

ОПТИКО-СТРУКТУРНЫЙ МАШИННЫЙ АНАЛИЗ (ОСМА) ДНК ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИМИ ОТЕКАМИ НИЖНЕЙ КОНЕЧНОСТИ

Маргарита Владимировна РОБИНСОН¹, Андрей Иванович ШЕВЕЛА², Валерий Алексеевич ТРУФАКИН¹

¹ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 4

²АНО Центр новых медицинских технологий
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 25/4

В работе анализируются данные ОСМА ДНК лимфоцитов больных лимфатическими отеками нижних конечностей при применении терапевтического лечения. Обнаружены изменения в содержании ДНК у больных по сравнению с здоровыми и в зависимости от лечения. Показана информативность изучения ДНК лимфоцитов крови в оценке патологического процесса лимфатической системы.

Ключевые слова: лимфатический отек, лимфоцит, ДНК.

В настоящее время накоплен обширный материал по этиологии и патогенезу, диагностике и лечению, роли лимфатической системы при лимфатических отеках конечностей, которые являются одной из распространенных патологий лимфатической системы [1, 2].

В последние годы выявлены изменения гуморального и клеточного иммунитета при возникновении лимфатических отеков конечностей [3, 4, 5], появились новые методы лечения, связанные с применением аутологических лимфоцитов [6], отдельных цитокинов [7, 8]. Между тем, в патогенезе лимфатических отеков конечностей не обозначена роль лимфоцитов, неизвестен их субпопуляционный состав и метаболизм в месте протекания патологического процесса и на уровне целостного организма.

В настоящее время накоплены некоторые данные по использованию оптико-структурного машинного анализа (ОСМА) ДНК для анализа лимфоидной системы в норме и при патологии [9, 10]. Несмотря на это, при лимфатических отеках конечностей и их лечении ОСМА ДНК лимфоцитов проведен не был. Все вышесказанное и определило цель данной работы — провести ОСМА ДНК лимфоцитов больных лимфедемой нижней конечности до и после консервативного лечения.

Материалы и методы

Больные наблюдались в клинике ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН сотрудниками лаборатории оперативной лимфологии. Под наблюдением находилось 32 женщины с лимфедемой нижней

конечности. Возраст больных колебался от 53 до 61 года, со средней продолжительностью отека 4,35 года. У 40,6% исследуемых наблюдали отек правой, у 59,4% — отек левой конечности. В качестве контроля служили 25 находящихся на обследовании в клинике и признанные на момент взятия крови здоровыми женщин сходного возраста.

Всем больным проводилось консервативное лечение. Базовый курс терапии включал в себя прием венотоников (Детралекс, Троксевазин) в общепринятой дозе, проведение пневмомассажа конечностей с помощью аппарата «Лимфа — Э» с компрессией до 60 мм рт. ст. в режиме «бегущей волны» в течение 45 минут один раз в сутки. В качестве десенсибилизирующей терапии больным назначался диазолин по одной таблетке на ночь.

У больных выполняли общепринятые стандартные лабораторные и биохимические тесты, а также реолимфовазографию, ультразвуковое исследование мягких тканей, импедансометрию, тепловизионное исследование конечностей. Исследования проводились в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации (2000).

У больных лимфатическими отеками до и после лечения был проведен оптико-структурный машинный анализ ДНК лимфоцитов крови. Параметры ДНК в лимфоцитах определяли на уровнях: донор — больной до лечения — больной после лечения. Кровь доноров и больных забирали в утренние часы.

Лимфоциты крови окрашивали в мазках венозной крови по Фельгену в модификации [11].

Робинсон М.В. — главн. н.с. лаборатории иммуноморфологии, д.б.н., e-mail: robin@physiol.ru

Шевела А.И. — научный руководитель Центра Новых Медицинских Технологий, чл.-корр. РАЕН, профессор, д.м.н.

Труфакин В.А. — академик РАМН, председатель президиума СО РАМН, зав. лаборатории иммуноморфологии, профессор

Таблица 1

Основные параметры ОСМА ДНК лимфоцитов больных лимфатическими отеками нижней конечности ($M \pm m$)

Группа	DL (мкм)	DP (мкм ²)	DI (усл. ед. прибора)
Контроль	19,22 ± 0,54	18,38 ± 0,60	6,52 ± 0,08
Больные до лечения	20,49 ± 0,97	23,07 ± 2,40*	6,91 ± 0,08*
Больные после лечения	20,61 ± 0,90	23,8 ± 2,10*	6,74 ± 0,09

Примечания: * — достоверное отличие от контроля.

