

УДК 616-002-008.953-092

## ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КИСЛОРОДЗАВИСИМОГО МЕТАБОЛИЗМА И АПОПТОЗА НЕЙТРОФИЛОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ МОЭКСИПРИЛА У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ И СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ

Ильин М.В., Мальцева П.А., Волкова А.С., Романов В.А., Хрусталеv О.А.

ГОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия» Минздрава России, Ярославль, e-mail: dissovet@yuma.ac.ru

Проведено исследование показателей окислительного стресса и апоптоза нейтрофилов у 50 больных системной красной волчанкой и 32 больных системной склеродермией, принимавших ингибитор АПФ моэксиприл в дополнение к стабильной терапии. Функциональную активность нейтрофилов исследовали хемиллюминесцентным методом, для определения экспрессии антигена bak на поверхности нейтрофилов использовали стрептавидин-биотиновый метод. Установлено, что применение моэксиприла в дополнение к стабильной терапии системной красной волчанки способствует уменьшению экспрессии нейтрофилами активных форм кислорода и не оказывает влияние на уровень спонтанного апоптоза нейтрофилов. Эффекты моэксиприла у больных системной склеродермией связаны со значительным ростом резерва образования активных форм кислорода нейтрофилами, а также увеличением резерва продукции супероксид-аниона.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, кислородзависимый метаболизм, апоптоз, моэксиприл

## THE EFFECT OF MOEXIPRIL ON THE DYNAMICS OF PARAMETERS OF REDOX REGULATION AND APOPTOSIS OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND SYSTEMIC SCLEROSIS

Ilyin M.V., Maltseva P.A., Volkova A.S., Romanov V.A., Khrustalev O.A.

Yaroslavl State Medical Academy, Yaroslavl, e-mail: dissovet@yuma.ac.ru

In this study we evaluated the effect of moexipril on the dynamics of parameters of redox regulation and apoptosis of neutrophils in 50 patients with systemic lupus erythematosus and 32 patients systemic sclerosis. Redox regulation of neutrophils was quantified by chemiluminescent method. The expression of protein bak was estimated using streptavidine-biotin method. It was established, that oral moexipril promotes the decrease of oxidative stress of neutrophils and does not influence the level of apoptosis of the cells in systemic lupus erythematosus. The effect of moexipril in scleroderma is connected to the significant increase of superoxide reserve and free radicals production by neutrophils.

**Keywords:** neutrophils, redox regulation, apoptosis, moexipril

Несмотря на значительное количество публикаций, посвященных исследованию спонтанного и индуцированного апоптоза нейтрофилов, его роль и механизмы регуляции при аутоиммунных заболеваниях остаются недостаточно изученными. Существует противоречивость данных, описывающих состояние апоптоза нейтрофилов при различных ревматических заболеваниях. Большинство исследований сводится к количественной характеристике изменений экспрессии факторов апоптозной гибели клеток, в то время как клинический аспект чаще остается вне пределов рассмотрения.

Ингибиторы АПФ обладают широким спектром влияний, к которым относятся подавление экспрессии тканевого фактора роста- $\beta_1$  и провоспалительных цитокинов [3], а также утилизация супероксид-аниона, продуцируемого нейтрофилами [5]. Применение ингибиторов АПФ способствует модификации функции нейтрофилов путем подавления синтеза активных форм кислорода стимулированными клетками и уменьшения интенсивности процессов перекисного окисления липидов.

Целью настоящего исследования является изучение динамики показателей кислородзависимого метаболизма и апоптоза нейтрофилов под влиянием моэксиприла у больных системной красной волчанкой (СКВ) и системной склеродермией (ССД). Выбор моэксиприла в качестве дополнения к стабильной терапии СКВ и ССД обусловлен способностью данного препарата уменьшать деградацию брадикинина посредством активации  $V_1$  и  $V_2$  рецепторов, играющих главную роль в мобилизации нейтрофильных гранулоцитов [2].

### Материалы и методы исследования

В исследование были включены 50 больных системной красной волчанкой, в возрасте от 18 до 73 лет (в среднем  $39,9 \pm 11,3$  года), и 32 пациента с системной склеродермией в возрасте от 18 до 72 лет (в среднем  $45,5 \pm 16,2$  лет). Принимая во внимание, что в группу больных СКВ были рандомизированы только женщины, для обеспечения корректности статистического анализа контрольную группу СКВ составили 11 женщин. В группу контроля ССД были включены 25 относительно здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с контингентом данной группы.

Диагноз СКВ устанавливали на основании клинических проявлений заболевания, данных лабораторных, инструментальных методов исследования и классификационных критериев Американской ассоциации ревматологов (1982). Для верификации диагноза ССД использовали критерии Американской ревматологической ассоциации (1980).

