

**Национальный Центр кардиологии и терапии
при Министерстве здравоохранения Кыргызской Республики**

На правах рукописи

УДК 61 : 616. 72 – 002 – 002 : 616 – 097 : 616 – 073. 537

ЛОБАНЧЕНКО Ольга Валерьевна

**КЛИНИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИЧЕСКИХ
ЭКСПРЕСС-МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА**

14.00.05 — внутренние болезни

АВТОРЕФЕРАТ
*диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук*

Бишкек — 2002

Работа выполнена в Кыргызской государственной медицинской академии

Научный руководитель – доктор медицинских наук, профессор

Бененсон Ефим Владимирович

Научный консультант – доктор медицинских наук, профессор

Бримкулов Нурлан Нургазиевич



Рецензенты: доктор медицинских наук, профессор

Сейсенбаев Аскар Шакинович

доктор медицинских наук, профессор

Истамбекова Джидеш Ногойбаевна

Ведущая организация – Волгоградский филиал НИИ Ревматологии РАМН

Защита состоится «3» мая 2002 г. в 14 часов 00 мин на заседании диссертационного совета Д.14.01.167 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора (кандидата) наук при Национальном центре кардиологии и терапии МЗ КР (720040, Бишкек, ул. Тоголока Молдо, 3).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Национального центра кардиологии и терапии при Министерстве здравоохранения Кыргызской Республики.

Автореферат разослан «26» мая 2002 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
кандидат медицинских наук,
старший научный сотрудник

Т.А. РОМАНОВА

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ: Ревматоидный артрит (РА) по праву считается центральной проблемой современной ревматологии (Сигидин Я.А. и соавт., 1994; Насонова В.А., Бунчук Н.В., 1997), поскольку это заболевание является наиболее распространенным во всем мире (Беневоленская Л.И., 1983; Alarson G.S., 1997) и наиболее тяжелым (Kaarela K. et al., 1987; Тейтельбаум М.З. и соавт., 1991) из воспалительных заболеваний суставов, представляя собой чрезвычайно серьезную социально-экономическую проблему даже в экономически развитых странах мира, например, США (ACR ad Committee on clinical guidelines, 1996; Grossman J.M., Brahn E., 1997).

По современным представлениям ведущими звеньями патогенеза РА являются поликлональная гиперактивация В-иммунного ответа (Harris E.D., 1996; Berek C., Kim H.J., 1997), связанная с нарушениями иммунорегуляции (Петров Р.В., 1982; Sewell K.L., Trentham D.E., 1993; Kingsley G., Panayi G.S., 1997) и, в частности, снижением Т-супрессорного контроля за процессами активации В-клеток (David-Ameline J. et al., 1996; Kinne R.W. et al., 1997). Эта иммунопатологическая концепция получила непосредственное подтверждение при выявлении у больных РА спонтанной гиперпродукции иммуноглобулинов и аутоантител при краткосрочном культивировании (Бененсон Е.В. и соавт., 1982; Schellekens G.A. et al., 1998) и в реакции бляшкообразования (Gerne N.K., Nordin A.A., 1983; Gupta S. et al., 1987), соответствующей высокой пролиферативной активности культур и активности болезни (Guillemin F. et al., 1990). Однако отдельные исследования этих реакций нередко противоречивы и имеют ограниченное клиническое значение. В частности, не всегда удается увязать выявленные дисфункции лимфоцитов с активностью и тяжестью болезни. В настоящее время также продолжают поиски новых методов, адекватно отражающих иммунный статус при различных клинических вариантах РА (Sander O., Rau R., 1998; Насонов Е.Л., 2001).

Более высокий уровень развития клинической иммунологии связан с оценкой не отдельных показателей иммунного ответа, а с изучением функционирования лежащих в его основе таких процессов как активация, пролиферация, иммунорегуляция и др. (Хаитов Р.М. и соавт., 1998). На основе цитофлюориметрических методов оценки этих процессов установлено, что периферические лимфоциты, особенно В-клетки, у больных РА находятся в состоянии высокой спонтанной активации (по уровню пролиферативной и ИГ-синтезирующей функций) и имеют сниженную супрессорную функцию. Имеется также подгруппа больных с умеренно измененными показателями функциональной активности лимфоцитов. Остается неясным, как соотносятся эти параметры функциональной активности лимфоцитов при других ревматических заболеваниях (РЗ), имеют ли они клиническое значение,

способны ли отражать по критериям специфичности и чувствительности тяжесть и прогноз РА в сопоставлении с РФ – главным иммунологическим маркером РА. Остается неизученной динамичность этих показателей в процессе стационарного лечения и длительного наблюдения.

Целью настоящего исследования явилось изучение клинического значения цитофлюориметрических показателей функциональной активности периферических лимфоцитов, отражающих процессы пролиферации, иммунорегуляции и В-активации при РА и других РЗ и усовершенствование на этом основании методы оценки тяжести и прогноза РА.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

1. Оценить уровень и частоту изменений цитофлюориметрических экспресс-показателей пролиферативной, супрессорной и ИГ-синтезирующей активности лимфоцитов при основных РЗ: РА, остеоартрите (ОА), ревматизме (Р), системной красной волчанке (СКВ), анкилозирующем спондилоартрите (АС).
2. Изучить уровни и частоту изменений цитофлюориметрических экспресс-показателей функциональной активности лимфоцитов при различных клинических вариантах РА.
3. Изучить уровни и частоту изменений цитофлюориметрических экспресс-показателей функциональной активности лимфоцитов при РА перед началом лечения и в процессе динамического наблюдения.
4. Изучить возможность применения цитофлюориметрических экспресс-показателей функциональной активности лимфоцитов для оценки тяжести и прогнозирования течения РА.
5. Провести сравнительный анализ клинического значения цитофлюориметрических экспресс-показателей функциональной активности лимфоцитов при основных РЗ.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА:

- Впервые у больных РА и основными РЗ проведен комплексный клинический анализ усовершенствованных цитофлюориметрических экспресс-показателей функциональной активности периферических лимфоцитов в свежeweделенной культуре, отражающей с максимальной приближенностью к процессам *in situ* основные параметры функционирования иммунной системы: пролиферацию и иммунорегуляцию (по митогениндуцированной активности лимфоцитов с учетом фаз клеточного цикла) и В-активацию (по уровню поверхностных иммуноглобулинов, связанных с одной клеткой).
- Установлены существенные различия в уровнях и частоте этих показателей функциональной активности лимфоцитов у больных РЗ.

