

2004-863
АКАДЕМИЯ НАУК КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ

На правах рукописи

УДК 612.017.1; 616.7; 612 – 002.77

Давлетова Чолпон Имаммусейиновна

**АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩАЯ И
ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ ФУНКЦИИ
ЛИМФОЦИТОВ С РУМАЛОНОМ У БОЛЬНЫХ
РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ**

03.00.13 – физиология, 14. 00. 36 – аллергология и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

*диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук*

Бишкек – 2004

Работа выполнена в лаборатории иммунологии Национального центра кардиологии и терапии при МЗ КР

Научный руководитель:

заслуженный деятель науки КР,
доктор медицинских наук,
профессор

М.И.Китаев

Научный консультант:

доктор медицинских наук,
профессор

Э.М.Миррахимов

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

В.Н.Кобзарь

доктор медицинских наук

Г.М.Саатов

Ведущие организации:

Российский университет дружбы народов (г. Москва)

ЗАО «Казахская академия питания» (г. Алматы)

Защита состоится «[^]» 2 0 0 4 г. в /[^] часов _____ мин на заседании диссертационного совета Д 03.04.262 при Институте биотехнологии Национальной Академии наук КР (720071 г.Бишкек, пр.Чуй 265).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Национальной Академии наук КР

Автореферат разослан

[^]_[^]^2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Ревматические заболевания и сегодня представляют серьезную медицинскую и социальную проблему. Одним из наиболее частых заболеваний этой группы является ревматоидный артрит (РА), который встречается практически во всех климатических широтах и во всех странах мира независимо от уровня экономического развития. Им страдает около 1% населения земли.

Ревматоидное воспаление развивается на иммунной основе. Иммунные сдвиги при РА рассматриваются, как генетически обусловленные дефекты иммунорегуляции (Беневоленская Л.И., 1985; Утазс) I. e1 al., 1998), в реализации которых принимают участие бактериальные антигены, в частности, стрептококки группы В и вирус Эпштейна — Барра, локализующиеся в В - лимфоцитах (Зборовский А.Б. и соавт., 1987; 2етрег1 В.А. e1 al., 1982; 2онсle1 M. e1 al., 1989). Однако, инфекционная природа РА не получила убедительного подтверждения, хотя в этом направлении продолжают поиски. Не снимается вопрос о пусковом влиянии инфекции и других экологически неблагоприятных факторов на развитие аутоагрессии (Pore! Oeпуз К.У., 1997).

Согласно другим взглядам, в основе РА лежит формирование аутоиммунного воспаления под влиянием неидентифицированного пока аутоантигена (Pepelore M. e1 al., 1989; \Уеуапс1 С.М., Сооопгу У.У., 1997).

К настоящему времени конкретные механизмы деструкции суставов при РА не совсем ясны. Постулируется положение о генетической предрасположенности к этому заболеванию (\Уеуапс1 С.М., Сооопгу У.У., 1997).

В развитии иммунного воспаления при РА особое значение придается циркулирующим иммунным комплексам (ЦИК), которые могут осаждаться на мембранах клеток, вызывая повреждение тканей путем воспаления. Eop! Oeпуз К.У.(1997) считает, что ЦИК могут провоцировать обострение заболевания. Основная роль в формировании ЦИК отводится ревматоидному фактору (РФ), который является антителом против собственных 1§0 (Ширинский В.С., Кирикова С.Ф., 1989). Патогенез внесуставных проявлений РА во многом связан с развитием иммунокомплексного воспаления.

Возможно также прямое цитотоксическое действие антител и непосредственное поражение тканей сенсibilизированными лимфоцитами, однако этот вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

Существенным звеном в механизме аутоиммунного процесса является способность сенсibilизированных лимфоцитов разрушать клетки - мишени, нагруженные специфическим антигеном. При РА эта сторона вопроса в диагностическом плане не исследовалась.

Вопросы этиологии и патогенеза этого заболевания дискутируются. Ведущее значение в патогенезе РА придается аутоиммунным процессам,

запускаемым неидентифицированным пока антигеном. В формировании ревматоидного воспаления существенная роль отводится циркулирующим иммунным комплексам, связанным с антиглобулиновыми антителами - ревматоидным фактором (Сперанский А.И., 1983; Огозтап У.М., Вгаби Е., 1997; СЯТ А., 1999).

Развитие этого заболевания связано с В-клеточной активацией, приводящей к неконтролируемому синтезу антител (Насонова В.А., 1997). Активаторами этого процесса выступают различные компоненты соединительной ткани и особенно коллагены хряща (Регш У.ел а!., 1990; ЛЛТ М.У., 1990).

В недавнее время появились сообщения о возможности использования в качестве антигена для выявления аутоантител стандартизованного препарата «Румалона», содержащего антигены протеогликанов хряща (Богомолова Н.А. и соавт., 1991; Мамасаидов А.Т., 1997; AnGelcl M., 1987; МасгошИг К Ж., 1991).

Существенным звеном в механизме аутоиммунного воспаления является способность сенсibilизированных лимфоцитов фиксировать на своей поверхности специфический антиген (Гариб Ф.Ю., 1978), в данном случае протеогликан хряща, и разрушать нагруженные им клетки-мишени. При РА такого рода исследования с использованием в качестве антигена румалона, содержащего протеогликан хряща, не проводились. Практически не изучена возможность использования иммуно-аллергических реакций лейкоцитов с румалоном в качестве дополнительных критериев иммунодиагностики этого заболевания - оценки костно-суставной деструкции, активности специфического процесса и его дифференциальной диагностики со смежной патологией.

Цель исследования: изучить возможности использования румалона в иммуно-аллергических реакциях лейкоцитов у больных ревматоидным артритом с целью повышения эффективности иммунодиагностики этого заболевания.

Задачи исследования:

1. Разработать модификацию цитотоксического эффекта лимфоцитов с румалоном для выявления у больных ревматоидным артритом киллерной активности Т-лимфоцитов, сенсibilизированных к протеогликанам хряща.
2. Определить клиническое значение модификации цитотоксического эффекта лимфоцитов крови и синовиальной жидкости с румалоном у больных ревматоидным артритом.
3. Провести сравнительное сопоставление информативности цитотоксического эффекта лимфоцитов и иммуносцифического торможения миграции лейкоцитов с румалоном у больных ревматоидным артритом.

4. Исследовать содержание румалонсвязывающих лимфоцитов в крови и синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом и оценить их значение в иммунодиагностике этого заболевания.
5. Оценить диагностическую информативность реакции аутолейкоцитоза с румалоном у больных ревматоидным артритом.