В зависимости от нозологии, на госпитальном этапе назначалась стабильная терапия, соответствующая современным рекомендациям по лечению данного заболевания. Дополнительно к стабильной терапии в течение трех недель у 29 (58%) больных СКВ и 21 (65,6%) больного ССД применялся моэксиприл. Моэксиприл рекомендовался в стартовой дозе 7,5 мг/сут. В зависимости от динамики АД, доза препарата увеличивалась до 15 мг/сут. Средняя суточная доза составила  $11,3 \pm 3,75$  мг. Протокол исследования был рассмотрен и утвержден Этическим комитетом Ярославской государственной медицинской академии. До начала исследования пациенты были осведомлены о его процедуре и подписали информированное согласие. Рандомизация больных осуществлялась методом случайной выборки, на основании предшествующей селекции по характеру течения, длительности, тяжести заболевания, возрастному и половому признакам.

Выделение нейтрофилов периферической крови проводили на двойном градиенте плотности фикола-урографина. Функциональную активность (ФА) клеток исследовали хемилюминесцентным методом. Для усиления хемилюминесценции (ХЛ) использовали люминол (ЛЛ), а также люцигенин (ЛН), который является селективным индикатором супероксид-аниона. О функциональном резерве клеток судили по коэффициентам активации хемилюминесценции (КА ХЛлл и КА ХЛлн), которые рассчитывали как отношение индуцированного показателя (иХЛлл и иХЛлн) к спонтанному (сХЛлл и сХЛлн). В качестве индуктора кислородзависимого метаболизма нейтрофилов использовали  $1 \cdot 10^9$  взвесь убитых нагреванием клеток *S. aureus* штамма p-209.

Для определения экспрессии проапоптозного антигена bak на поверхности нейтрофилов использовали стрептавидин-биотиновый метод (реагенты «ДАКОС cytometry», Дания). Исследование проводили в соответствии со стандартным протоколом, учитывая процент bak-положительных клеток. Использовали моноклональные мышинные антитела к гранулоцит-ассоциированному антигену CD15 для положительного контроля и разводящую жидкость для антител в качестве отрицательного контроля.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Осуществлялась проверка нормальности распределения количественных признаков. Для количественных признаков, имеющих распределение, отличное от нормального, производилось вычисление медиан и интерквартильных интервалов (Me (25; 75%)). Для сравнения двух независимых групп по одному признаку применяли критерий Манна-Уитни. Для изучения взаимосвязи двух признаков использовался корреляционный анализ по Спирмену. При установлении референтного интервала для количественных признаков использовалось процентильное определение нормы, основанное на измерениях, предпринятых на здоровой популяции. Критическое значение уровня статистической значимости принималось равным 5%.

### Результаты исследования и их обсуждение

Поскольку группы больных СКВ и ССД составляли преимущественно женщины, фактор половой принадлежности учитывался при выборе препарата. По результатам проведения рандомизированных плацебо контролируемых исследований были получены данные, свидетельствующие о высокой эффективности и безопасности применения моэксиприла в группе больных женского пола. Моэксиприл не оказывал отрицательного действия ни на один метаболический фактор риска развития сердечно-сосудистой и церебральной патологии. Принималось во внимание, что, несмотря на отсутствие тяжелых случаев нейтропении при использовании моэксиприла, опыт применения других ингибиторов АПФ свидетельствовал о необходимости постоянного контроля уровня лейкоцитов крови при системных заболеваниях соединительной ткани с поражением сосудов, особенно при наличии нарушения функции почек.

Результаты исследования изменения показателей окислительного стресса и уровня экспрессии проапоптозного фактора bak нейтрофилами под влиянием стабильной терапии, а также комбинации препаратов стабильной терапии с ингибитором АПФ моэксиприлом у больных СКВ представлены в табл. 1.

При сравнительном анализе динамики изучаемых показателей под влиянием терапии установлено, что применение моэксиприла способствовало снижению интенсивности процессов респираторного взрыва. В группе больных СКВ, дополнительно получавших ингибитор АПФ, наблюдалось снижение уровня образования активных форм кислорода нейтрофилами, по показателю сХЛлл ( $1,05 (1,0; 5,4) < 4,8 (1,0; 7,6)$ ;  $p = 0,02$ ), который приближался к результату группы контроля, не отличаясь от него статистически значимо. В группе пациентов, получавших стабильную терапию, выявлено статистически значимое увеличение резерва продукции нейтрофилами супероксидного анион-радикала, по данным иХЛлн ( $1,0 (0,7; 1,2) > 0,8 (0,1; 1,0)$ ;  $p = 0,01$ ).

