

УДК: 616.72-002.-615.252.453.-036

## ВЗАИМОСВЯЗЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ И ХАРАКТЕРА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К БЕТАМЕТАЗОНУ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Киреев В.В., Суяров А.А., Хатамов Х.М.

Институт иммунологии и геномики человека АН РУз

### ХУЛОСА

**Тадқиқотнинг мақсади:** РА билан оғриган беморлар қонида иммунологик ўзгаришлар билан бетаметазонга сезувчанлик даражаси ўртасидаги боғлиқликни ўрганиш.

**Материаллар ва усуллари.** РА билан касалланган 200 беморнинг қони текширилди, улар периферик қонни иммунологик текширувдан ўтказдилар, шу жумладан лимфоцитлар, CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD23, CD25, CD95, CD45RA моноклонал антикорлар ёрдамида ва иммуноглобулинлар а, М ва Г - ИФА даражаси. Глюкокортикоидларга сезгирлик қон лимфоцитларининг глюкокортикоидларга сезгирлигига асосланган ўзига хос хусусий техника ёрдамида аниқланди.

**Натижалар.** Жуда юқори ва ўртача сезгир беморлар ўртасида CD8% ва CD25%, мос равишда юқори ва ўртача сезгир беморлар ўртасида CD8% фарқлар мавжуд. IgA ва IgG даражаларида сезиларли фарқлар жуда юқори ва ўрта сезгир ва жуда юқори ва паст сезгир, IgA даражалари юқори ва паст сезгир ва жуда юқори ва ўрта сезгир ўртасида аниқланди. Ва IgG ўзгаришлари юқори ва ўртача сезгир беморлар ўртасида аниқланади. Ўрта ва паст сезувчанлик ўртасидаги IgM фарқлари ҳам аниқланди.

**Хулоса:** 1. CD8 кўрсаткичи бўйича бетаметазонга нисбатан ўта юқори ва ўртача сезувчанликка, юқори ва ўртача сезувчанликка, шунингдек CD25 - бўйича ўта юқори ва ўртача сезувчанликка эга беморлар ўртасида фарқлинишлар намоён бўлди.

2. IgA даражасида бетаметазонга нисбатан ўта юқори ва паст сезувчанликлар ўртасида, юқори ва паст сезувчанликлар ўртасида, ўта юқори ва ўртача сезувчанликлар ўртасида, IgG кўрсаткичи бўйича эса ўта юқори ва ўртача сезувчанликлар ўртасида, юқори ва ўртача сезувчанликлар ўртасида, IgM даражаси бўйича ўртача ва паст сезувчанликларга эга беморлар ўртасида фарқлар аниқланди.

**Калим сўзлар:** ревматоид артрит, бетаметазон, сезувчанлик даражаси, иммунологик кўрсаткичлари.

До настоящего времени, несмотря на все успехи фармакологии, глюкокортикоидные гормоны (ГК) занимают прочное место в терапии ревматоидного артрита (РА). Этому факту способствует несколько моментов: быстрота действия препаратов, наличие вы-

### SUMMARY

**The aim of the study** was to study the relationship between immunological changes and the degree of sensitivity to betamethasone in the blood of RA patients.

**Materials and methods.** The blood of 200 patients with RA was examined, who underwent an immunological examination of peripheral blood, including the determination of lymphocytes, CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD23, CD25, CD95, CD45RA using monoclonal antibodies and the level of immunoglobulins A, M and G - ELISA. Sensitivity to glucocorticoids was determined using an original proprietary technique based on the sensitivity of blood lymphocytes to glucocorticoids.

**Results.** There are differences of CD8% and CD25% between very highly and moderately sensitive patients, CD8% between highly and moderately sensitive patients, respectively. Significant differences in IgA and IgG levels were found between very high and medium-sensitive and very high and low-sensitive, IgA levels between high and low-sensitive, and between very high and medium-sensitive. And IgG changes are detected between highly and moderately sensitive patients. IgM differences between medium and low sensitivity were also revealed.

### Conclusion:

1. There is a difference in CD8 values between very highly and moderately sensitive and highly and moderately sensitive, and CD25 between very highly and moderately sensitive to betamethasone patients.

2. There is a difference in IgA levels between very high, highly and low-sensitivity, and very high and medium-sensitive patients, IgG between very high and highly sensitive patients compared to medium-sensitive patients, and IgM between medium and low-sensitivity betamethasone patients.

