

СПОНТАННАЯ ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ В-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ, СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ

Мамасаидов А.Т.¹, Мамасаидова Г.М.², Сакибаев К.Ш.¹,
Таджибаева Ф.Р.², Таджибаев К.Т.¹, Аширов К.Т.³,
Абдурашитова Д.И.³, Баймурзаева Г.О.³,
Шакиров М.Ю.¹, Ирисов А.П.³

¹ Ошский центр последипломного медицинского образования;

² Кыргызско - Узбекский университет;

³ Ошский государственный университет, г. Ош, Кыргызская Республика

Резюме. Целью настоящей работы явилось изучение спонтанной пролиферативной активности В-лимфоцитов (СПАВЛ) у больных ревматоидным артритом (РА), системной красной волчанкой (СКВ) и неспецифическим язвенным колитом (НЯК). Обследовано 128 больных РА, 52 больных СКВ и 29 больных НЯК. В качестве контрольной группы исследовано 34 больных остеоартрозом (ОА), 27 больных реактивным артритом (РеА), 28 больных хроническим гепатитом (ХГ) и 30 здоровых доноров. Обнаружен достоверно более высокий уровень СПАВЛ у больных РА, СКВ и НЯК, по сравнению с контрольной группой. У 90,3% больных СКВ, у 82,8% больных РА, у 79,3% больных НЯК и у 88,9% больных РА с поражением печени обнаружено значение СПАВЛ выше нормы. Определение СПАВЛ может быть использовано для оценки иммунологической активности аутоиммунных воспалительных заболеваний.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, СКВ, неспецифический язвенный колит, спонтанная пролиферация В-лимфоцитов.

Mamasaidov A.T., Mamasaidova G.M., Sakibaev K.Sh., Tajibaev K.T., Ashirov K.T., Abdurashitova D.I., Baimurzaeva G.O., Shakirov M.Yu., Irisov A.P.

SPONTANEOUS PROLIFERATIVE ACTIVITY OF B-LYMPHOCYTES IN RHEUMATOID ARTHRITIS, SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND NON-SPECIFIC ULCERATIVE COLITIS

Abstract. The aim of present work was to study spontaneous proliferative activity of B-lymphocytes (SP-ABL) in the patients with rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus (SLE) and non-specific ulcerative colitis (NSUC). In total, 128 patients with RA, 52 patients with SLE, and 29 patients with NSUC were observed. Thirty-four patients with osteoarthritis (OA), 27 patients with reactive arthritis (ReA), 28 patients with chronic hepatitis (CH), 19 patients with chronic colitis (ChC), and 30 healthy donors comprised the control group. Significantly higher mean levels of SPABL have been revealed in the patients with RA, SLE, and NSUC, as compared to the control group. The SPABL values proved to exceed normal limits in 90.3 % of SLE patients, 82.8 % patients with RA, in 79.3 % patients with NSUC, and in 88.9 % of RA group with liver affection. Determination of SPABL may be used for assessment of immunologic activity in autoimmune inflammatory diseases. (*Med. Immunol.*, 2006, vol.8, № 4, pp 557-560)

Введение

В настоящее время общепризнанным является ведущее значение в иммунопатогенезе ревматоидного артрита (РА), системной красной волчанки (СКВ) и неспецифического язвенного колита (НЯК) гиперактивации В-системы иммунитета, проявляющиеся, в частности, в накоплении при этих

Адрес для переписки:

Мамасаидов А.Т., Кыргызская Республика,
714004, г. Ош, ул. Верхне-Увямская, д. 10/17.
Тел.: +996 (3222) 59087, факс+996 (3222) 24771.
E-mail: oshcpmo1@yandex.ru

заболеваниях циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), сывороточных иммуноглобулинов (Ig), ревматоидного фактора (РФ), антинуклеарного фактора (АНФ), разнообразных антител к соединительнотканым структурам, компонентам ядер клеток, хряща сустава и толстого кишечника, антител к ДНК и т. д. [1-7].

При этом особое место в оценке В-системы иммунитета занимают методы изучения пролиферативной функции периферических лимфоцитов, позволяющие установить, в частности, высокую спонтанную пролиферативную активность В-лимфоцитов при РА, СКВ и НЯК [8-11].

