УДК 616.832- 004.2

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА НА ПРИМЕРЕ ОЦЕНКИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ БОЛЬШИХ ГРАНУЛЯРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Танаева Н.И., Макаров С.В., Вдовушкина Т.А., Макарова И.В.

ГБУЗ СО «Самарская городская больница № 4», Самара, e-mail: NITgb@yandex.ru

У 27 больных рассеянным склерозом с ремиттирующим и вторично-прогрессирующим течением в мазках периферической крови проведена морфометрия больших гранулярных лимфоцитов после нагрузочного теста с серотонином. В контрольной группе было 16 доноров, 19 пациентов с другими неврологическими заболеваниями. Изменения размеров клеток, ядер, цитоплазмо-ядерных отношений отражали различную активность больших гранулярных лимфоцитов в стадии обострения и ремиссии при ремиттирующем, вторично-прогрессирующем течении рассеянного склероза и подчеркнули значимую роль серотонинергических механизмов в регуляции функции этой популяции иммунокомпетентных клеток. На основе интегральной оценки морфофункционального состояния больших гранулярных лимфоцитов с применением системного многофакторного анализа разработаны математические модели для дополнительной клинико-лабораторной диагностики рассеянного склероза. Полученные результаты могут использоваться в качестве дополнительного метода в диагностике рассеянного склероза.

Ключевые слова: рассеянный склероз, большой гранулярный лимфоцит, морфометрия

CLINICAL LABORATORY DIAGNOSIS OF MULTIPLE SCLEROSIS IN CASE EVALUATION MORPHOFUNCTIONAL CONDITION LARGE GRANULAR LYMPHOCYTES

Tanaeva N.I., Makarov S.V., Vdovushkina T.A., Makarova I.V.

GBUZ SO «Samara city hospital № 4», Samara, e-mail: NITgb@yandex.ru

In 27 patients with relapsing-remitting and secondary progressive course multiple sclerosis in the peripheral blood smears performed morphometry of large granular lymphocytes after a load test with serotonin . In the control group was 16 donors, 19 patients with other neurological diseases. Changes cell volume, nuclear volume, ratio of the nucleus to the cytoplasm reflect different activity of large granular lymphocytes in the acute stage and remission in relapsing-remitting, secondary progressive course of MS. This emphasizes the important role of serotonergic mechanisms in the regulation of immune cell populations. Based on the integral evaluation of morphofunctional state of large granular lymphocytes using multivariate analysis system, developed mathematical models for additional clinical and laboratory diagnosis of multiple sclerosis. The results obtained can be used as an additional method for the diagnosis of multiple sclerosis.

Keywords: multiple sclerosis, large granular lymphocyte, morphometry

Диагностика рассеянного склероза (РС) не вызывает затруднений у лиц молодого возраста с типичной клинической картиной и характерными признаками параклинических методов исследования. Тем не менее невролог в практической работе встречается с необходимостью оценки течения заболевания, проведения дифференциальной диагностики РС с клинически сходными заболеваниями нервной системы сосудистого, дисметаболического, дегенеративного, аутоиммунного и иного генеза. Учитывая, что проявления рассеянного склероза имеют индивидуальные особенности с непрогнозируемыми периодами обострения заболевания [1, 5], разработка новых методов лабораторной диагностики РС, позволяющих получить дополнительную информацию о развитии заболевания на основе оценки состояния отдельных звеньев и систем, участвующих в иммунопатологических механизмах, имеет актуальное значение в условиях становления персонифицированной медицины.

Накапливаются данные об активном участии системы естественной цитотоксичности в реализации воспалительных и аутоиммунных реакций при РС [2, 6, 7]. Большой гранулярный лимфоцит (БГЛ) как представитель данной системы, имеющий определенные иммунологические и морфологические характеристики, связан с механизмами аминорегуляции [4]. Его способность к депонированию и высвобождению биогенных аминов в условиях аминорегуляции сочетается с ультраструктурной и морфологической перестройкой. К числу информативных морфометрических критериев перехода лимфоидных клеток в иное функциональное состояние [3] относится изменение размеров клетки, ядра, возможная динамика цитоплазменно-ядерных отношений (ЦЯО), отражающих компенсаторные процессы в клетке.

Цель исследования: определить морфофункциональное состояние (МФС) больших гранулярных лимфоцитов и на основе их интегральной оценки разработать допол-

нительный метод для диагностики рассеянного склероза.