Таблица 2

Процент клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла больных лимфатическими отеками нижней конечности («местная реакция») ($M \pm m$)

Группа	G0	G1	S
Контроль	53,6 ± 1,64	26,6 ± 3,50	19,8 ± 3,80
Больные до лечения	47,5 ± 4,38	28,3 ± 2,85	23,3 ± 4,70
Больные после лечения	45,3 ± 4,59*	24,8 ± 2,80	29,7 ± 3,61*

Мазки фиксировали в метаноле в течение 5 минут. Затем проводили гидролиз в 5 н HCl при температуре 25°C в течение 20 минут. Далее препараты переносили на 2 часа в реактив Шиффа (1 г основного фуксина для фуксинсернистой кислоты растворяли в кипящей дистиллированной H₂O, добавляли 2 г метабисульфита натрия или калия и 20 мл 1 н HCl) при комнатной температуре в темноте. Затем мазки споласкивали три раза по 2 минуты в сернистой воде (5 мл 10% раствора метабисульфита натрия или калия, 5 мл 1 н HCl, H₂O до 100 мл). Далее мазки промывали в дистиллированной воде, высушивали и микроскопировали. В мазке крови подсчитывали 150–200 клеток.

Измерения оптико-структурных параметров ДНК проводились на сканирующем микроскоп-фотометре «Люам ПМ-11» (ЛОМО), соединенном с компьютером IBM PC. Для анализа изображений использовался пакет собственных программ, разработанный сотрудниками лаборатории иммуноморфологии ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН И.Б. Беланом, н.с. Н.Л. Козырь [9].

Определяли следующие оптико-структурные параметры ДНК: периметр (DL; мкм), площадь (DP; мкм²), интегральную оптическую плотность (количество ДНК) (DI; условные единицы прибора) ДНК. Клетки, находящиеся в разных фазах клеточного цикла, оценивались при помощи предложенного Г.И. Козинцом и соавторами анализа двумерного распределения количества и оптической плотности ДНК [10].

В работе использовали общепринятые статистические методы. Достоверность разли-

чий оценивали по непараметрическому критерию Вилкоксона-Манна-Уитни. Информативность оценивалась количественным методом Кульбака [12].

Результаты и обсуждение

В лимфоцитах крови больных лимфатическими отеками нижней конечности наблюдались следующие изменения параметров ДНК (табл. 1). Площадь ядра (DP) была достоверно увеличена у больных до лечения (по сравнению с контролем). После лечения этот показатель остается повышенным (по сравнению с контролем), но не отличается от такового у больных до лечения.

Интегральная оптическая плотность (DI), характеризующая содержание ДНК в ядре клетки, была повышена у первичных больных (по сравнению с контролем), после лечения этот параметр несколько понижается по сравнению с таковым до лечения, не достигая контрольных величин.

Не остается постоянным при лимфатических отеках нижней конечности и количество клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла. Так, количество клеток, находящихся в G0-фазе клеточного цикла, уменьшается, а процент клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла у больных увеличивается, при этом после проведения курса терапии различия с контролем становятся достоверными (табл. 2).

Была подсчитана информативность параметров ОСМА, данных реолимфографии в оценке «здоровье — болезнь» и в оценке эффективности лечения больных лимфатическими отеками нижней конечности.

Следует отметить, что у больных лимфати-

Таблица 3

Информативность параметров ОСМА, данных реолимфовазографии в оценке «здоровье - болезнь» больных лимфатическими отеками нижней конечности

Параметр	Информативность
Скорость оттока лимфы	1,51
Количество клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла	0,60
Объем лимфооттока	0,52
Объем венозного оттока	0,45
Количество клеток, находящиеся в G1-фазе клеточного цикла	0,41
Скорость оттока в вены	0,40
Соппротивление венозному оттоку	0,36
DL	0,18
Соппротивление лимфооттоку	0,15
DI	0,12

Таблица 4

Информативность параметров ОСМА, данных реолимфовазографии в оценке «болезнь - лечение» больных лимфатическими отеками нижней конечности

Параметр	Информативность
Объем лимфооттока	0,71
Скорость лимфооттока	0,55
Скорость венозного оттока	0,50
Объем венозного оттока	0,36
Соппротивление лимфооттоку	0,35
Соппротивление венозному оттоку	0,17
Количество клеток, находящихся в G0-фазе клеточного цикла	0,17
Количество клеток, находящихся в G1-фазе клеточного цикла	0,16
Количество клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла	0,14
DL	0,14
DP	0,13
DI	0,13

ческими отеками нижней конечности высокоинформативными для характеристики процесса «здоровье — болезнь», наряду с параметрами реолимфовазографии, являются некоторые параметры ОСМА (процент клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла) (**табл. 3**).

