

## Показатели апоптоза лимфоцитов периферической крови у больных системной красной волчанкой с впервые установленным диагнозом

Мононуклеарные клетки, полученные из периферической крови больных с впервые установленным диагнозом системной красной волчанки и здоровых лиц (доноров), культивировали в течение 24 ч в присутствии (индуцированный апоптоз) или отсутствии (спонтанный апоптоз) дексаметазона, лейкладина (кладрибина), циклофосфана и флударабина. Процент апоптотических лимфоцитов (абсолютный апоптотический индекс) и относительный апоптотический индекс определяли до начала лечения больных и спустя месяц проведения патогенетической терапии. Установлено повышение интенсивности спонтанного и индуцированного апоптоза лимфоцитов больных СКВ в сравнении с донорами. Однако, вычисление относительного апоптотического индекса обнаружило пониженную чувствительность мононуклеарных клеток больных СКВ к влиянию лекарственных препаратов *in vitro*. Повторное изучение показателей апоптоза лимфоцитов больных СКВ в указанные выше сроки выявило тенденции к снижению уровней спонтанного и индуцированного апоптоза мононуклеарных клеток и к увеличению способности лимфоцитов отвечать на действие глюкокортикоидов и цитостатиков *in vitro*.

**Ключевые слова:** апоптоз, программированная клеточная гибель, лимфоциты, мононуклеарные клетки периферической крови, системная красная волчанка.

A. L. Rekun

Peripheral blood lymphocytes apoptosis indices in patients with first diagnosed systemic lupus erythematosus

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained from patients with first diagnosed systemic lupus erythematosus (SLE) and healthy controls (donors) were cultivated for 24 h in the presence (induced apoptosis) or absence (spontaneous apoptosis) of Dexamethasone, Leucladine (Cladribine), Cyclophosphamide and Fludarabine. Apoptotic lymphocytes percentage (absolute apoptotic index) and relative apoptotic index were evaluated before initiation of patients' treatment and after a month course of pathogenetic therapy. It was noted that SLE lymphocytes demonstrated more accelerated spontaneous and induced apoptosis intensities in comparison with those in donors. However, the levels of relative apoptotic index showed the lower sensibility of SLE mononuclear cells to the drugs *in vitro*. SLE lymphocytes apoptotic indices re-examination at a time referred above revealed the tendencies to decrease of PBMC spontaneous and induced apoptosis values and to increase of lymphocytes abilities for responding to treatment with glucocorticoid and cytostatic agents *in vitro*.

Key words: apoptosis, programmed cell death, lymphocytes, peripheral blood mononuclear cells, systemic lupus erythematosus

Системная красная волчанка (СКВ) – заболевание аутоиммунной природы, характеризующееся образованием аутореактивных иммунокомпетентных клеток и продукцией широкого спектра аутоантител, направленных на ряд внутриклеточных мишеней. Немаловажную роль в запуске аутоиммунного ответа играет процесс апоптоза (программированной клеточной гибели), в ходе которого внутриклеточные

макромолекулы перемещаются на поверхность мембраноассоциированных фрагментов (апоптотических телец) и играют роль аутоантигенов.

В научном мире продолжается дискуссия относительно характера нарушения апоптоза мононуклеарных клеток при СКВ. Согласно мнению одних авторов [3, 13], при СКВ наблюдается усиленная выработка активированными Т-лимфоцитами растворимой формы Fas-рецептора (sFas), накопление которого в микроокружении мононуклеаров препятствует реализации Fas-зависимого апоптоза (конкурентным образом подавляет взаимодействие Fas-рецептора с его лигандом FasL). У больных СКВ обнаружены также мутации гена Fas (CD95), вызывающие резистентность В-клеток зародышевых центров к Fas-индуцированному апоптозу и массивную клональную экспансию пула плазмобластов [8]. Высказывается гипотеза, что подавление апоптоза способствует персистенции клона аутореактивных лимфоцитов и прогрессированию аутоиммунного процесса.

