

ВЛИЯНИЕ БАЗИСНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОЦИТОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

**Емельянова В.А.¹, Демидов А.А.¹, Огнева Е.А.², Браташ В.И.¹, Матющенко С.В.²,
Расевич Т.Г.², Агапова Н.П.²**

¹ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет», Астрахань, e-mail: sapienti_sa@mail.ru;

²Александро-Мариинская областная клиническая больница, Астрахань, e-mail: ognevaelena@rambler.ru

Цель: оценить метаболический статус нейтрофилов и моноцитов периферической крови у пациентов с ревматоидным артритом, находящихся на терапии базисными противовоспалительными препаратами (БПВП) в составе комплексной терапии. У пациентов с ревматоидным артритом (РА) проводилось цитохимическое исследование активности ферментов нейтрофилов и моноцитов: сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) в динамике до и после стационарного лечения. Все пациенты к моменту исследования получали базисные противовоспалительные препараты. Средний цитохимический показатель (СЦП) по всем трём ферментам как в нейтрофилах, так и в моноцитах превышал норму в 2 и более раз на момент поступления в стационар. СЦП активности всех трёх ферментов в нейтрофилах был представлен клетками средней степени активности, а в моноцитах - низкой степени активности. По выписке из стационара не отмечалось нормализации СЦП как в нейтрофилах, так и в моноцитах, но заметна тенденция к снижению. Результаты указывают на значимую роль оценки цитохимической активности нейтрофилов и моноцитов у пациентов с РА, как важного диагностического маркера активности воспаления и эффективности проводимой терапии.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, нейтрофилы, моноциты, цитохимия.

THE EFFECT OF BASIC ANTI-INFLAMMATORY DRUGS IN THE COMPLEX THERAPY ON THE ENZYMATIC ACTIVITY OF NEUTROPHILS AND MONOCYTES BLOOD IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

**Emelyanova V.A.¹, Demidov A.A.¹, Ogneva E.A.², Bratash V.I.¹, Matyushenko S.V.²,
Rasevich T.G.², Agapova N.P.²**

¹Astrakhan State Medical University, Astrakhan, e-mail: sapienti_sa@mail.ru;

²The Alexandro-Mariinsky Regional Clinical Hospital, Astrakhan, e-mail: ognevaelena@rambler.ru

Goal: To assess the metabolic status of neutrophils and monocytes peripheral blood in patients with rheumatoid arthritis who are on therapy with basic anti-inflammatory drugs (CPAP) as part of complex therapy. In patients with rheumatoid arthritis (RA), the activity of neutrophil and monocyte enzymes: succinate dehydrogenase (SDG), lactate dehydrogenase (LDH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-FDH) in the dynamics before and after inpatient treatment was performed. All patients received baseline anti-inflammatory drugs at the time of the study. The average cytochemical index (SCP) for all three enzymes in both neutrophils and monocytes exceeded the norm 2 or more times at the time of admission to the hospital. The SPC activity of all three enzymes in neutrophils was represented by cells of moderate activity, and in monocytes with a low degree of activity. After discharge from the hospital, there was no normalization of the SCP both in neutrophils and in monocytes, but a tendency to decrease was noticeable. The results indicate a significant role in the evaluation of the cytochemical activity of neutrophils and monocytes in patients with RA as an important diagnostic marker of inflammatory activity and the effectiveness of the therapy.

Keywords: rheumatoid arthritis, neutrophils, monocytes, cytochemistry.

Ревматоидный артрит (РА) — аутоиммунное заболевание, проявляющееся эрозивно-деструктивным полиартритом и системным поражением внутренних органов [1].

Ревматоидный артрит считается тяжёлым, инвалидизирующим заболеванием, частота

встречаемости которого в популяции составляет около 1%. По последним эпидемиологическим исследованиям, частота данного заболевания среди населения России составляет 0,6% [2].

Мишенью РА является, прежде всего, синовиальная оболочка сустава, которая гиперплазируется, васкуляризируется, образуя специфичный «паннус». Последний внедряется в хрящевую ткань и приводит к формированию эрозий с обязательным поражением подлежащей костной ткани [3].

В состав синовиальной оболочки, помимо синовиоцитов, входят лимфоциты, моноциты, тучные и плазматические клетки. Моноциты, синтезируя интерлейкин 1,6 (ИЛ-1, ИЛ-6), фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α) и другие цитокины, относящиеся к провоспалительным, индуцируют и поддерживают воспаление.