В оценке эффективности лечения параметры реолимфовазографии имеют большее значение. Информативность параметров ОСМА ДНК лимфоцитов низка (**табл. 4**).

Таким образом, оценены параметры ОСМА ДНК лимфоцитов больных лимфатическими отеками нижней конечности. Определена информативность этих параметров и параметров реолимфовазографии в оценке лимфатических отеков нижней конечности как на уровне «здоровье — болезнь», так и на уровне «до лечения — после лечения».

Содержание ДНК в лимфоцитах больных лимфатическими отеками конечностей повы-

шено по сравнению со здоровыми людьми. Это может быть связано с перераспределением у больных клеток разного класса, и/или с изменением интенсивности процессов пролиферации, дифференцировки, миграции, апоптоза, играющих большую роль в жизнедеятельности иммунокомпетентных клеток. На активность данных процессов может оказывать влияние появление у таких больных в интерстиции веществ различных классов. Хорошо известно, что на начальных этапах протекания лимфатического отека в интерстиции прогрессирует образование кислых и нейтральных мукополисахаридов, протеинов, жиров и других коллоидных частиц с большим молекулярным весом. Происходит скопление в тканях фибрина, затрудняющего всасывание в лимфатических капиллярах, возможна задержка бактерий в тканях. Нарушение водного и белкового обмена приводит к разрастанию соединительной

ткани с последующим гиалинозом и склерозом. На этом фоне возникает благоприятная обстановка для развития инфекционного процесса [13]. Возможно, изменение содержания ДНК происходит под влиянием этих продуктов нарушенного белкового, водного и углеводного обмена и происходящих при этом процессах. Работы о взаимоотношении лимфоцитов и составляющих экстраклеточного вещества имеются. Так, было показано, что наряду с молекулами клеточной поверхности, лимфоцит может взаимодействовать с основными компонентами внеклеточного матрикса через рецепторы лимфоцитов для него [14]. Имеются данные о влиянии веществ внеклеточного матрикса и на морфогенетические процессы лимфоцитов [15, 16]. Таким образом, изменение содержания ДНК в лимфоцитах при нарушенном микроокружении кажется вполне вероятным.

Итак, нами были приведены данные оптико-структурного машинного анализа ДНК лимфоцитов крови здоровых доноров и больных лимфедемой нижней конечности. Найдены различия этих показателей у больных до и после лечения и здоровых людей. Обнаруженные изменения параметров ОСМА ДНК лимфоцитов регистрировались на фоне проведения консервативной терапии больных, положительный эффект которой был подтвержден данными клинического обследования. Выявлена информативность параметров ОСМА и данных реолимфографии. Показана значимость их изучения для характеристики лимфоцитов крови больных лимфатическими отеками.

