

# СПОНТАННАЯ ИММУНОГЛОБУЛИН-СИНТЕЗИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ В-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Мамасаидов А.Т.<sup>1</sup>, Аширов К.Т.<sup>3</sup>, Мамасаидова Г.М.<sup>2</sup>,  
Кулчинова Г.А.<sup>2</sup>, Абдурашитова Д.И.<sup>3</sup>, Шакиров М.Ю.<sup>1</sup>,  
Ирисов А.П.<sup>3</sup>, Эшбаева Ч.А.<sup>1</sup>, Нурмаматов З.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Центр последипломного медицинского образования, г. Ош

<sup>2</sup> Кыргызская государственная медицинская академия

<sup>3</sup> Ошский государственный университет, г. Бишкек и г. Ош, Кыргызская Республика

**Резюме.** Целью настоящей работы явилась оценка клинического значения спонтанной иммуноглобулинсинтезирующей активности В-лимфоцитов (СИАЛ) у больных такими ревматическими воспалительными заболеваниями (РЗ), как реактивный артрит (РеА), анкилозирующий спондилоартрит (АС), ревматоидный артрит (РА) и системная красная волчанка (СКВ). Обнаружены достоверно более высокие уровни СИАЛ у больных РеА, АС, РА и СКВ по сравнению со здоровыми лицами и больными остеоартрозом. Клиническое значение СИАЛ заключалось в том, что показатели СИАЛ отражают наличие и степень иммунологической активности при РеА, АС, РА и СКВ.

*Ключевые слова:* реактивный артрит, анкилозирующий спондилоартрит, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, ревматические болезни, В-лимфоциты, иммуноглобулины.

*Matasaidov A.T., Ashirov K.T., Mamasaidova G.M., Kulchinova G.A., Abdurashitova D.I., Shakirov M.Yu., Irissov A.P., Eshbaeva Ch.A., Nurmatov Z.B.*

## SPONTANEOUS IMMUNOGLOBULIN-SYNTHESIZING ACTIVITY OF B LYMPHOCYTES IN INFLAMMATORY RHEUMATIC DISEASES

**Abstract.** The aim of present work was to evaluate clinical significance of B-lymphocytes spontaneous antibody-synthesizing activity by B-lymphocytes (LASA) in patients with rheumatic inflammatory diseases (RD), i.e., reactive arthritis (ReA), ankylosing spondylitis (AS), rheumatoid arthritis (RA), and systemic lupus erythematosus (SLE). Significantly higher LASA levels were revealed in the patients with ReA, AS, RA, and SLE, as compared with healthy persons and patients with osteoarthritis. Clinical significance of LASA indexes and their changes may reflect manifestation and degree of immunological activities in ReA, AS, RA, and SLE. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 4-5, pp 527-530)

## Введение

В иммунопатогенезе таких воспалительных ревматических заболеваний (РЗ), как реактивный артрит (РеА), анкилозирующий спондило-

артрит (АС), ревматоидный артрит (РА) и системная красная волчанка (СКВ) центральное место занимает нарушение В-иммунного ответа [1, 2]. Наиболее изученными при этих заболеваниях являются нарушения гуморального звена, проявления которых являются высокие уровни циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), сывороточных иммуноглобулинов (Ig), ревматоидного фактора (РФ), антинуклеарного фактора (АНФ), антител к соединительнотканым структурам, компонентам ядер клеток, хряща сустава,

### Адрес для переписки:

714000, Кыргызская Республика, г. Ош,  
ул. Верхне-Увамская, 10/17.

Тел.: +996 (3222) 5-90-87 (рабочий).

Факс: +996 (3222) 2-74-41.

E-mail: oshcpm1@yandex.ru

антигенам микробов, к ДНК, фосфолипидам и т.д. [1, 3, 4, 5,]. Перечисленные факторы обуславливают разнообразные клинические проявления этих болезней.

В цепи В-иммунного ответа при РЗ малоизученным остаются клеточные механизмы активации В-клеток. По логике формирования патологического иммунного ответа при аутоиммунных заболеваниях, в частности при РеА, АС, РА и СКВ, каскад иммунологических нарушений начинается с изменений на клеточном уровне. Доказательством являются данные о высокой спонтанной пролиферативной активности В-лимфоцитов при РА и СКВ [6, 7, 8, 9, 10].

Цель исследования: изучить спонтанную иммуноглобулинсинтезирующую активность В-лимфоцитов при РеА, АС, РА и СКВ.

