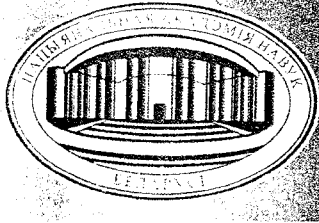


БИБЛИОТЕКА
Белорусского государственного
медицинского университета

ISSN 1814-6023

ВЕСТНИ



НАЦЫЯНАЛЬНАЙ
АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК

ИЗВЕСТИЯ
НАЦИОНАЛЬНОЙ
АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ
СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

PROCEEDINGS
OF THE NATIONAL ACADEMY
OF SCIENCES OF BELARUS
MEDICINE SERIES

2

Мінск
«Беларуская навука»
2010

УДК 615.036.8

*Н. В. ВОРОНОВА, О. П. СИРОЦ, Т. В. РЯБЦЕВА,
Т. М. ТАЛАКО, Н. Ф. СОРОКА*

**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ,
Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ
НА ФОНЕ ТЕРАПИИ ЦИТОСТАТИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТОМ ЛЕЙКЛАДИН**

Белорусский государственный медицинский университет, Минск

(Поступила в редакцию 15.07.2009)

Введение. Участие В-клеток в патогенезе ревматоидного артрита (РА) связано как с продукцией плазматическими клетками (ПК) аутореактивных антител, так и с активацией Т-клеток за счет презентации ими аутоантигенов, синтеза провоспалительных цитокинов и других агентов, стимулирующих Т-клетки. Последние, в свою очередь, вызывают вторичную активацию В-лимфоцитов и синовиальных макрофагов, выработку ими медиаторов воспаления и, как следствие, развитие аутоиммунного процесса по самовоспроизводящемуся механизму [1]. При этом до сих пор остается неясным, нарушения в каком звене иммунной системы пациента являются первичными в развитии аутоиммунной патологии: связано развитие РА с аномальным изменением Т-клеточной толерантности и активацией аутореактивных Т-лимфоцитов или собственно активация В-клеточного звена иммунитета приводит к экспансии аутореактивных клонов, детерминированы эти нарушения генетически или являются следствием эпигенетических изменений в клетках. Ответ на этот вопрос позволит определить, какое звено иммунной системы должно быть выбрано мишенью патогенетической терапии в каждом конкретном случае [2].

Известно, что у людей без аутоиммунных патологий до 50% незрелых В-лимфоцитов аутореактивны. В процессе созревания их количество снижается до 6–20% за счет преимущественной элиминации и/или утраты способности к выработке аутоантител [3]. Однако у пациентов с РА в сыворотке крови и синовиальной жидкости обнаруживается ряд аутоантител, ассоциированных с РА: ревматоидный фактор (РФ), антиколлаген типа II, анти-ССР и др. [4]. Кроме того, В-клетки способны к выработке цитокинов, являющихся ключевыми в регуляции аутореактивности: $TNF\alpha$ - β , IL-6 и IL-10 [5, 6]. Появление ПК, ответственных за выработку патогенетических антител и презентацию аутоантигенов в герминативных центрах синовиальных оболочек воспаленных суставов [7], характерно для последней стадии дифференциации В-лимфоцитов.

В связи с указанным выше применение анти-В-клеточной терапии оправданно в тех случаях, когда у пациентов отмечается высокий титр антител в сыворотке крови и избыточное количество иммунных комплексов, особенно в синовиальной жидкости. Динамика этих показателей (количество и процентное соотношение иммуноглобулинов, концентрации РФ и циркулирующих иммунных комплексов) на фоне проводимой терапии может служить критерием ее эффективности [8, 9]. Предполагается, что использование цитостатических иммуносупрессантов, вызывающих гибель предшественников ПК, приводит к снижению активности воспалительного процесса и скорости прогрессирующей деструкции суставов, протекающей с участием иммунных комплексов и аутореактивных антител [10]. Препарат лейклагин (кладрибин) (2-хлор-2'-дезоксаденозин), являясь аналогом 2-дезоксаденозина, ингибирует рибонуклеотидредуктазу, в норме катализирующую реакцию образования дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, что приводит к последующей апоптической гибели лимфоцитов [11].