В то же время, другими исследователями [2, 4, 7] показано, что лимфоциты крови больных СКВ обладают повышенной склонностью к апоптозу *in vitro*. Выявлена прямая линейная зависимость между концентрацией sFas в сыворотке и количеством апоптотических периферических Т-клеток, что доказывает проапоптогенный эффект sFas [11]. Возможно, программа апоптоза подразумевает высвобождение sFas с целью распространения сигнала смерти. Предполагается, что запрограммированная гибель мононуклеаров является одним из механизмов, приводящих к появлению ядерных антигенов во внеклеточной среде. Ускорение апоптоза лимфоцитов может сопровождаться возрастанием экскреции из клеток деградированной ДНК и гистонов [2, 4]. Таким образом, апоптотические клетки "поставляют" ранее скрытые аутоантигены, способствуя порочному кругу аутоагрессии.

Имеются сообщения о дисрегуляции и дисфункции механизмов клиренса продуктов запрограммированной гибели мононуклеаров у больных СКВ. Одни авторы указывают на нарушенный фагоцитоз апоптотических телец макрофагами [9], другие описывают дефект ряда дополнительных механизмов, включающих связывание клеточных фрагментов с белками-пентраксинами (С-реактивным белком, С1q-компонентом комплемента, сывороточным амилоидом Р и др.) с формированием антиген-белковых комплексов, которые затем захватываются и перерабатываются печенью и селезенкой [5, 6]. Блокирование одного или нескольких путей удаления апоптотического материала ведет к увеличению антигенной нагрузки, что поддерживает аутоиммунный процесс. Учитывая превалирующую роль аутоиммунных механизмов в развитии СКВ, основой лечения данного заболевания являются иммуносупрессивные препараты. Многие из них обладают свойством индуцировать апоптоз (глюкокортикостероиды [12], цитостатики [3], аминокинолиновые соединения [10]). Остается невыясненным влияние средств патогенетической терапии СКВ на клиренс апоптотического материала (элиминацию апоптотических телец). Полагаем, что изучение подверженности лимфоцитов действию индукторов апоптоза поможет раскрыть некоторые особенности течения этой аутоиммунной патологии и найти ключ к оптимизации терапии. Принимая во внимание необходимость практически пожизненного применения большинством больных СКВ препаратов-индукторов апоптоза, для выяснения особенностей нарушения запрограммированной гибели мононуклеарных клеток принципиально важным является включение в исследование пациентов с впервые в жизни установленным диагнозом до начала патогенетической терапии. Материалы по

исследованию интенсивности апоптоза лимфоцитов у больных СКВ, принимающих глюкокортикостероиды, опубликованы нами ранее [1].

Целью настоящей работы явилось исследование интенсивности спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови у впервые выявленных больных СКВ, не получающих лекарственной терапии, и изучение влияния на процессы программированной гибели клеток иммуносупрессивных препаратов (глюкокортикоидов и цитостатиков) *in vitro*.

#### Материал и методы исследований

В опытную группу были включены 17 больных СКВ, наблюдавшихся в Республиканском ревматологическом центре 9-й городской клинической больницы г. Минска. Диагноз СКВ данным пациентам был установлен впервые на основании критериев Американской ревматологической ассоциации (АРА, 1982). Забор крови для исследования производился до начала патогенетической терапии и через 1 месяц лечения. Все больные были женского пола в возрасте от 15 до 44 лет (средний возраст  $28,4 \pm 2,4$  лет). Степень активности СКВ была минимальной у 4-х, умеренной у 8-и и высокой у 5-и больных. У 4-х пациентов заболевание носило подострое течение и у 13-и ? хроническое. Частота встречаемости основных клинических синдромов и лабораторных показателей у наблюдаемых больных представлена в таблице 1. Как видно, преобладали “периферические” варианты заболевания с лихорадочным синдромом, трофическими нарушениями и преимущественным поражением кожи, слизистых, костно-мышечной и ретикулоэндотелиальной систем. Тяжелое поражение внутренних органов (миокардит, пневмонит, нефрит) встречалось довольно редко. Доминирующей среди гематологических нарушений являлась абсолютная лимфопения, а наиболее информативным иммунологическим тестом ? определение антинуклеарных антител. Всем больным были назначены глюкокортикоиды в дозах от 10 до 60 мг/сут в пересчете на преднизолон в зависимости от клинико-иммунологической активности заболевания, причем 8 пациентов получали до 20 мг/сут, такое же количество ? от 20 до 40 мг/сут и 1 человек ? более 40 мг/сут. Большинство больных (14) в дополнение к глюкокортикоидам принимали аминохинолиновые препараты (плаквенил), а одной пациентке с прогрессирующим люпус-нефритом и нефротическим синдромом были назначены цитостатические иммунодепрессанты (циклофосфан, а в последующем азатиоприн). Контрольная группа из 40 здоровых лиц (доноров) по возрастному и половому составу существенно не отличалась от опытной.