- Выявлена неоднородность этих показателей у больных РА, которая связана с клиническими особенностями болезни.
- Показана зависимость прогноза болезни от исходной степени снижения супрессорной функции лимфоцитов.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ РАБОТЫ

- Проведенное исследование дополнило представление о структуре и клиническом значении показателей функциональной активности при РА и других РЗ.
- Для более полной характеристики иммунного статуса у этих больных целесообразно изучать в свежeweделенной культуре лимфоцитов показатели пролиферативной, иммуноглобулинсинтезирующей и супрессорной функции.
- Установлены количественные и качественные различия в структуре иммунологической активности при этих заболеваниях.
- Предложен новый способ прогнозирования течения РА по степени снижения индекса супрессии.

ПОЛОЖЕНИЯ ДИССЕРТАЦИИ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Цитофлюориметрические экспресс-методы оценки функционального состояния лимфоцитов (иммуноглобулинсинтезирующая, пролиферативная и супрессорная функции) могут быть использованы с целью дифференциальной диагностики ревматических заболеваний воспалительного и невоспалительного типов.
2. Определение степени снижения супрессорной функции по индексу влияния преднизолона (ИВ_р) на ранней стадии РА позволяет определить вариант течения и прогноз РА для своевременного подбора иммуномодулирующей базисной терапии.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ. Работа доложена и обсуждена на межкафедральном заседании КГМА (03.04.2001г.). По материалам диссертации сделаны доклады на Пленуме правления Всесоюзного научного общества терапевтов (Фрунзе, 1989), Всесоюзном иммунологическом съезде (Сочи, 1989), II Международном симпозиуме «Реабилитация иммунной системы» (Дагомыс, 1990), IV Всесоюзном съезде ревматологов (Минск, 1991), на заседании иммунологического общества (Эдинбург, 1990), на 8^{ом} Интернациональном Конгрессе по Иммунологии (Будапешт, 1992), Интернациональном Конгрессе по иммунореабилитации (Сочи, 1992), заседаниях Общества ревматологов (Бишкек, 1995, 1997), конференции «Современная медицина на рубеже XX-XXI веков» (Бишкек, 2000), III съезде кардиологов (Бишкек, 2001), на международной конференции «Проблемы, стратегия и перспективы развития медицины труда в горных регионах», Бишкек, 2002г.

ПУБЛИКАЦИИ. По теме диссертации опубликовано 18 работ, в том числе 8 статей, 9 в виде тезисов докладов и 1 патент на изобретение.

ВНЕДРЕНИЕ В ПРАКТИКУ. По результатам работы получен патент на изобретение «Способ определения течения ревматоидного артрита» № 2027995 от 27/1-1995, выданный РосПатентом (Соавт.: Цай Е.Г., Бененсон Е.В.). Цитофлюориметрические экспресс-методы оценки функционального состояния лимфоцитов при ревматических заболеваниях используются в иммунологической лаборатории НПО «Профилактическая медицина».

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ. Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста, состоит из введения, 3 глав, выводов, практических рекомендаций, обзора литературы. Работа содержит 6 таблиц, 16 рисунков, 5 выписок из историй болезней. Указатель литературы включает 285 источников, в том числе 216 иностранных наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика больных и методы исследования

Клинико-иммунологические сопоставления проводились у 100 больных ревматоидным артритом (РА). Контрольную группу составили 80 здоровых доноров, а также 28 больных ОА (остеоартритом), 19 больных АС (анкилозирующим спондилоартритом), 16 больных Р (ревматизмом) и 18 больных СКВ (системной красной волчанкой).

Из 100 обследованных больных РА преобладали пациенты среднего возраста с полиартритической формой заболевания (87%), медленно прогрессирующим течением болезни (54%), серопозитивной формой (65%), с умеренной степенью активности РА (56%), II-III стадии (72%), II степени функциональной недостаточности суставов (61%). Внеуставные проявления имели 49 % больных. За период наблюдения больные получали глюкокортикоиды, короткие курсы базисных препаратов, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС). Для уточнения динамики и характера изменения цитофлюориметрических показателей в течение болезни и под влиянием лечения у 20 больных изучены эти показатели повторно через 4-6 недель стационарного лечения и в 3-й раз через 4-5 лет после первого обследования.

Для изучения прогностической способности показателей была сформирована группа больных РА (18 пациентов) в дебюте заболевания со стажем болезни от 1,5 месяцев до 1 года, у которых была прослежена динамика заболевания через 10 лет.

Исследование функциональной активности периферических лимфоцитов проводили в монослойных культурах, созданных на предметном стекле по

способу Краснюк А.Н. и соавт. (1985). Полученные монослой лимфоидных клеток погружали в инкубационные среды, основу которых составляла среда РТМИ-1640 без добавления сыворотки. Для изучения митогензависимой активации Т- и В-лимфоцитов в среду добавляли ФГА "Дифко" 1:400, ЛПС 5 мкг/мл пр-во НИИЭМ им. Гамалея. При исследовании супрессорной функции Т-клеток в среду вносили ЛПС 5 мкг/мл и преднизолон натрийфосфат 150 мкг/мл, производство "Сандоз" Индия. После одночасовой инкубации при 37°C монослойные культуры окрашивали в модифицированном методе Риглер Р. (1966) 0,001% акридиновым оранжевым (АО), цитофлюориметрировали. Количественную цитофлюориметрию проводили на базе люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ-ИЗ. Измеряли интенсивность флюоресценции в области 640 и 530 нм с площади поля зрения объектива малого увеличения в системе темного поля. Пролиферативную активность лимфоцитов изучали в цитофлюориметрическом тесте по способности активных участков нуклеиновых кислот ядра поглощать из раствора акридиновый оранжевый (АО). Метод основан на «Специфической флюоресценции лимфоидных клеток крови» (Бененсон Е.В., Цай Е.Г., А.С. №1328757 А1).

