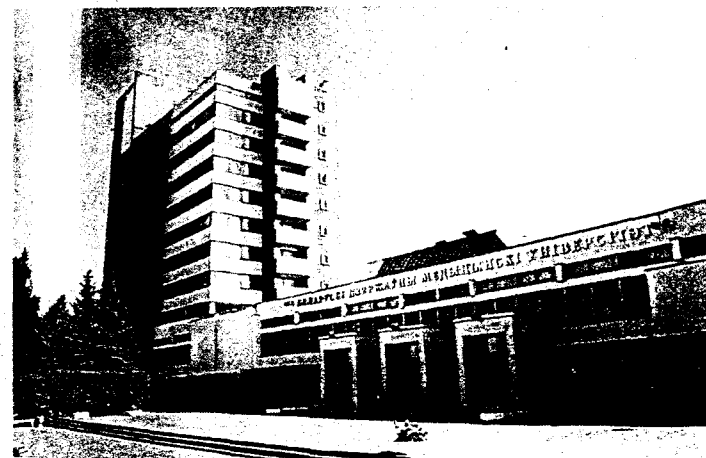


ПАТОГЕНЕЗ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Материалы конференции



Минск БГМУ 2010

¹Рябцева Т. В., ¹Воронова Н. В., ¹Талако Т. М., ¹Сирош О. П.,
²Сергиенко Т. Ф., ²Бакуи А. В., ²Тарас И. Б., ²Хлебко П. В.,
²Свириновский А. И., ¹Сорока Н. Ф.

**ИНДУКЦИЯ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ
КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ
И СИСТЕМНЫМ СКЛЕРОЗОМ ЛЕЙКЛАДИНОМ
IN VIVO И IN VITRO**

¹ Белорусский государственный медицинский университет;
² Республиканский научно-практический центр гематологии
и трансфузиологии

Анализ данных современной литературы, посвящённой иммунопато-
генезу системных заболеваний соединительной ткани, свидетельствует
о том, что многие из них характеризуются снижением интенсивности апоп-
тоза, в частности Fas-опосредованного, что связано с усиленной выработ-
кой активированными Т-лимфоцитами растворимой формы Fas-рецептора
и конкурентным подавлением Fas-FasL взаимодействия (одного из путей
инициации программированной клеточной гибели). В результате происхо-
дит накопление клона аутореактивных лимфоцитов [1, 2]. Постоянная ак-
тивация молекул, контролирующих апоптоз (NF- κ B, PI3k/Akt-1 и STAT3)
не только вносит вклад в постоянную экспрессию медиаторов воспаления
и деструкцию соединительной ткани, но и в экспрессию антиапоптотиче-
ских молекул, что также предотвращает программированную клеточную
гибель [3, 4]. Одной из мишеней действия лекарственных средств, исполь-
зуемых в ревматологии (глюкокортикоиды, метотрексат, гидроксихлор-
хин, циклофосфамид) являются процессы апоптоза. Современный цито-
токсический препарат Лейклагин (2-хлор-2'-дезоксиаденозин) является
аналогом 2'-дезоксиаденозина, входящего в состав молекулы ДНК, и спо-
собен индуцировать апоптоз клеток. Целью данного исследования явилось
изучение интенсивности апоптоза лимфоцитов, индуцированного Лейкла-
дином *in vitro* и *in vivo* у пациентов с ревматоидным артритом и системным
склерозом.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись лимфоциты, выделенные из периферической крови пациентов с системными заболеваниями соединительной ткани, проходивших стационарное лечение и амбулаторное наблюдение на базе Республиканского центра ревматологии (9-я клиническая больница г. Минска). В исследование были включены пациенты с системным склерозом (n = 7) и ревматоидным артритом (n = 6), которые в комплексе с традиционной терапией (за исключением цитостатиков) получали следующую терапию: 0,1%-ный раствор Лейкладина для инъекций из расчета 0,075 мг/кг массы тела пациента в сутки, в виде 2-часовой непрерывной внутривенной инфузии в течение 5–7 дней.

