

# МОДУЛЯЦИЯ ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ЦИРКУЛИРУЮЩИМИ ФАГОЦИТАМИ И КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

*Н.В.Романова, Н.П.Шилкина, А.Г.Бородин, В.Л.Крылов  
Государственная медицинская академия, Ярославль*

## *Резюме*

**Цель.** Исследовать клиническую эффективность глюкокортикоидов (ГК) и их влияние на продукцию активных форм кислорода циркулирующими фагоцитами (нейтрофилами и моноцитами) у больных системной красной волчанкой (СКВ), получавших традиционное лечение малыми и средними дозами ГК, а также пульс-терапию мегадозами ГК.

**Материал и методы.** Обследовано две рандомизированные группы больных (по 15 пациентов в каждой) с достоверным диагнозом СКВ, получавших лечение метилпреднизолоном в дозе 20-40 мг/сут в течение 3 нед. (1 группа) и метилпреднизолоном в мегадозах - 10 мг/кг внутривенно капельно в течение 3 дней с последующим снижением препарата до поддерживающих доз (2 группа). Определяли люминолзависимую и люцигенинзависимую хемилюминесценцию лейкоцитов в составе цельной крови, отдельно с нейтрофилами и моноцитами, а также фагоцитарные показатели и уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК).

**Результаты.** У больных СКВ установлено увеличение спонтанной продукции активных форм кислорода и уровня ЦИК на фоне снижения индуцированной хемилюминесценции, коэффициентов стимуляции фагоцитов и показателей фагоцитоза. Лечение пациентов средними дозами ГК привело к снижению синтеза активных форм кислорода нейтрофилами и моноцитами, а также к увеличению коэффициентов стимуляции клеток на фоне улучшения их перерабатывающей способности и уменьшения уровня ЦИК. Применение мегадоз ГК при СКВ клинически более эффективно, при этом существенно нарастают продукция активных форм кислорода циркулирующими фагоцитами, коэффициенты стимуляции клеток и фагоцитарные показатели на фоне снижения уровня ЦИК.

**Ключевые слова:** *активные формы кислорода, глюкокортикоидная терапия, системная красная волчанка*

## **Введение**

Значение активных форм кислорода (АФК) в патогенезе ряда заболеваний, в том числе ревматических, активно обсуждается в литературе [9,10,12]. Исследованиями ряда авторов [6,13,15,16,17] установлен факт гиперпродукции нейтрофилами АФК у больных системной красной волчанкой (СКВ), однако многие стороны функционирования нейтрофилов и моноцитов с учетом их разной роли в развитии острых и хронических воспалительных реакций [4] при этом заболевании остаются неясными. Положительный эффект применения глюкокортикоидов (ГК), в том числе их мегадоз [1,8], при СКВ отдельные авторы связывают с ингибированием функций ключевых воспалительных клеток - нейтрофилов и моноцитов [4]. Однако по вопросу о влиянии различных доз ГК на продукцию АФК циркулирующими фагоцитами данные литературы немногочисленны и противоречивы [3,14,16].

Нами исследованы клиническая эффективность ГК-терапии и продукция АФК в популяциях нейтрофилов и моноцитов, а также фагоцитов в составе цельной крови у больных СКВ, получавших традиционное лечение средними дозами ГК или пульс-терапию мегадозами ГК.

## **Материал и методы**

Обследовано 30 больных СКВ, разделенных на 2 равные группы. Терапию с использованием различных доз ГК (1 группа - метилпреднизолон per os в дозе 20-40 мг/сут. в течение 3 нед., 2 группа - мегадозы - 10 мг/кг в/в капельно в течение 3 дней с последующим снижением доз до поддерживающих). Параллельно пациентам назначали дезагрегирующие, вазодилатирующие, нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), аминохинолиновые производные. Обе группы формировали с учетом пола, возраста, клинических и лабораторных показателей пациентов. У большинства обследованных пациентов диагностирована умеренная активность и подострое течение воспалительного аутоиммунного процесса.