#### Таблица 1

Клинические проявления и лабораторные показатели у больных системной красной волчанкой

№	Клинические проявления и лабораторные показатели	Число случаев
1	Лихорадка в том числе: 37,0-37,5°C 37,5-38,0°C >38,0°C	14 8 5 1
2	Потеря массы тела в том числе: до 5 кг до 10 кг более 10 кг	9 6 1 2
3	Усиленное выпадение волос	4
4	Поражение кожи и слизистых оболочек в том числе: «бабочка» дискоидная волчанка капилляриты пальцев кистей фотосенсибилизация хейлит глоссит	13 4 2 2 2 2 1
5	Поражение суставов и мышц в том числе: полиартрит артралгии миалгии	15 10 4 1
6	Поражение серозных оболочек в том числе: плеврит перикардит плеврит и перикардит	4 1 1 2
7	Поражение сердца в том числе: миокардиодистрофия миокардит эндомиокардит	13 9 3 1
8	Поражение сосудов в том числе: синдром Рейно кожный васкулит	3 2 1
9	Поражение легких – пневмонит	1
10	Поражение почек – люпус-нефрит в том числе: с нефротическим синдромом и артериальной гипертензией	3 1
11	Поражение ретикулоэндотелиальной системы в том числе: лимфаденопатия гепатоспленомегалия	13 10 3
15	Изменения в гемограмме: лейкопения ( $< 4,0 \cdot 10^9/\text{л}$ ) лимфопения ( $< 1,5 \cdot 10^9/\text{л}$ ) анемия ( $\text{Hb} < 120 \text{ г/л}$ )	6 11 8
16	Иммунологические маркеры: выявление антиядерных антител повышение уровня антител к ДНК выявление LE-клеток	16 14 6

Лимфоциты выделяли из гепаринизированной крови больных и доноров с помощью градиентного центрифугирования, переносили в среду RPMI-1640, содержащую 10% эмбриональную телячью сыворотку, L-глутамин и антибиотики, и инкубировали в течение 24 ч в атмосфере 5% углекислого газа в воздухе при 37°C. В качестве индукторов апоптоза использовали дексаметазон, вводимый в культуральную среду до концентрации 5 мкМ, и цитостатики лейкладин (кладрибин), циклофосфан и флударабин в концентрациях 2 мкг/мл, 10 мкг/мл и 5 мкг/мл соответственно. После окончания культивирования клетки окрашивали акридиновым оранжевым и изучали под флуоресцентным микроскопом. Анализировали лимфоциты с конденсированным и фрагментированным хроматином и вычисляли процент апоптотических клеток (абсолютный апоптотический индекс). Для установления взаимосвязи спонтанного и индуцированного апоптоза лимфоцитов определяли относительный апоптотический индекс по формуле:

$$[(X_{\text{индуц.}} - X_{\text{спонт.}}) / X_{\text{спонт.}}] \cdot 100\%$$

где  $X_{\text{индуц.}}$  – процент апоптотических клеток (абсолютный апоптотический индекс) для индуцированного апоптоза, а  $X_{\text{спонт.}}$  – аналогичный показатель для спонтанного апоптоза. Достоверность различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