Целью нашей работы было выявление терапевтической эффективности применения отечественного цитостатического препарата лейккладин для лечения пациентов с РА, а также оценка влияния препарата на состояние клеточного звена иммунитета указанных пациентов.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось в рамках ГНТП «Лечебные и диагностические технологии» на базе Республиканского ревматологического центра (отделения ревматологии УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска). Оно включало 11 пациентов с РА (8 женщин, 3 мужчин) в возрасте от 26 до 59 лет (средний возраст $50,0 \pm 4,5$ года). Средняя длительность заболевания – $12,0 \pm 2,0$ года. Все пациенты данной группы имели высокую степень активности ревматоидного артрита (согласно индексу DAS 28). Резистентность к лечению препаратами первой линии (метотрексату, сульфасалазину, лефлуномиду) наблюдалась у 9 больных, а у 2 человек данные препараты были отменены из-за побочных эффектов. До назначения лейккладина из базисных противовоспалительных препаратов (БПВП) 9 пациентов принимали метотрексат, 1 человек – азатиоприн и 1 больной – плаквенил. Перед началом исследования БПВП были отменены, лейккладин назначали в сочетании с нестероидными противовоспалительными препаратами. Препарат лейккладин вводили в дозе 0,075 мг на 1 кг массы тела в сутки в виде двухчасовой внутривенной инфузии в течение 7 дней. Пациенты проходили от одного до трех курсов терапии с интервалом в 28 дней. Эффективность препарата оценивали через 3 недели после проведения каждого курса. С учетом резистентности пациентов к терапии препаратами первой линии, а также в связи с отменой данных препаратов из-за развития побочных эффектов в качестве контроля использовали лабораторные показатели этих же пациентов до начала исследования, т. е. эффективность терапии лейккладином оценивали в сравнении с эффективностью БПВП.

Количество лимфоцитов и их субпопуляционный состав оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Маркер апоптоза фосфатидилсерин определяли на лимфоцитах крови иммунофлуоресцентным методом с использованием зонда Annexin V, концентрацию иммуноглобулинов – методом иммуноферментного анализа.

Результаты и их обсуждение. В процессе терапии пациентов с РА препаратом лейккладин нами не обнаружено существенных изменений в клеточном составе крови (см. таблицу). Наблюдавшееся снижение абсолютного числа лейкоцитов после окончания первого курса терапии было обусловлено в основном снижением количества нейтрофилов всех субпопуляций. Содержание лимфоцитов также несколько снизилось, а процентное содержание моноцитов, напротив, возросло. Однако после проведения второго курса терапии общее содержание лейкоцитов возросло и приблизилось к исходному уровню, а количество лимфоцитов даже несколько превысило исходные значения. После окончания терапии (через 6 мес.) клеточный состав крови соответствовал исходному.

Изменение общего анализа крови у пациентов с ревматоидным артритом в процессе терапии препаратом лейккладин

Клинико-лабораторный показатель	Исходные значения	Сроки наблюдения			
		21-й день			через 6 мес. после окончания терапии
		после 1-го курса	после 2-го курса	после 3-го курса	
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	$6,9 \pm 1,2$	$4,85 \pm 0,8$	$5,02 \pm 0,9$	$6,07 \pm 0,12$	$6,8 \pm 1,25$
Гемоглобин, г/л	$125,1 \pm 13,2$	$103,8 \pm 11,1$	$112,5 \pm 12,7$	$124,7 \pm 12,65$	$127,2 \pm 15,0$
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	$367,6 \pm 81,14$	$460,33 \pm 78,18$	$420,03 \pm 54,8$	$421,98 \pm 48,06$	$359,75 \pm 68,2$
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	$9,05 \pm 3,07$	$6,77 \pm 3,89$	$7,98 \pm 2,76$	$8,12 \pm 3,54$	$8,95 \pm 3,48$
Базофилы, %	0	0	0	0	0
Эозинофилы, %	$1,45 \pm 0,60$	$2,40 \pm 0,70$	$1,67 \pm 0,23$	$1,73 \pm 0,46$	$1,44 \pm 0,58$
Нейтрофилы, %	$68,4 \pm 3,62$	$64,6 \pm 2,69$	$65,5 \pm 1,94$	$62,3 \pm 4,70$	$67,60 \pm 3,57$
Лимфоциты, %	$29,03 \pm 2,09$	$26,13 \pm 6,30$	$31,02 \pm 4,54$	$28,26 \pm 3,15$	$28,68 \pm 2,85$
Моноциты, %	$5,87 \pm 0,99$	$8,60 \pm 1,21$	$7,12 \pm 1,22$	$5,76 \pm 1,10$	$5,95 \pm 0,88$
СОЭ, мм/ч	$87,4 \pm 11,2$	$83,9 \pm 5,3$	$79,56 \pm 4,28$	$85,6 \pm 8,10$	$87,5 \pm 10,4$

Следует отметить, что введение данного цитостатического препарата в дозе 0,075 мг/кг/сут в течение 7 дней не вызвало снижения общего числа лимфоцитов в периферической крови пациентов, однако были зафиксированы существенные изменения их субпопуляционного состава. В частности, было обнаружено, что на 21-й день первого курса терапии в периферической крови пациентов уменьшилось как процентное (рис. 1), так и абсолютное количество В-клеток (CD19+).

