ВИХРЕВ ДЕНИС ВЛАДИМИРОВИЧ

МОНИТОРИНГ ИЗМЕНЕНИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ГОМЕОСТАЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА СВОБОДНОГО РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОГО КЛЕТОЧНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ

Актуальность проблемы.

Несмотря на революционные успехи в развитии лабораторной иммунодиагностики, ее возможности при вторичных иммунодефицитах остаются крайне ограниченными (Хаитов Р.М., Пинегин .В., 2001). Это связано с выраженной многокомпонентностью иммунной системы, что затрудняет точную идентификацию пораженного звена иммунитета, а также с отсутствием полного знания о всех составляющих компонентах иммунной системы и особенностей их функционирования. При назначении лабораторных исследований перед врачом закономерно встает задача подбора минимально достаточного и информативного набора тестов для мониторинга состояния иммунологического гомеостаза у пациента. Предпочтительными в этих случаях являются интегральые показатели иммунобиологической перестройки организма, отражающие (желательно в достаточной степени дифференцировано) максимальное количество иммунологических характеристик максимально большего числа популяций и субпопуляций иммунокомпетентных клеток. Реализация такого подхода в настоящее время становится возможной при использовании современных инструменальных методов. К числу таких методов можно отнести свободный распределительный клеточный электрофорез лимфоцитов крови.

Использование метода клеточного электрофореза в иммунологии основано на способности клеток изменять величину поверхностного заряда при их активации антигенами, пролиферации и дифференцировке в процессе иммуногенеза.

Метод препаративного клеточного электрофореза в свободном потоке позволяет составить представление о доле клеток в популяции, вовлекаемых в процесс активации (Suga M., 1980, Eggleton P. et all., 1992).

Наблюдается зависимость между продукцией ряда ключевых иммуномедиаторов и электрокинетическими свойствами лимфоцитов (Фирстова В.В., 1996).

Колебания зарядов у разных, но здоровых индивидуумов очень незначительны. Последнее приобретает большое значение для дифференцировки многих патологических состояний. При патологии электрический заряд может существенно меняться как в результате

изменения физико-химической структуры клеточной поверхности, так и вследствие нарушения состава окружающей среды - появление в средt антител, патологических белков, продуктов распада клеток и т.д. (Хараморенко С.С., 1974; Борзова Л.В. и соавт., 1975; Темнов А.В. и соавт., 1982; Мирошников А.И., 1986; Тихомирова Е.И., 1990; Kotzsch M. et all., 1982; Silva Filho. et all., 1987; Golovanov M.V., 1991; Walter H. et all., 1995; Kapur R., 1996).

Поэтому изучение величины электрического заряда клеток приобретает важное значение для мониторинга изменений гомеостаза, в том числе иммунологического (Хараморенко С.С., 1974; Козинец Г.И. и соавт., 1975; Тихомирова Л.А., 1985; Петров Р.В., 1987; Тихомирова Е.И., 1990).

Из работ многих исследователей следует, что значительные изменения электрокинетической подвижности иммунокомпетентных клеток наблюдаются в динамике инфекционного и вакцинного процессов, при аутоиммунных и онкологических заболеваниях (Ермакова Г.В. и соавт., 1982; Щуковская Т.Н., 1984; Ледванов М.Ю., 1987; Тихомирова Л.А., Тихомирова Е.И., 1990; Фирстова В.В. и соавт., 1996; Koenig U.D., 1985; Kraskina N. et all., 1985). Метод определения ЭФП лимфоцитов в настоящее время с успехом используется для интегральной оценки клеточного звена иммунитета у человека (при чуме, туберкулезе, злокачественных опухолях, миастении и т.д.) и экспериментальных животных (аллергический энцефаломиелит, оценка степени инбридинга и т.д.). Показана динамика нормализации электрокинетических свойств лимфоцитов периферической крови в динамике восстановления иммунологического гомеостаза организма при патогенетически адекватной терапии различных заболеваний (Герасимова К.И., 1990; Родионова Т.И., 1998; Мелещенко Н.Ю., 1999). Тем не менее, комплексных сравнительных исследований изменений электрокинетических свойств лимфоцитов крови при различных нозологических формах заболеваний не проводилось. Остаются неразработанными критерии оценки изменений электрокинетических свойств лимфоцитов крови в процессе иммуномодулирующей терапии.

Цель работы

На примере широкого спектра заболеваний изучить эффективность использования метода свободного распределительного клеточного электрофореза лимфоцитов крови для мониторинга изменений иммунологического гомеостаза, а также в качестве оценочного критерия иммуномодулирующей терапии.