Полученные результаты выражали отношением величин флюоресценции Ф640/530 - параметр А по Риглеру Р. (1966), отражающий соотношение свободных от хромосомных белков РНК/ДНК. Изменения параметра А под влиянием митогенов, а также при подавлении супрессорной функции Т-лимфоцитов преднизолоном выражали индексом влияния митогенов и преднизолона (ИВ, а также в %). Индексы влияния вычисляли по формуле: $ИВ = A_{\text{митогена}} / A_{\text{контроль}}$. При этом индекс влияния (ИВ) меньше 1,0 свидетельствовал о преобладании покоящейся популяции лимфоцитов, а повышение ИВ больше 1,0 отражало преобладание преактивированной *in vivo* популяции лимфоцитов. Уровень митогензависимой активации лимфоцитов в процентах выводили по формулам $ИВ \text{ митогена} = (A_{\text{митогена}} - A_{\text{контроль}} / A_{\text{контроль}}) \times 100\%$. Величину супрессии (ИС) получали как разность в уровнях активации В-клеток в присутствии преднизолона под воздействием ЛПС и только под влиянием ЛПС. Для изучения иммуноглобулинсинтезирующей функции периферических В-лимфоцитов монослой лимфоцитов окрашивали сывороткой против глобулинов человека, конъюгированной с флюоресцентиницином (ФИПЦ) производства НИИЭМ им. Гамалея в прямом методе Кунс (1950). Количественную цитофлюориметрию проводили разработанным на кафедре методом (Бененсон Е.В., Цай Е.Г., АС № 1325787). Результаты выражали соотношением флюоресценции монослоя к его светорассеянию и к флюоресценции эталона (урановое стекло 2,3 мм). Данное соотношение считали величиной,

отражающей среднее количество иммуноглобулинов (ИГ), связанных с лимфоидной клеткой.

Способность показателей характеризовать тяжесть РА оценивали по критериям специфичности и чувствительности.

Все основные показатели статистически анализировали с выведением средних величин, их дисперсий и ошибок средней, доверительных интервалов и коэффициентов корреляции между функциональными параметрами, используя для анализа микроЭВМ В-3-34 и пакет статистических программ (Цветков А.Н. и др., 1984). А также расчеты проводили с помощью программы «MS Excel 5.0».

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1.0. Иммуноглобулинсинтезирующая функция лимфоцитов

При изучении нозологической специфичности В-активации установлено (рис.1), что по уровню внутриклеточных ИГ и частоте положительных результатов все группы с РЗ воспалительной природы в отличие от группы здоровых и больных ОА имели высокие показатели ИГ-синтеза лимфоидными клетками.

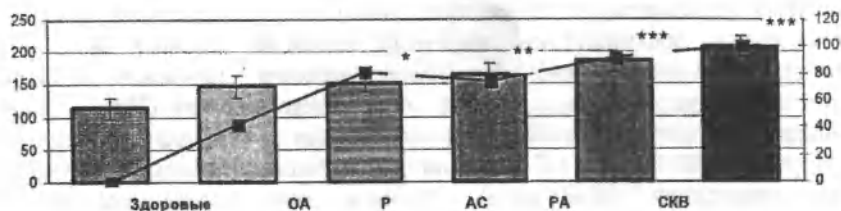


Рис.1. Иммуноглобулинсинтезирующая функция лимфоцитов больных РА и в контрольных группах ($M \pm m$ в условных единицах)

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

Причем, наиболее высокие значения показателя устанавливались в группе больных СКВ и РА ($207,6 \pm 16,1$ и $184,4 \pm 3,4$ у.е. соответственно). Полученные нами данные соответствуют результатам исследований Э.М. Миррахимовой (1989), Kliman D.M. et al., 1991, Ferraccioli G.F. et al., 1996. Существенные отличия по уровню ИГ, связанных с одной клеткой, установлены между Р и РА ($p < 0,001$). Эти данные также согласуются с исследованиями по спонтанной активности В-клеток при РА и СКВ (David-Ameline J. Lim A. Davodeau F.

,1996) и лимфоцитов с внутри-цитоплазматическими ИГ при РА и СКВ (Gause-Pfreundschuh A., 1996).

Уровень внутриклеточных ИГ у больных РА сопоставлен с клиническими особенностями болезни (табл.1).

Таблица 1
Иммуноглобулинсинтезирующая функция В-лимфоцитов у больных РА в зависимости от клинических признаков болезни

Показатели	n	ИГс (усл.ед)	
		M ± m	%
Вариант начала РА: с мелких суст.	45	$195,30 \pm 6,17$	97,7
	30	$175,70 \pm 5,05$	93,3
	25	$175,00 \pm 6,79$	84,0
Форма РА: моно-олигоартрит	13	$151,54 \pm 6,74$	61,5
	87	$189,25 \pm 3,91^{**}$	97,7
Серопозитивный	65	$194,3 \pm 4,64^{***}$	95,4
	35	$165,9 \pm 4,86$	82,9
с системными проявлениями	49	$207,12 \pm 4,98^{***}$	100
	51	$162,47 \pm 3,32$	86,3
Активность:	I	$155,70 \pm 3,50$	87,0
	II	$184,74 \pm 4,24$	89,3
	III	$216,76 \pm 8,98^{***}$	100
Стадия:	I	$157,88 \pm 8,02$	65,0
	II	$221,20 \pm 8,52$	84,1
	III	$221,52 \pm 7,33$	100
	IV	$202,10 \pm 14,47^{**}$	100
ФНС:	0-I	$172,20 \pm 7,06$	81,5
	II	$183,75 \pm 6,35$	93,4
	III	$214,66 \pm 8,67^*$	100
Вариант течения:	БТ	$159,64 \pm 3,84$	79,5
	НБТ	$200,15 \pm 4,53^{***}$	98,4

Примечание: БТ - благоприятное течение; НБТ - неблагоприятное течение; ФНС - функциональная недостаточность суставов; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

Обнаружена зависимость исследуемого показателя от наличия РФ, внесуставных проявлений болезни, высокой степени активности ревматоидного процесса, множественных поражений суставов, начала заболевания с мелких суставов. В целом же этот показатель существенно чаще устанавливается в подгруппе больных с тяжелым неблагоприятным течением болезни. Это и определяет его основное клиническое значение.

