



(19) KG (11) 401 (13) C2 (46) 30.09.2024

(51) G01N 33/53 (2023.01)

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ И ИННОВАЦИЙ
ПРИ КАБИНЕТЕ МИНИСТРОВ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ к патенту Кыргызской Республики

(21) 20230056.1

(22) 16.08.2023

(46) 30.09.2024. Бюл. № 9

(76) Мамасаидов Абдимуталиб Ташалиевич
Эшбаева Чынара Абдасбековна (KG)

(56) Патент KG № 1246 C1, кл. G01N 33/68;
31.03.2010

(54) Способ иммунологической диагностики раннего ревматоидного артрита

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к ревматологии и предназначено для использования в диагностике раннего ревматоидного артрита.

Задачей изобретения является разработка нового иммунологического метода диагностики на основе изучения антигенспецифического пролиферативного ответа В-лимфоцитов

периферической крови больных ранним ревматоидным артритом.

Сущность изобретения состоит в том, что из венозной крови исследуемого больного путем центрифугирования крови на градиенте плотности верографин-фикалл выделяют В-лимфоциты, инкубируют их с агрегированным иммуноглобулином G, вносят обработанную флюоресцеинизотиоционатом люминесцирующую сыворотку, регистрируют уровень флюоресценции, рассчитывают показатель антигенспецифической пролиферативной активности В-лимфоцитов и при значении показателя, равному 160 условных единиц и более, диагностируют ранний ревматоидный артрит.

1 н. п. ф., 3 табл., 2 пр.

(19) KG (11) 401 (13) C2 (46) 30.09.2024

Изобретение относится к медицине, а именно к ревматологии и предназначено для использования в диагностике раннего ревматоидного артрита.

Ревматоидный артрит (РА) - хроническое системное воспалительное заболевание соединительной ткани аутоиммунной природы, характеризующееся хроническим воспалением периферических (синовиальных) суставов, с формированием прогрессирующего эрозивно-деструктивного полиартрита [Насонов Е. Л. Рекомендации Европейской Антиревматической Лиги по диагностике и лечению раннего артрита: 2016 // Научно-практическая ревматология. - 2017. - т. 55(2). - с. 138-150; Каратеев Д. Е., Ю. А. Олюнин, Е. Л. Лучихина Новые классификационные критерии ревматоидного артрита АКР/ЕАРЛ 2010 - Шаг вперед к ранней диагностике // Научно-практическая ревматология. - 2011. - № 1. - с. 10-15; Алетаха Д., Неогри Т., Силман А. Ж. и др. Классификационные критерии ревматоидного артрита. По совместной инициативе Американской коллегии ревматологов и Европейской Антиревматической Лиги. Ревм. артриты 2010 Сент.; 62(9):2569-81].

Ранний РА является условно выделяемой клинико-патогенетической стадией болезни с длительностью заболевания не более года, а при более строгой оценке только первые 6 месяцев заболевания можно отнести к раннему РА [Насонов Е. Л. Ревматология: Клинические рекомендации. М.: Гэотар-Медиа, 2010. - С. 274; Каратеев Д. Е., Ю. А. Олюнин, Е. Л. Лучихина Новые классификационные критерии ревматоидного артрита АКР/ЕАРЛ 2010 - Шаг вперед к ранней диагностике // Научно-практическая ревматология, 2011, № 1, 10-15; Комби Б., Ландеве Р., Дайен К. и др. Обновленная версия рекомендаций ЕАРЛ по диагностике и лечению раннего артрита. 2016, Декабрь]. Дебют болезни или «ранний» РА характеризуется развитием синовита и внесуставных проявлений заболевания и связан с выраженным нарушениями клеточных и гуморальных иммунных реакций. «Ранний» РА - промежуток времени, в течение которого активная терапия может эффективно затормозить прогрессирование поражения суставов [Алетаха Д., Неогри Т.,

Силман А. Ж. и др. Классификационные критерии ревматоидного артрита. По совместной инициативе Американской коллегии ревматологов и Европейской Антиревматической Лиги. Ревм. артриты 2010 Сент.; 62(9):2569-81; Каратеев Д. Е., Олюнин Ю. А. О классификации ревматоидного артрита. Научно-практическая ревматология. 2008; 46(1):5-16; Фирестейн Г. С. Патогенез ревматоидного артрита: насколько рано - это рано? // диагностика и лечение артритов. - 2005. - № 7. - С. 157-159].

Известен способ иммунологической диагностики РА, заключающий в определении ревматоидного фактора, представляющий аутоиммунное антитело (иммуноглобулиновый белок - IgM) производимый иммунной системой организма.