**Keywords:** rheumatoid arthritis, betamethasone, sensitivity level, immunological parameters.

раженного противовоспалительного эффекта, невозможность в целом ряде случаев достижения контроля за заболеванием с помощью других лекарственных средств [9]. Кроме того, ГК гормоны, и бетаметазон, в частности широко используется для локального

(внутриуставного) применения, позволяя в целом ряде случаев подавлять воспаление в пораженном суставе (ах), улучшая течение заболевания.

Однако, за 50 лет применения бетаметазона в клинической практике накоплено достаточно фактов, свидетельствующих о развитии к нему резистентности. Но вопросы взаимоотношения чувствительности к бетаметазону и степени чувствительности к нему остаются неизученными [2,10,11].

Известно влияние системных ГК на иммунологические показатели при различных аутоиммунных ревматических заболеваниях, включая РА [4,5]. Однако до настоящего времени не изучалась взаимосвязь иммунологических изменений в крови в зависимости от степени чувствительности к ГК. Это было обусловлено отсутствием методик, позволяющих в короткие сроки проводить оценку чувствительности к различным ГК. Созданные до настоящего времени методики определения чувствительности не имели градации чувствительности, были привязаны к одному препарату (обычно дексаметазону), были трудоемки в исполнении, требовали большого числа реагентов и оборудования, и могли быть одновременно использованы для других ГК. В связи с чем они не нашли широкого применения в клинической практике.

Лимфоцит является основной фигурой иммунной системы, принимающей участие в реакциях клеточного иммунитета. Также на поверхности лимфоцита имеются рецепторы, ответственные за чувствительность к ГК. Давно известен феномен кортизол-резистентных лимфоцитов, т.е. не погибающих под действием ГК [5,11]. Вот почему представляется актуальным выяснение характера взаимосвязи между степенью чувствительности и иммунологическими изменениями крови, что позволяет в большой степени понимать механизмы резистентности лимфоцитов к конкретному ГК на примере РА, являющегося широко распространенным заболеванием [1,2,3,5,8].

#### ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение взаимосвязи иммунологических изменений и степени чувствительности к бетаметазону в крови больных РА.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 200 больных с РА. Диагноз РА устанавливали на основании данных анамнеза, физического и клинико-лабораторного исследования согласно критериям Американской ревматологической ассоциации (АРА) 1987 г и рабочей классификации, предложенной ассоциацией ревматологов России (2003). Женщин было - 188, мужчин -19. Возраст больных составил от 25 до 78 лет (средний возраст  $57,55 \pm 0,87$  лет), с продолжительностью заболевания от 2 мес. до 35 лет (средняя продолжительность  $8,66 \pm 0,54$  года).

Пациентам проводилось иммунологическое исследование периферической крови, включающее определение лимфоцитов, CD3, CD4, CD8, CD16,

CD20, CD23, CD25, CD95, CD45RA методом моноклональных антител, уровня иммуноглобулинов А, М и G ИФА-методом. Контрольная группа составила 20 практически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту.

Определение чувствительности к глюкокортикоидам осуществлялось с помощью оригинальной запатентованной методики определения чувствительности к глюкокортикоидам (гидрокортизону, преднизолону, метилпреднизолону, дексаметазону, триамцинолону, бетаметазону). У пациента забирают 1 мл венозной крови независимо от приема пищи в стерильную гепаринизированную центрифужную пробирку. После центрифугирования в течение 10 мин при 1500 об/мин выделяют лимфоциты по методу Boum на 76% фиколле и подсчитывают количество лимфоцитов в камере Горяева под микроскопом при увеличении 250. Затем в пробирку добавляют при помощи мерной пипетки 500 мкл взвеси лимфоцитов и добавляют, с использованием отдельной мерной пипетки, по 100 мкл раствора глюкокортикоидов. С учетом биоэквивалентности глюкокортикоидов, стандартные ампулированные растворы глюкокортикоидов разводят: дексаметазон (1 мл) разводят физиологическим раствором в количестве 26,6 мл стерильного физиологического раствора (0,9% раствор хлорида натрия), триамцинолон (кеналог), урбазон (солю-медрол, метилпреднизолон) в 4 мл стерильного физиологического раствора, преднизолон в 5 мл, а бетаметазон в 22 мл раствора соответственно. Эти растворы стабильны в течении месяца при хранении в стерильных условиях в темноте в холодильнике при температуре 8С. Полученную смесь инкубируют в термостате при температуре 37С в течении 1 часа, затем окрашивают трипановым синим и фиксируют глутаральдегидом, после чего проводят подсчет оставшихся лимфоцитов в камере Горяева под микроскопом. Если количество лимфоцитов уменьшалось на 1 -20% -то результат чувствительности оценивают, как очень низко чувствительный, 21- 40% низко чувствительный, 41-60% - средне чувствительный, 61- 80% высокочувствительный, свыше 80% очень высоко чувствительный [3].