Цель исследования - изучить патогенетическое и клиническое значение спонтанной пролиферативной активности В-лимфоцитов (СПАВЛ) при различных клинических вариантах РА, СКВ и НЯК.

Материалы и методы

Нами обследованы 128 больных РА, 52 больных СКВ и 29 больных НЯК. Диагноз РА и СКВ устанавливался согласно критериям Американской ревматологической ассоциации (АРА). 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 (г. Москва). Диагноз НЯК устанавливали общепринятыми методами диагностики.

В исследуемом контингенте больных РА преобладали молодые девушки и женщины наиболее трудоспособного возраста, и в этой группе обследованных преобладала серопозитивная форма (по наличию IgM-РФ), значительное число больных имели быстропрогрессирующее течение (БПТ), у подавляющего большинства больных была отмечена умеренная (II) и высокая (III) степень активности с функциональной недостаточностью суставов I-II стадии. У 36 больных РА отмечен системный вариант - с поражением печени.

Под нашим наблюдением находились 52 больных СКВ (50 женщин и 2 мужчин в возрасте от 15 до 37 лет), которые были разделены на подгруппы по следующему клиническому вариантам:

А) по степени активности: I-ю (минимальную) степень активности патологического процесса мы наблюдали у 16 (30,7%) больных, II-ю (умеренную) - у 24 (46,1%) и III-ю (выраженную) - у 12 (23,7%) пациентов; Б) по течению: острое течение болезни отмечено у 11 (21,1%), подострое - у 25 (48,07%) и у 16 (30,7%) больных - хроническое течение болезни; В) по наличию АНФ: у 36 (69,2%) больных определялся АНФ, а у 16 (30,7%) отсутствовал; Г) с проявлениями антифосфолипидного синдрома (АФС): у 6 (11,5%) больных встречались проявления АФС, а у 46 больных (88,6%) без АФС.

Исследование проводили у 29 больных достоверным НЯК. В исследование включены 19 женщин и 10 мужчин, средний возраст которых составлял 30,6 лет. Средняя продолжительность болезни - 4,7 лет. I степень активности была отмечена у 7 больных, II

степень активности - у 13 больных, III степень активности у 9 больных.

В качестве группы сравнения обследовано 34 больных остеоартрозом (ОА), 27 больных реактивным артритом (РеА), 28 больных хроническим гепатитом (ХГ) и 19 больных хроническим колитом (ХК).

Контрольную группу составили 30 здоровых лиц, которую составили студенты медицинского факультета 20-30 лет и доноры 21-40 лет станции переливания крови, не страдающие хроническими заболеваниями и не получавшие в течение 6 месяцев никаких прививок.

Определение СПАВЛ проводилось оригинальным методом количественной цитофлюорометрии [12], основанном на определении степени активности ядерного хроматина лимфоцитов по способности активных участков нуклеиновых кислот ядра лимфоидной клетки поглощать из раствора акридиновый оранжевый (АО).

Спонтанная пролиферативная активность В-лимфоцитов определялась следующим образом.