Обследование больных обеих групп производилось при поступлении в клинику до начала терапии, а также на 21 день лечения. Наряду с клиническим обследованием применялись общепринятые лабораторные и инструментальные методы, включавшие реовазографию конечностей и ультразвуковое сканирование сосудов. Контрольную группу составили 30 практически здоровых доноров.

Продукцию АФК оценивали по данным люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ), позволяющей идентифицировать образование АФК, а также люцигенинзависимой ХЛ - аналога НСТ-теста [4], отражающей продукцию супероксиданиона [2,4]. Исследования выполнены с использованием изолированных популяций нейтрофилов и моно-

цитов, а также с помощью скрининговой методики в составе цельной крови [2,5]. Нейтрофилы и моноциты выделяли из гепаринизированной крови в двойном градиенте плотности фиколл-верографина 1,077 и 1,092 г/мл [18]. Разделение моноцитов и лимфоцитов осуществляли методом изокинетического центрифугирования в течение 5 мин. при 400 g в градиенте перколла плотностью 1,060 [11]. Взвесь клеток доводили до концентрации  $5 \times 10^6$ /мл, жизнеспособность клеток в тесте с трипановым синим составляла 98-99%.

Исследовались спонтанная и индуцированная ХЛ фагоцитов. Индуцированную ХЛ вызывали взвесью убитых клеток *Staph. epidermidis* - высокоэффективным лецитинопосредованным стимулятором [5], учет реакции проводили через 30 мин (пик индуцированной хемилюминесценции, установленный в предварительных пробах) стимуляции фагоцитов эпидермальным стафилококком на жидкостно-сцинтиляционном счетчике "Бета-1" (КПО "Медаппаратура", Киев). Результаты спонтанной и индуцированной ХЛ выражали количеством импульсов в 1 мин (имп/мин) с подсчетом коэффициента стимуляции (КС) фагоцитов (отношение индуцированной ХЛ к спонтанной). Исследовались также фагоцитарные показатели (фагоцитарный индекс и фаго-

цитарное число) и уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) осаждением сывороточных белков в полиэтиленгликоле по общепринятым методикам. Результаты исследований обработаны на компьютере с помощью программы Statistica (версия 5.5) с вычислением среднего значения (M), стандартного отклонения (Sd) и оценкой значимости различий в группах с помощью параметрического t-критерия Стьюдента и непараметрического - Манна-Уитни; для выявления связей между признаками применяли метод корреляционного анализа Спирмена [7].

**Результаты**

Выполненные исследования показали (табл.), что до проведения терапии ГК показатели спонтанной люминол- и люцигенинзависимой ХЛ изолированных нейтрофилов, моноцитов и фагоцитов в составе цельной крови у больных СКВ были достоверно выше по сравнению с группой контроля, свидетельствуя об активации как НАДФ.Н- и НАД.Н-оксидазы, так и системы миелопероксидазы с выработкой широкого спектра АФК. В то же время индуцированная ХЛ, коэффициенты стимуляции нейтрофилов и моноцитов (отражающие резервные функции фагоцитов), а также показатели фагоцитоза у больных были ниже, чем у