Полученные данные согласуются с исследованиями Gause-Pfreundschuh A., 1996, He X. et al., 1996, Berek C., Kim H.J., 1997.

Клинико-иммунологические сопоставления в группах больных не

позволяют установить зависимость показателя от демографических характеристик обследованных больных. Отсутствие связи уровня ИГ-секретирующей активности с национальной принадлежностью согласуется с данными по секреции ИГ (Мамасаидов А.Т., 1992), а также имеются косвенные подтверждения в исследованиях Lopez-Mendez A., Paul W.A., 1989.

В динамике заболевания через 5 лет и через 4-6- недель стационарного курса лечения существенных изменений уровня и частоты положительных значений показателя не произошло.

2.0. Проллиферативная активность Т- и В- лимфоцитов при РА

Изучение исходной и митогензависимой активации В- и Т- лимфоцитов по параметру *a* (рис. 2), индексам влияния (ИВ) митогенов в группах обследованных выявило ее достоверное повышение у больных РЗ по сравнению с донорами ($p < 0,001$). Что согласуется с результатами

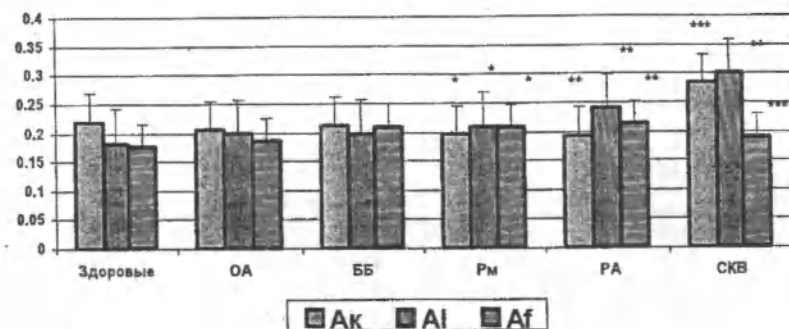


Рис.2. Митогензависимая активация В- и Т-лимфоцитов в группах обследованных по параметру *a*

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

исследований Wagner G. et al., 1998, Blass S. et al., 1999, Steiner G. et al., 1999. При этом практически у всех больных РА и СКВ отмечен эффект повышенного потребления АО, что говорит о высокой спонтанной активации ядерного хроматина лимфоцитов при РА и СКВ. Это соответствует данным Klinman D.M. et al., 1991, исследовавшими поликлональную активацию антителобразующих клеток при СКВ. Более выраженный у больных РА ответ на В-митоген ЛПС, чем на Т-митоген ФГА, выявляемый в АО-тесте, свидетельствует о преобладании гиперактивации В-клеточной популяции. Это

согласуется с исследованиями Guellmin F. et al., 1996, Schaser et al., 1996, David-Amelin J. et al., 1996.

Анализ структуры болезни в группах больных РА с ИВ митогенов >1 выявил следующие закономерности (табл. 2).

Таблица 2
Проллиферативная активность периферических Т- и В-лимфоцитов у больных РА в зависимости от клинических проявлений болезни

Клинический вариант	n	ИВ ЛПС		ИВ ФГА		
		M±m	%	M±m	%	
Моно-олигоартрит	7	1,22±0,084	57	1,10±0,057	57	
Полиартрит	39	1,29±0,025**	85	1,15±0,017**	85	
С системными проявлениями	23	1,33±0,022	96	1,19±0,023	96	
Без признаков системности	23	1,22±0,042**	61	1,08±0,028**	61	
РФ (+)	26	1,35±0,02	92,3	1,17±0,02	92,3	
РФ (-)	20	1,19±0,04***	60	1,08±0,04**	60	
Активность	I	10	1,24±0,05	80	1,12±0,04	80
	II	26	1,27±0,04	69,2	1,13±0,03	69,2
	III	10	1,36±0,03**	100	1,18±0,03**	100
Стадия	I	5	1,31±0,068	20	1,17±0,059	20
	II	20	1,24±0,042*	75	1,12±0,034*	75
	III	17	1,30±0,035	88	1,16±0,028	88
	IV	5	1,32±0,033	100	1,15±0,030	100
БТ	17	1,17±0,05	53	1,02±0,019	59	
НБТ	29	1,35±0,01***	96,4	1,21±0,032***	96,4	

Примечание: ИВ - индекс влияния митогенов; % - % положительных результатов показателя; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

Уровень и частота положительных результатов показателя В-митогениндуцированной активации лимфоцитов коррелировали с системными проявлениями, наличием РФ, неблагоприятным течением заболевания и не зависели от распространенности суставного процесса и стажа болезни.

Активация ядерного хроматина под влиянием Т-митогена в меньшей степени зависела от этих клинических особенностей РА. Выявленные закономерности указывают на соответствие цитофлуориметрических показателей пролиферативной активности лимфоцитов (по индексам влияния митогенов) клиническому полиморфизму РА, что подтверждает данные Macey M.G. et al., 1996, Waase I. et al., 1998. Данные по исследованию ПАЛ в АО-тесте согласуются с результатами исследований Namekawa T. et al., 1998, изучавших функциональные подклассы пролиферирующих CD4+ Т-клеток при

РА и обнаруживших нарушение способности обеспечивать В-клетки хелперным эффектом, что ассоциирует с экстраартикулярными поражениями при РА.

3.0. Супрессорная функция Т-лимфоцитов при РА

При исследовании исходной супрессорной функции (СФ) лимфоцитов у здоровых и больных РЗ (рис.3) на модели ядерного хроматина выявляются закономерности: ЛПС-стимулированные В-лимфоциты здоровых лиц отвечали дополнительным приростом активности ядерного хроматина в присутствии преднизолона.