Известны различные виды определения ревматоидного фактора (РФ), наиболее точным и часто используемым из них является иммуноферментный метод (Журнал "Справочник заведующего клинико-диагностической лабораторией. Современная лабораторная диагностика ревматоидного артрита" № 6, 2010 год; Методы исследований в ревматологии: методические рекомендации для врачей-интернов, клинических ординаторов, аспирантов, врачей общей практики. - Воронеж, 2009 - 80 с.) (АНАЛОГ). Недостатком данного способа является то, что определяются сывороточные антитела к IgG и эта реакция является поздним этапом иммунного ответа, не позволяющим установить диагноз на ранних стадиях болезни. Если бы проводилось определение этой реакции на клеточном уровне, то возможно было бы установить диагноз на более ранних стадиях болезни.

Известен также способ иммунологической диагностики РА заключающийся в определении антигенспецифической иммуноглобулинсintéзирующей активности В-лимфоцитов в присутствии агрегированного иммуноглобулина G (ИАВЛ-аIgG). Патент Кыргызской Республики № 1246, кл. G01N 33/68, 31.03.2010 - Бюллетень № 11. Авторы Мамасаидов А. Т., Абдурашитова Д. И. (ПРОТОТИП). Недостатком этого способа является то, что иммуноглобулинсintéзирующая активность В-лимфоцитов является более поздним этапом иммунного ответа, чем пролифе-

ративная активность В-лимфоцитов. Поэтому определение пролиферативного ответа является более ранним и специфическим ответом В-лимфоцитов на аIgG и позволяет на более ранних стадиях установить диагноз и начать лечение.

Задачей изобретения является разработка нового иммунологического метода диагностики на основе изучения антигенспецифического пролиферативного ответа В-лимфоцитов периферической крови больных ранним ревматоидным артритом.

Поставленная задача решается в способе иммунологической диагностики раннего ревматоидного артрита, путем выделения лимфоцитов из венозной крови, инкубирования их с агрегированным иммуноглобулином G, внесения люминесцирующей сыворотки конъюгированной с флюоресцеинизотиоцинатом, регистрации уровня флюоресценции, где рассчитывают показатель антигенспецифической пролиферативной активности В-лимфоцитов и при значении показателя равному 160 условных единиц и более диагностируют ранний ревматоидный артрит.

Нами предложен способ иммунологической диагностики раннего РА, основанный на определении антигенспецифической пролиферативной активности В-лимфоцитов в присутствии агрегированного иммуноглобулина G (АГПАВЛ-аIgG) (ЗАЯВЛЯЕМЫЙ СПОСОБ).

Способ поясняется 3 таблицами.

ЗАЯВЛЯЕМЫЙ СПОСОБ осуществляется следующим образом.

В-лимфоциты человека выделяют центрифугированием гепаринизированной венозной крови на градиенте плотности фиколл-верографина ($d=1,078$ г/см). Собранные с интерфазы лимфоцитов ($1-1,5 \times 10^6$ клеток/мл) дважды отмывают средой 199, ресуспензируют 1,0 мл физиологического раствора (физ. р-ра). По 0,1 мл супензии вносят в две центрифужные пробирки, в одну (контроль) добавляют 1 каплю физиологического раствора, а в опыт 1 каплю разведенного раствора агрегированного иммуноглобулина IgG (аIgG, производства НИИ им. Н. Ф. Гамалея). Затем опытный и контрольный образцы помещают в термостат при $t = 37^{\circ}\text{C}$ с влажной камерой. Пробы инкубируют 18 часов в гер-

метически закупоренных центрифужных пробирках. После инкубации культуру лимфоцитов однократно отмывают средой № 199 и формируют монослой лимфоидных клеток на чистом обезжиренном предметном стекле, а не прилипшие клетки смывают физиологическим раствором. Затем монослой клеток окрашивают 0,001 % акридиновым оранжевым (АО), исключая этап ацетилирования белков.