Материал и методы исследования

Под наблюдением находилось 27 больных рассеянным склерозом с ремиттирующим (РРС) и вторично-прогрессирующим течением (ВПРС) в возрасте от 26 до 45 лет с длительностью заболевания от 2 до 18 лет. Показатель инвалидизации больных по шкале EDSS составил 4,31 + 0,36 балла. Контрольная группа пациентов состояла из 16 доноров и 19 пациентов в возрасте от 20 до 52 лет с другими неврологическими заболеваниями (ДНЗ) сосудистого, вертеброгенного генеза, нейродегенеративной патологией, имеющими клиническое сходство с рассеянным склерозом на определенном этапе своего развития и вызвавшими затруднения в процессе диагностики. В обследовании приняли участие лица обоего пола.

Материалом для лабораторного исследования служила гепаринизированная венозная кровь, взятая натощак. Фракция мононуклеарных клеток выделялась общепринятым способом с использованием градиента плотности фиколл-верографин фирмы «Pharmacia Chemical» (Uppsala, Sweden). Взвесь мононуклеарных клеток в концентрации $2 \cdot 10^6$ кл. в 1 мл среды 199 инкубировалась 40 мин при t – 37°С в 10^{-4} М растворе креатинин-сульфата серотонина. Материалом для морфометрии служили мазки, приготовленные из взвеси мононуклеарных клеток, полученных после обработки гистохимическим методом Севки и окраской по Романовскому-Гимза. Морфометрия БГЛ (от 45 клеток в каждой группе исследований) проводилась с использованием правила случайной выборки и включала в себя измерение линейных размеров цитоплазмы и ядра клеток в 2-х взаимоперпендикулярных осях с помощью окуляр-микрометра МОВ-1-15х. Полученные данные подвергались математической обработке по программе вычисления стереометрических показателей: объем клетки ($V_{кл}$), объем ядра ($V_{яд}$). Цитоплазмо-ядерное отношение (ЦЯО) определялось по формуле: $(V_{кл} - V_{яд})\backslash V_{яд}$. Расчет статистических данных включал: среднее арифметическое значение показателей (X), стандартное отклонение (σ). Определение статистической значимости различий выборок проводилось с помощью параметрического критерия Стъюдента. Корреляционный анализ признаков внутри группы проводился методом ранговых корреляций Спирмена. Для математического моделирования использовался системный многофакторный анализ, в основе которого лежит вычисление интегральных показателей ($X_{Bi} \pm \sigma_i$) по полученным в процессе исследования единичным параметрам [3]. Степень влияния единичных параметров на систему, за которую принят большой гранулярный лимфоцит с комплексом морфометрических данных при нагрузке серотонином, оценивалась весовым коэффициентом (P_i).

Результаты исследования и их обсуждение

Для сравнительной характеристики были выделены группы больных с различным течением РС и ДНЗ. В группе доноров объем клеток составлял 267,3 ± 9,7 мкм, что было заметно меньше ($p < 0,05$), чем в группах больных рассеянным склерозом (таблица); объем ядра составил – 144,9 ± 6,5 мкм; ЦЯО – 0,95. Идентичность ЦЯО БГЛ – как одного из признаков активации морфофизиологических процессов клетки при сравнении групп доноров и больных ДНЗ дает основание предполагать ограниченную роль этой популяции лимфоцитов в формировании иммунной дисфункции при ДНЗ. Показатели объема клеток у больных РС были выше, достигая статистически значимых различий при ремиттирующем течении ($p < 0,05$) в сравнении с данными больных с ДНЗ.

Большие величины объема клетки БГЛ в нагрузочном тесте с серотонином при РС в сравнении с контрольными группами подтверждают их активацию и роль в механизмах амиинорегуляции при этом заболевании. Объем ядра БГЛ больных с различным течением РС также превышал аналогичный показатель доноров и пациентов с ДНЗ, особенно в стадии обострения заболевания ($p < 0,05$). Цитоплазмо-ядерные отношения БГЛ больных с РРС в стадии ремиссии и ВПРС отличались более высокими значениями в сравнении с данными доноров и ДНЗ. В сравнении со стадией ремиссии при РРС период обострения заболевания характеризовался меньшими морфометрическими показателями ядра БГЛ, ЦЯО. У больных со вторично-прогрессирующим течением РС в сравнении с ремиттирующим течением объем клетки и ядра БГЛ был существенно меньше. Однако их показатели имели определенное сходство с данными группы ДНЗ, что может указывать на меньшую морфофункциональную активность этой популяции лимфоцитов в реализации иммунопатологических реакций при ВПРС. У больных с ремиттирующим течением РС отмечались большие значения стандартных отклонений, особенно в стадию ремиссии, что подтверждает неоднородность функциональной активности БГЛ в этот период заболевания и может быть проявлением отражения клинико-иммунологической гетерогенности РС. При сравнительной внутригрупповой оценке показателей возраста, пола, уровня поражения нервной системы, длительности течения заболевания, показателя инвалидизации с морфометрическими данными БГЛ у больных РС с различным течением заболевания значимых изменений не выявлено.