Задачи исследования

1. Провести анализ электрокинетических характеристик популяций и субпопуляций лимфоцитов крови у здоровых доноров (в том числе здоровых беременных женщин)
2. Провести сравнительный анализ электрокинетических свойств лимфоцитов крови людей с инфекционной патологией (сальмонеллез, урогенитальный хламидиоз, генитальный кандидоз)
3. Провести анализ электрокинетических характеристик лимфоцитов крови людей при аутоиммунной патологии (аутоиммунной офтальмопатии у больных диффузным токсическим зобом)
4. Изучить электрокинетические характеристики лимфоцитов крови людей при хронических интоксикациях (опийной и алкогольной)
5. Провести анализ электрокинетических свойств лимфоцитов крови при онкологической патологии (рак прямой кишки)
6. Провести изучение динамики изменений электрокинетических свойств лимфоцитов крови в процессе иммуномодулирующей терапии
7. Определить возможность использования показателей электрофоретической подвижности лимфоцитов крови для оценки изменений иммунологического гомеостаза, а также для определения и прогнозирования эффективности иммуномодулирующей терапии.

Научная новизна работы

Научная новизна работы определяется тем, что в ней впервые комплексно проведен анализ электрокинетических характеристик лимфоцитов крови у людей с различными заболеваниями (инфекционная патология, аутоиммунная патология, хронические интоксикации, рак прямой кишки), отличающимися по ведущему патогенетическому механизму.

Сравнительный анализ гистограмм распределения лимфоцитов крови у здоровых и больных людей позволил впервые убедительно показать отчетливое различной степени выраженности снижение электрофоретической подвижности лимфоцитов в группе больных, а также достоверные (характерные для конкретного заболевания) изменения у больных профиля распределения лимфоцитов по ЭФП. Особенно выраженные изменения ЭФП касались фракций лимфоцитов с низкой электрофоретиче-

ской подвижностью, состоящих в основном из Т-лимфоцитов. Представлены новые закономерности, отражающие значительные изменения электрокинетических свойств популяций и субпопуляций лимфоцитов. Выявлены характерные особенности изменений электрокинетических свойств лимфоцитов крови, присущие отдельным нозологическим формам заболеваний.

Новыми являются данные о клинико-лабораторной эффективности терапии хронического пиелонефрита индуктором эндогенного интерферона – циклофероном. Выявлена способность циклоферона обеспечивать восстановление иммунологического гомеостаза, выражающееся в нормализации электрокинетических свойств лимфоцитов. Впервые с использованием конкретных значений электрофоретических свойств лимфоцитов показана зависимость между исходным состоянием иммунной системы у больных пиелонефритом и эффективностью последующей терапии циклофероном.

Обоснована эффективность иммуномониторинга заболеваний, сопровождающихся нарушением иммунологического гомеостаза, с использованием клеточного электрофореза.

Практическая значимость

Определена практическая значимость и количественные критерии электрокинетических характеристик лимфоцитов крови для оценки изменений иммунологического гомеостаза.

Результаты исследований могут быть использованы в практическом плане для иммуномониторинга применения иммуномодулирующих препаратов, а также прогнозирования эффективности их действия.

Полученные данные могут быть полезны при разработке индивидуальных схем иммуномодулирующей терапии (реализации принципа индивидуализации иммуномодулирующей терапии). Результаты работы могут явиться основой создания эффективных систем иммунологического мониторинга развития иммунодефицитных состояний, а также для решения задач прогнозирования и контроля комплексной терапии.

Внедрения в практику

По материалам исследований составлены учебно-методические рекомендации “Электрокинетические свойства клеток и их использование в медицине”, которые рассмотрены и утверждены (протокол № 4 от 25 января 2002 г.) редакционно-издательской комиссией при медицинском факультете Пензенского государственного университета. Учебно-методические рекомендации используются в практической работе и научных исследованиях лабораторий РосНИПЧИ “Микроб” (г.Саратов). Материалы диссертации используются в учебном процессе на кафедрах биоло-

гии, физиологии и терапии медицинского факультета ПГУ, на кафедре гистологии Саратовского государственного медицинского университета.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены и обсуждены на:

- 4-ом конгрессе Российской Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов (РААКИ) “Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии”, Москва, 2001 г.
- Пятой научной конференции с международным участием “Дни иммунологии в Санкт-Петербурге 2001”, Санкт-Петербург, 2001 г.
- III Всероссийской конференции с международным участием “Гомеостаз и инфекционный процесс”, Сочи, 2002 г.
- Международном конгрессе «Практикующий врач», Сочи, 2002 г.
- Межкафедральной конференции Медицинского факультета ПГУ и СГМУ

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ

Проведенные исследования показали (Рис. 1), что у здоровых доноров (возрастная группа 23-33 лет) лимфоциты крови распределялись по электрофоретической подвижности (ЭФП) с 51 по 69 фракцию и формировали 4 хорошо выраженные, различающиеся по ЭФП популяции. Популяция, обладающая максимально выраженной ЭФП (А) составляла в среднем 28,34±5,94% от всего пула клеток. Максимальный выход клеток в данной популяции отмечался в 55 фракции (10,23±1,86%). Популяция с меньшей ЭФП (Б), распределявшаяся с 58 по 62 фракцию, включала 23,55±3,78% клеток с максимумом в 60 фракции (14,21±1,94%). Наибольший процент лимфоцитов крови составлял на гистограмме пик В (34,11±6,76%). В 63 фракции идентифицировался максимальный выход клеток (21,76±3,25%) при электрофоретической сортировке лимфоцитов крови доноров. Популяция лимфоцитов, обладающая наименьшей ЭФП, определялась в 65-69 фракциях (14,33±3,36%). Максимум значений выхода клеток составлял 8,21±1,05% (66 фракция).