Научная новизна исследования:

1. Выявлен в крови и синовиальной жидкости у больных ревматоидным артритом пул Т-лимфоцитов-киллеров с высокой цитотоксической активностью по отношению к клеткам-мишеням, нагруженным антигенами протеогликанов хряща. Величина этого показателя отражает развитие гиперчувствительности замедленного типа и зависит от стадии и активности заболевания.
2. Впервые обнаружено при ревматоидном артрите резкое повышение числа румалонсвязывающих лимфоцитов в крови и синовиальной жидкости соответственно стадиям и активности заболевания. Феномен обладает диагностической информативностью и выявляется при ранней стадии заболевания и минимальной степени активности специфического процесса.
3. Реакция аутолейкоцитоза с румалоном у больных ревматоидным артритом, отражающая развитие гиперчувствительности немедленного типа к протеогликанам хряща, обладает высокой информативностью и может быть использована в качестве вспомогательного теста для ранней диагностики этого заболевания.

Практическая значимость работы

Предлагаются модифицированные методы количественного учета аутолейкоцитоза, антигенсвязывающих и цитотоксических лимфоцитов в крови и синовиальной жидкости с румалоном в качестве дополнительных критериев ранней и дифференциальной диагностики ревматоидного артрита, оценки величины костно-суставной деструкции и степени активности специфического процесса.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Применение иммуно-аллергических реакций лейкоцитов с румалоном, содержащий протеогликан хряща, позволяет повысить эффективность лабораторной диагностики ревматоидного артрита.
2. Тесты парной агглютинации лимфоцитов и аутолейкоцитоза с румалоном имеют вспомогательное значение в ранней и дифференциальной диагностике ревматоидного артрита.

3. У больных ревматоидным артритом выявляют высокое содержание в крови и синовиальной жидкости цитотоксических и антигенсвязывающих лимфоцитов с румалоном соответственно величине костно-суставной деструкции и степени активности специфического процесса.

Структура диссертации. Диссертация изложена на русском языке на 112 страницах компьютерного текста и иллюстрирована 14 таблицами и 10 рисунками. Состоит из введения, обзора литературы, глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 221 наименований, в том числе 167 работ из стран дальнего зарубежья.

Апробация работы. Работа доложена и обсуждена на межотделенческой конференции НЦКТ (10.02.2003 г.). По материалам диссертации сделаны доклады на 9-ом международном конгрессе Ассоциации ревматологов Азии (Сингапур, 2000), на III Международном Конгрессе кардиологов тюркоязычных стран и IV Конгрессе Ассоциации кардиологов Центральной Азии (Бишкек, 2002).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых периодических изданиях.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Иммунологические исследования проведены у 373 больных ревматоидным артритом преимущественно женского пола (83,3%) в возрасте 20-65 лет, находившихся на стационарном лечении в Национальном центре кардиологии и терапии при МЗ КР. Диагноз устанавливался в соответствии с критериями американской ревматологической ассоциации врачами отделения ревматологии НЦКТ к.м.н. А.Х. Миррахмедовой и к.м.н. К.А. Джайлобаевой, при консультации профессора Э.М.Миррахимова. В контрольную группу вошли 82 практически здоровых лиц. В группы сопоставления включены 118 больных остеоартрозом (ОА) и 121 больной реактивным артритом (РеА).

Оценку активности РА проводили по совокупности клинических и лабораторных данных. Определение рентгенологической стадии заболевания осуществлялось согласно классификации, принятой Всесоюзным обществом ревматологов (1980).

Методы исследования включали определение ревматоидного фактора, острофазовых показателей воспаления (С-реактивный белок, СОЭ, фибриноген), БЕ- клеток.

Ревматоидный фактор (РФ) в сыворотке крови определяли с помощью реакции Ваалер-Роуза и латекс-теста. Согласно международной

классификации болезней (1990) выделяли серопозитивный (титр РФ > 1: 24) и серонегативный (титр РФ < 1: 24) варианты РА.

Устанавливали степень активности РА: I - минимальную, II - среднюю, III - максимальную. Их определение основывалось на совокупности клинических признаков (выраженности экссудативного компонента воспаления, числа пораженных суставов, наличия внесуставных проявлений) и лабораторных показателей СОЭ (скорость оседания эритроцитов), СРБ (С - реактивный белок), определение ревматоидного фактора (РФ). (Насонова В. А., 1997).

Исследовались следующие клеточно-опосредованные иммунологические реакции:

1. Цитотоксический эффект лимфоцитов (ЦТЭ).
2. Реакция парной агглютинации лимфоцитов антигеном (ПАЛ).
3. Феномен торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ).
4. Реакция аутолейкоцитолита.

Цитотоксическую активность сенсibilизированных Т-лимфоцитов при РА изучали с помощью цитотоксического эффекта по В.Л. Морозову и соавт. (1980) в нашей модификации. В этом феномене эффекторными клетками являются Т-лимфоциты периферической крови больных РА, а в качестве клеток-мишеней нами использовались не эритроциты барана, а собственные эритроциты больных, нагруженные стандартизованным препаратом хряща - румалоном, содержащим антигены протеогликанов хряща.

В контроле учитывали воздействие Т-лимфоцитов на аутоэритроциты ненагруженные антигеном. Феномен иммунологически специфичен, отражает повышенную чувствительность замедленного типа.

Реакция цитотоксического эффекта лимфоцитов (ЦТЭ) включала следующие этапы:

1. выделение лимфоцитов из периферической крови;
2. выделение и подготовка аутоэритроцитов;
3. инкубация лимфоцитов с клетками-мишенями, нагруженными румалоном;
4. оценка результатов реакции.

Пробу, где лимфоциты были в контакте с сенсibilизированными эритроцитами, колориметрировали на фотозлектроколориметре при синем светофилт্রে, против контроля сенсibilизированных эритроцитов, а пробу, где лимфоциты были в контакте с несенсibilизированными эритроцитами - против контроля несенсibilизированных эритроцитов.

Для сопоставления нами ставилась реакция *торможения миграции лейкоцитов* с румалоном, которая является одним из базовых методов гиперчувствительности замедленного типа. Ответственными за эту реакцию являются сенсibilизированные лимфоциты, которые при контакте с антигеном выделяют белковый фактор МИФ (миграции ингибирующий фактор), задерживающий миграцию лейкоцитов (индикатор реакции).

Торможение миграции лейкоцитов связано с Т-лимфоцитами. Реакцию ставили в открытых капиллярах по методике Д.К. Новикова. и соавт. (1977). С помощью окуляр-микрометра определяли величину миграции основной массы лейкоцитов от границы эритроцитарного осадка в контроле и опыте. Результаты выражали в виде процента миграции в опыте относительно контроля.

Выявление циркулирующих антигенсвязывающих лимфоцитов проводили методом *парной агглютинации* их антигеном по Р.М. Хаитову, Ф.Ю. Гарибу (1973). Феномен основан на способности сенсibilизированных лимфоцитов связывать специфический антиген и объединяться в парные агглютинанты. В качестве антигена в этой реакции нами использовался препарат румалона. Содержание антигенсвязывающих лимфоцитов в мазках выражали в процентах к общему числу лимфоцитов. Подсчет лимфоцитов проводили в иммерсионной системе (УВ 15х90), подсчитывали 400 свободно лежащих клеток, отмечая среди них число сдвоенных или строенных клеток. Вычитали из числа антигенсвязывающих лимфоцитов опыта соответствующее число в контроле и результат выражали в процентах к числу свободно лежащих лимфоцитов в мазке.