Для определения диагностической ценности полученных результатов проведено математическое моделирование МФС БГЛ. Наибольшие значения интегрального показателя, характеризующего степень изменения МФС БГЛ, были отмечены у больных РС при сопоставлении с группой ДНЗ, где он носил отрицательное значение. Если у больных РС на результат интегрального

показателя согласно коэффициенту (Pi) доминирующее влияние оказывал объем клетки и ЦЯО БГЛ, то у пациентов с ДНЗ это был объем клетки и ядра.

Средние значения, коэффициент влияния и интегральные показатели МФС БГЛ у больных РС и ДНЗ

Показатель морфометрии в тест-системе с серотонином	X ± σ	Коэффициент влияния (Pi)	Расчетный интегральный показатель $\left(\hat{X}_{Bi} \pm \sigma_i\right)$	Интегральный показатель для практической модели ($X_{Bi} \pm \sigma_i$)
Ремиттирующее течение. Стадия ремиссии				
$V_{клетки}$	368,0 ± 37,2	24,6	0,087 ± 0,01	0,095 ± 0,041
$V_{ядра}$	203,0 ± 57,0	0,68	0,095 ± 0,041	
ЦЯО	1,19 ± 0,06	5,62	0,047 ± 0,012	
Ремиттирующее течение. Стадия обострения				
$V_{клетки}$	375,2 ± 37,5	16,7	0,037 ± 0,011	0,089 ± 0,008
$V_{ядра}$	194,3 ± 17,3	16,2	0,089 ± 0,008	
ЦЯО	0,96 ± 0,06	37,8	0,015 ± 0,004	
Вторично-прогрессирующее течение				
$V_{клетки}$	294,0 ± 15,3	11,96	–0,115 ± 0,015	
$V_{ядра}$	157,6 ± 13,5	4,45	0,004 ± 0,017	0,004 ± 0,017
ЦЯО	1,12 ± 0,09	58,0	0,053 ± 0,004	
Группа ДНЗ				
$V_{клетки}$	260,7 ± 21,8	28,1	–0,041 ± 0,01	
$V_{ядра}$	147,5 ± 8,7	120,6	–0,093 ± 0,003	-0,093 ± 0,003
ЦЯО	1,08 ± 0,06	24,6	–0,085 ± 0,005	

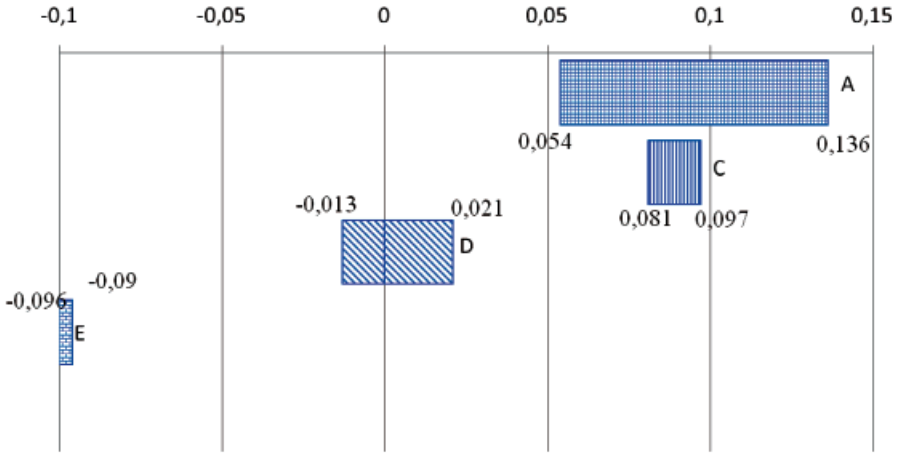
Примечание. Объемы (*V*) клетки, ядра (*V*) измерялись в мкм^3.

Высокие среднеквадратичные отклонения (σ_i) расчетной величины интегрального показателя $\left(\hat{X}_{Bi}\right)$ у больных РС свидетельствуют о большей динамичности системы, неоднородном функциональном состоянии этих клеток и, следовательно, различной степени участия в иммунных процессах при РС и ДНЗ. Это дает основание использовать анализируемые данные для дифференциальной диагностики РС с другой патологией нервной системы. Полученные интегральные показатели МФС БГЛ были неодинаковы в моделях как в группах больных РС с различным течением, так и при ДНЗ. Это создало предпосылки для разработки математических моделей МФС БГЛ, предлагаемых в практику. Анализ показателей весовых коэффициентов позволил внести в работу по математическому моделированию МФС БГЛ значения объема клетки и ядра. Полученные интегральные показатели ($X_{Bi} \pm \sigma_i$) МФС БГЛ для практического применения у больных РС были выше, чем в расчетных (теоретических) моделях $\left(\hat{X}_{Bi} \pm \sigma_i\right)$, за исключением пациентов с ДНЗ, что подчеркивает информативность моделей для дополнительной диагностики РС.