Лимфоциты выделяли общепринятым методом на градиенте плотности 1,007 г/см³ верографин-фиколл. Выделенные лимфоциты отмывали еще 1 раз средой 199, путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 минут, затем ресуспендировали в 3-4 каплях среды 199, доводя концентрацию клеток до 4-5x10⁶/мл. Исследование пролиферативной функции лимфоцитов проводили в монослойных культурах, созданных на предметных стеклах по способу А.Н. Красюка и др. [13]. Каплю густой свежевыделенной суспензии лимфоцитов наносили на 2 чистых обезжиренных предметных стекла (контроль и опыт), инкубировали во влажной камере при комнатной температуре 3-5 мин. После чего не прилипшие клетки смывали средой 199. В результате на стекле оставалось четко сформированное пятно клеточного монослоя жизнеспособных клеток. Затем стекла со сформированным монослоем лимфоцитов, не допуская высыхания, сразу же помещали в камеры для культивирования с полной питательной средой (ППС), состоящей из среды 199 с добавлением гентамицина (0,08 мг/мл). Затем в обе культуры лимфоцитов (контроль и опыт) добавляли В-клеточный митоген - ЛПС 5 мкг/мл производства НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалея. После чего камеру с контрольной культурой лимфоцитов немедленно помещали в холодильник при t=4°C, а камеру с опытной культурой - в термостат при t=37°C с влажной камерой. Камеры инкубировали 2 часа. Затем стекла вынимали, ополаскивали в среде 199, фиксировали 15 мин 70% раствором этанола. Затем мазки окрашивали 0,001% акридиновым оранжевым (АО) по Р. Риглеру (1966). Рабочий раствор АО готовили в день опыта из маточного раствора АО концентрации 1:1000, разводя его цитратным буфером до концентрации 1:100000. Затем препарат промывали 10 минут в чистом цитратном буфере, подсушивали и измеряли уровень флюоресценции лимфоидных клеток методом количественной цитофлюорометрии (КЦФ). КЦФ проводили оригинальным методом [10] на базе микроскопа ЛЮМАМ-ИЗ, используя фотометрическую приставку ФМЭЛ-1. Цитофлюорометрию лимфоидных клеток, окрашен-

ных АО, осуществляли следующим образом. На произвольный участок препарата при невозбуждающем освещении фокусировали объектив фотометра, в котором был предварительно убран один из микрозондов с целью обеспечения измерения со всей площади объектива. После фокусирования объектива устанавливали положение, соответствующее убранному микрозону, заменяли светофильтр на возбуждающий и измеряли интенсивность флуоресценции в области 640 нм; выделяя эту область интерференционным светофильтром, встроенным в фотометр. После регистрации результата, поворотом диска заменяли интерференционный фильтр на другой и измеряли флуоресценцию в области 530 нм. Вся процедура непосредственных измерений занимает 20-30 секунд, что практически устраняет эффект фотодеструкции АО.

Полученные результаты выражали отношением флуоресценции (Ф) комплекса АО с РНК (640 нм) к комплексу АО с ДНК (530 нм). Данное соотношение (Ф640/Ф530) известно как параметр А, отражающий степень активности ядерного хроматина клеток. Таким образом определяли соотношение РНК/ДНК ядерного хроматина, которое закономерно изменяется в ходе активизации лимфоцитов. Сравнивая уровень параметра А в контроле и опыте, выводили показатель спонтанной пролиферативной активности В-лимфоцитов (СПАВЛ) по формуле: СПАВЛ=(А опыт : А контроль) × 100 усл. ед. За положительный результат принимали значение СПАВЛ, превышающее максимальное значение доверительного интервала у здоровых лиц, по формуле $M \pm \sigma$ (где σ - среднее квадратичное отклонение), т. е. значение СПАВЛ, равное 125 усл. ед. и более.

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

Результаты

Уровни СПАВЛ в обследованных группах представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, показатель СПАВЛ у больных РА, СКВ и НЯК значительно выше, чем у больных контрольной и сравнительной групп.

При этом минимальное значение данного показателя найдено у лиц контрольной группы, среднее значение СПАВЛ выявлено у больных группы сравнения, максимальное же значение вышеуказанного показателя наблюдается у больных РА, СКВ и НЯК.

При сравнении с контрольной группой уровень СПАВЛ у больных РА, СКВ и НЯК был достоверно выше ($t=7,3$, $t=14,6$ и $t=6,3$ соответственно; $p<0,001$). У больных РеА и ХГ из группы сравнения данный показатель также достоверно превышал нормативный показатель ($t=2,6$, $t=2,8$ соответственно; $p<0,01$), но был все же меньше, чем у больных РА, СКВ и НЯК. А у больных ХК и ОА из группы сравнения вышеуказанный показатель не отличался от здоровых лиц.

При сравнении же уровня СПАВЛ у больных РА с поражением печени с больными группы сравнения, следует отметить более высокое значение этого показателя у больных РА с поражением печени, по сравнению с больными ХК, ОА, ХГ и РеА, что было достоверно подтверждено ($t_1=9,2$, $t_2=8,8$, $t_3=8,1$ и $t_4=6,4$ соответственно; $p<0,001$).