Результаты типирования лимфоцитов (полученных с помощью распределительного клеточного электрофореза) с использованием моноклональных антител анти-CD3 (Т-лимфоциты) и анти-CD19 (В-лимфоциты) показали (рисунок 2), что клетки, относящиеся к В-популяции, концентри-

ровались преимущественно в низкоподвижных в электрическом поле фракциях (59-69 фракции). Максимум выхода В-лимфоцитов отмечался при идентификации 63 и 66 фракций (5,78±1,76% и 5,28±1,71%). Т-лимфоциты распределялись с 51 по 66 фракцию. Наибольший процент Т-лимфоцитов определялся в 63 фракции (15,91± 2,92%).

У здоровых детей (возрастная группа 3-10 лет) лимфоциты крови распределялись по электрофоретической подвижности (ЭФП) с 51 по 74 фракцию и формировали 4 хорошо выраженные, различающиеся по ЭФП популяции. Популяция, обладающая максимально выраженной ЭФП (А) составляла в среднем 16,21±3,814% от всего пула клеток. Максимальный выход клеток в данной популяции отмечался в 55 фракции (5,12±0,74%). Популяция с меньшей ЭФП (Б), распределявшаяся с 58 по 61 фракцию, включала 22,42±3,46% клеток с максимумом в 60 фракции (9,13±1,56%). Наибольший процент лимфоцитов крови составлял на гистограмме пик В (49,30±7,14%). В 63 фракции идентифицировался максимальный выход клеток (15,81±3,11%) при электрофоретической сортировке лимфоцитов крови детей. Популяция лимфоцитов, обладающая наименьшей ЭФП, определялась в 67-74 фракциях (12,31±2,18%). Максимум значений выхода клеток составлял 3,74±0,73% (69 фракция). Распределение лимфоцитов крови детей обследованной возрастной группы по электрофоретической подвижности достоверно отличалось от распределения этих клеток у взрослых.

Лимфоциты, выделенные из периферической крови *беременных*, распределялись по электрофоретической подвижности (ЭФП) с 61 по 72 фракцию (рисунок 3). Гистограмма распределения была представлена одним пиком с максимальным выходом клеток в 66 фракцию (22,33±4,16%). При сравнении распределения лимфоцитов, полученных из крови беременных и небеременных женщин, обращает внимание обнаруживаемое у беременных выраженное смещение гистограммы в сторону преобладания клеток с пониженной ЭФП. Пик максимального выхода клеток в коллектор фракций у беременных смещался на 3 канала вправо (с 63 до 66 фракций).

При инфекционной патологии наблюдались значительные изменения распределения лимфоцитов по электрофоретической подвижности.

Лимфоциты (Рис. 2) крови женщин с урогенитальным хламидиозом, обнаруживаемые после электрофоретической сортировки во фракциях 67-82 формировали три отчетливо идентифицируемые популяции (пики с максимум выхода в 68, 70 и 74 фракции). Важно отметить, что у больных лимфоциты обнаруживались в наиболее низкоподвижных фракциях, в которых у здоровых женщин клетки не выявлялись вовсе (70-82 фракции).

Анализ электрофоретической подвижности лимфоцитов крови беременных с кандидозным вульвовагинитом позволил выявить следующие сдвиги в изучаемом показателе. Лимфоциты, выделенные из периферической крови беременных с генитальным кандидозом, распределялись по электрофоретической подвижности с 63 по 74 фракцию (рисунок 3). Гистограмма распределения была представлена двумя пиками с максимальным выходом клеток в 67 фракцию (22,97±4,71%). При сравнении распределения лимфоцитов, полученных из крови беременных без грибковых поражений и с генитальным кандидозом, отмечается статистически достоверное (P<0,05) смещение гистограммы вправо в сторону преобладания клеток с пониженной ЭФП. Пик максимального выхода клеток в коллектор фракций у больных кандидозом беременных смещался на 1 канал вправо и приходился на 67 фракцию.

Анализ электрофоретической подвижности лимфоцитов крови детей, страдающих гастроинтестинальной формой сальмонеллеза показал следующие факты (Рис.4). Лимфоциты, выделенные из периферической крови на 3 сутки после поступления детей в стационар, распределялись по электрофоретической подвижности (ЭФП) с 55 по 79 фракцию (рисунок 3). Гистограмма распределения была представлена несколькими пиками, среди которых три были наиболее выражены. Первый пик (содержащий наиболее подвижные в электрическом поле клетки) имел максимальный выход клеток в 57 фракцию. В ней тестировалось 5,2± 0,46% клеток. Указанная (наиболее подвижная) популяция лимфоцитов обладала меньшей ЭФП, по сравнению с популяцией наиболее подвижных клеток (55 фракция), полученных из крови здоровых детей.