В механизме феномена *аутолейкоцитоза* играет роль реакция аллергена с антителами на поверхности лейкоцитов. Участие в механизме этого феномена сывороточных факторов сближает его с реакциями гиперчувствительности немедленного типа. Подсчет лейкоцитов производили в ста больших квадратах счетной камеры Горяева.

В качестве антигена в аутоиммунных реакциях при ревматоидном артрите и в группах сопоставления нами использовался стандартизированный препарат хряща – *румалон*, содержащий антигены протеогликанов хряща (Богомолова И.А. и соавт., 1991; Мамасаидов А.Т., 1997; Anfeld M., 1987; Macrowitz R. et al., 1991). В 1 мл коммерческого румалона (Робафарм А.Г., Базель, Швейцария) содержится 3,5 мг хряща (Anfeld M., 1987; Macrowitz R., Reese Y.H., Young R.J. et al., 1991), в том числе 1,8 мг/л гликозаминогликан-протеинового комплекса.

Во всех реакциях с кровью и синовиальной жидкостью больных и здоровых (контрольная группа) нами использовался румалон серии 4571 MFD 12/90.

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с помощью вариационно-статистических методов. Определялись средняя арифметическая, среднее квадратичное отклонение, ошибка средней арифметической, критерий «t» по Стьюденту, доверительные интервалы и стандартные отклонения, коэффициенты корреляции (Е.В. Гублер, А.А. Генкин, 1973).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

У больных РА изучали лейкоцитарно-опосредованные реакции с румалоном, содержащий протеогликан хряща, возможность исследования этих феноменов для оценки активности специфического процесса, костно-суставной деструкции и его дифференциальной диагностики со смежной патологией.

Цитотоксический эффект лимфоцитов с использованием в качестве антигена румалона определяли у 168 больных РА преимущественно женского пола (83%) в возрасте от 20-65 лет.

В группы сопоставления вошли больные с остеоартрозом (ОА, 55 чел.) и больные реактивным артритом (РеА, 52 чел.). Контрольную группу составили 25 практически здоровых лиц.

В крови больных РА выявлен пул сенсibilизированных к румалону лимфоцитов с высокой цитотоксической активностью к клеткам-мишеням, нагруженным этим антигеном (табл.1).

Таблица 1.

Цитотоксический эффект лимфоцитов крови с румалоном у больных ревматоидным артритом по стадиям заболевания

Группы	n	M ± m, усл. ед.	Число больных	
			ЦТЭ > нормы (M + mt)	%
РА в целом	168	0,45 ± 0,05*	149	88,7
Стадия I	39	0,20 ± 0,05*	27	69,2
Стадия II	38	0,32 ± 0,05*	30	78,2
Стадия III	52	0,42 ± 0,06*	43	82,7
Стадия IV	39	0,36 ± 0,02*	29	74,3
Контрольная группа	25	0,12 ± 0,01		

* - отличается достоверно от данных контрольной группы.

При РА этот показатель был значительно выше, чем в контрольной группе практически здоровых лиц (0,45 ± 0,05 против 0,12 ± 0,01; P < 0,02). Этот тест в 69,2% случаев существенно превышал соответствующие показатели у здоровых лиц при первой стадии заболевания и сохранялся на высоком уровне у большинства больных при всех рентгенологических стадиях РА. Более высокие средние показатели цитотоксического эффекта

лимфоцитов относительно здоровых лиц возникали у больных РА, начиная со второй стадии заболевания (рис.1).

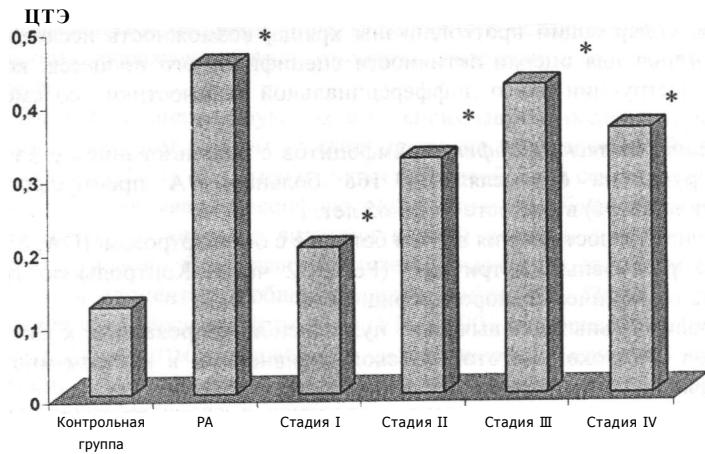


Рис. 1. Цитотоксическая активность лимфоцитов крови с румалоном у больных ревматоидным артритом при разных стадиях заболевания
* - достоверно отличается от данных контрольной группы

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о связи этого феномена с наличием костно-хрящевой деструкции и подтверждают развитие при этом заболевании гиперчувствительности замедленного типа к органоспецифическим антигенам протеогликанов хряща.

В развитии иммунологических реакций при РА определенное значение придается ревматоидному фактору (РФ), который является аутоантигеном со специфической активностью к Рс - фрагменту 1 β C.

Исследование 1 β M - РФ в реакции Ваалер-Роузе позволило разделить обследованный нами контингент больных на 2 группы. При серопозитивной форме заболевания цитотоксическая активность лимфоцитов была выше, чем у больных с серонегативной формой ($0,5 \pm 0,06$ и $0,38 \pm 0,04$; $P < 0,001$). При обеих формах РА киллерная активность лимфоцитов существенно превышала ($P < 0,05$) соответствующие показатели контрольной группы практически здоровых лиц (рис.2).

Величина цитотоксического эффекта у больных с I и II степенями активности была выше, чем у практически здоровых лиц ($P < 0,05$). При III степени активности этот показатель был значительно выше, чем при I и II степенях ($P < 0,05$). То есть, можно утверждать, что выраженность цитотоксического эффекта лимфоцитов коррелирует с активностью заболевания. Высокая частота (80%) и выраженность ($0,38 \pm 0,04$ усл.ед. при норме $0,12 \pm 0,06$; $P < 0,02$) цитотоксического эффекта лимфоцитов у

больных с минимальной степенью активности патологического процесса позволяет говорить о высокой чувствительности этого феномена. Чувствительность этой реакции у больных РА при I степени активности составляла 80%, а специфичность была равна 92%, т.е. у более чем 90 % здоровых лиц этот показатель был отрицательным, что позволяет говорить о специфичности этой реакции и ее высокой чувствительности.