Снижение количества лимфоцитов под действием аналога дезоксиаденозина, очевидно, связано с массовым уходом лимфоцитов в апоптоз. Для выявления маркера апоптоза на мембранах лимфоцитов периферической крови в процессе лечения пациентов препаратом лейклаглин был использован флуоресцентный зонд Annexin V (рис. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что имеет место слабовыраженная индукция апоптоза CD19+ клеток. Однако не исключено, что на 21-й день после первого курса терапии препаратом лейклаглин часть вставших на путь апоптоза клеток уже элиминировалась, и по этой причине нам не удалось обнаружить выраженной экспрессии фосфатидилсерина на поверхности мембран выживших лимфоцитов.

Следует отметить, что, несмотря на существенное снижение количества CD19+ клеток в периферической крови, концентрация иммуноглобулинов в сыворотке крови у пациентов с РА, прошедших терапию лейклаглином, не изменилась (рис. 3). Даже при сроках, существенно превышающих время полужизни иммуноглобулинов (до 4 мес.), титр антител у пациентов оставался константно высоким и почти не отличался от исходного, наблюдаемого до начала терапии препаратом лейклаглин.

Полученные нами данные указывают на сохранение концентрации иммуноглобулинов в плазме крови пациентов на фоне резкого сокращения пула CD19+ клеток, что требует более детального обсуждения. Анти-В-клеточная терапия в лечении РА призвана в первую очередь сократить количество циркулирующих иммунных комплексов и общего титра антител как активных агентов патологического процесса за счет истощения пула предшественников ПК. Однако наши данные и данные некоторых других исследователей, полученные при изучении эффективности анти-CD20+ препаратов, показывают, что ожидаемого эффекта не происходит [12].

Можно предположить существование сразу нескольких механизмов, обеспечивающих сохранение титра антител в периферической крови пациентов с РА на фоне почти полной элиминации в периферической крови предшественников ПК. Во-первых, следует учитывать возможность того, что массовый уход в апоптоз CD19+ клеток, индуцированный лейклаглином, приводит к увеличению процента дифференциации В-клеток в ПК. У одной из пациенток из группы исследования в миелограмме было выявлено двукратное превышение количества ПК (3,5% при норме 1,5%).

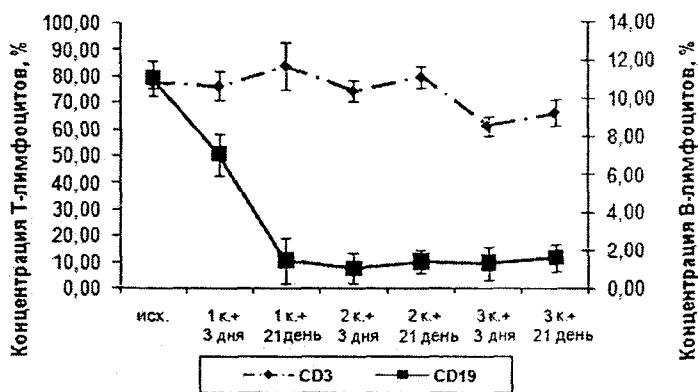


Рис. 1. Изменение процентного соотношения лимфоцитов различных субпопуляций у пациентов с ревматоидным артритом в процессе терапии препаратом лейклаглин

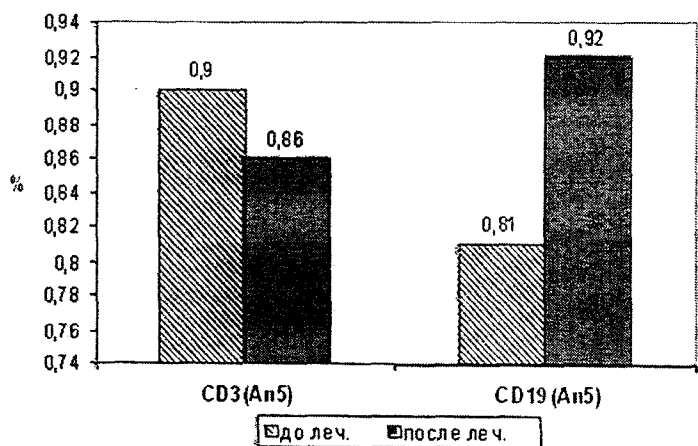


Рис. 2. Экспрессия раннего маркера апоптоза на лимфоцитах пациентов с ревматоидным артритом в процессе терапии препаратом лейклаглин