Иммунные комплексы, продуцируемые в синовиальной оболочке, активируют компоненты комплемента, это в свою очередь приводит к выработке факторов хемотаксиса, которые адгезируют лейкоциты к эндотелию венул. Таким же эффектом обладают вышеперечисленные провоспалительные интерлейкины, синтезируемые макрофагами синовии суставов. ФНО- α , С5а, лейкотриен В4 и ИЛ-8, а также гистамин, синтезируемый тучными клетками синовиальной оболочки, привлекают нейтрофилы в синовиальную жидкость из сосудистого русла. Нейтрофилы, попав в полость сустава, поглощают иммунные комплексы, что сопровождается выбросом свободных радикалов кислорода, а значит поддерживается воспалительная реакция в суставе. Моноциты крови и тканевые макрофаги, генерируя факторы роста, стимулируют эндотелий к размножению, определяя наравне с нейтрофилами активность воспалительной реакции в синовиальной оболочке сустава [4].

Помимо механизмов клеточного иммунитета, в патогенезе РА играют значительную роль и механизмы гуморального иммунитета в виде синтеза антител (АТ) - биомаркеров заболевания. Так, В-лимфоциты продуцируют аутоантитела, прежде всего, ревматоидный фактор (РФ) и антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП), а также АТ к цитруллинированному фибриногену, цитруллинированному виментину, цитруллинированной а-энолазе, цитруллинированному коллагену II типа, АТ к RA-33 - гетерогенному ядерному нуклеопротеину A2 [5].

Различают серопозитивный и серонегативный ревматоидный артрит по наличию или отсутствию ревматоидного фактора в сыворотке крови соответственно.

Нейтрофилы и макрофаги, инфильтрирующие синовиальную оболочку сустава, поглощают ревматоидный фактор, что приводит к синтезу большого количества цитокинов и высвобождению протеолитических ферментов, усиливающих воспаление.

Изучение функциональной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови посредством цитохимического метода позволит дать оценку интенсивности воспалительной реакции в синовиальной оболочке и эффективности проводимой терапии.

Интерес к цитохимическому методу объясняется возможностью определять с его помощью активность ферментов в целой клеточной популяции, в отличие от возможностей стандартных биохимических исследований.

Немногочисленность работ, посвящённых изучению цитохимического профиля вышеуказанных клеток у пациентов с ревматологической патологией [6], обуславливает актуальность нашего исследования.

Цель исследования. Оценить метаболический статус нейтрофилов и моноцитов периферической крови у пациентов с ревматоидным артритом, находящихся на терапии базисными противовоспалительными препаратами.

Материалы и методы исследования.

В ревматологическом отделении ГБУЗ АО «Александро-Мариинская областная клиническая больница» было обследовано 67 пациентов с ревматоидным артритом в возрасте от 27 до 65 лет.

Критерии включения в исследование: диагноз «ревматоидный артрит», возраст от 27 до 65 лет.

Критерии исключения: острые и хронические неревматические воспалительные заболевания в стадии обострения, заболевания системы крови, острые инфекционные заболевания, злокачественные новообразования, возраст старше 65 лет.

Из 67 пациентов с ревматоидным артритом 42 пациента имели серопозитивный РА (n=42) и 25 пациентов - серонегативный РА (n=25). Контрольная группа представлена 35 здоровыми донорами. Распределение пациентов по полу и возрасту было следующим: мужчины - 12 человек (17,9%), женщины – 55 человек (82,1%) в возрасте от 27 до 65 лет. Средний возраст женщин с серопозитивным РА - 53,3 (мин. 31, макс. 65 лет), с серонегативным РА - 51,1 (мин. 27, макс. 65 лет), мужчин с серопозитивным РА – 54,8 (мин. 47, макс. 64 лет), с серонегативным РА – 44,5 лет (мин. 33, макс. 53 лет).

Все пациенты на момент исследования находились на стационарном лечении в ревматологическом отделении, уже получая БПВП (метотрексат - 31 пациент, сульфасалазин - 11 пациентов, лефлунамид - 21 пациент). В отделении пациенты также получали нестероидные противовоспалительные препараты (НПВС) и глюкокортикостероиды (ГКС). Исследование цитохимической активности ферментов нейтрофилов и моноцитов крови проводилось дважды: при поступлении в стационар и по выписке.