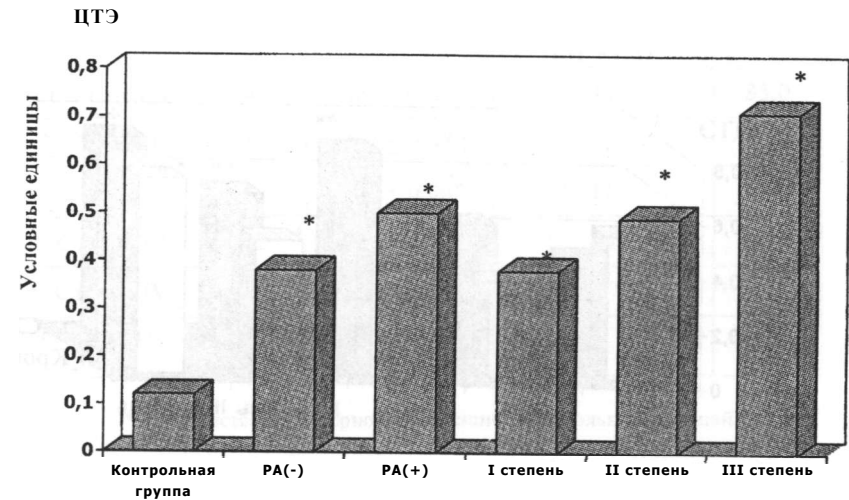


Рис. 2. Цитотоксическая функция лимфоцитов крови с румалоном у больных ревматоидным артритом с разными степенями активности.
* - отличается достоверно от данных контрольной группы

Возраст обследованных больных не оказывал существенного влияния на проявление цитотоксического эффекта с румалоном. Кроме того, не удалось установить связи уровня цитотоксического эффекта лимфоцитов с этнической принадлежностью.

Нами исследовалась у больных РА и другой суставной патологией цитотоксическая активность лимфоцитов синовиальной жидкости.

Выраженность цитотоксического эффекта лимфоцитов синовиальной жидкости коррелировала со степенью активности РА. С увеличением активности заболевания возрастала цитотоксичность лимфоцитов. Цитотоксический эффект лимфоцитов синовиальной жидкости у больных РА был достоверно выше, чем у больных остеоартрозом и реактивным артритом ($P < 0,05$), что свидетельствует о диагностической информативности этого

показателя, возможности использования его в качестве вспомогательного теста в дифференциальной диагностике РА.

Средняя величина цитотоксического эффекта лимфоцитов синовиальной жидкости была значительно выше цитотоксического эффекта лимфоцитов крови ($0,71 \pm 0,03$ и $0,45 \pm 0,05$ усл.ед.) (рис.3).

Все это в конечном итоге свидетельствует о том, что цитотоксический эффект лимфоцитов синовиальной жидкости может иметь вспомогательное значение в дифференциальной диагностике РА и смежной патологии (РеА и ОА).

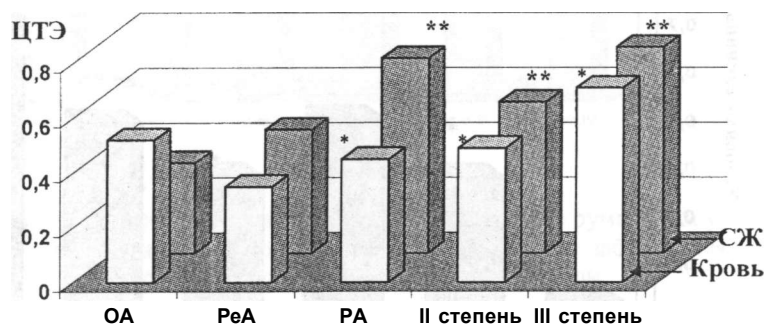


Рис. 3. Сопоставление цитотоксической функции лимфоцитов крови и синовиальной жидкости с румалоном по степеням активности у больных ревматоидным артритом.

*- достоверно отличается относительно данных группы сопоставления РеА

** - достоверно отличается относительно данных групп сопоставления РеА и ОА

Нами проводилось сопоставление цитотоксического эффекта лимфоцитов и теста *торможения миграции* лейкоцитов с румалоном у больных РА.

С помощью этого теста, используя в качестве антигена препарат румалона, нами было обследовано 47 больных РА. Контрольную группу составили 23 практически здоровых донора. В норме индекс торможения миграции с румалоном составлял $71 \pm 0,04\%$, а при РА он был значительно ниже — $46 \pm 0,01\%$ ($P < 0,01$), отражая развитие повышенной чувствительности замедленного типа к протеогликанам хряща (табл.2).

Как видно из таблицы 2, величина этого показателя была существенно снижена уже при I стадии заболевания и сохранялась низкой при всех стадиях развития костно-хрящевой деструкции. Частота положительных результатов этой реакции составляла 80-85% .

Таблица 2.

Реакция торможения миграции лейкоцитов крови с румалоном по стадиям заболевания у больных РА

Группы	п	М + ш, %	Число больных	
			РТМЛ < нормы (М + ш1)	%
1. РА в целом	47	$46 \pm 0,01^*$	40	85,0
2. Стадия I	15	$38,7 \pm 0,07^*$	12	80,0
3. Стадия II	13	$38,0 \pm 0,06^*$	11	84,6
4. Стадия III	12	$43 \pm 0,12^*$	10	83,3
5. Стадия IV	7	$32 \pm 0,03^*$	6	85,7
6. Контрольная группа	23	$71 \pm 0,04$		

* - отличается достоверно в сравнении с контрольной группой.

При серопозитивной форме РА значение индекса торможения миграции лейкоцитов было ниже такового при серонегативной форме ($P < 0,05$) . При РА в целом это значение значимо отличалось от данных групп сопоставления (рис. 4).

В группе больных с серонегативной формой РА выявлена высокая частота положительных реакций торможения миграции лейкоцитов с румалоном (86%), что свидетельствует о довольно высокой сенсibilизации лимфоцитов к протеогликанам хряща.

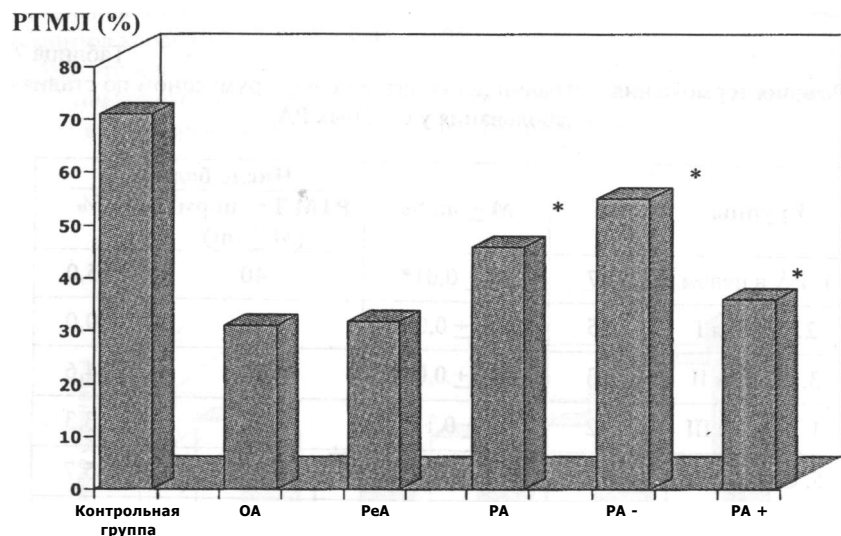


Рис. 4. Реакция торможения миграции лейкоцитов крови с румалоном у больных ревматоидным артритом.