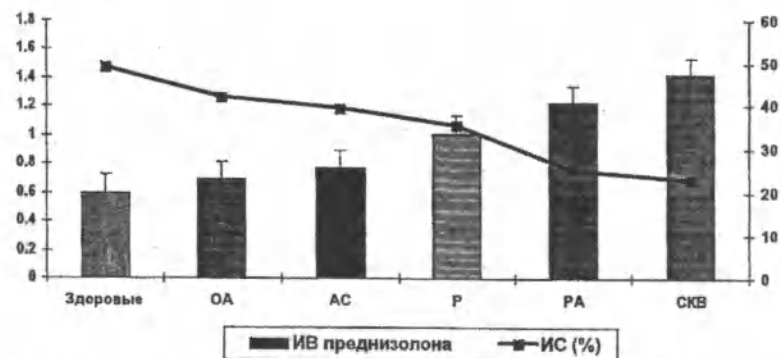


Рис.3. Супрессорная функция лимфоцитов (по ИВ_{пр} и ИС) при РА и в контрольных группах

Степень этого прироста и характер дополнительной активации (за счет ДНК или РНК) были различны в группах обследованных. Для здоровых лиц характерен наибольший прирост активности ядерного хроматина (49,4%) в основном за счет возрастания содержания в активированных клетках ДНК. Уровень СФ у здоровых принят за 100%. При основных РЗ степень дополнительной активации ядерного хроматина была меньшей, а характер этой активации был различным. У больных с ОА, АС и Р отмечали незначительное по сравнению со здоровыми лицами снижение уровня активации (42, 39 и 35% соответственно), что составляет 85-72% сохраненной СФ.

У больных РА и СКВ отмечен наименьший индекс супрессии (25,1 и 22,8% соответственно) и, следовательно, наибольшую степень потери СФ, что составило 50 и 45% сохранившейся супрессии. При этом прирост активации ядерного хроматина у больных РА и СКВ в отличие от больных ОА, АС и Р происходил за счет накопления РНК (ИВ_{пр}>1). При этом устанавливаются достоверные различия в уровне и характере дополнительной активации

ядерного хроматина у больных РА и СКВ, с одной стороны, и у больных другими РЗ, с другой, что в целом согласуется с данными Fox D.A. (1997) и Gaston J.S. (1998). В наших исследованиях в подгруппах с преобладанием преактивированных клеток определялся еще более низкий уровень ИС (до 19,9% при РА и 21,3% при СКВ). Обнаруженные статистически достоверные различия в уровнях супрессии внутри группы РА между подгруппами с исходнопокоящимися и преактивированными клетками подтверждают гипотезу об иммунологической неоднородности РА (Gay S., 1998). Однако, при СКВ между подгруппами с покоящимися и преактивированными клетками статистически значимого различия показателей супрессии не было установлено. Это, по-видимому, связано с исходно высокой при СКВ пролиферативной активностью популяции, отвечающей на стимуляцию ЛПС в условиях устранения супрессорного воздействия преднизолоном главным образом приростом РНК (ИВ>1), что подтверждает данные Э.М.Миррахимовой (1989).

При исследовании взаимосвязи СФ (табл.3) с клиническими признаками

Таблица 3

Супрессорная функция лимфоцитов при различных клинических проявлениях РА по ИВ_{пр} и индексу супрессии (ИС)

Клинические варианты	N	ИВ _{пр} (усл.ед.)	ИС(%)	
моно-олигоартрит	8	0,96 ± 0,06	28,13 ± 2,03	
полиартрит	38	1,18 ± 0,04 **	24,39 ± 1,94	
серопозитивный	26	1,14 ± 0,04	22,69 ± 1,90	
серонегативный	20	0,85 ± 0,06 **	29,70 ± 1,97	
активность	I ст.	10	0,95 ± 0,09	30,27 ± 2,07
	II ст.	26	0,97 ± 0,06	26,04 ± 2,18
	III ст.	10	1,20 ± 0,02***	20,00 ± 2,33
с висцеритами	34	1,16 ± 0,03	20,53 ± 1,86	
без висцеритов	12	0,83 ± 0,07**	31,02 ± 2,04**	
стадия	I	4	0,98 ± 0,09	25,56 ± 1,91
	II	19	1,11 ± 0,10**	23,16 ± 2,02
	III	18	1,04 ± 0,07	24,37 ± 1,89
	IV	5	0,96 ± 0,08	26,11 ± 2,06
ФНС	I ст	9	1,09 ± 0,05*	22,66 ± 2,31
	II ст	30	1,10 ± 0,08	23,87 ± 2,04
	III ст	7	0,89 ± 0,06	25,19 ± 1,91
Н БТ	29	1,19 ± 0,02***	20,54 ± 1,50	
БТ	17	0,75 ± 0,06	33,22 ± 1,84***	

Примечание: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001.

РА установлено, что умеренное ее снижение сочетается в основном с благоприятными проявлениями болезни (моно- и олигоартрит,

серонегативность, отсутствие висцеритов, минимальная активность и стадия, низкая степень функциональной недостаточности); более глубокое снижение СФ ассоциирует с неблагоприятным вариантом течения и тяжести РА (наличие системных поражений, серопозитивность по РФ, высокие степени активности и прогрессирования хрящевой деструкции и функциональной недостаточности суставов, быстрые темпы развития этих проявлений).

Установлено, что показатели СФ не зависят от снижения клинической активности в конце курса стац. лечения под влиянием НПВС, а также малоизменчивы в течение болезни (рис.4).

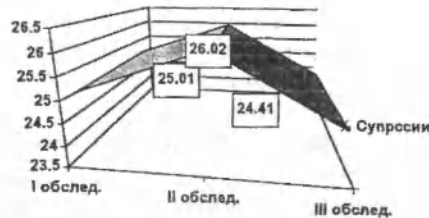


Рис.4. Динамика показателей СФ при РА (по ИС в %)

Это свидетельствует о его низкой динамичности и способности отражать, по-видимому, более глубокие, чем клиническая активность болезни, процессы, связанные с генетически детерминированным уровнем активации лимфоидных клеток, или в общем виде иммунодефицита, свойственных данному организму и не претерпевающему существенных изменений в течение болезни и под влиянием лечения.