По клинической стадии пациенты с РА распределились следующим образом: поздняя

стадия - 56,7% (серопозитивный РА - 37,3%, серонегативный РА - 19,4% пациентов), развёрнутая стадия - 43,3% (серопозитивный РА - 25,4%, серонегативный РА - 17,9%).

По рентгенологической стадии заболевания выявлено следующее. III рентгенологическая стадия диагностировалась чаще всего – в 41,7% случаев (28,3% - у пациентов с серопозитивным РА, 13,4% - с серонегативным РА). IV рентгенологическая стадия определена у 31,5% (23,9% - с серопозитивным РА, 7,6% - с серонегативным РА). II стадия выявлена у 23,8% пациентов с РА (10,4% пациентов с серопозитивным РА и 13,4% с серонегативным РА).

По степени активности заболевания получены следующие данные. И у пациентов с серопозитивным (47,8%), и у пациентов с серонегативным РА (22,4%) чаще всего выставлялась 3-я степень активности, что соответствовало индексу DAS 28 >5,1. 2-я степень активности диагностирована у 14,9% больных с серопозитивным РА и у 11,9% с серонегативным РА (DAS 28 3,2-5,1).

Большинство пациентов с РА имели ФК III (76,1%), распределение которого среди пациентов с серопозитивным и серонегативным РА не одинаково: 55,2% и 20,9% соответственно. ФК II определён у 23,9% пациентов с РА: у 16,4% пациентов с серонегативным РА и у 7,5% пациентов с серопозитивным РА.

Установлено, что у 51 пациента (76,1%) обнаружены системные проявления РА: ревматоидные узелки выявлены у 10,4%, анемия – у 19,4%, тромбоцитоз – у 14,9%, сочетание двух и более системных проявлений (обязательным являлось наличие ревматоидного васкулита) наблюдалось у 29,8% пациентов, системные проявления не выявлены у 23,9% пациентов.

Всем пациентам проводилась цитохимическая оценка ферментативной активности нейтрофилов и моноцитов. Нейтрофилы определяли в мазке из цельной крови методом Р.П. Нарциссова (1970). Выделение моноцитов проводили по методике И.С. Фрейдлин (1978).

Исследовали окислительно-восстановительную группу энзимов: сукцинатдегидрогеназу (СДГ), отражающую цикл Кребса; лактатдегидрогеназу (ЛДГ), отражающую анаэробный гликолиз; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Г-6-ФДГ), отражающую активность пентозо-фосфатного шунта [7].

Результаты цитохимических реакций оценивали полуколичественным методом Карлов (1955) [8] с определением среднего цитохимического показателя (СЦП). Суть метода заключается в том, что все клеточные элементы разделяются по группам в зависимости от выраженности окраски и количества определяемого в клетке цитохимически активного вещества. Если клетки не имеют гранул, они относятся к нулевой группе. Клетки, площадь окраски которых представлена 25% цитоплазмы, или содержащие единичные гранулы,

относятся к первой группе, т.е. это клетки низкой степени активности (степень «а»). Если цитоплазма клеток заполнена гранулами на 30-70%, то такие клетки относятся ко второй группе, т.е. к клеткам средней степени активности (степень «б»). Клетками третьей группы, т.е. высокой степени активности, считаются те, цитоплазма которых заполнена гранулами на 70-100% и из которых наблюдался выход гранул независимо от того, контролировалось ядро или нет (степень «в»).

Чтобы рассчитать СЦП в мазке выделяли 100 клеток (нейтрофилов или моноцитов, в зависимости от типа мазка). При этом число клеток каждой из степеней умножали на номер степени. Таким образом, для подсчёта СЦП используется формула: $СЦП = a + 2b + 3v$ (усл. ед.).

Полученные цитохимические данные подвергались математической обработке на персональном компьютере в программе «Статистика 8». Учитывая отличное от нормального распределение признаков в группе, использовались непараметрические методы описания (Me [LQ; UQ]), сравнения (тест Манна-Уитни, Вилкоксона), установления связи (тест Спирмена) данных. Сравнение достоверности распределения признаков в группах проводилось с помощью критерия χ^2 . Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Цитохимический анализ проводили в динамике: на момент поступления в стационар и на момент выписки из стационара (через 2 недели).