Статистическая обработка полученных данных выполнена с использованием пакета программ «Statistica 12.0». Достоверность полученных величин определялась при помощи t критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни. За статистически значимые изменения принимался уровень достоверности  $p < 0,05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты представлены в таблице. Бетаметазон – ГК сверхдлительного действия. В настоящее время многие эффекты бетаметазона на иммунные клетки изучены недостаточно, и данные противоречивы [5]. Препарат существенно не влияет на уровень естественных киллеров, В-клеток, а также влияет на уровень Т-регуляторных клеток (CD4,

CD25, а также CD3) [4]. Установлено достоверное повышение относительного показателя лимфоцитов (за исключением группы средне чувствительных) по сравнению со здоровыми лицами. При этом выявлено достоверное различие между средне и низко чувствительными пациентами ( $30,0 \pm 5,68\%$  и  $43,0 \pm 1,41\%$ ;  $p < 0,05$ ). А уровень абсолютного показателя CD3+ достоверно снижен лишь в группе очень высоко чувствительных пациентов по сравнению со здоровыми лицами. Относительный показатель CD4,% был достоверно снижен во всех группах по сравнению со здоровыми лицами без достоверных различий между ними. А абсолютный показатель CD4+ был достоверно снижен во всех группах по сравнению со здоровыми лицами, причем отмечаются достоверные различия между очень высоко чувствительными и средне чувствительными.

Уровень относительного показателя CD8% различается достоверно между очень высоко и средне чувствительными пациентами ( $22,08 \pm 0,74\%$  и  $25,66 \pm 1,20\%$ ;  $p < 0,05$ ), высоко ( $21,16 \pm 1,12\%$ ;  $p < 0,01$ ) и средне чувствительными пациентами соответственно без достоверного различия со здоровыми лицами. Также выявляются достоверные отличия показателя CD25,% между очень высоко чувствительными и средне чувствительными пациентами ( $20,92 \pm 0,61\%$  и  $17,66 \pm 0,33\%$ ;  $p < 0,001$ ) и снижение у средне чувствительных пациентов по сравнению со здоровыми лицами ( $20,1 \pm 0,7\%$ ;  $p < 0,05$ ).

Относительный показатель CD95,% был достоверно снижен во всех группах по сравнению со здоровыми лицами без достоверных различий между ними.

Обнаружены достоверные различия уровня IgA между очень высоко и низко чувствительными ( $1,48 \pm 0,03$  г/л и  $1,59 \pm 0,03$  г/л;  $p < 0,05$ ), между высоко и низкочувствительными ( $1,48 \pm 0,04$  г/л и  $1,59 \pm 0,03$  г/л;  $p < 0,05$ ), между очень высоко и средне чувствительными ( $1,48 \pm 0,03$  г/л и  $1,36 \pm 0,04$  г/л;  $p < 0,01$ ). Отмечается достоверное повышение уровня IgA низко чувствительных к бетаметазону пациентов в сравнении со здоровыми лицами. А изменения уровня IgG выявляется между очень высоко и средне чувствительных ( $11,95 \pm 0,22$  г/л и  $10,85 \pm 0,13$  г/л;  $p < 0,01$ ), между высоко и средне чувствительными пациентами ( $11,21 \pm 0,35$  г/л и  $10,85 \pm 0,13$  г/л;  $p < 0,01$ ). Выявлены также различия уровня IgM между средне и низкочувствительными ( $1,13 \pm 0,01$  г/л и  $1,30 \pm 0,04$  г/л;  $p < 0,001$ ). Достоверных изменений в зависимости от характера чувствительности по другим показателям у бетаметазона выявлено не было.