#### Результаты и их обсуждение

Результаты изучения спонтанного и индуцированного апоптоза в 24-часовой культуре лимфоцитов периферической крови впервые выявленных больных СКВ *in vitro* отражены на диаграмме (рис.1). Исследование спонтанного апоптоза до начала лечения выявило существенно более высокую его интенсивность ( $14,3 \pm 1,3\%$ ) по сравнению с донорами ( $6,0 \pm 0,4\%$ ,  $p < 0,001$ ). Учитывая, что данные пациенты не получали в момент исследования глюкокортикоиды, и влияние последних на лимфоциты больных *in vivo* было полностью исключено, подчеркивается взаимосвязь апоптотических процессов в мононуклеарных клетках и механизмов развития СКВ. В частности, повышенный уровень спонтанного апоптоза лимфоцитов при СКВ может свидетельствовать об участии этого феномена в образовании ядерных аутоантигенов (продуктов упорядоченной деградации хроматина) и активации аутоиммунного процесса.

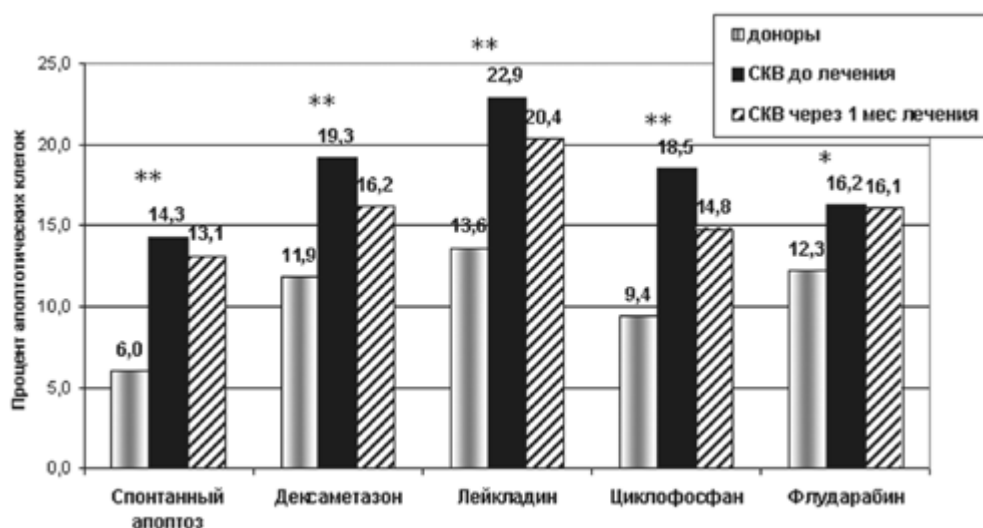


Рис. 1. Интенсивность спонтанного и индуцированного апоптоза лимфоцитов периферической крови доноров и больных системной красной волчанкой

\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$  – достоверность различий между больными (до лечения) и донорами

Индукция апоптоза введением в 24-часовую культуру лимфоцитов дексаметазона (5мкМ) вызывала рост количества апоптотических клеток в контрольной группе от  $6,0 \pm 0,4\%$  (при спонтанном апоптозе) до  $11,9 \pm 0,6\%$  ( $p < 0,001$ ), а в опытной (больные СКВ) – от  $14,3 \pm 1,3\%$  до  $19,3 \pm 2,0\%$  ( $p < 0,05$ ). Воздействие лейкладина (2мкг/мл), циклофосфана (10мкг/мл) и флударабина (5мкг/мл) приводило к увеличению числа апоптотических мононуклеаров до  $13,6 \pm 0,7\%$ ,  $9,4 \pm 0,5\%$  и  $12,3 \pm 0,8\%$  ( $p < 0,001$ ) в культуре донорских лимфоцитов и до  $22,9 \pm 2,3\%$  ( $p < 0,01$ ),  $18,5 \pm 2,1\%$  ( $p = 0,083$ ) и  $16,2 \pm 1,7\%$  ( $p = 0,397$ ) в культуре клеток больных СКВ соответственно. Таким образом, как глюкокортикостероиды, так и цитостатики способны индуцировать программированную гибель мононуклеарных клеток *in vitro*.