В первый день поступления в стационар СЦП СДГ нейтрофилов составил 48,0 [44,0;50,0] у.е. (норма СДГ $15,02 \pm 0,02$ у.е.), превышая норму в 3 раза. Все реагирующие клетки классифицировались как степень «б» (средняя степень активности). Активность ЛДГ при поступлении у больных РА превышала норму в 2,5 раза и составила 53,0 [46,0; 54,0] у.е. (норма ЛДГ $20,02 \pm 0,02$ у.е.), при этом все клетки также были степени «б». СЦП Г-6-ФДГ составил 65,0 [58,0; 66,0] у.е. при норме $35,04 \pm 0,02$ у.е., что превышает норму в 1,7 раза, и снова все реагирующие клетки были классифицированы как степень «б».

После курса стационарного лечения (через 2 недели) активность СДГ и ЛДГ оставалась практически неизменной ($p=0,33$, $p=0,15$ соответственно при сравнении показателей до и после курса стационарного лечения), в отношении Г-6-ФДГ отмечалось некоторое снижение активности (на 12,9%), она составила 57,0 [50,0; 59,0] у.е. ($p=0,002$). СЦП всех ферментов также был сформирован клетками степени «б», как и при поступлении в стационар.

В отношении моноцитов наблюдалась следующая тенденция.

При поступлении в стационар активность СДГ составляла 47,0 [41,0; 50,0] у.е. (норма СДГ $20,02 \pm 0,01$ у.е.), это превысило нормальные значения в 2,1 раза. СЦП активности ЛДГ у

больных с РА на момент госпитализации превышал норму в 3 раза и составил 45,0 [39,0; 47,0] у.е. (норма ЛДГ $15,16 \pm 0,04$ у.е.). При норме $15,60 \pm 0,04$ у.е. активность Г-6-ФДГ составила 39,0 [32,0; 40,0] у.е., что было выше нормы в 2,1 раза. СЦП активности всех трёх ферментов был представлен клетками степени «а» (низкой активности).

При выписке из стационара после курса лечения активность СДГ снизилась до 26,0 [22,0; 29,0] у.е. ($p=0,003$), активность ЛДГ - до 24,0 [21,0; 26,0] у.е. ($p=0,001$). Активность Г-6-ФДГ осталась практически неизменной ($p=0,11$). СЦП всех ферментов также был сформирован клетками степени «а». Все вышеуказанные данные представлены в таблице.

Динамика активности окислительно-восстановительных ферментов нейтрофилов и моноцитов крови у пациентов с РА на БПВП после курса стационарного лечения

Ферменты (n=67) РА на БПВП		До стационарного лечения	После стационарного лечения	P (до/ после)
Нейтрофилы	СДГ	48,0 [44,0;50,0]	48,0 [44,0;50,0]	0,33
	ЛДГ	53,0 [46,0; 54,0]	52,0 [48,0; 53,0]	0,15
	Г-6-ФДГ	65,0 [58,0; 66,0]	57,0 [50,0; 59,0]	0,002
Моноциты	СДГ	47,0 [41,0; 50,0]	26,0 [22,0; 29,0]	0,003
	ЛДГ	45,0 [39,0; 47,0]	24,0 [21,0; 26,0]	0,001
	Г-6-ФДГ	39,0 [32,0; 40,0]	37,0 [33,0;40,0]	0,11

Активность окислительно-восстановительных ферментов нейтрофилов и моноцитов крови в нашем исследовании принципиально не отличалась в зависимости от типа получаемых БПВП ($p>0,05$).

Также нами была проведена оценка взаимосвязей между некоторыми гематологическими показателями, величиной индекса DAS-28, который отражает активность РА, и активностью окислительно-восстановительных ферментов нейтрофилов и моноцитов крови. Выявлена положительная корреляция средней силы ($r=0,6$) между всеми ферментами нейтрофилов, кроме СДГ (сильная корреляция - $r \geq 0,7$), моноцитов и уровнем скорости оседания эритроцитов (СОЭ), DAS-28, такая же корреляция существует и между активностью ферментов только нейтрофилов и уровнем С-реактивного белка (СРБ).

Т.к. DAS-28 является отражением клинико-лабораторной активности РА, то вышеуказанные корреляционные связи указывают на чёткую зависимость между активностью заболевания и активностью ферментов нейтрофилов и моноцитов крови, т.е. чем выше DAS-28 (активность заболевания), тем выше уровень ферментов нейтрофилов и моноцитов периферической крови.