Литература

1. Person B., Addiss D., Bartholomew L. et al. A qualitative study on the psychological distress, suffering and coping of woman with chronic filarial lymphedema // Health Care Women Int. 2008. 29 (4): 349-365.
2. Damstra R.J., Stensel M.A., Boomsa J. et al. Erysipelas as a sign of subclinical primary lymphedema // Brit.J.Dermatol. 2008. 3: 325-328.
3. Елагина Л.В., Савченко Т.В., Павлова М.В. Диагностическое и прогностическое значение некоторых показателей гуморального механизма неспецифической защиты у больных лимфедемой, осложненной рожистым воспалением // Клин. мед. 1998. 1: 25-27.
4. Elagina L.V., Savchenko T.V., Pavlova M.V. Diagnostical and prognostic meaning of some parameters of humoral mechanisms of nonspecific defense in lymphedema patients complicated with erysipelas // Clinical Medic. 1998.1: 25-27.
5. Mallon E., Powell S., Mortimer P. Evidence for altered cell-mediated immunity in postmastectomy lymphedema // Brit.J.Dermatol. 1997. 137: 928-933.
6. Anand S.B., Gnanasekar M., Thangadurai M. et al. Immune response. studies in human lymphatic filariasis // Parasitol. Res. 2007. 101 (4): 981-988.
7. Ogawa Y., Yoshizumi M., Kitagawa T. et al. Investigation of mechanism of lymphocyte injection therapy in treatment of lymphedema // Lymphology 1999. 32 (4): 151-156.
8. Петров С.В., Семенов А.Д., Галкина О.В. Клинико-иммунологические исследования препаратов бета-лейкина при лечении больных с лимфедемой верхней конечности. // Иммунология 1998. 6: 41.
9. Petrov S.V., Semenov A.D., Galkina O.V. Clinico-immunological investigations of beta-leukin preparatus during the treatment of the patients with upper extremity lymphedema. // Immunology 1998. 6: 41.
10. Робинсон М.В., Труфакин В.А., Мельникова Е.В. и др. Иммуноморфологические особенности лимфоцитов крови больных постмастэктомической лимфедемой при применении лейкинферона в комплексном лечении. // Матер. VII Междунар. конгр. по иммунореабилитации. Канны, Франция; 2002. 159.
11. Robinson M.V., Trufakin V.A., Mel'nikova E.V et al. Immunomorphological peculiarities of blood lymphocyte of postmastectomy lymphedema patients having leukiniferon in combined treatment // Proceedings of VII International Congress of Immunorehabilitation. Cannes, France 2002. 159.
12. Труфакин В.А., Белан И.Б., Робинсон М.В. и др. Оптико-структурный машинный анализ ДНК лимфоцитов в норме и патологии. Новосибирск, 2002. 136.
13. Trufakin V.A., Belan I.B., Robinson M.V et al. Optico-structural machine analysis of DNA lymphocyte in normal and pathological conditions. Novosibirsk, 2002. 136.
14. Козинец Г.И., Котельников В.М., Гольдберг В.Е. Цитофотометрия гемопоэтических клеток. Томск: Издательство Томского университета, 1990. 186.
15. Kozinets G.I., Kotel'nikov V.M., Goldberg V.E. Cytophotometry of hemopoietic cells. Tomsk: Edition of Tomsk University, 1990. 186.
16. Olson G.B., Andresson R.E., Bartels P.H. Differentiation of murine thoracic duct lymphocytes into T- and B subpopulations by computer-scanning techniques // Cell. Immunol 1974. 13: 347-355.
17. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Л.: Медицина, 1978. 294.
18. Gubler E.V. Calculating methods of analysis and discerning of pathological processes. L. Medicine, 1978. 294.
19. Marcks P. Lymphedema. Pathogenesis, prevention and treatment. Cancer Pract. 1997. 5 (1): 32-38.
20. Shimizu Y, Shaw S. lymphocyte interactions with extracellular matrix. FASEB 1991. 5 (9): 2298-2299.
21. Reichgardt P., Gunzer F., Gunzer M. Analysing the physiocynamics of immune cells in a three-dimensional collagen matrix // Methods.Mol.Biol. 2007. 380: 253-269.
22. Yang B.G., Tanaka T., Jang M.H. et al. Binding of lymphoid chemokines to collagen IV that accumulates in the basal lamina of high endothelial venules // J.Immunol 2007. 179 (7): 4376-4382.

OPTICO-STRUCTURAL MACHINE ANALYSIS OF LYMPHOCYTE DNA IN PATIENTS WITH LYMPHEDEMA OF LOWER EXTREMITY

Margarita Vladimirovna ROBINSON¹, Andrey Ivanovich SHEVELA², Valeriy Alekseevich TRUFAKIN¹

¹*SI Institute of Clinical and Experimental Lymphology SB RAMS
4, Ac.Timakov str., Novosibirsk, 630117*

²*Centre of New Medical Technology, corresponding member of RANS
25/4, Pirogova str., Novosibirsk, 630090*

Optico-structural machine analysis of lymphocyte DNA in patients with lymphedema of lower extremity receiving a course of therapeutic treatment has been carried out. The changes in DNA content in health and patients and in patients after treatment have been observed. The meaning of study of lymphocyte blood DNA in the estimation of pathological process of lymphatic system has been revealed.

Key words: lymphedema, lymphocyte, DNA.

Robinson M.V. – main scientific worker of the laboratory of immunomorphology, doctor of biological sciences, e-mail: robin@physiol.ru

Shevela A.I. – scientific Head, corresponding member of RANS, doctor of medical sciences, professor, e-mail: Shevela@cnmt.ru

Trufakin V.A. – member of Russian academy of medical sciences, a Head of SB RAMS, chief of the laboratory of immunomorphology, professor