Таким образом, приведенный фактический материал показывает, что *инфекционный процесс, как правило, сопровождается значительным изменением профилей распределения лимфоцитов (и их популяций) по ЭФП и выраженным снижением (особенно Т-клеток) их электрокинетического потенциала*.

У больных с легкой степенью *аутоиммунной офтальмопатией* (АО) гистограмма распределения лимфоцитов была представлена двумя пиками. Левый пик, соответствующий наиболее подвижным в электрическом поле лимфоцитам, формировался клетками, вышедшими в 55-61 фракции. На их долю приходилось 78,70±14,24 процента. При сравнении с высокоподвижными лимфоцитами (вышедшими в коллектор до 62 фракции) здоровых доноров, оказалось, что у больных АО в этом интервале находилось в 1,5 раза больше клеток (P<0,05). Принимая во внимание эти данные, можно сделать вывод о повышении ЭФП лимфоцитов у больных АО легкой степени выраженности.

При средней тяжести заболевания наблюдалось выраженное снижение ЭФП основного пула лимфоцитов, по сравнению с предыдущей группой. Максимальный выход клеток отмечался в 61 фракции (22,46±4,15%), тогда как при легкой степени - в 56 фракции (20,71±3,59%). Обращало внимание наличие небольшой популяции лимфоцитов (12,51±2,16%), вышедших в наиболее подвижных 51-53 фракциях. Еще более сниженной ЭФП лимфоцитов была в группе больных АО тяжелой степени. Основной пул лимфоцитов формировал пик на гистограмме в районе 67-70 фракций. Эта популяция низкоподвижных клеток составляла большую часть проанализированных лимфоцитов – 72,33±8,15%.

Таким образом, лимфоциты, выделенные из крови больных АО различной степени тяжести значительно отличались по своим электрокинетическим свойствам. Чем тяжелее была степень АО, тем ниже электрофоретическая подвижность основного пула лимфоцитов.

Значительные сдвиги в электрофоретической подвижности лимфоцитов крови отмечались при хронических интоксикациях. Так, у больных опийной наркоманией (ОН) наблюдалось значительное снижение ЭФП и изменение профиля распределения клеток по изучаемому параметру (Рис. 1). Выход клеток в коллектор фракций регистрировался с 56 по 75 фракции. Следует отметить, что у здоровых лиц низкоподвижных лимфоцитов в интервале фракций 70-75 не обнаруживалось. У пациентов с ОН в этом интервале тестировалось 10,2±1,36% клеток. У больных не удавалось также статистически достоверно идентифицировать определенные электрокинетически гетерогенные популяции лимфоцитов (пики на гистограмме). Приблизительно одинаковый максимальный выход клеток приходился одновременно на 63 (9,51%), 65 (9,47%) и 68 (9,13%) фракции. Иная картина распределения лимфоцитов по ЭФП наблюдалась у больных, страдающих алкоголизмом. Лимфоциты крови больных из этой группы распределялись по электрофоретической подвижности (ЭФП) с 50 по 71 фракцию и формировали 4 достоверно выраженные, различающиеся по ЭФП популяции. Популяция, обладающая максимально выраженной ЭФП (51-55 фракции) составляла в среднем 35,04±2,47% от всего пула клеток. Максимальный выход клеток в данной популяции отмечался в 53 фракции (10,14±1,74%). Популяция с меньшей ЭФП (Б), распределявшаяся с 56 по 58 фракцию, включала 18,76±2,61% клеток с максимумом в 57 фракции (8,39±1,12%). Меньший процент лимфоцитов крови составляли на гистограмме популяции лимфоцитов с более низкой электрофоретической подвижностью. Максимальный выход клеток в этих популяциях составлял 5,04+0,89% (62 фракция) и 4,75±0,79% (66 фракция).

При сравнении данных, полученных в группе больных алкоголизмом и опийной наркоманией, можно отметить большую электрофоретическую подвижность лимфоцитов, выделенных из крови алкоголиков. Так, в 50-55 фракциях у алкоголиков тестировалось 35,04±2,47% всего пула клеток. У больных ОН в этом интервале высокоподвижных клеток лимфоциты не выходили. Напротив, в интервале низкоподвижных в электрическом поле клеток (67-75 фракции) у больных алкоголизмом тестировалось 9,41±1,23% клеток, тогда как у больных ОН – 43,37±4,58% клеток (P<0.05).