Работ, посвященных взаимосвязи влияния бетаметазона и состояния иммунитета в доступной литературе практически не найдено, и эти данные противоречивы. Большинство работ касается клинической оценке применения бетаметазона при РА, особенно при внутрисуставном введении. Лишь в исследова-

нии Langewouters и соавт. показано, что терапия бетаметазоном в сочетании с алекапеном псориатического артрита, являющегося аутоиммунным заболеванием, в течении 12 недель приводило к статистически значимому снижению субпопуляций CD45RO+, CD8+, CD16+, CD4+, CD25+ [6,7]. В нашей работе отмечается снижение уровня CD25+ между очень высоко чувствительными и средне чувствительными, что подтверждает эти данные. Аналогичная ситуация наблюдается и с уровнем CD8+ между очень высоко чувствительными и очень низко чувствительными пациентами. С другой стороны ГК, включая бетаметазон, стимулируют апоптоз лимфоцитов [2,9].

Однако в нашем исследовании статистически значимых изменений в содержании CD95+ обнаружено не было. Возможно, это связано с продолжительностью действия препарата и наличием в его составе атома фтора [11,12].

Таким образом, выявляются различия влияние бетаметазона на 6 иммунологических показателей в зависимости от характера чувствительности к ЛС.

#### ВЫВОДЫ:

1. Отмечается различие показателей CD8% между очень высоко и средне чувствительными и высоко и средне чувствительными, и CD25% между очень высоко и средне чувствительными к бетаметазону пациентами.

2. Обнаруживается различия уровня IgA между очень высоко и низко чувствительными, между высоко и низко чувствительными, между очень высоко и средне чувствительными, а по уровню IgG между очень высоко и средне чувствительных, между высоко и средне чувствительными и по уровню IgM между средне и низко чувствительными к бетаметазону пациентами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Курочкина Ю. Д. Эффект глюкокортикоидов на функции интерферон-альфа-индуцированных дендритных клеток здоровых доноров и больных ревматоидным артритом. //Дисс...канд. мед. наук. Новосибирск 2019. - 146 с.
2. Тодосенко Н. М. Реакции Т-лимфоцитов больных ревматоидным артритом на глюкокортикоиды in vitro. // Автореф. дисс... канд. биол. наук Калининград –2018. - 24 с.
3. Aripova T. U., Kireyev V. V., Suyarov A. A., Xatamov X. M., Usmanbekova X. T. Способ определения чувствительности к глюкокортикоидам in vitro). // Патент на полезную модель №FAP 02182 от 26.12.2022.
4. Banuelos J., Lu N. Z. A gradient of glucocorticoid sensitivity among helper T cell cytokines Cytokine Growth Factor Rev. //Cytokine Growth Factor Rev. 2016 Oct;31:27-35. doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.05.002.