Интенсивность индуцированного апоптоза лимфоцитов *in vitro* была значительно выше у больных СКВ по сравнению с донорами (достоверность различий между группами  $p < 0,001$  для дексаметазона, лейкладина и циклофосфана,  $p < 0,05$  для флударабина). Однако, степень ее нарастания под влиянием индукторов оказалась меньшей, чем у здоровых лиц. Для более наглядного представления данного феномена был вычислен относительный апоптотический индекс (рис. 2). Воздействие дексаметазона на 24-часовую культуру лимфоцитов вызывало рост числа апоптотических клеток на  $110,3 \pm 19,9\%$  (относительный апоптотический индекс) у здоровых лиц и на  $40,6 \pm 7,8\%$  у больных СКВ ( $p < 0,05$ ). Относительный апоптотический индекс соответственно для донорских и волчаночных лимфоцитов составил при использовании лейкладина  $115,0 \pm 14,8\%$  и  $68,7 \pm 9,9\%$  ( $p < 0,05$ ), циклофосфана –  $39,3 \pm 5,4\%$  и  $39,7 \pm 6,0\%$  ( $p = 0,970$ ), флударабина –  $80,5 \pm 12,6\%$  и  $49,8 \pm 6,8\%$  ( $p = 0,138$ ). Этот факт может говорить о меньшей чувствительности иммунокомпетентных клеток больных СКВ к действию глюкокортикоидов и цитостатиков (лейкладина и флударабина) *in vitro*. Влияние циклофосфана на лимфоциты доноров и больных было практически равноценным, что может быть обусловлено неодинаковыми условиями работы препарата *in vitro* и *in vivo*. Циклофосфан является пролекарством, то есть превращается в активную форму при ферментативном расщеплении в печени либо в тканях-мишенях. Дизайн нашего исследования предопределяет низкий индуцирующий эффект данного препарата в сравнении с другими цитостатиками и глюкокортикоидами.

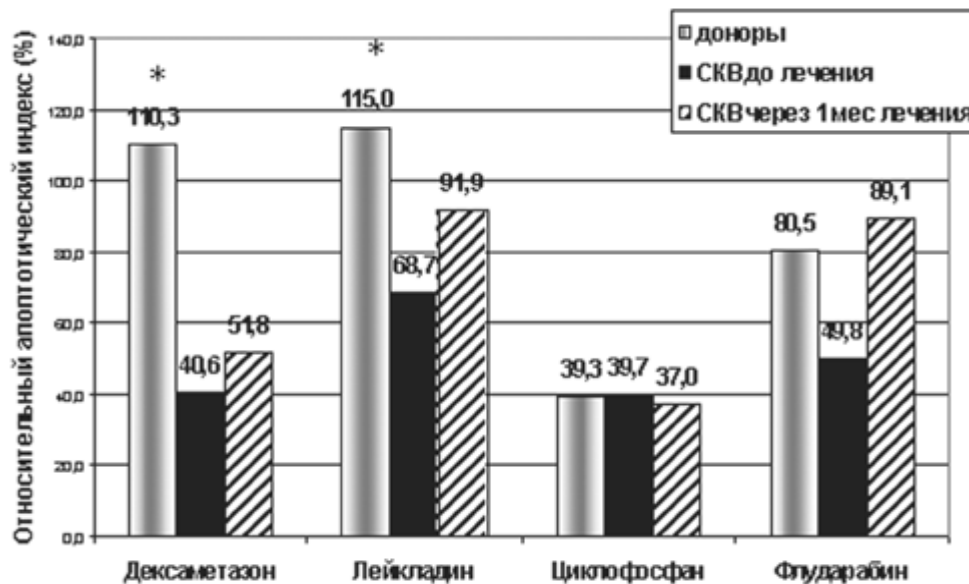


Рис. 2. Относительный апоптотический индекс лимфоцитов периферической крови доноров и больных системной красной волчанкой