* - достоверные различия в сравнении с контрольной группой и другой суставной патологией.

При сравнительном сопоставлении частоты положительных реакций цитотоксического эффекта и торможения миграции лейкоцитов крови с румалоном у больных РА получены примерно однозначные результаты. При всех степенях активности ревматоидного воспаления частота положительных результатов реакции торможения миграции лейкоцитов коррелировала с соответствующими данными цитотоксического эффекта.

Выявленный нами с помощью рангового коэффициента Спирмена показатель $r = -0.9$ ($P < 0,05$) свидетельствует о наличии обратной корреляционной связи между этими показателями, т.е. при увеличении значения ЦТЭ соответственно стадиям заболевания происходит снижение коэффициента торможения миграции лейкоцитов (рис.5).

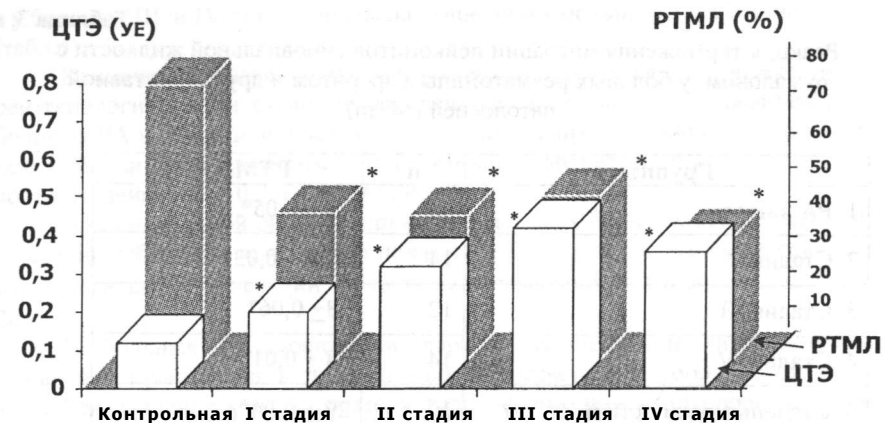


Рис. 5. Соотношение цитотоксического эффекта и реакции торможения миграции лейкоцитов крови у больных ревматоидным артритом по стадиям заболевания.

*- достоверные различия от данных контрольной группы

Следует отметить, что торможение миграции лейкоцитов с румалоном у больных РА было больше, чем у доноров и больных с другой суставной патологией - РеА и ОА (рис.5), но цитотоксический эффект лимфоцитов у больных ОА превышал соответствующие данные при РА. По-видимому, это связано с тем, что РА и ОА - заболевания с разным патогенезом. Синовит при РА - это острое первичное аллергическое воспаление, в то время как ОА - хроническое невоспалительное заболевание. При ОА — синовит носит вторичный характер, который проявляется пролиферацией хондроцитов, в результате чего происходит « переключение » на биосинтез не свойственных нормальной хрящевой ткани коллагена и протеогликана. Хотя, по некоторым литературным данным цитотоксичность лимфоцитов в периферической крови обнаруживается с одинаковой частотой как у больных РА так и у больных ОА (Влаш АО. 8соП БО. 1991).

Реакция торможения миграции лейкоцитов нами проводилась и с синовиальной жидкостью у больных РА (табл.3).

При сопоставлении реакции торможения миграции лейкоцитов синовиальной жидкости у больных РА и другой суставной патологией (ОА и РеА) выявлено, что при РА этот показатель был достоверно ниже, чем у больных ОА и РеА (табл. 3.), его интенсивность также, как и цитотоксического эффекта лимфоцитов, коррелирует с острофазовыми реакциями ревматоидного воспаления.

Таблица 3.

Реакция торможения миграции лейкоцитов синовиальной жидкости с румалоном у больных ревматоидным артритом и другой суставной патологией (M+т).

Группы	п	РТМЛ (%)
1. РА в целом	40	29 + 0,05*
2. Стадия II	14	30,0 + 0,03
3. Стадия III	12	28+ 0,06*
4. Стадия IV	14	28 + 0,01*
5. Степень активности II	10	29 + 0,04*
6. Степень активности III	16	27 + 0,05*
7. Остеоартроз	15	30 ± 0,04
8. Реактивный артрит	10	31,5+0,01

* - достоверные различия в сравнении с данными групп сопоставления - ОА и РеА .

Выявление циркулирующих антигенсвязывающих лимфоцитов проводили методом парной агглютинации их антигеном, основанном на способности sensibilizированных лимфоцитов связывать специфические антигены и при определенных условиях объединяться в парные агглютинанты. В качестве антигена использовали румалон, содержащий протеогликаны хряща.

С помощью этой реакции нами было исследовано 63 больных РА преимущественно женского пола в возрасте от 50 до 65 лет. Для сопоставления эта реакция проводилась у 18 больных остеоартрозом и 25 больных реактивным артритом. В контрольную группы вошли 22 практически здоровых лиц.

Выявлено, что в крови практически здоровых доноров содержится от 0 до 2,5% румалонсвязывающих лимфоцитов, средняя величина этого показателя составляет 1,3 + 0,2%.

У больных ревматоидным артритом содержание румалонсвязывающих лимфоцитов в целом было значительно выше, чем в группе здоровых доноров (6,2 + 0,4% против 1,3 + 0,2%; P < 0,05). Этот тест существенно превышал соответствующие данные у практически здоровых лиц уже при I стадии заболевания (5,7 + 0,2% против 1,3 ± 0,2%; P < 0,05) и сохранялся на высоком уровне при всех рентгенологических стадиях РА. Так, величина показателя парной агглютинации лимфоцитов (ПАЛ) при второй стадии

заболевания значительно превышала величину этого эффекта при первой стадии, а у больных III и IV стадий она была выше, чем у больных II и I стадий (табл.4).

Клиническое значение этого феномена определяется его корреляцией с рентгенологическими стадиями заболевания. Величина этого показателя у больных РА в целом и при всех стадиях заболевания была значительно выше, чем у больных остеоартрозом и реактивным артритом (6,2 + 0,4 против соответственно 4,0 + 0,3 и 3,4 + 0,6; P < 0,01).

При сигмальной оценке данных почти у всех больных РА, независимо от стадии заболевания, величина показателя ПАЛ находилась выше границы физиологических колебаний этого теста у практически здоровых лиц (M ± 2a).

У больных РА показатели парной агглютинации лимфоцитов с румалоном практически во всех случаях превышал и 5,6% порог ПАЛ, а при ОА и РеА значение этого показателя было значительно ниже этого порога. Таким образом, порог ПАЛ 5,6% имеет вспомогательное дифференциально - диагностическое значение.

Таблица 4.