## Материалы и методы

Нами обследовано 53 больных РеА, 36 больных АС, 166 больных РА и 62 больных СКВ. При этом у 28 больных РА отмечались признаки поражения печени, а у 15 – признаки поражения сердца. А вот у 19 больных СКВ выявлены симптомы антифосфолипидного синдрома (АФС). Диагнозы РеА, АС, РА и СКВ устанавливались согласно критериям Американской ревматологической ассоциации. Степень активности патологического процесса, характер течения, рентгенологическая стадия и иммунологическая форма болезни определялись в соответствии с классификацией РА, принятой Ассоциацией ревматологов России и Институтом Ревматологии РАМН (Москва). Диагноз АФС основывался на диагностических критериях G.R.V. Hughes и N.N. Harris.

В качестве сравнительной группы обследовано 39 больных остеоартрозом (ОА) и в качестве контроля – 30 здоровых лиц из числа студентов и клинических ординаторов медицинского факультета 20-30 лет, не страдающих хроническими заболеваниями и не получавших в течение последних 6 месяцев никаких прививок.

Определение СИАЛ проводили оригинальным методом количественной цитофлуориметрии, основанным на количественном определении внутрилимфоцитарных иммуноглобулинов.

Определение СИАЛ проводили следующим образом. Лимфоциты выделяли из периферической венозной крови, стабилизированной антикоагулянтом, на градиенте плотности 1,007 г/см<sup>3</sup> верографин-фиколл. Градиент готовили следующим образом: 1 часть 76% раствора верографина смешивали с 4 частями раствора фиколла. После тщательного перемешивания смесь была готова к употреблению (для длительного хранения смесь верографин-фиколл помещают в холодильник при 4°C). В бактериологическую пробирку наливали 2,5 мл смеси верографин-фиколл (высота стол-

ба смеси 2-2,5 см). Пробирку оставляли на столе до тех пор, пока смесь не примет комнатную температуру. Из локтевой вены брали 5 мл крови. Для предотвращения свертывания, в кровь при взятии добавляли антикоагулянты: гепарин (20 единиц на 1,0 мл крови) или 0,1 мл 5% раствора этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА) на 1,0 мл крови. С помощью пастеровской пипетки аккуратно нашлаивали цельную стабилизированную антикоагулянтом кровь в объеме 4 мл на градиент, избегая смешивания градиента и крови. Затем центрифугировали при 1500 об/мин в течение 30 минут. При этом эритроциты и гранулоциты оседали на дно пробирки, а на границе раздела градиента и крови находились мононуклеарные клетки. По всей площади сечения пробирки на границе раздела фаз отсасывали пастеровской пипеткой слой мононуклеаров (плотное облачко над смесью). Клетки, прилипшие к стенке пробирки, собирали кончиком пипетки. Лимфоциты переносили в чистую центрифужную пробирку. Выделенные клетки дважды отмывали от плазмы средой 199 центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 минут. Надосадок удаляли, а лимфоциты ресуспендировали раствором питательной среды. Собранные с интерфейсы лимфоциты 1 раз отмывали средой 199, путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 минут. Надосадок удаляли, а мононуклеары ресуспендировали 1,0 мл среды 199. Затем по 0,5 мл суспензии лимфоцитов вносили в 2 (две) центрифужные пробирки (контроль и опыт) с ППС, состав которой описан выше. Контроль немедленно помещали в холодильник при t 4°C, а опыт – в термостат при t 37°C с влажной камерой. Пробы инкубировали 18 часов в герметически закупоренных центрифужных пробирках. После инкубации пробы центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут, надосадок удаляли, а лимфоциты ресуспендировали 2 каплями среды 199. После этого получали монослой лимфоцитов, для чего каплю густой свежeweделенной суспензии лимфоцитов наносили на 2 чистых обезжиренных предметных стекла (контроль и опыт), инкубировали во влажной камере при комнатной температуре 3-5 мин. После этого не прилипшие клетки смывали средой 199. В результате, на стекле оставалось четко сформированное пятно клеточного монослоя жизнеспособных клеток. Сразу после получения монослоя его фиксировали 4% раствором формальдегида в течение 10 минут. После фиксации препарат промывали средой 199, подсушивали и окрашивали люминесцирующей сывороткой против глобулинов человека, конъюгированной с флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ-сыворотка) производства НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. После окрашивания и тщательного отмывания от несвязавшихся белков и ФИТЦ, стекла подсушивали и проводили коли-