Рабочий раствор АО готовят в день опыта из маточного раствора АО концентрации 1:1000, разводя его цитратным буфером до концентрации 1:100000. Затем препарат промывают 10 минут в чистом цитратном буфере, подсушивают и флюорометрируют методом количественной цитофлюорометрии (КЦФ). КЦФ проводят оригинальным методом на базе микроскопа ЛЮМАМ-ИЗ, используя фотометрическую приставку ФМЭЛ-1. Источником возбуждения служит лампа ДРК-120, дающая стабильный разряд, источник устанавливают по варианту освещения сверху, возбуждающий фильтр СС-15-4, защищающий фильтр ЖС-9. Световыделительную систему устанавливают по темнопольному варианту с темнопольным ОПАК-объективом малой скрещенности увеличения 9x0,20. Для обеспечения максимальной регистрации интенсивности, люминесценцию осуществляют на ФЭУ-39А с базовым напряжением усилительного комплекса 1000-1500 вольт с выдачей результатов на цифровой вольтметр в регистре 2-20 вольт. Цитофлюориметрию лимфоидных клеток, окрашенных АО, осуществляют следующим образом. На произвольный участок препарата при невозбуждающем освещении фокусируют объектив фотометра, в котором предварительно убирают один из микрозондов с целью обеспечения измерения со всей площади объектива. После фокусирования объектива устанавливают положение, соответствующее убранному микрозонду, заменяют светофильтр на возбуждающий и замеряют интенсивность флюоресценции в области 640 нм, выделяя эту область интерференционным светофильтром, встроенным в фотометр. После регистрации результата поворотом диска заменяют интерференционный фильтр на другой и замеряют флюоресценцию в области 530 нм. Вся про-

цедура непосредственных измерений занимает 20-30 секунд, что практически устраниют эффект фотодеструкции АО.

Полученные результаты выражают отношением флюоресценции (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, определяют соотношение РНК/ДНК ядерного хроматина, которое закономерно изменяется в ходе активизации лимфоцитов. Сравнивая уровень параметра А в контроле и опыте, выводят показатель антигенспецифической пролиферативной активности В-лимфоцитов (АГПАВЛ).

Уровень параметра А в опыте и контроле, выводят показатель АГПАВЛ на aIgG по формуле:

$$\text{АГПАВЛ} = (\Phi \text{ опыт: } \Phi \text{ контроль}) \times 100 \text{ усл. ед.}$$

За положительный результат АГПАВЛ на aIgG принято его значение превышающее его значение у здоровых $M \pm \sigma$.

Основные сравнительные исследования проводятся в группах больных с ранним РА (60 чел.) и здоровых лиц (30 чел.). Статистическую обработку материалов проводят с выведением t-критерия Стьюдента.

Проводят диагностическую ценность 3-х способов иммунологической диагностики раннего РА следующим образом:

1. Путем определения в сыворотке крови ревматоидного фактора (РФ) иммуноферментным методом (АНАЛОГ). За положительный результат этого способа принимали значения РФ выше 14 МЕ/мл, согласно инструкции диагностикума (Журнал "Справочник заведующего клинико-диагностической лабораторией. Современная лабораторная диагностика ревматоидного артрита" № 6, 2010 г.).

2. Путем определения антигенспецифической иммуноглобулинов - синтезирующей активности В-лимфоцитов в присутствии агрегированного иммуноглобулина G (ИАВЛ-aIgG) (ПРОТОТИП). За положительный результат данного способа принимали значения показателя ИАВЛ-aIgG выше 200 усл.ед. («Способ лабораторной диагностики ревматоидного артрита». Патент Кыргызской Рес-

публики № 1246. Журнал «Описание изобретения». - 2008 г. - Бюллетень № 11).

3. Путем оценки антигенспецифической пролиферативной активности В-лимфоцитов в присутствии агрегированного иммуноглобулина G (АГПАВЛ-aIgG) (ЗАЯВЛЯЕМЫЙ СПОСОБ). За положительный результат предлагаемого способа принимают уровень АГПАВЛ-aIgG, превышающий значение $d_{\max} = M + \sigma$ у здоровых (где d_{\max} - максимальное значение доверительного интервала, M - среднее арифметическое: σ - среднее квадратическое отклонение). При этом d_{\max} равняется 159,7 усл. ед. Отсюда положительным результатом предлагаемого способа считают значение АГПАВЛ-aIgG равное 160 усл. ед. и более.

Сравнительные исследования 3-х способов (АНАЛОГа, ПРОТОТИПа И ЗАЯВЛЯЕМОГО СПОСОБА) представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, по всем изучаемым показателям группа больных ранним РА достоверно отличается от группы здоровых лиц. Однако, если по результатам АНАЛОГА эти различия в группах больных ранним РА и здоровых лиц были достоверны в средней степени ($p < 0,01$), то по результатам ПРОТОТИПА и ЗАЯВЛЯЕМОГО СПОСОБА эти различия были максимально достоверно ($p < 0,001$).