В завершении математического моделирования была создана графическая матрица интегральных показателей МФС БГЛ (рисунок). Как видно из рисунка, матрицы ($X_{Bi} \pm \sigma_i$) для оценки МФС БГЛ при РС и ДНЗ не имеют зон совмещения, что свидетельствует о высокой их дискриминирующей способности для клинико-лабораторной диагностики РС.

Отмечалось частичное совмещение зон между интегральными показателями МФС БГЛ у больных РС с ремиттирующим течением в стадии обострения и ремиссии. Такое состояние, возможно, связано с идентично-

стью их морфофункциональных характеристик и серотонинергической регуляцией БГЛ на определенном этапе развития РРС. Тем не менее сохраняется высокая диагностическая ценность вычисленных интегральных показателей МФС БГЛ в практической модели.



Матрица интегральных показателей ($X_{Bi} \pm \sigma_i$) морфофункционального состояния БГЛ у неврологических больных (горизонтальная ось их значения): A – РРС стадия ремиссии; C – РРС стадия обострения; D – ВПРС; E – ДНЗ

Заключение

Таким образом, разработанные математические модели морфофункционального состояния больших гранулярных лимфоцитов отражают различную степень их активности в иммунных реакциях при РС и ДНЗ. Выявленная дискриминирующая способность нагрузочного теста с серотонином в оценке МФС БГЛ подтверждает, что серотонинергическая регуляция функции клеток системы естественной цитотоксичности принимает участие в патогенетических механизмах развития заболевания. Разработанный метод дополнительной клинико-лабораторной диагностики РС может применяться в практическом здравоохранении.

Список литературы

1. Гусев Е.И., Завалишин И.А., Бойко А.Н. Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. – М., 2004. – 540 с.

2. Макаров С.В., Танаева Н.И., Тюмина О.В. К вопросу о роли системы естественной цитотоксичности в механизмах пато- и саногенеза рассеянного склероза // Рассеянный склероз: современные тенденции: материалы III Сибирской межрегиональной научно-практической конференции. – Новосибирск, 2007. – С. 17–20.

3. Математическое моделирование в теоретической и практической медицине: сб. науч. работ / Самар. гос. мед. ун-т ; под ред. М.В. Угловой – Самара, 1994. – 110 с.

4. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Физиология естественных киллеров. – М., 2005. – 455 с.

5. Шмидт Т.Е., Яхно Н.Н. Рассеянный склероз: рук. для врачей. – 2-е изд. – М., 2010. – 267 с.

6. Kaur G., Trowsdale J., Fugger L. Natural killer cells and their receptors in multiple sclerosis // Brain. – 2013. – Sep;136 (Pt 9). – P. 2657–2676.

7. Sakuishi K., Miyake S., Yamamura T. Role of NK cells and invariant NKT cells in multiple sclerosis // Results Probl. Cell Differ. – 2010. – 51. – P. 127–147.

References

1. Gusev E.I., Zavalishin I.A., Boyko A.N. Rasseyannyy skleroz i drugie demieliniziruyuschie zabolevaniya. M., 2004. 540 p.

2. Makarov S.V., Tanaeva N.I., Tyumina O.V. *Materialy III Sibirskoy mezhregionalnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Rasseyannyy skleroz: sovremennye tendentsii»*. Novosibirsk, 2007. pp. 17–20.

3. Matematicheskoe modelirovanie v teoreticheskoy i prakticheskoy meditsine = Mathematic simulation in theoretical and practical medicine : sb. nauch. rabot / Samar. gos. med. un-t ; pod red. M.V. Uglovoy, G.P. Kotelnikova. Samara, 1994. 110 p.

4. Sepiashvili R.I., Balmasova I.P. Fiziologiya estestvennykh killerov. M., 2005. 455 p.

5. Shmidt T.E., Yakhno N.N. Rasseyannyy skleroz : ruk. dlya vrachey. 2-e izd. M., 2010. 267 p.

6. Kaur G., Trowsdale J., Fugger L. Natural killer cells and their receptors in multiple sclerosis // Brain. 2013. Sep;136 (Pt 9). P. 2657–2676.

7. Sakuishi K., Miyake S., Yamamura T. Role of NK cells and invariant NKT cells in multiple sclerosis // Results Probl. Cell Differ. 2010. 51. P. 127–147.

Рецензенты:

Кухтевич И.И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой неврологии, ГБОУ ДПО «Пензенский институт усовершенствования врачей» Минздрава России, г. Пенза;

Калуцкий П.В., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Курск.

Работа поступила в редакцию 04.04.2014.