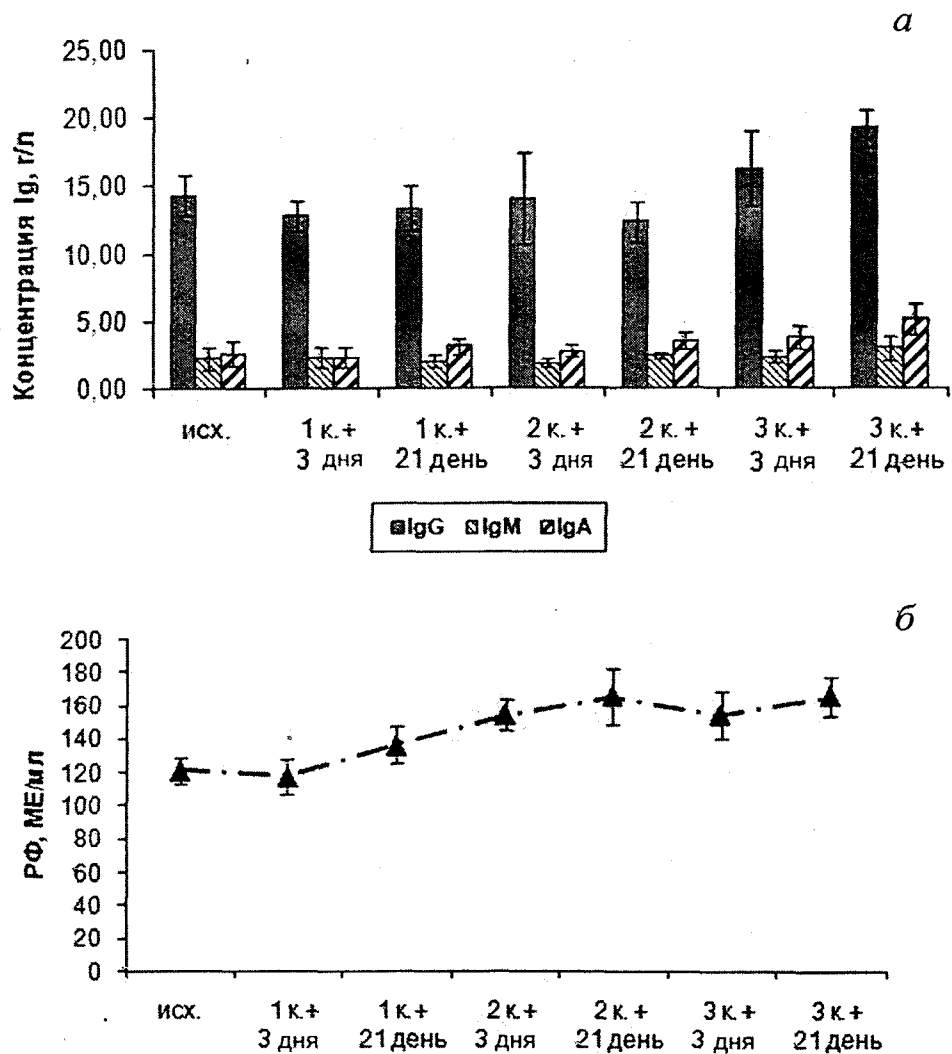


Рис. 3. Изменение концентрации иммуноглобулинов классов А, М, G (а) и РФ (б) у пациентов с ревматоидным артритом в процессе терапии препаратом лейкокладин

Мы полагаем, что в костном мозге под действием цитостатического препарата осуществляется селекция В-клеток по их способности выживать и активно пролиферировать в условиях продолжающегося поступления лекарственного препарата. Во-вторых, не исключено, что ПК людей с диагнозом «ревматоидный артрит» изначально обладают способностью к более высокой продукции антител и/или к более высокой реактивности на воздействие патологически активированных аутореактивных Т-лимфоцитов. В-третьих, вполне вероятно, что продолжительность жизни долгоживущих ПК у пациентов с РА выше, чем в норме. Это позволяет им длительное время сохранять титр иммуноглобулинов в плазме крови, несмотря на почти полное исчезновение из периферического кровотока CD19+ лимфоцитов.