Уровень снижения ЭФП у больных ОН зависел от длительности заболевания (Рис.2). При стаже инъекций суррогатов опия до 1 года (группа А) снижение ЭФП было менее значительным, по сравнению с пациентами, принимавшими наркотик от 1 до 5 лет (группа Б) и, особенно, свыше 5 лет (группа В). Так, в группе В, начиная с 70 фракции (где в у здоровых людей лимфоцитов не обнаруживалось) и до 83 фракции идентифицировалось 62,76±4,53% клеток (P<0,001). В группе Б (стаж 1-5 лет) в указанном диапазоне фракций выявлялось 30,8±2,33%. В группе А - 2,2±0,16% соответственно. Таким образом, выявлялась четкая зависимость между изменениями в архитектонике поверхностных структур мембран лимфоцитов и длительностью заболевания ОН. Коэффициент корреляции между ЭФП лимфоцитов и стажем приема наркотика составлял 89,67±0,67 (P<0,01). Свои особенности имели конфигурации полученных гистограмм. Назначение комплексной терапии через 28 дней приводило к практически полному восстановлению ЭФП лимфоцитов в А-группе, достоверному повышению ЭФП лимфоцитов в группе Б и незначительным изменениям со стороны изучаемого показателя у больных в группе В.

Анализ электрофоретической подвижности лимфоцитов крови больных *раком прямой кишки* (средние значения до операции) показал следующее. Лимфоциты, выделенные из периферической крови, распределялись по электрофоретической подвижности (ЭФП) с 51 по 82 фракцию (рисунок 3). Гистограмма распределения была представлена четырьмя пиками с максимальным выходом клеток в 65 фракцию (9,51±1,16%). При сравнении распределения лимфоцитов, полученных из крови онкологических больных и здоровых доноров, обращает внимание обнаруживаемое у больных выраженное статистически достоверное (P<0,05) смещение гистограммы в сторону преобладания клеток с пониженной ЭФП. Пик максимального выхода клеток в коллектор фракций у больных раком прямой кишки смещался на 2 канала вправо (с 63 до 65 фракции). Если у здоровых доноров количество лимфоцитов, определяемых в высокоподвижных фракциях (51-60) составляло 46,24±6,59%, то у больных в этом интервале

фракций выявлялось только 28,67±2,74% клеток. У здоровых людей в низкоподвижных в электрическом поле фракциях (с 70 по 82) клетки не обнаруживались, тогда как у больных их количество составляло 16,69±1,22% (P<0,001). Обращает также внимание значительное изменение распределения по ЭФП отдельных популяций лимфоцитов (профиль распределения клеток значительно отличался от контрольного).

Приведенные факты свидетельствуют о высокой чувствительности мониторинга изменений иммунологического гомеостаза методом распределительного клеточного электрофореза лимфоцитов крови. В связи с этим представлялось важным изучить изменения электрофоретической подвижности лимфоцитов крови в аспекте разработки критериев оценки иммуномодулирующей терапии (динамики восстановления иммунологического гомеотаза).

Для иммуномодулирующей терапии *хронического пиелонефрита* и *урогенитального хламидиоза* был использован индуктор интерферона – циклоферон.

У больных хроническим пиелонефритом отмечались выраженные сдвиги в ЭФП лимфоцитов крови, по сравнению с группой здоровых доноров. Комплексная терапия заболевания приводила к определенной нормализации гистограммы распределения лимфоцитов крови по элекрофоретической подвижности. Включение в комплексную терапию заболевания препарата циклоферона способствовало по данным ЭФП более эффективному восстановлению показателей иммунологического гомеостаза и улучшению клинической картины заболевания (Рис.).

На рисунке показаны гистограммы распределения лимфоцитов крови по ЭФП больных хроническим пиелонефритом (стандартная схема лечения и схема, включающая циклоферон).

Как видно из рисунка, у больных хроническим пиелонефритом наблюдалось выраженное смещение гистограммы распределения лимфоцитов крови по ЭФП в сторону преобладания клеток с пониженной электрофоретической подвижностью. Так, в интервале фракций 70-75, в котором у здоровых доноров лимфоциты не встречались, у больных (до лечения) тестировалось 22,20±3,77% клеток. Лечение хронического пиелонефрита с использованием стандартной схемы приводило через 14 дней к снижению числа низкоподвижных клеток до 9,23±1,69%. В то же время, введение в схему терапии индуктора эндогенного интерферона – циклоферона приводило к более выраженному снижению числа низкоподвижных клеток – до 3,28±0,63%. Конфигурация гистограммы распределения лимфоцитов приближалась к контрольным значениям (четыре хорошо выраженных пика, сохраняющих пропорции контрольной гистограммы). Однако все четыре

пика оказывались достоверно смещенными влево (в сторону фракций с более низкой электрофоретической подвижностью).

Анализ влияния иммуномодулирующей терапии циклофероном на электрокинетические свойства лимфоцитов крови был проведен также на примере терапии урогенитального хламидиоза у женщин.