Лимфоциты выделяли центрифугированием на градиенте фикола верографина (плотность 1,077). Для оценки апоптоза *in vitro* лимфоциты культивировали в полной среде (с добавлением препарата в концентрации 2 мкг/мл) в течение 24 ч, далее проводили учёт апоптотической гибели клеток морфологическим методом. Для оценки ингибирования пролиферативной активности лимфоцитов Лейкладином использовали МТТ-тест. Рассчитывали показатель выживаемости клеток по формуле:

$$ЖК = (ОП1 / ОП2) \times 100 \%,$$

где ОП1 — средняя оптическая плотность триплета лунок с клетками, которые подвергались воздействию, за вычетом оптической плотности среды; ОП2 — средняя оптическая плотность триплета лунок с интактными клетками за вычетом оптической плотности среды.

Для оценки апоптоза *in vivo* с использованием проточной цитофлуориметрии определяли процентное содержание Т- и В-лимфоцитов (CD3-CD19+), а также оценивали процент клеток, экспрессирующих ранний маркер апоптоза — фосфатидилсерин с помощью AnnexinV. Статистический анализ проводили с использованием непараметрических методов. Все данные представлены медианой (25–75 процентилями).

Результаты и обсуждение

Результаты оценки влияния Лейкладина на клеточный состав крови пациентов с ревматоидным артритом (РА) и системным склерозом (СС) свидетельствуют о достоверном снижении абсолютного числа общих лейкоцитов, общих лимфоцитов, а также Т- и В-лимфоцитов (табл. 1). Данные исследования свидетельствуют о том, что Лейкладин является избирательным, «мягким» цитостатическим препаратом и не приводит к истощению ростков кроветворения.

Для оценки возможности прогнозирования развития цитостатического эффекта препарата по тестам на определение лекарственной чувствительности лимфоцитов нами проводился сравнительный анализ выживаемости мононуклеаров *in vivo* у пациентов после 1 курса Лейкладина с выжива-

емостью *in vitro* при добавлении Лейкладина в питательную среду. Результаты исследования представлены в табл. 2.

Таблица 1

Изменение абсолютного числа лимфоцитов периферической крови у пациентов с ревматоидным артритом и системным склерозом до и после терапии препаратом Лейкладин

Лабораторные показатели	Ревматоидный артрит (n = 6)		Системный склероз (n = 7)	
	До лечения	После	До лечения	После
Общие лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	7,54 (5,42; 10,50)	4,36 (3,43; 5,41)*	9,20 (5,62; 10,80)	7,20 (4,83; 8,54)
Общие лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	1,96 (1,52; 2,34)	1,06 (0,71; 1,32)*	1,98 (1,32; 2,70)	1,18 (0,60; 2,76)
Т-лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	1,46 (1,12; 2,07)	0,78 (0,50; 1,21)*	1,26 (0,89; 1,90)	0,96 (0,55; 2,33)
В-лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,21 (0,10; 0,27)	0,009 (0,006; 0,03)*	0,16 (0,11; 0,38)	0,04 (0,03; 0,08)*

Примечание: * — $p < 0,05$ (тест Манна–Уитни).

Таблица 2

Выживаемость лимфоцитов периферической крови у пациентов с ревматоидным артритом и системным склерозом под действием Лейкладина *in vitro* и *in vivo*

Лабораторные показатели	Ревматоидный артрит (n = 6)	Системный склероз (n = 7)
Выживаемость лимфоцитов <i>in vitro</i> , %	48,60 (42,0; 63,0)	58,41 (44,90; 72,90)
Выживаемость Т-клеток <i>in vivo</i> , %	42,37 (38,99; 58,40)	63,00 (60,30; 84,72)*
Выживаемость В-клеток <i>in vivo</i> , %	14,0 (7,30; 30,00)	21,05 (12,00; 37,64)

Примечание: * — $p < 0,05$ (тест Манна–Уитни).

По данным экспериментов, результаты теста *in vitro* могут прогнозировать выживаемость Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов после 1 курса терапии Лейкладином. Корреляционный анализ показал статистически значимую прямую зависимость результатов *in vitro* и *in vivo* — $R = 0,95$, $p = 0,05$. Результаты тестов *in vivo* выявили, что чувствительность В-клеток к действию препарата значительно превышает таковую Т-клеток.