Каждая из данных гипотез заслуживает тщательного изучения, поскольку знание молекулярных механизмов, позволяющих аутореактивным клонам ПК или их предшественников «ускользнуть» из-под действия иммуносупрессивных препаратов при РА, поможет ответить на вопрос: почему, несмотря на достижения современной медицины, результаты лечения РА не могут быть признаны удовлетворительными?

Собственно, выход В-клеток из-под действия цитостатических препаратов может осуществляться сразу двумя независимыми путями. Известно, что В-клетки способны к индуцируемой амплификации гена, продукт которого представляет собой мишень для действия цитостатика [13]. В результате амплификации многократно увеличивается экспрессия данного продукта, поэтому его полное ингибирование становится невозможным. Кроме того, в мембране В-клеток выделяют

белки-переносчики, ответственные за активный выброс цитостатиков из клетки, экспрессия которых также может возрастать при постепенном поступлении препарата в кровь [14]. Это дает нам основание предположить, что при длительном поступлении цитостатического иммуносупрессанта в организм происходит отбор В-клеток по их способности выживать и активно пролиферировать под действием цитостатика. Это и приводит к сохранению суммарного титра антител в сыворотке крови пациентов с РА.

Заключение. Применение препарата лейкладин в терапии РА вызывает существенное уменьшение количества В-лимфоцитов в периферической крови пациентов на 3-й день после окончания введения препарата. Количество Т-лимфоцитов уменьшается незначительно. Тем не менее концентрация иммуноглобулинов всех классов в плазме крови пациентов остается без изменений, несмотря на почти полное исчезновение из периферической крови предшественников плазматических клеток.

В связи с тем что даже при резком падении количества В-клеток в периферической крови не происходит угнетения иммунного ответа, следует уточнить механизмы, позволяющие плазматическим клеткам пациентов с РА уходить из-под действия цитостатических препаратов, чтобы спрогнозировать возможные вмешательства в эти процессы.

Литература

1. Mandik Nayak L., Ridge N., Fields M. et al. // *Curr. Opin. in Immunol.* 2008. N 20. P. 639–645.
2. Лыскина Г. А. // *Педиатрия.* 2004. № 26. С. 46–52.
3. Wardemann H., Yurasov S., Schaefer A. // *Science.* 2003. N 301. P. 1374–1377.
4. Rowley M. J., Nandakumar K. S., Holmdahl R. // *Mod. Reumatol.* 2008. N 18. P. 429–441.
5. Lund F. E. // *Curr. Opin. in Immunol.* 2008. N 20. P. 332–338.
6. Mauri C., Gray D., Mushtaq N. // *Trends Immunol.* 2008. N 29. P. 34–40.
7. Tarlinton D., Radbruch A., Hiepe F., Dorner T. // *Curr. Opin. in Immunol.* 2008. N 20. P. 162–169.
8. James P. V. *Use and interpretation of tests in clinical immunology.* Eight ed. 1992.
9. Насонов Е. Л. *Ревматология 2008: клин. рекомендации.* М., 2008.
10. Стерлинг Д. В. *Секреты ревматологии.* СПб., 2001.
11. Сорока Н. Ф., Свирновский А. И., Рекуна А. Л. // *Науч.-практ. ревматол.* 2007. № 1. С. 15–21.
12. Ahuja A., Anderson S. M., Khalil A., Shlomchik M. J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. N 105. P. 4802–4807.
13. Patrushev L. I. *Gene Expression.* Moscow, 2000.
14. Никитин Е. А. // *Материалы VIII Рос. онколог. конгр. М., 2004.*

*N. V. VORONOVA, O. P. SIROSH, T. V. RYABZEVA,
T. M. TALAKO, N. F. SOROKA*

AMOUNT OF IMMUNOGLOBULINE, T- AND B-LYMPHOCYTES IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS TREATED WITH CYTOSTATIC LEUCLADIN

Belarusian State Medical University, Minsk

Summary

It was found that the amount of B cells was significantly decreased in rheumatoid arthritis patients by Leucladin (Cladribin) therapy. But for all, in the patients' peripheral blood there was no decrease in both the total Ig-titre and the content of the rheumatoid factor. The absence of the connection between the B cells abundance and Ig concentration in the rheumatoid arthritis patients' blood allows us to suppose that the CD19+ cells apoptosis induced by Leucladin (Cladribin) therapy leads to a high rate of the B cells, which differentiates the plasma cells.