чественную цитофлюориметрию (КЦФ) на базе микроскопа ЛЮМАМ-ИЗ, используя фотометрическую приставку ФМЭЛ-1. Источником возбуждающего излучения служила лампа ДРК-120, дающая стабильный разряд. Источник устанавливали по варианту освещения сверху. Световыделительная система устанавливалась по темнопольному варианту с темнопольным ОПАК-объективом малого увеличения 9x0,20 для обеспечения максимальной «скрещенности». Регистрация интенсивности люминесценции осуществлялась на ФЭУ-39А с базовым напряжением усилительного комплекса 1000-1500 В с выдачей результата на цифровой вольтметр в регистре 2-20 В. Линейность зависимости фототока от интенсивности люминесценции в данном диапазоне измерений и стабильности разряда источника излучения контролировались измерениями флюоресценции эталонных урановых стекол с толщиной 2,3 мм, при этом величина отношения интенсивности флюоресценции этих эталонов в области 530 нм оставалась постоянной изо дня в день.

Измерение Ig-синтезирующей функции лимфоцитов проводили в области 530 нм с площади участка препарата. Помимо суммарной флюоресценции на том же участке препарата измеряли суммарное светорассеивание, используя для этого комбинацию не возбуждающих флюоресценцию светофильтров МС-1 и НС-10. Светорассеивание при выбранных условиях измерений линейно отражает клеточную плотность монослоя, поэтому отношение суммарной флюоресценции к светорассеиванию есть средняя флюоресценция на плоскости монослоя, или величина, отражающая уровень Ig на одну клетку в изучаемой лимфоидной популяции. Учитывая, что сила разряда лампы источника не является строго постоянной величиной и, следовательно, интенсивность флюоресценции может меняться от серии

опытов к серии, вводили поправку к величине суммарной флюоресценции, измеряя в каждой серии определений флюоресценции эталонного уранового стекла толщиной 2,3 мм –  $\Phi_0$ . Отсюда среднюю флюоресценцию ( $\Phi$ ) плотности монослоя вычисляли по соотношению:  $\Phi = \Phi_0 : C \times \Phi_0$ .

Данное соотношение отражает среднее количество внутриклеточных Ig, связанных с лимфоидной клеткой. Затем, сравнивая уровни Ig в опыте и контроле, выводили показатель СИАЛ по формуле:  $СИАЛ = (\Phi_{опыт} : \Phi_{контроль}) \times 100$  усл. ед.

Статистическую обработку полученных данных проводили на персональном компьютере с помощью пакета статистических программ с выведением критерия t – Стьюдента.

## Результаты

Уровни СИАЛ в обследованных группах представлены в таблице.

Как видно из таблицы, показатели СИАЛ у больных РеА, АС, РА и СКВ значительно выше, чем у больных сравнительной группы и здоровых лиц. При этом минимальные значения данного показателя найдены у здоровых лиц и у больных ОА, средние значения СИАЛ выявлены у больных РеА и АС, максимальные же значения вышеуказанных показателей наблюдаются у больных РА и СКВ.

Уровни СИАЛ у больных РА и СКВ были достоверно выше ( $p < 0,001$ ), чем у здоровых лиц и больных ОА. В группе больных РеА и АС данные показатели также достоверно превышали нормативный показатель ( $p < 0,01$ ) и значение СИАЛ у больных ОА ( $p < 0,05$ ). Но при этом уровни СИАЛ у больных РеА и АС были все же несколько меньше, чем у больных РА и СКВ. Следует также отметить то, что значения СИАЛ у больных РА с поражением печени и сердца были выше,

ТАБЛИЦА. УРОВНИ СИАЛ В ОБСЛЕДОВАННЫХ ГРУППАХ

Обследованные группы	n	M±m	Число положительных результатов	
			абс.	%
Здоровые	30	124,2±1,92 (113,9-134,5)	4	13,3
Больные ОА	39	128,1±1,99	15	38,5
Больные РеА	53	138,3±2,71**	32	60,4
Больные АС	36	142,2±4,40***	27	75,0
Больные РА	166	145,3±2,20***	149	89,8
Больные РА с п/п	28	149,1±1,62***	26	92,3
Больные РА с п/с	15	149,7±2,97***	14	93,3
Больные СКВ	58	162,3±2,70***	54	93,1
Больные СКВ с АФС	19	148,1±3,08**	15	79,0

Примечания: в скобках доверительный интервал у здоровых лиц по формуле  $M \pm \delta$ ; \* – достоверно, по сравнению со здоровыми лицами (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ).

чем у больных РА в целом и приближались к их значениям у больных СКВ. А вот в группе больных СКВ с АФС показатель СИАЛ имел меньшее значение, чем у больных СКВ в целом.

Уровни СИАЛ выше нормы обнаружены у 13,3% здоровых лиц, у 38,5% больных ОА, у 60,4% больных РеА, у 75,0% больных АС, у 89,8% больных РА, у 92,3% больных РА с поражением печени, у 93,3% больных РА с поражением сердца, у 93,1% больных СКВ, у 79,0% больных СКВ с АФС.