4.0. Комплексный анализ цитофлюориметрических экспресс-методов оценки иммунологической активности РА

У обследованных больных с различными по тяжести течения вариантами РА, устанавливались следующие соотношения показателей (рис.5): при неблагоприятном течении болезни существенно чаще обнаруживались ревматоидный фактор (РФ) и особенно снижение СФ, по ИГ-синтезирующей функции эти группы достоверно не различались, при неблагоприятном течении – обратные соотношения этих показателей.

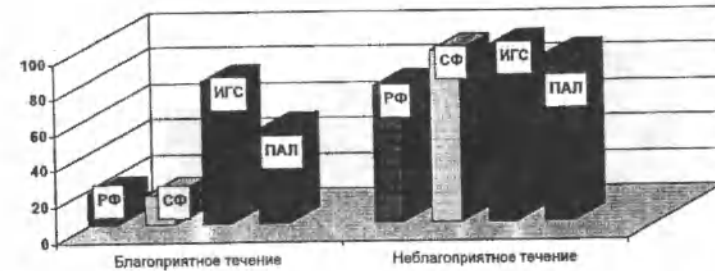


Рис 5. Показатели функциональной активности лимфоцитов при различных по тяжести вариантах РА по встречаемости положительных результатов в %

В оценке варианта тяжести РА сопоставляемые методы различаются по чувствительности и специфичности (рис. 6). При изучении чувствительности методы оценки функциональной активности лимфоцитов имеют по существу максимальные, примерно одинаковые значения (93-98%), превышающие (на 16-21%) чувствительность РФ. При сравнении специфичности этих методов тяжесть болезни примерно одинаково отражают РФ (82%) и СФ (83%), и в меньшей мере пролиферативная (50%) и ИГ-синтезирующая (41%) функции лимфоцитов.

Анализ частоты положительных значений экспресс-показателей иммунологической активности в группах больных РА, различных по степени активности, серопринадлежности и наличию висцеритов показал, что все три метода оценки функционального состояния лимфоцитов при РА характеризуют параметры болезни. Причем, положительные значения ИВ_Р по сравнению с показателем ПАЛ и ИГС наиболее существенно преобладали в подгруппах больных с высокой степенью активности, серопозитивностью и системностью.

В процессе 10-летнего клинического наблюдения за пациентами, обследованными в дебюте заболевания установлен вариант течения РА, который ретроспективно сопоставлен с показателями функциональной активности лимфоцитов периферической крови этих больных. Выявлена (рис. 6) высокая прогностическая способность показателя супрессорной функции (ИВ_{ИР}): у 10 из 11 больных (90,9%) с БТ РА в начале заболевания определялся ИВ_{ИР} <1, а у 100% больных с НБТ определялся в дебюте болезни ИВ_{ИР} >1.

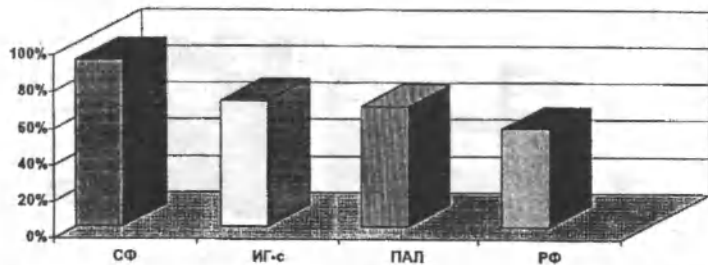


Рис. 6. Прогностическое значение показателей иммунологической активности при РА
Примечание: по оси Y - % подтвержденных случаев

Такие показатели, как ПАЛ, оцененная по IB_{LPS} и IB_{FHA} , ИГ-синтезирующая активность лимфоцитов и титры РФ, по способности прогнозировать вариант течения РА распределились следующим образом: ИГС – 69%, $IB_{митогенов}$ – 66%, РФ – 54%.

В каждом конкретном случае снижение индекса супрессии и значение $IB_{ПР} > 1$ указывает на более тяжелый вариант и имеет неблагоприятное прогностическое значение, что подтверждается данными 10-летнего проспективного наблюдения (Патент на изобретение № 2027995 от 27/1-95г.). Т-клеточные маркеры как инструмент для раннего прогноза РА признаются и другими авторами (Отт Р., 1996).

ВЫВОДЫ:

1. Обнаружены существенные различия по уровню функциональной активности лимфоцитов между группами обследованных. Группы больных с РЗ достоверно отличались от здоровых высокими показателями ИГ-синтезирующей, пролиферативной и снижением супрессорной активности периферических лимфоцитов.
2. При РА установлено существенное достоверное снижение супрессорной функции лимфоцитов, изученной в цитофлюориметрическом тесте по ранним процессам активации ядерного хроматина в ЛПС-стимулированной культуре периферических лимфоцитов в присутствии преднизолона, оцененной по индексу супрессии (ИС) в зависимости от фазы клеточного цикла ($IB_{ПР}$).
3. Выявлена иммунологическая неоднородность внутри группы пациентов с РА и обнаружены корреляции ИГ-синтезирующей, пролиферативной (по

параметру a и $IB_{митогенов}$) и супрессорной активности (по $IB_{ПР}$ и ИС) с клиническими проявлениями РА: с высокой степенью активности, полиартритическим вариантом, наличием РФ, внесуставными проявлениями, быстропрогрессирующим течением.