Реакция парной агглютинации лимфоцитов крови румалоном у больных ревматоидным артритом по стадиям заболевания

Группы	п	M ^ т (%)	Число больных > M + 2a
1. РА в целом	63	6,2 ± 0,4*	61
2. РА стадия I	19	5,7 + 0,2*	18
3. РА стадия II	18	6,8 + 0,5*	18
4. РА стадия III	14	7,5 + 0,2*	14
5. РА стадия IV	12	7,8 + 0,2*	12
6. ОА	18	4,0 + 0,3*	16
7. РеА	25	3,4 + 0,5	21
7. Контрольная группа	22	1,3 + 0,2	

* - достоверные различия относительно данных контрольной группы и групп сопоставления.

Величина феномена парной агглютинации лимфоцитов (ПАЛ) крови с румалоном у больных ревматоидным артритом зависела от степени активности специфического процесса (рис.6).

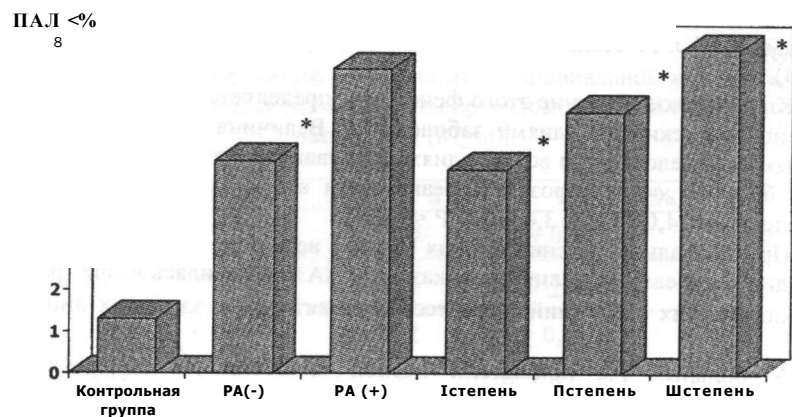


Рис. 6. Парная агглютинация лимфоцитов крови с румалоном у больных ревматоидным артритом с разными степенями активности.

* - достоверные различия от данных контрольной группы

Высокие показатели этой реакции выявлялись уже при первой степени активности РА ($P < 0,05$). Уровень антигенсвязывающих лимфоцитов с рецепторами к румалону при более высоких степенях активности заболевания (II и III) достоверно превышал таковой при меньшей степени активности (соответственно $6,3 \pm 0,6\%$ и $7,8 \pm 0,2\%$ против $4,9 \pm 0,6\%$; $P < 0,01$), что свидетельствует о связи этого теста с острофазовыми реакциями собственно ревматического воспаления - СОЭ и СРБ (табл. 5).

Высокая частота этой реакции у больных с минимальной степенью патологического процесса позволяет использовать этот тест в качестве вспомогательного для ранней диагностики РА, особенно его малоактивных форм (рис.6).

Эта реакция нами исследовалась также в синовиальной жидкости у 36 больных РА (табл.5).

Выраженность этого феномена коррелировала со стадией заболевания. Содержание румалонсвязывающих лимфоцитов в синовиальной жидкости у больных III и IV стадиями заболевания было достоверно выше, чем у больных со II стадией РА ($P < 0,01$). Клиническое значение этого феномена определяется его соответствием с рентгенологическими стадиями заболевания.

Таблица 5.

Реакция парной агглютинации лимфоцитов синовиальной жидкости с румалоном у больных ревматоидным артритом (М + ш)

Группы	п	%
1. РА в целом	36	$7,2 \pm 0,03^*$
2. Стадия II	14	$6,2 \pm 0,05^*$
3. Стадия III	12	$7,1 \pm 0,02^*$
4. Стадия IV	10	$7,6 \pm 0,06^*$
5. Степень активности II	15	$7,9 \pm 0,04^*$
6. Степень активности III	14	$8,2 \pm 0,03^*$
7. Остеоартроз	13	$4,2 \pm 0,04$
8. Реактивный артрит	14	$3,3 \pm 0,02$

* - достоверные различия от данных групп ОА и РеА

В группы сопоставления вошли 13 больных ОА и 14 больных РеА (табл. 5). Из таблицы 5 видно, что уровень антигенсвязывающих лимфоцитов с рецепторами к румалону при более высокой степени активности заболевания достоверно превышает таковой при низкой степени активности ($8,2 \pm 0,03\%$ против $7,9 \pm 0,04\%$; $P < 0,05$). Кроме того, содержание румалонсвязывающих лимфоцитов у больных РА в целом значительно выше, чем у больных другой суставной патологией - ОА и РеА ($7,9 \pm 0,03\%$ против $4,2 \pm 0,04\%$ и $3,3 \pm 0,02\%$ соответственно; $P < 0,01$).

Выявлена более высокая величина ПАЛ у больных РА в синовиальной жидкости по сравнению с этим показателем в крови ($7,9 \pm 0,03\%$ против $6,2 \pm 0,04\%$; $P < 0,01$).

С помощью рангового коэффициента по Спирмену нами выявлена у больных РА прямая корреляционная связь между показателями цитотоксического эффекта и реакции парной агглютинации лимфоцитов с румалоном ($r = 0,9$; $P < 0,05$). При возрастании уровня румалонсвязывающих лимфоцитов соответственно усиливалась цитотоксическая активность лимфоцитов с румалоном, что свидетельствует о патогенетической связи двух феноменов (рис.7).

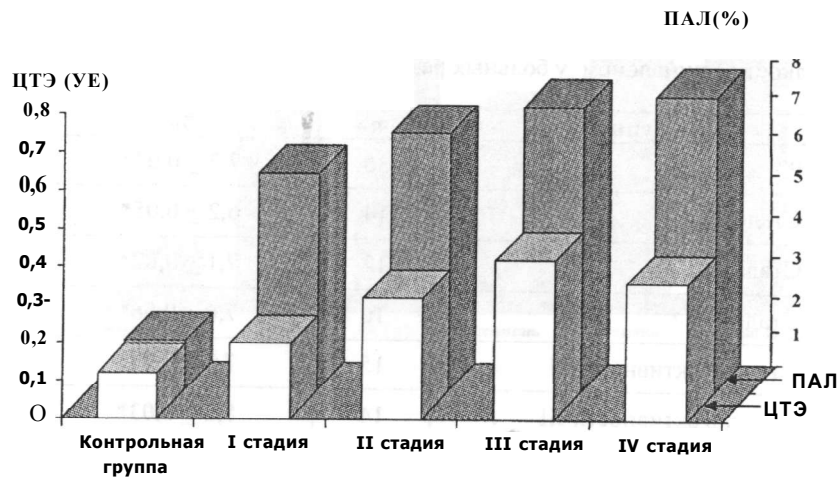


Рис.7. Соотношение цитотоксического эффекта и парной агглютинации лимфоцитов крови с румалоном у больных ревматоидным артритом по стадиям заболевания.

Механизм реакции аллергического лейкоцитолита связан с иммунологическим конфликтом антиген-антитело на мембране лейкоцитов (Китаев М.И., 1978). Феномен включает цитолитические эффекты лимфоцитов, нейтрофилов, базофилов.