Таблица

**ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ХЛ КЛЕТОК КРОВИ БОЛЬНЫХ СКВ**

Показатель	Контроль (n = 22)	Базисная терапия ГК (n = 15) M±Sd		Пульс-терапия ГК (n = 15) M±Sd	
		до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Фагоцитарный индекс	77,8±2,3	43,4±1,2*	41,4±3,6*	46,9±1,4*	52,9±1,2* **
Фагоцитарное число	5,7±0,3	4,1±0,1*	3,5±0,3* **	4,3±0,1*	4,8±0,3* **
ЦИК, ед. опг. пл.	33,7±1,8	64,8±3,7*	35,2±2,0 **	65,3±2,2*	34,6±3,5 **
ХЛн Лм С 10 <sup>4</sup> , имп/мин	1,0±0,4	4,1±0,7*	2,1±0,4* **	4,2±0,8*	5,5±0,4* **
ХЛн. Лм И 10 <sup>4</sup> , имп/мин	8,4±1,1	5,9±1,5*	5,1±1,1* **	5,1±1,5*	5,6±0,8*
КС ХЛн. Лм	8,4±0,8	1,4±0,2*	2,4±0,4 **	1,2±0,3*	1,0±0,3*
ХЛм Лм С 10 <sup>4</sup> , имп/мин	1,0±0,3	3,8±1,3*	1,4±1,4* **	3,6±0,3*	5,3±0,8* **
ХЛм Лм И 10 <sup>4</sup> , имп/мин	6,2±1,7	1,1±2,3*	1,1±0,3* **	1,1±0,3*	2,3±0,5* **
КС ХЛм Лм	6,2±1,0	0,3±0,2*	0,8±0,3* **	0,3±0,2*	0,4±0,6*
ХЛн Лг С 10 <sup>4</sup> , имп/мин	2,2±0,93	3,6±0,2*	2,4±0,5 **	3,4±0,4*	5,8±1,2* **
ХЛн. Лг И 10 <sup>4</sup> , имп/мин	10,5±1,9	2,6±0,6*	1,9±0,6* **	2,4±0,8*	4,5±1,3* **
КС ХЛн. Лг	4,8±1,4	0,7±0,2*	0,8±0,2*	0,7±0,4*	0,8±0,2* **
ХЛм Лг С 10 <sup>4</sup> , имп/мин	1,2±0,8	2,1±0,6*	1,5±0,4* **	2,1±0,7*	4,9±0,4* **
ХЛм Лг И 10 <sup>4</sup> , имп/мин	7,2±1,9	2,5±0,5*	2,5±2,4* **	2,6±0,8*	5,6±3,3* **
КС ХЛм Лг	6,0±1,4	1,2±0,4*	1,7±0,3*	1,2±0,7*	1,1±0,4*
ХЛф Лм С 10 <sup>4</sup> , имп/мин	1,1±0,16	6,1± 0,9*	5,2± 1,0* **	6,0± 0,8*	7,0± 0,8* **
ХЛф. Лм И 10 <sup>4</sup> , имп/мин	2,4±0,4	1,1±0,1*	1,2± 0,8*	1,3±0,2*	6,2±1,5* **
КС ХЛф. Лм	2,2±0,1	0,2±0,2*	0,2±0,2*	0,2±0,2*	0,9±0,3 **
ХЛф Лг С 10 <sup>4</sup> , имп/мин	1,2±0,7	3,2±0,4*	1,1±0,2 **	2,4±0,5*	4,2±0,6* **
ХЛф. Лг И 10 <sup>4</sup> , имп/мин	1,9±1,2	1,2±0,7*	1,1±1,3* **	1,3±0,3*	3,3±1,4* **
КС ХЛф. Лг	1,58±0,9	0,4±0,3*	1,0±0,2* **	0,5±0,4*	0,8±0,4* **

Обозначения: ХЛ - хемилюминесценция, н - нейтрофилы, м - моноциты, ф - фагоциты в составе цельной крови, Лм - люминол, Лг - люцигенин, С - спонтанная реакция, И - индуцированная, КС - коэффициент стимуляции. \* - различия достоверны (p<0,05) по сравнению с показателями контроля, \*\* - различия достоверны (p<0,05) между показателями группы до и после лечения.

здоровых лиц. Продукция супероксиданиона по данным спонтанной люцигенинзависимой ХЛ была выше у нейтрофилов по сравнению с моноцитами. Показатели спонтанной и люцигенинзависимой ХЛ фагоцитов в составе цельной крови были достоверно более высокими ( $p < 0,05$ ), чем люминолзависимой ХЛ нейтрофилов и моноцитов, а также люцигенинзависимой ХЛ моноцитов. Уровень и частота обнаружения (76%) ЦИК при СКВ были достоверно повышены по сравнению с группой контроля. Установлены прямые корреляционные связи ( $r = 0,5-0,7$ ) между уровнями ЦИК и спонтанной ХЛ с нейтрофилами, моноцитами и фагоцитами в составе цельной крови.