На рисунке 8 показана гистограмма распределения лимфоцитов крови больных урогенитальным хламидиозом спустя 7 дней после назначения терапии циклофероном. Лимфоциты, выделенные из периферической крови, распределялись по электрофоретической подвижности (ЭФП) с 54 по 74 фракцию. Гистограмма распределения была представлена в основном четырьмя пиками. Первый пик (содержащий для данной группы обследованных наиболее подвижные в электрическом поле клетки) имел максимальный выход клеток в 59 фракцию. В ней тестировалось 7,00± 1,12% клеток. Указанная (наиболее подвижная) популяция лимфоцитов обладала несколько меньшей ЭФП, по сравнению с популяцией наиболее подвижных клеток, (58 фракция), полученных из крови здоровых женщин. Второй пик на гистограмме распределения лимфоцитов, полученных от больных женщин на 7 сутки после начала лечения, был сформирован клетками, преимущественно вышедшими в 61 фракцию. В этой же фракции тестировался максимальный выход на всей гистограмме (10,47±1,67%). Отмечалось практически полное совпадение профилей вторых пиков на гистограммах, полученных при электрофоретической сортировке лимфоцитов больных урогенитальным хламидиозом до и после начала терапии циклофероном. Однако клетки, сформировавшие на гистограмметрети пик, имели на одну фракцию меньшую (чем в группе больных до начала лечения индуктором интерферона) электрфоретическую подвижность. Максимум их выхода тестровался во фракции с порядковым номером 65 и составлял 7,03±1,14%. Еще один (четвертый) достаточно четко выраженный пик из числа клеток с наиболее низкой электрофоретической подвижностью выявлялся в диапазоне фракций 69-72 (максимум 70-ая фракция – 1,75±0,28%). В отличие от гистограммы женщин с не леченным хламидиозом, у которых лимфоциты при электрофооретической сортировке выявлялись во фракциях с порядковым номером выше 74 (0,85±0,14%), у женщин, начавших лечение циклофероном, в этих фракциях клетки не обнаруживались.

Таким образом, спустя неделю с момента начала терапии циклофероном наблюдались небольшие, но статистически значимые ($P<0,05$) изменения электрофоретической подвижности лимфоцитов крови, по сравнению с зарегистрированными в группе больных не леченных женщин. Эти изменения касались как величиных электрофоретической подвижно-

сти лимфоцитов, так и профиля получаемых гистограмм распределения клеток по ЭФП.

Спустя 14 дней после назначения терапии циклофероном лимфоциты крови больных женщин распределялись по электрофоретической подвижности с 49 по 69 фракцию. Гистограмма распределения также как и в предыдущих случаях была представлена в основном четырьмя пиками. Первый пик (наиболее подвижные в электрическом поле клетки) имел максимальный выход клеток в 56 фракцию. В ней тестировалось 7,43±1,63% клеток. В то же время у нелеченных женщин в этой фракции тестровалось лишь 1,35±0,21% клеток, т е в 5,5 раза меньше (P<0,001). Важно отметить, что после 14 дней применения циклоферона в крови появлялись клетки с высокой электрофоретической подвижностью (фракции 49-53 – 4,51±0,99%), которых не было у нелеченных женщин. Более того, во фракциях 49-50 (2,02±0,44%) идентифицировались лимфоциты, выявить которые не удавалось даже у здоровых женщин. Второй пик на гистограмме распределения лимфоцитов, полученных от больных женщин на 14 сутки после начала лечения, был сформирован клетками, преимущественно вышедшими в 59 фракцию. В этой фракции тестировалось 10,47±1,67% клеток. Третий пик в основном был составлен клетками 61-63 фракций. В этом диапазоне идентифицировалось 19,94±4,38% лимфоцитов. Максимальный выход клеток в коллектор фракций для данной группы обследованных отмечался в 62 фракции (7,94±1,74%). Четвертый пик гистограммы, представляющий клетки с наименьшей электрофоретической подвижностью имел максимум выхода в 66 фракцию (6,00±1,32%). Важно отметить, что распределение лимфоцитов по электрофоретической подвижности в группе больных через 14 дней после начала лечения циклофероном практически полностью укладывалось (49-69 фракции) в интервал фракций распределения клеток по ЭФП у здоровых женщин (51-69 фракции). В то же время конфигурация кривой распределения клеток по ЭФП у больных резко отличалась от зарегистрированной в контроле. Необходимо также подчеркнуть, что при сравнении ЭФП-гистограмм у леченных (на 14 день) и нелеченных больных, отмечалось достоверное повышение электрофоретической подвижности основного пула лимфоцитов в группе больных, получавших циклоферон. Так, в низкоподвижных 70-78 фракциях до лечения определялось 8,64±1,38% клеток, после двух недель терапии клетки не определялись (P<0,00 1).

На Рис. 10 представлены данные распределения по электрофоретической

подвижности лимфоцитов крови женщин черед 28 дней после начала терапии циклофероном. Гистограмма сформирована четырьмя четко идентифицируемыми пиками.