Изучение реакции аллергического лейкоцитолита с румалоном проводилось у 47 больных ревматоидным артритом, 20 больных остеоартрозом, 26 больных реактивным артритом (группы сопоставления) и 25 практически здоровых лиц (контрольная группа).

При анализе нашего материала у больных РА был выявлен повышенный лейкоцитолит с румалоном относительно контрольных данных здоровых лиц ($75,2 \pm 1,3\%$ против $24 \pm 1,2\%$). Установлено резкое возрастание процента лизированных лейкоцитов (ПЛЛ) в присутствии румалона у больных РА по сравнению с донорами (табл. 6).

Таблица 6.

Реакция аутолейкоцитолита крови румалоном у больных ревматоидным артритом по стадиям заболевания

Группы	п	М+ш%	Число больных М + 25,
1. РА в целом	47	$75,2 \pm 1,3^*$	47
2. Стадия I	15	$69,3 \pm 1,1^*$	15
3. Стадия II	13	$72,1 \pm 1,4^*$	13
4. Стадия III	12	$77,4 \pm 1,2^*$	12
5. Стадия IV	7	$84,1 \pm 1,3^*$	7
6. ОА	20	$59,0 \pm 1,5$	19
7. РеА	26	$53,2 \pm 1,2$	25
7. Контрольная группа	25	$24,0 \pm 1,2$	

* достоверное различие от данных контрольной группы и групп сопоставления.

При всех стадиях РА показатель аутолейкоцитолита с румалоном существенно превышал референтные показатели этого теста у практически здоровых лиц.

Продолжая эти исследования, нами было проведено сопоставление реакции аутолейкоцитолита у больных РА по степеням активности. Этот тест существенно превышал соответствующие данные у здоровых лиц уже при минимальной степени активности, что позволяет говорить о высокой специфичности этого феномена. При серопозитивной форме РА величина феномена аутолейкоцитолита с румалоном была выше, чем у больных с серонегативной формой заболевания ($78,4 \pm 1,5\%$ и $70,2 \pm 1,2\%$; $P < 0,05$).

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о наличии при ревматоидном артрите специфической аллергии, проявляющейся разрушением лейкоцитов в аллергических реакциях с румалоном, которая коррелирует с активностью ревматоидного процесса.

При проведении корреляции по Спирмену между реакциями парной агглютинации лимфоцитов и аутолейкоцитолита с румалоном выявлено наличие синхронности изменений сопоставляемых рядов. Коэффициент корреляции r в этом случае равнялся 1 ($P < 0,05$), что свидетельствует о прямой корреляционной зависимости этих показателей (рис.8).

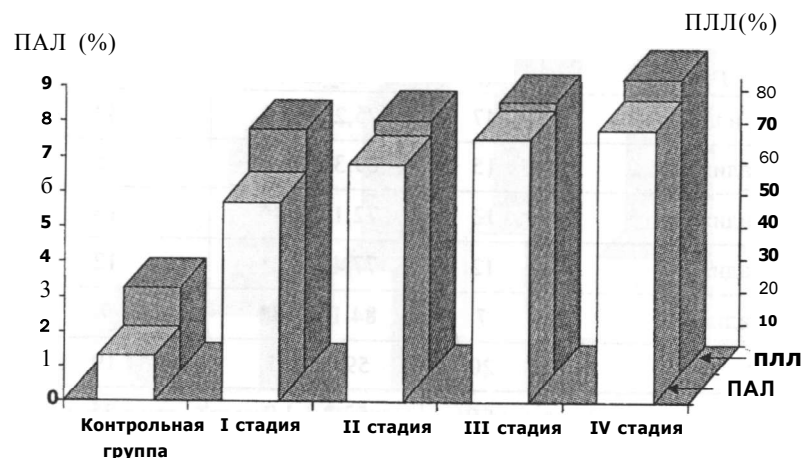


Рис. 8. Соотношение процента лизиса лейкоцитов и парной агглютинации лимфоцитов крови с румалоном у больных ревматоидным артритом по стадиям заболевания.

Высокая частота реакции аутолейкоцитолита с румалоном у больных РА при ранней стадии заболевания и минимальной степени активности позволяет использовать этот тест в качестве дополнительного при ранней диагностике этого заболевания.

ВЫВОДЫ

1. Разработана модификация цитотоксического эффекта для выявления у больных РА киллерной активности Т-лимфоцитов, сенсibilизированных к протеогликанам хряща. В качестве клеточных мишеней в этом феномене используются аутоэритроциты, нагруженные стандартным препаратом хряща-румалоном.
2. Выявлен пул лимфоцитов-киллеров в общей циркуляции с высокой цитотоксической активностью к клеткам-мишеням, нагруженным антигенами протеогликанов хряща у 88,7% больных РА. Величина этого эффекта зависит от стадии и активности специфического

процесса. Цитотоксический эффект лимфоцитов синовиальной жидкости обладает диагностической информативностью.

3. Установлена корреляция между данными цитотоксического эффекта лимфоцитов и реакции торможения миграции лейкоцитов при всех степенях активности ревматического воспаления, отражая развитие гиперчувствительности замедленного типа к протеогликанам хряща.
4. Для больных РА характерно высокое содержание в крови и синовиальной жидкости румалон-связывающих лимфоцитов, реагирующих с протеогликанами хряща. Клиническое значение этого теста определяется его соответствием рентгенологическим стадиям и степеням активности заболевания и может иметь значение в качестве вспомогательного для ранней диагностики заболевания, особенно малоактивных форм.
5. Выявлены высокие показатели реакции лейкоцитолита с румалоном, отражающие развитие гиперчувствительности немедленного типа к протеогликанам хряща у 97% больных РА. Интенсивность этого теста зависит от стадии заболевания и степени активности. Реакция может быть использована в качестве дополнительного теста для ранней диагностики этого заболевания.

Основные положения диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Цитотоксический эффект лимфоцитов крови и синовиальной жидкости у больных ревматоидным артритом. // Иммунология. (г. Москва, Россия).-2002.-№5.-Т.23.-С.279-282. (соавт.: Китаев М.И., Миррахмедова А.Х., Джайлобаева К.А.).
2. Реакция парной агглютинации лимфоцитов с румалоном у больных ревматоидным артритом.//Вестник ВУЗОВ.-2002.-№2.-С.: 61-63
3. Реакция аутолейкоцитолита у больных ревматоидным артритом.// Вестник ВУЗОВ.-2003.-№3-4.-С:82-83
4. Иммуно-аллергические реакции лейкоцитов с румалоном у больных ревматоидным артритом. //Центрально-Азиатский Медицинский журнал.-2004.-№1-2.С.: (соавт. Китаев М.И., Миррахимов Э.М.).
5. Цитотоксическая активность лимфоцитов у больных ревматоидным артритом.//Центрально-Азиатский Медицинский журнал.-2004.-№1-2.С.: (соавт. М.И.Китаев, А.Х.Миррахмедова, К.А.Джайлобаева).
6. I/Б полиморфизм гена АПФ и развитие высотной легочной артериальной гипертензии у горцев Кыргызстана.// Центрально-Азиатский Медицинский журнал.-2001.-Т-УП.-Приложение1.-С.:23-27
7. I/Э полиморфизм гена ангиотензин-превращающего фермента в кыргызской популяции. Связь I/Э полиморфизма с концентрацией и активностью фермента в сыворотке крови.//Сердце и сосуды