4. Показана стабильность показателей ИГ-синтезирующей активности лимфоцитов, митогензависимой активации и супрессорной функции при обычном естественном течении болезни после 4-5 недельного курса стационарного лечения, а также при длительном наблюдении за 5 лет.
5. Разработан новый способ определения тяжести течения РА по степени снижения супрессорной функции лимфоцитов и состоянию активности ядерного хроматина: умеренно сниженная супрессорная функция, контролирующая процессы активации ядерного хроматина в популяции В-клеток ($IB_{ПР} < 1$) характерна для благоприятных вариантов болезни; более выраженное снижение супрессорной функции, сочетающееся с высокой исходной активностью ядерного хроматина популяции ($IB_{ПР} > 1$), определяет вариант тяжелого течения РА.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Целесообразно определять уровни ИГ-синтезирующей, митогениндуцированной пролиферативной активности и степень снижения супрессорной функции лимфоцитов для комплексной оценки нарушений иммунного статуса при РА и с целью его дифференциальной диагностики от других РЗ.
2. Рекомендуется определять степень снижения супрессорной функции по $IB_{ПР}$ на ранней стадии РА с целью определения варианта течения и прогноза РА для своевременного подбора иммуномодулирующей базисной терапии.

Основное содержание диссертации отражено в следующих публикациях:

Статьи:

1. Иммуноглобулинсинтезирующая и пролиферативная активности лимфоцитов при ревматоидном артрите и остеоартрозе. // В кн.: Клиническая иммунология ревматических болезней (иммунодиагностика и терапия). - Т. 168. - Фрунзе, 1988. - С. 44-50.
2. Синтез и секреция иммуноглобулинов в краткосрочных культурах периферических лимфоцитов при РА. // Иммунология. - 1990. - № 2. - С. 55-57 (Соавт.: Бененсон Е.В., Цай Е.Г., Панов В.Г.)

3. Цитофлюориметрический анализ функциональной активности лимфоцитов крови при ревматоидном артрите. // Иммунология. -1991. - №2 - С.49-52. (Соавт.: Бененсон Е.В., Цай Е.Г.)
4. Иммуноглобулинсинтезирующая функция лимфоцитов при ревматоидном артрите. //В кн.: «Современная медицина на рубеже XX-XXI веков». - Бишкек, 2000. - С.621-626. (Соавт.: Умарова С.И.)
5. Применение опросника SF-36 для оценки качества жизни при внутренних заболеваниях.// В кн.: «Хирургия в период экономических реформ», Бишкек, 2001. - С.113-117. (Соавт.: Бримкулов Н.Н., Мергенбаева Т.К., Курумшиева А.Ш.)
6. Цитофлюориметрический анализ пролиферативной и иммуноглобулинсинтезирующей функции периферических лимфоцитов при ревматоидном артрите и других ревматических заболеваниях. // В кн.: Проблемы, стратегия и перспективы развития медицины труда в горных регионах. - Бишкек, 2002. - С.251-256.
7. Сравнительный анализ клинического значения цитофлюориметрических экспресс-методов оценки иммунологической активности ревматоидного артрита. // В кн.: Проблемы, стратегия и перспективы развития медицины труда в горных регионах. - Бишкек, 2002. -С.256-261.
8. Прогнозирование течения ревматоидного артрита. // Вестник КРСУ. -2002. - № 1, Т. II. (принято в печать).

Тезисы:

1. К особенностям В-активации при ревматоидном артрите. - Иммунный гомеостаз в норме и патологии. Лобанченко О.В. //Тезисы докладов конференции молодых ученых, посвященной 50-летию института.- Фрунзе, 1989. - С. 49.
2. Особенности иммунного статуса и новые возможности иммунокоррекции при ревматических заболеваниях воспалительного типа. Бененсон, Е.В.Цай, Е.Г., Миррахимова Э.М., Лобанченко О.В., Мамасаидов А.Т., Игембердиева Р.З., Батайкина Е.А. //Тезисы докладов Пленума правления Всесоюзного научного общества терапевтов. - Фрунзе, 1989. - С.20-21.
3. Особенности иммуногенеза основных ревматических заболеваний. Бененсон Е.В., Лобанченко О.В., Батайкина Е.А., Табышалиева А.С., Мамасаидов А.Т. //Тезисы докладов Всесоюзного иммунологического съезда. - Сочи, 1989. - С.18.
4. Экспресс-показатели В-активации в оценке иммунного статуса и иммунореабилитации. Бененсон Е.В., Цай Е.Г., Лобанченко О.В., Мамасаидов А.Т. //Тезисы докладов II Международного симпозиума: Реабилитация иммунной системы. - Дагомыс, 1990. - С. 92.
5. В-активация и супрессорная функция лимфоцитов при различных вариантах

- ревматоидного артрита. Бененсон Е.В., Мамасаидов А.Т., Цай Е.Г., Лобанченко О.В. //Тезисы докладов IV Всесоюзного съезда ревматологов.- Минск, 1991. - С. 139.
6. Пролиферативная активность лимфоцитов при ревматоидном артрите и ревматизме. Лобанченко О.В. //Тезисы докладов на III съезде кардиологов. - Бишкек, 2001. - С. 105.
 7. Immunocytology of B-cells in Rheumatoid Arthritis (RA) and Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Benenson E.V., Tsy E.G., Lobanchenko O.V., Mamasaidov A.T. //Abstracts of Immunological Societies, 10th meeting. Edinburgh, 1990. - P. 24.
 8. Monitoring of initial cell cycle phase and supres-sor function in freshly isolated lymphocytes in Rheumatoid Arthritis (RA) Benenson E.V., Tsy E.G., Lobanchenko O.V. //Abstracts of 8th International Congress of Immunology. Budapest, Hungary, 1992. - W-103/II-4. - P. 645.
 9. New in vitro test-systems in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. Benenson E.V., Tsy E.G., Lobanchenko O.V., Mamasaidov A.T. // Abstracts of International Conference on immunorehabilitation.- Sochi, 1992. - P. 32.

Патент на изобретение

1. Способ определения течения ревматоидного артрита. Патент на изобретение № 2027995 от 27/1-1995, выданный РосПатентом. (Соавт.: Цай Е.Г., Бененсон Е.В.)

АННОТАЦИЯ

диссертации Лобанченко О.В. на тему

«Клинический анализ цитофлюориметрических экспресс-методов оценки иммунологической активности ревматоидного артрита»
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук
по специальности 14.00.05 – внутренние болезни

В настоящей работе изучено клиническое значение цитофлюориметрических экспресс-показателей функциональной активности периферических лимфоцитов, отражающих процессы пролиферации, иммунорегуляции и В-активации у 100 больных с различными вариантами ревматоидного артрита.