Из приведенных данных таблицы 1 видно, что показатель СПАВЛ у больных СКВ, по сравнению со значением СПАВЛ у больных группы сравнения (ХК, ОА, ХГ и РеА), имел значительное превосходство, что было подтверждено статистически достоверным результатом ($t_1=12,7$, $t_2=12,2$, $t_3=11,9$ и $t_4=10,1$ соответственно; $p<0,001$).

На основе сравнения показателя СПАВЛ у больных НЯК с больными группы сравнения нами отмечен достоверно высокий уровень этого показателя у больных НЯК, по сравнению с больными ХК, ОА, ХГ и РеА ($t_1=4,9$; $t_2=4,5$; $t_3=3,6$ соответственно; $p<0,001$; $t_4=2,8$; $p<0,01$).

В частоте вышеуказанного показателя, выходящего за границы доверительного интервала нормы, имеется следующее различие. Уровень СПАВЛ выше нормы обнаружен лишь у 2 лиц из контрольной группы (6,7%), тогда как при РА, СКВ, НЯК и РА с поражением печени он составил 82,8, 90,3, 79,3 и 88,9% соответственно. У больных же группы сравнения (ОА, ХК, ХГ и РеА) уровень СПАВЛ выше нормы выявлен у 12 (35,5%), 5 (26,3%), 15 (53%) и 11 (57,9%) больных соответственно.

Табл. 1. УРОВЕНЬ СПАВЛ В ОБСЛЕДОВАННЫХ ГРУППАХ

Обследованные группы	n	M ± m	Число положительных результатов	
			Абс.	%
Контрольная	30	115,6±1,73 (106,3-124,9)	3	10,0
Больные ХК	19	117,7±2,29	5	26,3
Больные ОА	34	118,4±2,40	12	35,3
Больные ХГ	28	122,8±1,96**	15	53,0
Больные РеА	19	123,8±2,71**	11	57,9
Больные НЯК	29	133,8±2,40***	23	79,3
Больные РА	128	138,3±2,74***	106	82,8
Больные РА с поражением печени	36	145,6±1,99***	32	88,9
Больные СКВ	52	162,3±2,70***	47	90,3

Примечание: 1. в скобках доверительный интервал у здоровых лиц по формуле $M \pm \sigma$. 2.*- достоверно, по сравнению со здоровыми лицами (*- $p<0,05$; **- $p<0,01$; ***- $p<0,001$).

Обсуждение

Вышеприведенные данные, в виде высокого уровня СПАВЛ у больных РА, СКВ, НЯК, РеА и ХГ по сравнению со здоровыми, больными ОА и ХК, согласуясь с работами других авторов [2, 3, 7, 8, 10, 11, 14], подтверждают соответствие количественных значений СПАВЛ степени выраженности воспалительного процесса. Как следует из данных литературы, пролиферативная активность лимфоцитов коррелирует с наличием и степенью воспалительных изменений, а высокая пролиферативная активность В-лимфоцитов на фоне дефицита супрессорной функции Т-лимфоцитов свойственна аутоиммунным воспалительным заболеваниям, в частности РА, СКВ и НЯК [1-3, 5, 6, 15]. Обнаруженный нами максимальный уровень СПАВЛ у больных СКВ, РА и НЯК лишний раз доказывает наличие высокой степени гиперактивности иммунного ответа при этих болезнях.

Выявленное нами более высокое значение показателя СПАВЛ у больных РА с поражением печени в сравнении с больными ХГ может свидетельствовать о том, что степень иммунных сдвигов при этой форме болезни значительно выше, чем при ХГ. Но особо заслуживает внимание тот факт, что у больных РА с поражением печени показатель СПАВЛ был гораздо выше, чем у больных РА с суставным вариантом. Последнее свидетельствует о более высокой выраженности воспалительных иммунных сдвигов у больных РА с поражением печени. Следовательно, наличие ревматоидной гепатопатии говорит о более тяжелом варианте течения болезни, что должно быть учтено в определении подбора вида базисной противоиммуновоспалительной терапии и прогноза болезни у больных РА с поражением печени.