В результате лечения в группе больных, получавших моэксиприл, обнаружено снижение продукции и резерва образования супероксид-аниона нейтрофилами, по показателям сХЛлн и иХЛлн ( $1,1 (0,4; 2,0) < 1,6 (0,75; 2,9)$  и  $0,7 (0,2; 1,0) < 1,0 (0,1; 1,0)$ ;  $p > 0,05$ ), значимо отличавшихся от показателей группы контроля. В то же время в группе больных, находившихся на стабильной терапии, наблюдался противоположный эффект, вы-

ражавшийся в дальнейшем увеличении генерации  $O_2^{\bullet}$  и ростом резерва его образования ( $1,6 (1,0; 2,8) > 0,9 (0,5; 1,7); p > 0,05$  и  $1,0 (0,7; 1,2) > 0,8 (0,1; 1,0); p < 0,05$ ).

Под влиянием стабильной терапии происходило незначительное увеличение экс-

прессии нейтрофилами проапоптозного белка bak ( $15,1 (12,3; 15,2) > 13,3 (11,2; 15,6); p > 0,05$ ), в отличие от группы больных, получавших моэксиприл, где данный показатель оставался стабильным ( $13,7 (12,4; 14,9)$  против  $13,5 (11,4; 17,4); p > 0,05$ ).

Таблица 1

Изменение показателей кислородзависимого метаболизма и апоптоза нейтрофилов под влиянием моэксиприла у больных системной красной волчанкой

Показатели	Контроль (n = 11)	Системная красная волчанка						
		А. Стабильная терапия (n = 21)			p	В. Стабильная терапия и моэксиприл (n = 29)		
		И. При поступлении	II. При выписке	И. При поступлении		II. При выписке	p	
сХЛлл, $10^4$ , имп/мин	1,1 (0,5; 1,8)	2,0* (1,0; 8,7)	2,0 (1,0; 6,0)	0,58	4,8* (1,0; 7,6)	1,05 (1,0; 5,4)	0,02	
иХЛлл, $10^4$ , имп/мин	1,1 (0,2; 3,0)	1,1 (0,6; 4,1)	1,1 (1,0; 4,0)	0,61	1,0 (0,9; 6,4)	1,0 (0,3; 7,5)	0,23	
сХЛлн, $10^4$ , имп/мин	0,55 (0,2; 1,1)	0,9* (0,5; 1,7)	1,6 (1,0; 2,8)	0,14	1,6 (0,75; 2,9)	1,1* (0,4; 2,0)	0,36	
иХЛлн, $10^4$ , имп/мин	0,3 (0,1; 0,9)	0,8 (0,1; 1,0)	1,0 (0,7; 1,2)	0,01	1,0 (0,1; 1,0)	0,7* (0,2; 1,0)	0,33	
КА ХЛлл, Ед	1,69 (0,92; 3,3)	1,2 (0,3; 2,5)	1,0 (0,3; 1,9)	0,46	0,88 (0,18; 1,4)	0,9 (0,3; 2,5)	0,52	
КА ХЛлн, Ед	0,75 (0,25; 1,5)	0,6 (0,3; 1,0)	0,7 (0,36; 1,2)	0,32	0,45 (0,28; 0,9)	0,5 (0,31; 1,7)	0,27	
бак-положит. нейтр., %	18,0 (17,4; 18,8)	13,3* (11,2; 15,6)	15,1* (12,3; 15,2)	0,94	13,5* (11,4; 17,4)	13,7* (12,4; 14,9)	0,68	

Примечание. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Исследование динамики показателей кислородзависимого метаболизма и апоптоза нейтрофилов у больных

ССД под влиянием моэксиприла продемонстрировало следующие результаты (табл. 2).

Таблица 2

Изменение показателей кислородзависимого метаболизма и апоптоза нейтрофилов под влиянием моэксиприла у больных системной склеродермией

Показатели	Контроль (n = 25)	Системная склеродермия						
		А. Стабильная терапия (n = 11)			p	В. Стабильная терапия и моэксиприл (n = 21)		
		И. При по- ступлении	II. При выписке	И. При по- ступлении		II. При выписке	p	
сХЛлл, $10^4$ , имп/мин	1,15 (0,5; 1,8)	0,9 (0,5; 2,5)	1,8* (1,0; 4,6)	0,23	1,5 (0,4; 5,6)	4,0* (0,9; 5,2)	0,71	
иХЛлл, $10^4$ , имп/мин	1,1 (0,3; 2,75)	4,1* (3,6; 12,0)	6,3* (4,1; 13,0)	0,09	1,1 (0,5; 5,8)	0,9 (0,3; 7,0)	0,81	
сХЛлн, $10^4$ , имп/мин	0,7 (0,35; 1,3)	0,9 (0,5; 1,7)	1,2 (0,5; 2,0)	0,75	1,5 (0,2; 2,5)	1,2 (0,2; 4,1)	0,50	
иХЛлн, $10^4$ , имп/мин	0,75 (0,11; 1,0)	1,0 (0,1; 1,7)	1,2 (0,4; 1,8)	0,27	0,1 (0,1; 0,9)	0,3 (0,1; 1,0)	0,04	
КА ХЛлл, Ед	1,1 (0,7; 1,83)	4,0* (1,2; 10,3)	3,2* (1,4; 5,6)	0,39	0,77 (0,1; 3,6)	0,57 (0,1; 3,0)	0,61	
КА ХЛлн, Ед	0,69 (0,3; 1,75)	0,5 (0,2; 2,7)	0,6 (0,3; 7,4)	0,14	0,31 (0,1; 1,0)	0,42 (0,2; 1,1)	0,42	
бак-положит. нейтр., %	17,6 (16,7; 18,6)	12,4* (10,5; 14,7)	12,5* (11,1; 13,8)	0,86	13,4* (8,5; 19,2)	11,3* (10,8; 13,5)	0,58	