Также проведен сравнительный анализ частоты положительных результатов вышеуказанных 3-х способов в обследованных группах. Результаты представлены в таблице 2.

Из данных таблицы 2, следует, что у больных РА частота положительных результатов АНАЛОГА составляет 63,3 %, ПРОТОТИПА - 83,3 % и ЗАЯВЛЯЕМОГО СПОСОБА - 88,3 %. Таким образом, частота положительных результатов ЗАЯВЛЯЕМОГО СПОСОБА выше, чем АНАЛОГА и ПРОТОТИПА.

На основании данных табл. 2, определяли чувствительность и специфичность сравниваемых 3-х способов иммунологической диагностики раннего РА. Как известно, чувствительность метода - это частота положительных результатов у больных, а специфичность - это частота отсутствия положительного результата у здоровых [Власов В. В.

Эффективность диагностических исследований. - М., 1988. - С. 33-34]. Результаты исследования чувствительности и специфичности вышеуказанных 3-х методов представлены в таблице 3.

Из данных табл. 3 следует, что наибольшей чувствительностью (88,3 %) обладает **ЗАЯВЛЯЕМЫЙ СПОСОБ**, при этом чувствительность **ЗАЯВЛЯЕМОГО СПОСОБА** выше чувствительности **АНАЛОГА** на 25,0 % и **ПРОТОТИПА** на 5,0 %. А специфичность **ЗАЯВЛЯЕМОГО СПОСОБА** выше специфичности **АНАЛОГА** на 10 % и равна специфичности **ПРОТОТИПА**.

Таким образом, **ЗАЯВЛЯЕМЫЙ СПОСОБ** отличается от **АНАЛОГА** тем, что:

1) Иммунологическая диагностика раннего РА основывается на определении реакции В-лимфоцитов по отношению к такому специальному для этой болезни антигену, как aIgG, а не по уровню сывороточных антител к ним. Используемый aIgG является специфическим стимулом и по логике формирования иммунного ответа при раннем РА имеет отношение к специфической сущности РА - артриту, который развивается вследствие аутоиммунной реакции синовиальной оболочки суставов на aIgG. Следовательно, используемый aIgG приводит к антигенспецифичному В-иммунному ответу раннего РА и при использовании **ЗАЯВЛЯЕМОГО СПОСОБА** можно обосновано предположить повышение специфичности иммунологической диагностики раннего РА.

2) Антигенспецифическая активация В-иммунного ответа определяется на клеточном уровне, а не на гуморальном уровне всего организма, что способствует повышению чувствительности иммунологической лабораторной диагностики раннего РА.

3) Чувствительность иммунологической диагностики раннего РА выше на 25,0 %, а специфичность - выше на 10 %.

ЗАЯВЛЯЕМЫЙ СПОСОБ отличается от **ПРОТОТИПА** тем, что:

1) Иммунологическая диагностика раннего РА проводится по уровню пролиферативной активности В-лимфоцитов в присутствии aIgG, при этом активация (пролиферация) ядерного хроматина В-лимфоцитов явля-

ется более ранней стадией В-клеточного иммунного ответа, чем иммуноглобулинсintéрирующая активность В-лимфоцитов. За счет этого при использовании **ЗАЯВЛЯЕМОГО СПОСОБА** достигается диагностика на более ранних стадиях болезни и повышается чувствительность иммунологической диагностики раннего РА.

2) Антигенспецифическая активация В-лимфоцитов основывается на определении пролиферативной активности В-лимфоцитов, являющейся гораздо более специфической и качественной реакцией В-лимфоцитов, чем иммуноглобулинсintéрирующая активность этих лимфоцитов, которая определяется у **ПРОТОТИПА**. Переход от исследования антигенспецифической иммуноглобулинсintéрирующей активности В-лимфоцитов к изучению антигенспецифической пролиферативной активности В-клеток, на наш взгляд, приводит к повышению специфичности иммунологической диагностики раннего РА.

3) Чувствительность иммунологической диагностики раннего РА выше на 5,0 %.

Клинический пример 1.

Больная Т., 33 года. Клинический диагноз: Серопозитивный ревматоидный артрит, ранняя стадия (ранний РА), III степень активности, с системными признаками. Аутоиммунная железодефицитная анемия.

Жалобы на симметричные боли и припухлость проксимальных межфаланговых, пястно-фаланговых, лучезапястных, локтевых и коленных суставов, утреннюю скованность в течение 2 часов.

Болеет в течение 1 года. Похудела на 7 кг с момента начала болезни. Принимает мепотрексат 10 мг/нед и НПВП без особого эффекта.