При обследовании после лечения у пациентов I группы, получавших средние дозы ГК *per os*, отмечено снижение синтеза АФК нейтрофилами и моноцитами как в спонтанном, так и в индуцированном тестах ХЛ, а также увеличение коэффициентов стимуляции моноцитов и нейтрофилов на фоне улучшения переваривающей способности фагоцитов и уменьшения уровня ЦИК. Мегадозы в/в ГК вызывали существенное нарастание значений спонтанной и индуцированной ХЛ циркулирующих фагоцитов, коэффициентов их стимуляции, фагоцитарных показателей на фоне снижения уровня ЦИК.

Анализ динамики клинической картины показал, что наиболее эффективной оказалась терапия мегадозами ГК. Позитивных изменений в клинической картине не определено лишь у I пациента этой группы, в то время как отсутствие положительной динамики регистрировалось у 4 больных I-ой группы. Уменьшение лабораторных показателей активности воспалительного процесса также было более выражено у пациентов, получавших мегадозы ГК.

Эритематозные высыпания на коже и поражение слизистых подверглись регрессии у 50% больных 2-ой группы, тогда как в группе I подобный эффект отмечен в I случае из 5. Воздействие разных доз ГК на редукцию язв, экхимозов и трофических расстройств (сухость и шелушение кожи, изменение волос и ногтей) достоверно не отличалось в обследованных группах.

Проявления сосудистого синдрома (капилляриты, сосудистая "бабочка") оказались более чувствительными к пульс-терапии ГК. Резистентностью к проводимой терапии характеризовался вазоспастический синдром; ишемические проявления в равной степени корригировались у пациентов обеих групп.

Более высокая эффективность пульс-терапии ГК проде-

монстрирована при нефротическом синдроме, суставных и неврологических проявлениях СКВ.

### Обсуждение

Выполненные исследования свидетельствуют о существенном увеличении при СКВ продукции АФК циркулирующими фагоцитами (как в составе цельной крови, так и изолированными клетками) на фоне снижения фагоцитарных показателей, резервных функций фагоцитов и повышения уровня ЦИК, что согласуется с данными других авторов [6,13,15,17]. Продукция супероксиданиона была выше у нейтрофилов по сравнению с моноцитами, соответствуя данным литературы о более высокой реактивности нейтрофилов и отражая их важную роль в развёртывании воспалительного процесса при СКВ [4]. Показатели спонтанной ХЛ фагоцитов в составе цельной крови в большинстве тестов были выше по сравнению с аналогичными показателями изолированных нейтрофилов и моноцитов, что, вероятно, объясняется стимулирующими эффектами ряда сывороточных факторов (ЦИК, цитокины, аутоантитела и др.) при постановке реакции с цельной кровью, а также частичной утратой функциональных свойств клетками в процессе их выделения. Эти данные указывают на перспективность применения ХЛ цельной крови как менее трудоёмкого экспресс-метода оценки продукции АФК при СКВ.

Позитивные клинические эффекты лечения больных СКВ малыми и средними дозами ГКС сопровождались уменьшением спонтанной продукции АФК и снижением уровня ЦИК, в то время как фагоцитарные показатели увеличивались. Мегадозы в/в ГК, характеризуясь более выраженными эффектами купирования ряда органных и тканевых поражений, напротив, повышали спонтанную генерацию АФК на фоне нормализации уровня ЦИК и увеличения фагоцитарных показателей. Это позволяет рассматривать увеличение продукции АФК фагоцитами в данной ситуации как позитивный патогенетический фактор.

### Заключение

Проведенные исследования свидетельствуют об усилении продукции АФК циркулирующими фагоцитами больных СКВ, а также о дозозависимости модулирующего действия ГК на функции циркулирующих фагоцитов и более высокой эффективности пульс-терапии мегадозами ГК в лечении СКВ, по сравнению со средними дозами пероральных ГК.