Таким образом: уровни СПАВЛ у больных РА, СКВ и НЯК были значительно выше, чем у больных ХК, ХГ, ОА, РеА и здоровых лиц; при РА с поражением печени показатель СПАВЛ был больше, чем в группе больных РА в целом; оценка СПАВЛ может быть использовано для определения иммунологической активности при аутоиммунных заболеваниях; высокий уровень СПАВЛ у больных РА, СКВ и НЯК может быть использован в качестве показателя для назначения иммунодепрессивной терапии.

Список литературы

1. Насонова В.А. Справочник по ревматологии. - М; Медицина. 1995. - с. 270.
2. Сперанский А.И., Насонова В.А., Иванова С.М., Алекберова З.С., Решетняк Т.М., Александрова Е.Н., Мелкумова К.Л. Клинико - иммунологические субтипы системной красной волчанки // Тер. архив. - 1992. - 5. - с. 6-9.
3. Ларченко Н.Т., Лоранская И.Д., Автондилов Г.Г., Трофимов К.А., Соколов М.А. Значение клинико - морфологических и иммунологических показателей в

постановке диагноза и оценке активности процесса // Клини. Медицина. - 1990. - №3. - с. 116-120.

4. Breedveld F.C. New insights in the pathogenesis of rheumatoid arthritis // I. Rheumatol. - London, 1998, - Т.25. - с. 3-6.

5. Ширинский В.С., Кирикова С.Ф. Иммунологические нарушения при различных клинических вариантах ревматоидного артрита // Тер. архив. М., 1992. - № 5. - Т.64. - с. 14-17.

6. Тимофеев В.Т., Шостак Н.А., Логинова Т.К., Мурадянц А.А., Салмаси Ж.М., Потанин А.Ю. Иммунодиагностика раннего РА // Научно-практическая ревматология. - М., 2003. - №2. - с.75 (приложение №287).

7. Sahne T. Tools for prediction of diagnosis and prognosis in RA: cartilage bone degradation // Избранные тезисы Европейского конгресса ревматологов (EULAR 2005) в сборнике матер. конф. «Актуальные вопросы ревматологии». - Алматы. - 2005. - с.91.

8. Порядин Г.В., Семёнова Л.Ю., Казимирский А.Н., Просвилов Е.Ю., Кельцева М.В. Характеристика субпопуляций лимфоцитов и активационных процессов в иммунной системе больных ранним ревматоидным артритом // Ревматология. - М., 2002. - № 4. - с. 22-25.

9. Мамасаидов А.Т., Мурзабаева Г.О., Кульчинова Г.А. Клиническое значение показателя спонтанной пролиферативной активности В-лимфоцитов при воспалительных ревматических заболеваниях. // Ревматология. М., 2003. - № 2. - С.66.

10. 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 // Медицинская иммунология. - 2004. - том 6. - №6. - С. - 567-572.

11. Таджибаева Ф.Р., Мамасаидов А.Т. Спонтанная пролиферативная В-клеточная активация при НЯК // Центрально - Азиатский медицинский журнал. - Бишкек. - 2004. - С. 78-80.

12. Бененсон Е.В., Цай Е.Д. АС. СССР. № 1328757. Открытие и изобретение. - М. 1987. - Бюлл. № 29.

13. Красюк А.Н., Панченко Н.А., Дедорович В.И. Способ определения клеточного иммунитета. // Откр. изобр. - 1985. - Бюлл. №31. - А.С. СССР №1174033.

14. Мамасаидов А.Т., Бешимов Ж.Ж., Баймырзаева Г.О. Спонтанная пролиферативная В-клеточная активация при ревматических заболеваниях // Центрально-азиатский медицинский журнал. Бишкек, 1999. - Т 5. - № 1. - С.63-65.

15. Зикирьянова Г.К., Сейсенбаев А.Ш., Габдулина Г.Х., Даниленко С.А., Беляев Н.Н. Натуральная супрессорная активность клеток периферической крови больных РА // Сборник матер. конф. «Актуальные вопросы ревматологии». - Алматы, 2005. - с. 32.

поступила в редакцию 12.01.2006
отправлена на доработку 02.02.2006
принята к печати 16.04.2006