\* $p < 0,05$  – достоверность различий между больными (до лечения) и донорами

Изучение интенсивности спонтанного и индуцированного апоптоза лимфоцитов больных СКВ через 1 месяц после начала патогенетической терапии выявило тенденцию к снижению данных показателей. Так, уровень спонтанного апоптоза уменьшился от  $14,3 \pm 1,3\%$  (при установлении диагноза) до  $13,1 \pm 1,9\%$  (через месяц лечения,  $p = 0,630$ ). Интенсивность апоптоза, индуцированного дексаметазоном, снизилась от  $19,3 \pm 2,0\%$  до  $16,2 \pm 1,4\%$  ( $p = 0,216$ ), лейкладином – от  $22,9 \pm 2,3\%$  до  $20,4 \pm 2,2\%$  ( $p = 0,428$ ), циклофосфаном – от  $18,5 \pm 2,1\%$  до  $14,8 \pm 1,6\%$  ( $p = 0,168$ ). Флударабин-индуцированный апоптоз практически не изменился ( $16,2 \pm 1,7\%$  и  $16,1 \pm 1,5\%$ , соответственно до и после лечения,  $p = 0,936$ ). Возможно, отсутствие достоверных различий между значениями изучаемых показателей в динамике связано с относительно малым сроком наблюдения больных и, соответственно, действия назначенных препаратов. Обнаруженная тенденция может свидетельствовать об уменьшении в ходе лечения массы циркулирующих аутоантигенов и напряженности аутоиммунных процессов в целом. Нельзя не заметить парадокс: назначение больным лекарственных средств, являющихся классическими индукторами апоптоза, приводит в итоге к снижению процента апоптотических клеток, а не к ожидаемому его увеличению. Не исключено, что глюкокортикоиды, цитостатики и аминоксинолиновые соединения положительно влияют на клиренс апоптотического материала. В этом случае количество циркулирующих продуктов программированной клеточной гибели будет зависеть от баланса между апоптоз-стимулирующим и клиренс-стимулирующим действием средств патогенетической терапии. С другой стороны, подавление данными препаратами интимных механизмов развития СКВ может снижать индуцирующее влияние последних на апоптоз иммунокомпетентных клеток.

Динамика относительного апоптотического индекса, напротив, отличалась тенденцией к увеличению. Если до начала патогенетической терапии дексаметазон вызывал рост числа апоптотических клеток *in vitro* на  $40,6 \pm 7,8\%$ , то через месяц лечения – на  $51,8 \pm 8,0\%$  ( $p = 0,330$ ). Величина относительного апоптотического индекса для лейкладина возросла от  $68,7 \pm 9,9\%$  до  $91,9 \pm 16,7\%$  ( $p = 0,236$ ), а для флударабина – от  $49,8 \pm 6,8\%$  до  $89,1 \pm 28,0\%$  ( $p = 0,217$ ). Обращает на себя внимание относительно низкое и практически неизменное значение данного индекса для циклофосфана

( $39,7 \pm 6,0\%$  и  $37,0 \pm 10,6\%$ , соответственно до и после лечения,  $p=0,828$ ). Об особенностях данного препарата было сказано выше. Таким образом, в процессе лечения больных СКВ отмечается тенденция к повышению чувствительности мононуклеарных клеток, выделенных из периферической крови пациентов, к апоптоз-индуцирующему действию лекарственных препаратов *in vitro*.

Полученные данные обуславливают целесообразность использования показателей спонтанного и индуцированного апоптоза лимфоцитов для оценки эффективности терапии системной красной волчанки. Большое значение имеет направленность изменений данных показателей при исследовании в динамике. Снижение уровня спонтанного апоптоза мононуклеарных клеток может свидетельствовать о благоприятном течении заболевания. Увеличение относительного апоптотического индекса может служить маркером положительного ответа на патогенетическую терапию.