**Иммунологические различия больных РА в зависимости от характера чувствительности к бетамазону**

№	Показатель	Очень высоко чувствительные (n=96)	Высоко чувствительные (n=41)	Средне чувствительные (n=4)	Низко чувствительные (n=29)	Очень низко чувствительные (n=26)	Контрольная группа (n=20)
1	лейкоциты	5074,72±231,49	5385±445,22	8333,33±3600,62	4948,15±428,28	5558,33±592,49	6787,75±162
2	лимфоциты	39,37±0,67*	39,30±1,29*	30,0±5,68**	43,0±1,41 <sup>□</sup> *	40,79±1,79*	30,1±1,1
3	лимфоциты. абс	2042,27±115,43	2170,97±181,64	2131,33±507,19	2176,89±230,80	2346,04±310,07	2043±147
4	CD3, %	46,39±1,16*	46,80±1,57*	51,33±6,36	49,89±2,67*	46,16±2,02*	57,5±1,6
5	CD3.абс	978,89±68,12*	1059,64±110,31	1031±147,07	1145,74±182,71	1139±174,74	1189±89
6	CD4, %	23,65±0,66*	23,66±0,81*	31,33±6,44	24,55±1,2*	24,25±1,23*	36,2±1,03
7	CD4, абс	494,32±35,91*	539,89±58,57	612,33±88,83	546,26±70,58	561,08±73,01	752±61,0
8	CD8, %	22,08±0,74	21,16±1,12	25,66±1,20***, **, *	24,33±1,53	24,33±1,64	22,4±1,2
9	CD8, абс	466,28±33,86	503,44±61,37	558±154,27	559,92±84,95	609,83±107,64	475±42
10	CD4/CD8	1,12±0,03	1,17±0,05	1,22±0,29	1,09±0,07	1,08±0,07	1,56±0,01
11	CD16, %	21,29±0,72*	21,14±1,14*	18,0±3,05*	23,66±1,62*	23,71±1,64*	11,9±0,8
12	CD16.абс	459,37±36,92*	492,5±60,11*	393,66±116,09	560,70±93,27*	589,87±99,85*	286±27
13	CD20, %	24,47±0,72	25,72±1,13	28,0±5,51	25,81±1,54	24,46±1,29	22,3±0,6
14	CD20.абс	513,74±37,48	582±63,60	652,66±250,89	596,66±101,47	593,41±95,12	449±37
15	CD 23, %	20,63±0,61*	21,5±1,21*	26,0±6,0	21,89±1,20*	20,82±1,61*	16,83±0,43
16	CD 25, %	20,92±0,61	21,75±1,16	17,66±0,33***, ***	21,31±1,23	21,75±1,58	20,1±0,7
17	CD45RA, %	20,13±0,87	22,6±1,36	н/д	21,27±1,14	22,28±1,57	17,3±0,8
18	CD95, %	20,32±0,52*	20,75±1,10*	21,0±3,51*	21,81±1,12*	21,95±1,85*	28,0±1,1
19	IgA, г/л	1,48±0,03	1,48±0,04	1,36±0,04***, **, *	1,59±0,03 <sup>□</sup>	1,51±0,06	1,42±0,09
20	IgM, г/л	1,26±0,03	1,27±0,03	1,13±0,01	1,30±0,04 <sup>□</sup>	1,25±0,05	1,25±0,01
21	IgG, г/л	11,95±0,22	11,21±0,35	10,85±0,13**	11,54±0,29 <sup>□</sup>	11,38±0,30	11,73±0,54

Примечание: \* - достоверность показателей между исследуемыми и здоровыми, \*\* - между очень высоко и средне чувствительными. \*\*\* - между высоко и средне чувствительными, <sup>□</sup> - между средне и низко чувствительными.

5. Bazsó A., Kövesdi A., Rásonyi R., Nagy E., Poór G., Patócs A., Kiss E. Glucocorticoid receptor polymorphisms in rheumatoid arthritis: results from a single centre //Clin Exp Rheumatol Sep-Oct 2020;38(5):858-863.
  6. Jang Y.H., Kim S.L., Lee K.C., Kim M.J., Park K.H. et al. A Comparative study of oral cyclosporine and betamethasone minipulse therapy in the treatment of alopecia areata. // Ann Dermatol. 2016 Oct;28(5) P.569-574.
  7. Kotb IS, Lewis BJ, Barker RN, Ormerod AD. Differential effects of photo therapy, adalimumab and betamethasone-calcipotriol on effector and regulatory T cells in psoriasis. //Br J Dermatol. 2018 Jul;179(1):127-135. doi: 10.1111 /bjd. 16336.
  8. Liu S., Verma M., Michalec L., Liu W., Sripada A. et al. Steroid resistance of airway type 2 innate lymphoid cells from patients with severe asthma: The role of thymic stromal lymphopoietin // J. Allergy Clin. Immunol. January 2018 P.258-268.
  9. Lovato P, Norsgaard H, Tokura Y, Røpke MA. Calcipotriol and betamethasone dipropionate exert additive inhibitory effects on the cytokine expression of inflammatory dendritic cell-Th17 cell axis in psoriasis. // J Dermatol Sci. 2016 Mar;81(3):153-64. doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.12.009. 23.
  10. Perna-Barrull D., Gieras A., Rodriguez-Fernandez S., Tolosa E., Vives-Pi M. Immune system remodelling by prenatal betamethasone: effects on B-cells and type 1 diabetes //Front. Endocrinol. 2020 Aug 11; 11:540. doi: 10.3389 /fendo. 2020.00540 9P.
  11. Pongratz G. Glucocorticoid therapy in rheumatoid arthritis - pro //Dtsch Med. Wochenschr.2016 Oct;141(22):1650.doi: 10.1055/s-0042-110983.
  12. Satake K, Amano T, Okamoto T. Calcipotriol and betamethasone dipropionate synergistically enhances the balance between regulatory and proinflammatory T cells in a murine psoriasis model. // Sci Rep. 2019 Nov 8;9(1):16322. doi: 10.1038/s41598-019-52892-1.
-