Итак, в отношении нейтрофилов мы наблюдали отсутствие динамики активности ЛДГ

и СДГ, но небольшую тенденцию к нормализации активности Г-6-ФДГ, в отношении которой до лечения наблюдалась наибольшая активность. СЦП всех клеток сформирован клетками средней степени активности как до, так и после лечения. Это свидетельствует о том, что по окончании курса лечения (через 2 недели) не достигается оптимальное цитохимическое равновесие внутриклеточных ферментов нейтрофилов периферической крови, т.е. истинной ремиссии не наблюдается, несмотря на то что у 21% пациентов по выписке из стационара на основании показателей DAS-28 была достигнута клинко-лабораторная ремиссия РА (примечательно также, что после курса стационарного лечения в рамках расчёта DAS-28 пациенты оценивали уровень боли по визуально-аналоговой шкале (ВАШ) как «слабый» или «полное отсутствие боли», т.е. субъективная оценка своего состояния пациентом: «удовлетворительно» или «хорошо»). Несколько активнее меняется функциональная активности моноцитов: явная тенденция к нормализации относительно СДГ и ЛДГ, Г-6-ФДГ остаётся неизменной. Но СЦП всех клеток изначально сформирован клетками низкой степени активности как до, так и после курса стационарного лечения. Нельзя не отметить, что несмотря на очевидное повышение активности внутриклеточных ферментов нейтрофилов и моноцитов крови до курса стационарного лечения, их активность все же значительно ниже тех цифр, которые мы регистрировали у аналогичной группы пациентов, не получавших до стационарного лечения БПВП (СЦП активности СДГ, ЛДГ, Г-6-ФДГ в нейтрофилах $96, 129, 156 \pm 0,02$ у.е. соответственно и в моноцитах $92 \pm 0,01$ у.е., $104 \pm 0,04$ у.е., $122 \pm 0,04$ у.е., $p=0,0001$).

Полученные данные свидетельствуют также о том, что на момент обострения заболевания усиление уже имеющейся БПВП приёмом НПВС и ГКС целесообразно ввиду однозначного влияния последних на стабилизацию цитохимического профиля нейтрофилов и моноцитов крови. Обращает на себя внимание и тот факт, что СЦП всех клеток не был представлен клетками высокой степени активности. Это обусловлено тем, что БПВП, в частности те, которые принимала наша группа пациентов, способны накапливаться в клетках ретикулоэндотелиальной системы и влиять на процессы фагоцитоза и презентации антигенов [9].

Таким образом, дальнейшее изучение функциональной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови у пациентов с РА позволит разработать диагностические алгоритмы оценки патохимической активности воспалительного процесса, а также эффективности проводимой терапии.

Список литературы

1. McInnes I.B., Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis // *New Engl. J. Med.* – 2012. – V. 365. – P. 2205-19. DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1004965>.
2. Балабанова Р.М., Эрдес Ш.Ф. Распространённость ревматических заболеваний в России в 2012-2013 гг. // *Научно-практическая ревматология.* – 2015. – Т. 53. – № 2. – С.120-124.
3. Петров В.И., Черевкова Е.В., Солоденкова К.С., Бабаева А.Р. Инновационные аспекты фармакотерапии ревматоидного артрита // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.* – 2012. – № 1 (41). – С. 3-9.
4. Криворучко Н.А. Динамика морфологических изменений синовиальной оболочки у больных ревматоидным артритом после трансплантации фетальных хондроцитов // *Клиническая медицина Казахстана.* – 2012. – № 2 (25). – С. 70-74.
5. Kroot E.J. et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* - 2000. - V. 43. - P. 1831-1835.
6. Заводовский Б.В. Клинико-патогенетическое значение исследования метаболизма иммунокомпетентных клеток периферической крови при воспалительных ревматических заболеваниях: дис. ... докт. мед. наук: 14.00.39. – Волгоград, 2004. – 322 с.
7. Буеверов А.О. Апоптоз лимфоцитов и гранулоцитов периферической крови при хронических ИБУ- и ИСУ-инфекциях / А.О. Буеверов, Е.В. Тихонина, Е.Ю. Москалева и др. // *Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* – 2010. – № 6. – С. 33-36.
8. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
9. Емельянова В.А., Демидов А.А. Цитохимическая активность моноцитов крови у больных с серопозитивным ревматоидным артритом // *Молодой ученый.* - 2016. - № 14. - С. 218-221.