и относительным и абсолютным содержанием CD3+, CD19+ CD4+, CD8+, CD4+CD25+ клеток. При исследовании связи резистентности к лейкокладину *in vitro* и иммунофенотипом клеток пациентов достоверная зависимость показана только для апоптотических В-лимфоцитов (табл. 2).

Таблица
Зависимость ответа клеток на лейкокладин *in vitro* от иммунофенотипического статуса пациента

Показатель	Коэффициент корреляции
CD 3+, %	0,16
CD 3+ Annexin V+, %	-0,45
CD 19+, %	-0,23
CD 19+ Annexin V+, %	0,88 *
CD 4+, %	0,49
CD 4+25+, %	-0,04
CD 8+, %	1

Примечание: * — различия достоверны с уровнем значимости $p = 0,02$.

Выводы

Чувствительность мононуклеаров периферической крови к лейкокладину в терапевтической концентрации *in vitro* не отличалась в образцах пациентов с СКВ, РА, СС и СШ до начала лечения и составила около 50%. Устойчивого развития лекарственной резистентности *in vitro* к лейкокладину в процессе терапии не выявлено в большинстве исследованных случаев. В процессе терапии лейкокладином пациентов с аутоиммунными заболеваниями чувствительность их клеток *in vitro* к метотрексату, дексаметазону и преднизолону не изменялась. Показано, что лейкокладин при введении *in vivo* сенсibilизирует клетки к хлорамбуцилу *in vitro*. Выявлена коррелятивная зависимость между резистентностью лимфоцитов к лейкокладину *in vitro* и содержанием апоптотических CD19+ В-лимфоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сорока, Н. Ф. Влияние иммуносупрессивных лекарственных препаратов на апоптоз лимфоцитов больных системной красной волчанкой *in vitro* / Н. Ф. Сорока, А. И. Свириновский, А. Л. Рекуи // Научно-практическая ревматология. 2007. № 1. С. 15–21.
2. Оспанова, Ш. М. Фармакотерапия системной красной волчанки / Ш. М. Оспанова // Бюллетень СО РАМН. 2003. Т. 107. С. 91–94.
3. Калиниченко, Е. Н. Модифицированные нуклеозиды: синтез и перспективы использования в качестве химиотерапевтических агентов / Е. Н. Калиниченко // Наука и инновации. 2004. № 9. С. 57–64.