## Обсуждение

Обнаруженный нами факт достоверно более высокого значения показателя СИАЛ у больных воспалительными РЗ, чем у больных с невоспалительным дегенеративно-дистрофическим заболеванием суставов (ОА), свидетельствует о гораздо более высокой активности В-лимфоцитов при воспалительных РЗ по сравнению с ОА, что подтверждено и другими авторами [1, 3, 4, 5]. Более высокий уровень СИАЛ при РА и СКВ, чем у больных РеА и АС, лишний раз доказывает соответствие степени Ig-синтезирующей активности В-лимфоцитов удельному весу аутоиммунных изменений при воспалительных РЗ [1, 2, 5, 9].

Важное патогенетическое значение имеет более высокое значение показателя СИАЛ у больных РА с поражениями печени и сердца по сравнению с общей группой РА, что свидетельствует о более выраженных иммунных сдвигах при этих формах болезни. С другой стороны, меньшее значение СИАЛ у больных СКВ с АФС, чем у больных СКВ без АФС, еще раз доказывает меньшую выраженность аутоиммунных изменений при этом субтипе СКВ.

Таким образом, изученный нами показатель спонтанной Ig-синтезирующей активности В-лимфоцитов отражает наличие и степень выраженности иммунологических нарушений при воспалительных РЗ, что может быть использовано в практике врача для определения активности патологического процесса и решения целесообразности назначения базисной иммунодепрессивной терапии при этих заболеваниях.

## Выводы

1) Уровни СИАЛ у больных воспалительными РЗ были значительно выше, чем у больных ОА и здоровых лиц.

2) Определение СИАЛ может быть использовано для оценки иммунологической активности при воспалительных РЗ.

3) Наличие высокого уровня СИАЛ у больных воспалительными РЗ может быть обоснованием

необходимости проведения иммунодепрессивной терапии.

## Список литературы

1. Бененсон Е.В., Мамасаидов А.Т., Цай Е.Т. Антигенспецифическая В-клеточная активация при ревматоидном артрите и остеоартрозе // Ревматология. – 1992. – № 1. – С. 18-22.
2. Мазуров В.И. Клиническая ревматология. – СПб., 2001. – 411 с.
3. Насонов Е.Л. Антифосфолипидный синдром: клиника, диагностика, лечение // Рос. мед. журн. – 2002. – № 10.
4. Насонова В. А. Справочник по ревматологии. – М.: Медицина, 1995. – 270 с.
5. Мамасаидов А.Т., Мурзабаева Г.О., Кулчинова Г.А. Клиническое значение показателя спонтанной пролиферативной активности В-лимфоцитов при воспалительных ревматических заболеваниях // Науч.-практ. ревматология. – 2003. – № 2. – С. 66.
6. Мамасаидов А.Т., Бешимов Ж.Ж., Баймырзаева Г.О. Спонтанная пролиферативная В-клеточная активация при ревматических заболеваниях // Центр.-азиат. мед. журн. – Бишкек, 1999. – Т. 5., № 1. – С. 63-65.
7. Мамасаидов А.Т., Мамасаидова Г.М., Сакибаев К.Ш., Таджибаева Ф.Р., Таджибаев К.Т., Аширов К.Т., Абдурашитова Д.И., Баймурзаева Г.О., Шакиров М.Ю., Ирисов А.П. Спонтанная пролиферативная активность В-лимфоцитов при ревматоидном артрите, системной красной волчанке и неспецифическом язвенном колите // Мед. иммунология. – 2006. – Т. 8, № 4. – С. 557-560.
8. Порядин Г.В., Семёнова Л.Ю., Казимирский А.Н. и др. Характеристика субпопуляций лимфоцитов и активационных процессов в иммунной системе больных ранним ревматоидным артритом // Науч.-практ. ревматология. – 2002. – № 4. – С. 22-25.
9. Юсупов Ф.А., Мамасаидов А.Т., Мурзалиев А.М., Грошев С.А. Клинико-иммунологическое значение показателя спонтанной пролиферативной активности В-лимфоцитов у больных системной красной волчанкой с поражением нервной системы // Мед. иммунология. – 2004. – Т. 6, № 6. – С. 567-572.
10. Lindqvist A.K., Alarcon-Riguelme M.E. The genetic of systemic lupus erythematosus // Scand. J. Immunol. – 1999. – Vol. 50, N 6. – P. 526-571.

поступила в редакцию 31.01.2007

принята к печати 30.05.2007