### ЛИТЕРАТУРА

- Захарова Е.В. Системная красная волчанка в нефрологии - волчаночный гломерулонефрит и другие ее проявления. *Леч.врач*, 2003, 8, 63-69
- Земсков В.М., Барсуков А.А., Безносенко С.А. Изучение функционального состояния фагоцитов человека. В кн.: Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. М., ВНИРО, 1995, 154-162
- Матвейков Г.П., Титова И.П., Каля Е.С. Роль иммуномодулирующих средств в комплексном лечении системной красной волчанки. *Сов.-Болгар. симп. по ревматол. Тез.докл. Стара-Загора*, 1987, 16
- Маянский А.Н., Пикуза О.И. Клинические аспекты фагоцитоза. Казань, Магариф, 1993
- Невмятуллин А.П., Зеленова Е.Г., Маянский А.Н. Сравнительная оценка метаболизма нейтрофилов по реакциям хемилюминесценции и восстановления нитросинего тетразолия. *Лаб. дело*, 1985, 6, 347-349
- Полтырев А.С., Аршинов А.В., Крылов В.Л. и др. Свободные радикалы кислорода и их влияние на медиаторы воспаления у больных системной красной волчанкой. *Ревматол.*, 1991, 1, 15-18
- Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. М., Медиафера, 2002
- Ревматические болезни (Под ред. В.А. Насоновой, Н.В. Бунчука). М., Медицина, 1997
- Ahsan H., Ali A., Ali R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003, 131(3), 398-404
- Halliwell B., Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, 1999
- Hardin J.A., Downs J.T. Isolation of human monocytes on reorienting gradients of percoll. *J. Immunol. Method.*, 1981, 40, 1-6
- Kumagai S., Jikimoto T., Saegusa J. Pathological roles of oxidative stress in autoimmune diseases. *Rinsho Byori*, 2003, 51(2), 126-132
- Kurien B.T., Scofield R.H. Free radical mediated peroxidative damage in systemic lupus erythematosus. *Life Sci.*, 2003, 15, 73 (13), 1655-1666
- Miesel R., Zuber M. The collapse of antioxidant defenses in inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Abstracts der 26. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft fuer Rheumatologie. Suppl. 1 zur Zeitschrift fuer Rheumatol.*, 1994, 53, 42
- Nuttall S.L., Heaton S., Piper M.K. et al. Cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus--evidence of increased oxidative stress and dyslipidaemia. *Rheumatol. (Oxford)*, 2003, 42 (6), 758-762

16. Tanaseanu S., Serban M.G., Nita V. Lipid peroxidation and the activity of some antioxidant enzymes in patients with systemic vasculitidis treated with corticoids. Rom. J. Intern. Med., 1994, 32, 1, 47-50
17. Waszczykowska E., Robak E., Wozniacka A. et al. Estimation of SLE activity based on the serum level of cholesterol cytokines and superoxide radical generation. Mediat. Inflamm., 1999, 8 (2), 93-100
18. Wong M., Wilson R.D. The identification of Fc and C3 receptors on human neutrophils. J. Immunol. Method., 1975, 7, 69-76

Поступила 18.08.04

#### Abstract

*N.V. Romanova, N.P. Shilkina, A.G. Borodin, V.L. Krylov*

#### **Modulation of active oxygen forms production by circulating phagocytes and clinical efficacy of glucocorticoid treatment in patients with systemic lupus erythematosus**

**Objective.** To study glucocorticoids (GC) clinical efficacy and their influence on active oxygen forms production by circulating phagocytes (neutrophils and monocytes) in pts with systemic lupus erythematosus (SLE) receiving traditional treatment with low and intermediate doses of GC so as with pulse-therapy with mega doses of GC.

**Material and methods.** SLE pts were randomly allocated in two groups (15 pts in each). Group 1 was treated with methylprednisolone (MP) 20-40 mg/day during 3 weeks and Group 2 pts received MP mega doses 10 mg/kg as intravenous drip-feed during 3 days with subsequent decrease to maintaining doses. Luminol-dependent and lucigenin-dependent whole blood leucocytes chemiluminescence separately with neutrophils and monocytes so as phagocytic indices and circulating immune complexes (CIC) level were evaluated

**Results.** SLE pts showed increase of active oxygen forms spontaneous production and CIC level so as decrease of induced chemiluminescence, phagocytes stimulation coefficient and phagocytosis indices. Treatment with intermediate GC doses provided decrease of active oxygen forms synthesis by neutrophils and monocytes so as to cell stimulation coefficients increase along with improvement of their digesting capability and decrease of CIC level

**Key words:** *oxygen active forms, glucocorticoid therapy, systemic lupus erythematosus*