Первый пик (наиболее подвижные в электрическом поле клетки) имел максимальный выход клеток в 54 фракцию. В ней тестировалось 10,47±2,09% клеток. В то же время у здоровых женщин в этой фракции обнаруживалось 2,00±0,32% клеток (в 5,23 раза меньше, P<0,01). У нелеченных женщин в этой фракции тестровалось лишь 0,28±0,05% клеток, т. е. почти, чем в 37 раз, меньше (P<0,001). У леченных циклофероном женщин на 7 и 14 сутки в 54 фракции количество клеток также было меньше: в 95 (0,11%) и 6,6 (1,58%) раз соответственно (P<0,01). Очевидно у женщин на 28 день после лечения циклоферном выявлялась наиболее элекрофоретически подвижная популяция лимфоцитов, из числа обнаруженных в условиях всех наших экспериментов. После 28 дней применения циклоферона в крови появлялось наибольшее количество клеток с максимально высокой электрофоретической подвижностью (фракции 49-53 - 11,48±2,29%). Второй пик на гистограмме распределения лимфоцитов, полученных от больных женщин на 28 сутки после начала лечения, был сформирован клетками, преимущественно вышедшими в 59 фракцию. В этой фракции тестировалось 14,41±2,88% клеток. Третий пик был составлен клетками 62 фракции (16,67±3,33). В ней идентифицировался максимальный выход клеток для данной группы обследованных. Четвертый пик гистограммы, представляющий клетки с наименьшей электрофоретической подвижностью имел максимум выхода в 66 фракцию (5,00±1,02%).

Необходимо отметить, что контуры гистограммы распределения лимфоцитов по электрофоретической подвижности в группе больных через 28 дней после начала лечения циклофероном были сходны с полученными при сортировке клеток здоровых женщин. Различия фактически заключались в смещении гистограммы леченных лиц на 1 фракцию в сторону более подвижных клеток. Указанный факт свидетельствовал, что в процессе терапии циклофероном электрофоретическая подвижность лимфоцитов крови не только постепенно восстанавливалась до контрольных цифр, но и статистически достоверно повышалась, по сравнению с ними, к 28 суткам после назначения препарата.

Одним из широко используемых методов иммуномодулирующей терапии в настоящее время является внутрисосудистое лазерное облучение крови (ВЛОК).

Изменения электрокинетических свойств лимфоцитов крови были проанализированы также на примере иммуномодулирующей терапии

больных раком прямой кишки в процессе комплексного лечения которых применялся метод внутрисосудистого лазерного облучения крови (ВЛОК).

На рисунках 3,6,7 показаны гистограммы распределения лимфоцитов крови пациентов до операции, после операции и спустя 7 дней после назначения курса ВЛОК. Как видно из рисунка 7, лимфоциты распределялись по электрофоретической подвижности с 51 по 82 фракции. Максимальный выход клеток (10,00±%1,09) обнаруживался в 62 канале. Обращала внимание тенденция к восстановлению профиля гистограммы распределения лимфоцитов по ЭФП до характеристик, регистрируемых в контроле (здоровые доноры), за исключением наиболее низкоподвижных фракций 70-82, где процент клеток (8,09±%) оказывался выше чем значений определяемых у здоровых доноров (P<0,05).

Анализ выхода клеток в 70-85 фракции позволил выявить четкие статистически достоверные сдвиги в ЭФП лимфоцитов в зависимости от состояния больного.

Восстановление после курса проведенной ВЛОК-терапии электрокинетических свойств лимфоцитов крови до величин, регистрируемых в группе здоровых доноров, свидетельствовало об определенной нормализации иммунологического гомеостаза.

Таким образом, использование физико-химического метода определения электрофоретической подвижности лимфоцитов позволило дать интегральную общую характеристику изменениям иммунологического гомеостаза у пациентов с различными заболеваниями инфекционной и неинфекционной природы. Полученные данные могут иметь важное значение при оценке степени нарушений иммунологического гомеостаза и эффективности их коррекции иммуномодулирующими препаратами.

ВЫВОДЫ

8. Анализ электрокинетических характеристик популяций и субпопуляций лимфоцитов крови у здоровых доноров (взрослых и детей) показал, что при проведении проточного распределительного электрофореза клетки, как правило, формируют 4 хорошо выраженные электрокинетически гетерогенные популяции. Клетки, относящиеся к В-популяции концентрируются преимущественно в низкоподвижных в электрическом поле фракциях, Т-лимфоциты – в высокоподвижных.

9. Гистограмма распределения лимфоцитов крови по электрофоретической подвижности (ЭФП) у беременных была представлена одним пиком. При сравнении распределения лимфоцитов,

полученных из крови беременных и небеременных женщин, обращает внимание обнаруживаемое у беременных выраженное смещение гистограммы в сторону преобладания клеток с пониженной ЭФП.

10. Развитие инфекционного процесса (сальмонеллез, урогенитальный хламидиоз, генитальный кандидоз) сопровождалось характерными изменениями профиля распределения лимфоцитов по электрофоретической подвижности. Основным направлением изменения электрофоретической подвижности является ее снижение, наиболее выраженное у Т-клеток.