Примечание. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

Как следует из представленных в табл. 2 данных, в группе больных, которым наряду с основными препаратами назначался моэксиприл, в результате лечения наблюдалось увеличение резерва продукции супероксид-аниона (0,3 (0,1; 1,0) > 0,1 (0,1; 0,9);  $p = 0,04$ ). В группе пациентов, которым назначалась стабильная терапия, отмечено повышение резерва образования активных форм кислорода нейтрофилами, по данным иХЛлл (4,1 (3,6; 12,0) < 6,3 (4,1; 13,0);  $p = 0,09$ ). Вне зависимости от характера назначенного лечения у больных ССД при выписке было выявлено повышение интенсивности кислородзависимого метаболизма нейтрофилов, по данным сХЛлл (1,8 (1,0; 4,6) > 0,9 (0,5; 2,5);  $p > 0,05$  и 4,0 (0,9; 5,2) > 1,5 (0,4; 5,6);  $p > 0,05$ ).

Снижение интенсивности процессов кислородзависимого метаболизма нейтрофилов у больных СКВ, принимавших моэксиприл, очевидно, связано с подавлением цитозольной р47phox, чувствительной к ангиотензину II и участвующей в активации НАДФ-оксидазы [6]. В то же время увеличение образования супероксид-аниона у больных ССД может быть связано с активацией мембранной НАДФ-оксидазы на фоне сохраненной активности супероксиддисмутазы, что подтверждается результатами исследований, в которых показано повышение активности антиоксидантной защиты под влиянием ингибиторов АПФ [1, 4].

#### Заключение

Таким образом, применение моэксиприла в дополнение к стабильной терапии системной красной волчанки способствует уменьшению экспрессии нейтрофилами активных форм кислорода и не оказывает влияния на уровень спонтанного апоптоза нейтрофилов. Эффекты моэксиприла у больных системной склеродермией связаны

со значительным ростом резерва образования активных форм кислорода нейтрофилами, а также увеличением резерва продукции супероксид-аниона.

#### Список литературы

1. Subchronic exposure to high-dose ACE-inhibitor moexipril induces catalase activity in rat liver / E. Adeghate, M. Hasan, A. Ponery et al. // *Mol Cell Biochem.* – 2005. – № 280(1-2). – P. 159–163.
2. A novel inflammatory pathway involved in leukocyte recruitment: role for the kinin B1 receptor and the chemokine CXCL5 / J. Duchene, F. Lecomte, S. Ahmed et al. // *J Immunol.* – 2007. – № 179(7). – P. 4849–4856.
3. Ford C., Li S., Pickering J. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in human vascular smooth muscle cells. Involvement of the AT1 receptor, transforming growth factor- $\beta$ , and tyrosine phosphorylation // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 1999. – № 19. – P. 1843–1851.
4. Han L., Yu D., Xie Y. Effects of lisinopril on diabetic peripheral neuropathy: experiment with rats // *Zhonghua.* – 2008. – № 88(35). – P. 2513–2515.
5. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers effectively and directly potentiate superoxide scavenging by polymorphonuclear leukocytes from patients with type 2 diabetes mellitus / T. Inukai, N. Yoshida, S. Wakabayashi et al. // *Am J Med Sci.* – 2005. – № 329(5). – P. 222–227.
6. Reduced NAD(P)H oxidase in low renin hypertension: link among angiotensin II, atherogenesis, and blood pressure / M. Zhou, I. Hernandez, P. Pagano et al. // *Hypertension.* – 2006. – № 47(1). – P. 81–86.

#### Рецензенты:

Баранов А.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ГОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Ярославль;

Малафеева Э.В., д.м.н., профессор кафедры микробиологии с вирусологией и иммунологией ГОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Ярославль.

Работа поступила в редакцию 18.04.2011.