#### Выводы

1. Интенсивность спонтанного и индуцированного апоптоза лимфоцитов периферической крови впервые выявленных больных системной красной волчанкой *in vitro* достоверно выше, чем у здоровых лиц.

2. В процессе проведения патогенетической терапии наблюдается тенденция к снижению уровня как спонтанного, так и индуцированного апоптоза мононуклеарных клеток больных *in vitro*.

3. Подверженность иммунокомпетентных клеток больных системной красной волчанкой действию индуцирующих апоптоз лекарственных препаратов *in vitro* достоверно ниже, чем в контрольной группе.

4. Адекватное лечение больных системной красной волчанкой приводит к повышению чувствительности лимфоцитов к индукции апоптоза глюкокортикоидами и цитостатиками *in vitro*.

#### Литература

1. Свирновский А.И., Сорока Н.Ф., Каля Е.С. и др. Апоптоз лимфоцитов периферической крови у больных системной красной волчанкой // Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии. Сборник научных трудов к 70-летию НИИ гематологии и переливания крови. – Мн., 2003.– С. 228-232

2. Тронов В.А., Никольская Т.А., Конопляников М.А. и др. Спонтанная гибель мононуклеарных клеток, полученных от здоровых доноров и больных системной красной волчанкой // Цитология.- 1999.- т.41.- №5.- С. 400-404.

3. Ярилин А.А., Никонова М.Ф., Ярилина А.А. и др. Апоптоз, роль в патологии и значимость его оценки при клинико-иммунологическом обследовании больных // Медицинская иммунология.- 2000.- т.2.- №1.- С. 7-16.

4. A E M van Nieuwenhuijze, T van Lopic, R J T Smeenk et al. Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythemftosus // Annals of the Rheumatic Diseases.- 2003.- Vol. 62.- №1.- P.10-14.

5. Angelo A. Manfredi, Patrizia Rovere, Glacomo Galati et al. Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus // Arthritis & Rheum.- 1998.- Vol. 41.- №2.- P.205-214.

6. Bijl M, Horst G, Bijzet J et al. Serum amyloid P component binds to late apoptotic cells and mediates their uptake by monocyte-derived macrophages // Arthritis & Rheum.- 2003.- Vol. 48.- №1.-P.248-254.



7. Elmen W., Niebur J., Koder R. Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus // J. Immunol.-1995.-Vol.152.-P.3685-3692.
8. Kurth J, Perniok A, Schmitz R et al. Lack of deleterious somatic mutations in the CD95 gene of plasmablasts from systemic lupus erythematosus patients and autoantibody-producing cell lines // Eur J Immunol.- 2002.- Vol. 32.- №12.-P. 3785-3792.
9. Martin Herrmann, Reinhard E. Voll, Otmar M. Zoller et al. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus // Arthritis & Rheum.- 1998.- Vol. 41.- №7.- P. 1241-1250.
10. Meng X.W., Feller J.M., Ziegler J.B. et al. Induction of apoptosis in peripheral blood lymphocytes following treatment in vitro with hydroxychloroquine // Arthritis & Rheum.- 1997.-Vol.40.-№5.-P.927-935.
11. Silvestris F, Grinello D, Tucci M et al. Enhancement of T cell apoptosis correlates with increased serum levels of soluble Fas (CD95/Apo-1) in active lupus// Lupus.- 2003.- Vol. 12.- №1.- P.8-14.
12. Seki M., Ushivama C., Seta N. et al. Apoptosis of lymphocytes induced by glucocorticoids and relationship to therapeutic efficacy in patients with systemic lupus erythematosus // Arthritis & Rheum.- 1998.- Vol. 41.- №5.- P. 823-830.
13. Suzuki N., Ichino M., Mihara S. et al. Inhibition of Fas/FasL ligand-mediated apoptotic cell death of lymphocytes in vitro by circulating anti-Fas ligand autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus // Arthritis & Rheum.- 1998.- Vol. 41.- №2.- P. 344-353.