Полученные результаты свидетельствуют об иммунологической неоднородности внутри группы пациентов с РА. Обнаружены корреляции показателей ИГ-синтезирующей, пролиферативной (по параметру *a* и индексам влияния митогенов) и супрессорной функции лимфоцитов с клиническими проявлениями РА: высокой степенью активности, полиартритическим вариантом, серопозитивностью, наличием висцеритов и внесуставных проявлений, быстропрогрессирующим течением, но не с рентгенологической стадией, стажем болезни и демографическими характеристиками пациентов.

Показана стабильность показателей ИГ-синтезирующей активности лимфоцитов, митогензависимой активации и супрессорной функции при обычном естественном течении болезни после 4-5 недельного курса стационарного лечения, а также при длительном наблюдении за 5 лет.

Разработан новый способ определения тяжести течения РА по степени снижения супрессорной функции лимфоцитов и состоянию активности ядерного хроматина: умеренно сниженная супрессорная функция, контролирующая процессы активации ядерного хроматина в популяции В-клеток ($ИВ_{ГР} < 1$) характерна для благоприятных вариантов болезни, более выраженное снижение супрессорной функции, сочетающееся с высокой исходной активностью ядерного хроматина популяции ($ИВ_{ГР} > 1$) определяет вариант тяжелого течения РА.

SUMMARY

of the thesis of Lobanchenko O.V. on the theme:

"Clinical analysis of rapid flow cytometric methods for assessing the activity of rheumatoid arthritis"

for receive the degree of candidate of medical science 14..00.05.- inner decases.

The aim of this work was to study the clinical significance of flow cytometric express-indices of peripheral lymphocyte functional activity relating to proliferation, immunoregulation and B-activation processes in 100 patients with different variants of rheumatoid arthritis (RA).

The obtained data revealed significant differences in Ig-synthesizing, proliferative and suppressor activity indicators when patients with arthritic diseases were compared between themselves and with healthy subjects.

The obtained data indicate immunological heterogeneity within the group of patients with RA. Lymphocyte Ig-synthesizing, proliferative (by the parameter a and mitogen influence indices) and suppressor activities were correlated with such clinical manifestations of RA as highly active RA, polyarthritic variant, seropositivity, the presence of visceritides and extra-articular manifestations, a rapidly progressive course but not with a roentgenological stage, duration of disease and demographical characteristics.

Lymphocyte Ig-synthesizing, mitogen-dependent activation and suppressor function indicators were found to be stable for RA with a normal natural course after 4-5 weeks of hospital treatment as well as in a long-term follow-up of 5 years.

According to the results of sensitivity and specificity studies of these tests in assessing severity of RA, the suppressor function indicator was the most clinically important. This test has higher specificity compared to B-activation and higher sensitivity compared to RF.

A new method was developed for determining clinical severity of RA by degree

of lymphocyte suppressor function reduction and nuclear chromatin activity: moderate reduction of suppressor function regulating nuclear chromatin activation processes in B-cells (prednisolone influence index < 1) is characteristic of benign variants of RA and a more marked reduction of suppressor function combined with high base-line nuclear chromatin activity of B-cells (prednisolone influence index > 1) is indicative of a severe variant of RA.

КОРУТУНДУСУ

О.В. Лобанченко "Ревматоиддик артрит боюнча цитофлюориметриялык экспресс-методунун клиникалык анализи"
деген тамадагы, 14.00.05 -

Диссертацияда ревматоидуу артриттин ар кандай варианттары менен ооруган 100 кишинин перифериялык лимфоциттердин функцияналдык активдуулугунун цитофлюориметриялык экспресс-корсоткучторунун (пролиферация процессин, иммунорегуляцияны жана В-активдуулугун корсотуучу) клиникалык мааниси изилденген. Алынган маалыматтар РА менен ооругандардын ИГ-синтездечу, пролиферативдик жана супрессордук активдуулук корсоткучтору боюнча оз ара группаша жана контролдук группаша кескин айырмаларын аныктады.

Алынган результаттар РА менен ооруган пациенттердин оз ара иммунологиялык айырмалануусуна кубо болот. Лимфоциттин ИГ-синтездечу, пролиферативдик (a параметри жана митоген индексинин таасири), супрессордук функциянын корсоткучтору менен РА клиникалык симптомдорунун: ото чоп активдуулугу, полиартрит варианты, серопозитивдуулугу, висцерит менен муундан сырткары оорунун турлору, тез прогресс менен отушу, (рентгенологиялык стадияда эмес) оорунун стажы, пациенттердин демографиялык озгочолуктору менен болгон корреляция аныкталды.

РА менен ооруган пациенттерди 4-5 жумалык стационардык дарылоодон кийин жана 5 жылга чейин байкоодо лимфоциттин ИГ-синтездечу активдуулугу митоген коз каранды активтуулугу жана супрессордук функциянын корсоткучторунун стабилдуу экени кеорсотулгон. Изилдоолордун маалыматы сезгич жана спецификалык параметрлери боюнча РА варианттарын баалодо супрессордук функция кобууроок клиникалык мааниге ээ. Бул тест В активтуулугунун корсоткучторуно салыштырмалуу эн коп специфтуу, ал эми РФ менен салыштырганда эн коп сезгичтуу. Лимфациттердин супрессордук функциясынын азаячу даражасы менен жана ядролук хроматиндин активтуулугу боюнча РА варианттарын актыктоого жаны метод иштелип чыккан. В клетка популяциясындагы ($ИВ_{ГР} < 1$) ядролук хроматиндин активдуулук процессин текшеруучу супрессордук функциянын кичине азайышы РА женил вариантына муноздуу ($ИВ_{ГР} > 1$) популяциядагы ядролук хроматиндин мурунку кучтуу активдуулугу супрессордук функциянын ото азайышы менен бирге РА оор вариантын аныктайт.