Сравнительный анализ выживаемости лимфоцитов периферической крови *in vivo* пациентов с ревматоидным артритом и системным склерозом показал, что лимфоциты пациентов с системным склерозом более устойчивы к действию Лейкладина, чем лимфоциты пациентов с ревматоидным артритом (рис. 1).

Индукция апоптоза лимфоцитов Лейкладином подтверждается *in vitro* морфологически. Однако в тестах *in vitro* мы наблюдаем в случае пациентов с СС более высокий процент апоптотических клеток, чем у пациентов с РА (рис. 2).

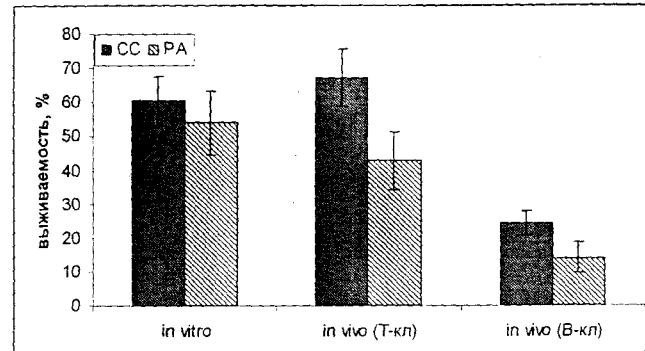


Рис. 1. Процент выживающих лимфоцитов у пациентов с СС и РА после индукции апоптоза Лейкладином *in vitro* и *in vivo*

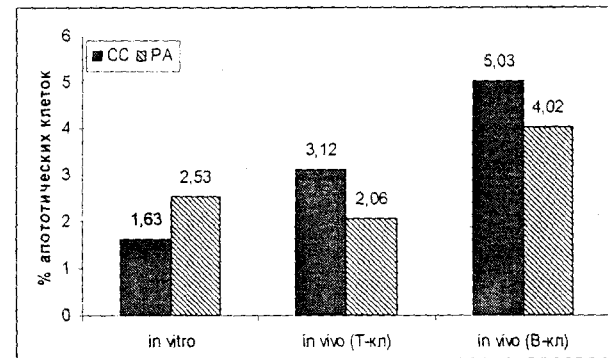


Рис. 2. Процент апоптотических лимфоцитов у пациентов с СС и РА после индукции апоптоза Лейкладином *in vitro* и *in vivo*

Интересным является, что у пациентов с СС процент апоптотических клеток *in vivo* выше, чем у пациентов с РА, а в случае определения выживаемости лимфоцитов *in vitro* и *in vivo* мы наблюдали обратное. Возможно, это связано с тем, что у пациентов с СС наряду с высокой интенсивностью апоптоза лимфоцитов наблюдается и высокая пролиферативная активность данного типа клеток.

Выводы

Под действием Лейкладина происходит индукция апоптоза лимфоцитов, причём наиболее чувствительны к действию препарата В-клетки. Несмотря на то, что *in vitro* была показана возможность прогнозирования развития цитостатического эффекта Лейкладина на лимфоциты периферической крови, среди пациентов с РА и СС были больные, у которых при

высокой чувствительности *in vitro* наблюдалась устойчивость к действию препарата *in vivo*, что подтверждалось лабораторными показателями и клиническими данными.

ЛИТЕРАТУРА

1. *The apoptosis-1/Fas protein in human systemic lupus erythematosus* / E. Mysler [et al.] // J. Clin. Invest. 1994. Vol. 93(3). P. 1029–1034.
2. *Liu, H. The role of apoptosis in rheumatoid arthritis* / H. Liu, R. Pope // Current opinion in Pharmacology. 2003. Vol. 3. P. 317–322.
3. *Pope, R. M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis* / R. M. Pope // Nature reviews. Immunology. 2002. Vol. 2. P. 1–9.
4. *Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with juvenile idiopathic arthritis* / E. Smolewska [et al.] // Ann. Rheum. Dis. 2003. Vol. 62. P. 761–763.