11. Лимфоциты, выделенные из крови больных аутоиммунной офтальмопатией (АО) различной степени тяжести значительно отличались по своим электрокинетическим свойствам. Чем тяжелее была степень АО, тем ниже электрофоретическая подвижность основного пула лимфоцитов.

12. При хронических интоксикациях (опийной наркомании и алкоголизме) наблюдалось значительное снижение ЭФП и изменение профиля распределения клеток по изучаемому параметру. Выявлялась четкая зависимость между изменениями электрокинетических свойств лимфоцитов и длительностью заболевания. Коэффициент корреляции между ЭФП лимфоцитов и стажем приема наркотика составлял 89,67±0,67 ($P<0,01$).

13. При онкологической патологии (рак прямой кишки) отмечались характерные изменения профиля распределения лимфоцитов по электрофоретической подвижности, направленные в сторону снижения ЭФП отдельных популяций.

14. В процессе патогенетически корректно проводимой иммуномодулирующей терапии (циклоферон при хламидийной инфекции и хроническом пиелонефрите, назначение внутрисосудистого лазерного облучения крови при раке прямой кишки) отмечалось повышение ЭФП лимфоцитов крови и нормализация профиля гистограмм распределения лимфоцитов по ЭФП.

15. Свободный проточный клеточный электрофорез лимфоцитов крови можно рекомендовать в качестве высокочувствительного и высокоинформативного метода мониторинга изменений иммунологического гомеостаза при различной патологии.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Эффективность мониторинга изменений иммунологического гомеостаза при инфекционных заболеваниях методом свободного

распределительного клеточного электрофореза // Тезисы докл. На Конгрессе «Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии». – Москва. – 2001. – С. 147. Соавт.: Журавель В.А., Стукова Н.Ю., Семененко М.С., Фирстова В.В., Мелещенко Н.Ю., Цека Ю.С., Ледванов М.Ю.

2. Изменения иммунологического гомеостаза у больных аутоиммунной офтальмопатией в сочетании с диффузным токсическим зобом // Тезисы докл. На Конгрессе «Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии». – Москва. – 2001. – С. 85. Соавт.: Журавель В.А., Мелещенко Н.Ю., Стукова Н.Ю., Семененко М.С., Фирстова В.В., Михайлов А.В., Ледванов М.Ю.
3. Распределение по фазам клеточного цикла (G1+G0; S; G2+M) электрокинетически гетерогенных популяций лимфоцитов крови при хламидийной и вирусной урогенитальной инфекции // Тезисы докл. На Конгрессе «Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии». – Москва. – 2001. – С. 219. Соавт.: Стукова Н.Ю., Журавель В.А., Семененко М.С., Фирстова В.В., Кравцов А.Л., Ледванов М.Ю.
4. Активность ферментов метаболизма адениннуклеотидов в электрокинетически гетерогенных популяциях лимфоцитов крови у беременных с грибковыми поражениями половых органов // Тезисы докл. На Конгрессе «Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии». – Москва. – 2001. – С. 164. Соавт.: Журавель В.А., Мелещенко Н.Ю., Стукова Н.Ю., Семененко М.С., Фирстова В.В., Михайлов А.В., Ледванов М.Ю.
5. Мониторинг иммунологического гомеостаза при инфекционных заболеваниях методом свободного распределительного клеточного электрофореза // Тезисы докл. на конф. «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге 2001”, г. Санкт-Петербург. – 2001. – С. 216. Соавт.: Журавель В.А., Стукова Н.Ю., Семененко М.С., Фирстова В.В., Мелещенко Н.Ю., Цека Ю.С., Ледванов М.Ю.
6. Прогнозирование эффективности лечения циклофероном хламидийного эндоцервицита с использованием мониторинга электрокинетических свойств лимфоцитов // Тезисы докл. на конф. «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге 2001”, г. Санкт-Петербург. – 2001. – С. 325. Соавт.:Ледванов М.Ю., Стукова Н.Ю., Журавель В.А., Семененко М.С., Фирстова В.В., Кравцов А.Л., Китков А.В., Егорова Е.В., Бутковская М.Н.

7. Изучение популяционного состава и функциональной активности клеток системы фагоцитирующих мононуклеаров в процессе иммуногенеза к чуме с применением проточного распределительного клеточного электрофореза // Тезисы докл. на конф. «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге 2001”, г. Санкт-Петербург. – 2001. – С. 240. Соавт.: Стукова Н.Ю., Фирстова В.Ф., Журавель В.А., Ледванов М.Ю.
8. Мониторинг изменений иммунологического гомеостаза с использованием метода свободного распределительного клеточного электрофореза лимфоцитов крови // Тезисы докл. на III Общероссийской конф. «Гомеостаз и инфекционный процесс», г. Сочи. – 2002. – С. 129. Соавт.: Журавель В.А., Фирстова В.В., Стукова Н.Ю., Цека Ю.С., Мелещенко Н.Ю., Семененко М.С., Темников Р.А., Ледванова Т.Ю., Родионова Т.И.