- (Казахстан).-2001.-№3.-С.: 15-18. (Соавт. Калмырзаев Б.Б., Ким Е.В., Маманова Л.Б., Полупанов А.Г., Халматов А.Т., Пак О.А., Алдашев А.А.).
8. СуЮЮхю еТес! оГ IутрЪосуиз т раПеп! \У|Ь гНеитаюШ аПьШз// 9* Азла РасШс Беа§ие оГ Аззоаа^опз Гог ЯбеитаЮ1о§у Соп§гезз.-2000/-Веут& СЫпа.-Р.206.
 9. Антигенсвязывающие лимфоциты с рецепторами к протеогликанам хряща у больных ревматоидным артритом.//IV Конгресс кардиологов тюркоязычных стран.-Бишкек.-ЦАМЖ.-№3-4.-С.:45
 10. Цитотоксическая функция лимфоцитов у больных ревматоидным артритом.// IV Конгресс кардиологов тюркоязычных стран.-Бишкек.-ЦАМЖ.-№3-4.-С.:51
 11. Связь I/Э полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента с его концентрацией и активностью в плазме крови у представителей кыргызской популяции.//ЛНсъезд кардиологов Кыргызской Республики. Международный симпозиум по горной медицине., ЦАМЖ.-2001.- Т-7,- С.:28.
 12. СуЮЮхю ейесl оПугпрЪосуйез \уИЬ сарсlШр!п т сНа§позl8 IГ тусарсl1a1 тйгсlюп.//4^а Iпегпаюпаl Соп§гезз оГ СапЮ1о18(з оС ТигкlзЬ-8реапа§ СоиШпез. Апlаlуа-Тигкеу.-2003.-Р.20.

Ч.И. Давлетованын «Ревматоиддик артрит менен ооруган ооруларда лимфоциттердин румалон менен болгон таасири, андагы антигенбайланыштыруунулук касиети жана клеткагаларга зыяндуулугун аныктоо» деген темадагы, 03.00.13 - физиология, 14.00.36 - иммунология жана аллергология адистиги боюнча жактала турган кандидаттык диссертациясынын

КОРУТУНДУСУ

Изилдеенун максаты ревматоиддик артрит менен ооруган ооруларда лимфоциттердин антигенбайланыштыруучу жана клеткагаларга зыяндуулугун аныктоосу ошону менен бирге румалонду колдонууда лейкоциттердин иммундук-аллергиялык кошулмалардагы болгон таасирин аныктоодо диагностикалык метод катары колдонуу болуп эсептелет.

Изилдееде биринчи болуп организмдеги айланым жаткан суюктуктардагы лимфоциттердин румалонбайланыштыруучу заттардын санын аныктоо, алардын устундугу иммуноглобулиндик рецепторлорду алып журуусу жана бул антиген менен толтурулган мишен-клеткапарындагы лимфоцит - елтуруучулорунун клеткагаларга зыяндуу таасири аныктоо болгон.

Т-лимфоциттердин влтуруучу активдуулугун аныктоодо, кемирчектеги сенсбилизацияланган протеогликандарда лимфоциттердин румалон менен клеткаларга зыяндуу болгон таасирин жаны модификациясы аныкталган. Бул тест бир гана ооруунун активдуу болгон формасы эмес, андан тышкары 80% оорууларда ооруунун активдуулугун алгачкы башталышында эле аныктоого шарт тузет. Бул жаны модификацияланган лимфоциттердин румалон менен болгон таасириндеги лейкоциттердин езудорун - езудеру елтуруусу, антигенбайланыштыруучулугу, клеткага зыяндуулугун аныктоо методу кунумдук медициналык практикада ревматоиддик артрит жана сеек-муун ооруларында, жана ошол оорууларда ооруунун активдуулугун аныктоодо диагнозго кошумча метод катарында колдонууга мумкундук берет. _____у

АННОТАЦИЯ

Диссертации Давлетовой Ч.И. на тему «**Антигенсвязывающая и цитотоксическая функции лимфоцитов с румалонем у больных ревматоидным артритом**» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.00.13 - физиология, 14.00.36 - иммунология и аллергология.

В настоящей работе изучены антигенсвязывающая и цитотоксическая функции лимфоцитов у больных ревматоидным артритом и возможность использования румалона в иммуно-аллергических реакциях лейкоцитов для диагностики этого заболевания.

Впервые при ревматоидном артрите изучено содержание в общей циркуляции румалонсвязывающих лимфоцитов, несущих на своей поверхности иммуноглобулиновые рецепторы, и цитотоксическое действие лимфоцитов-киллеров на клетки-мишени, нагруженные эти антигеном.

Разработана новая модификация цитотоксического эффекта лимфоцитов с румалонем для выявления киллерной активности Т-лимфоцитов, сенсбилизированных к протеогликанам хряща. Этот тест коррелирует с активностью болезни и выявляется у 80% больных с минимальной степенью активности специфического процесса. Показано, что модифицированные методы учета аутолейкоцитолита, антигенсвязывающих и цитотоксических лимфоцитов с румалонем могут быть использованы в качестве дополнительных при диагностике РА, оценке костно-суставной деструкции и степени активности специфического процесса.

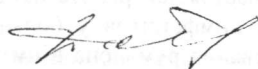
ANNOTATION

Davletova's C. I. Dissertation for academic degree as a candidate of life sciences on the following specializations 03.00.13 – physiology, 14.00.36 – immunology and allergology **“Antigen-binding and cytotoxic lymphocyte functions with rumalon of rheumatoid arthritis patients”**

This Dissertation studies the antigen-binding and cytotoxic lymphocyte functions with rumalon of rheumatoid arthritis (RA) patients and possibilities of utilization of rumalon in immunity-allergic reactions of leucocytes for diagnostics of this disease.

Rumalon binding lymphocytes in general circulation bearing immunoglobulin receptors on its surface and cytotoxic effect lymphocytes-killers have on cells-targets, loaded by these antigens were deeply studied for the first time in view of rheumatoid arthritis.

New modification of cytotoxic effect of lymphocytes with rumalon for detection of killer activity of T-lymphocytes was developed which sensibilized for proteoglycan gristle. This test correlates with disease activity and emerges at 80% of patients with minimal level of activity of specific process. At present modified record methods of autoleikocitoliz, antigen-binding and cytotoxic lymphocytes with rumalon can be used as a subsidiary during RA diagnosis, evaluation of bones and joints destruction and activity level of specific process.



Заказ № 973. Формат 60x84 1/16. Тираж 200 экз.

Отпечатано в ОсОО «ДЭМИ»
г. Бишкек, ул. Кулатова, 1/3