Общее состояние средней тяжести. Пониженного питания. Кожные покровы и видимые слизистые оболочки бледной окраски. Увеличены подмыщечные и паховые лимфоузлы. Тест поперечного сжатия проксимальных межфаланговых, пястно-фаланговых, лучезапястных, локтевых и коленных суставов положительный с обеих сторон. Плотные подкожные узловатые образования (ревматоидные узелки) в области локтевых суставов с обеих сторон.

11

Лабораторные исследования. Общий анализ крови: гемоглобин 92 г/л, эритроциты $3,55 \times 10^{12}/\text{л}$, ЦП 0,8, СОЭ 40 мм/ч, СРБ 48 мг/мл. Ревматоидный фактор 96 МЕ/мл, АЦЦП 84 Ед/мл, СПАВЛ 232 усл.ед. АГПАВЛ на aIgG 168 усл.ед.

Таким образом, у курируемой нами больной ранним РА с высокой клинико-лабораторной активностью отмечалось наличие высокого уровня АГПАВЛ на aIgG, т. е. в конкретном случае показатель АГПАВЛ на aIgG (наряду с классическими клинико-лабораторными диагностическими критериями) подтверждает диагноз раннего РА.

Клинический пример 2.

Больная Я., 29 лет. Клинический диагноз: Реактивный артрит, острое течение, III степень активности. Исключить ревматоидный артрит, ранняя стадия (ранний РА).

Жалобы на боли, припухлость и ограничение движения локтевых, коленных и голеностопных суставов, утреннюю скованность в течение 30 минут.

Болеет в течение 2 месяцев. Боли и припухлость вышеуказанных суставов появились через 3 месяца после родов.

Во время объективного осмотра отмечались боли, припухлость и ограничение движения локтевых, коленных и голеностопных суставов без строгой симметричности с

12

положительным тестом поперечного сжатия этих суставов с обеих сторон.

Лабораторные исследования: СОЭ = 44 мм/ч, СРБ - 48 мг/мл, ревматоидный фактор и АЦЦП - отрицательные, СПАВЛ - 190 усл.ед., АГПАВЛ на aIgG - 162 усл.ед.

На основании клинических данных и высокого уровня АГПАВЛ был выставлен клинический диагноз: Серопозитивный ревматоидный артрит, ранняя стадия (ранний РА), III степень активности. Но больная отказалась от базисной терапии и принимала НПВП в средних дозах.

Через 2 месяца у больной появились боли, припухлость, ограничения движения и положительный тест поперечного сжатия проксимальных межфаланговых, пястно-фаланговых и лучезапястных суставов положительный с обеих сторон, а в анализах крови: ревматоидный фактор - 48 МЕ/мл, АЦЦП - 56 Ед/мл.

Таким образом, у больной полиартрите том крупных и средних суставов с отрицательными результатами РФ и АЦЦП наличие высокого уровня АГПАВЛ на aIgG позволили поставить диагноз РА, ранняя стадия. И данный диагноз подтвердился через 2 месяца, когда появились классические клинические и лабораторные признаки РА.

Таблица 1

Показатели АНАЛОГА, ПРОТОТИПА И ЗАЯВЛЯЕМОГО СПОСОБА в обследованных группах

Обследуемые	N	Способ обследования		
		АНАЛОГ $M \pm SD$ в МЕ/мл	2-ой СПОСОБ $M \pm SD$ в усл. ед.	ЗАЯВЛЯЕМЫЙ СПОСОБ $M \pm SD$ в усл. ед.
Здоровые	30	$12,3 \pm 3,9$	$149,7 \pm 8,8$	$131,3 \pm 5,3$
Больные ранним РА	60	$28,6 \pm 9,2$	$209,6 \pm 9,9$	$182,1 \pm 5,9$
t		2,67	4,53	6,12
p		<0,01	<0,001	<0,001

Примечание: t, p – достоверность различий между больными ранним РА и здоровыми

Таблица 2

Частота положительных результатов 3-х способов в обследованных группах

Обследованные группы	N	Способ обследования					
		АНАЛОГ		ПРОТОТИП		ЗАЯВЛЯЕМЫЙ СПОСОБ	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Здоровые	30	3	10,0	0	0	0	0
Больные ранним РА	60	38	63,3	50	83,3	53	88,3

Таблица 3

Показатели чувствительности и специфичности АНАЛОГА, ПРОТОТИПА и ЗАЯВЛЯЕМОГО СПОСОБА

Способы	Чувствительность, %	Специфичность, %
АНАЛОГ	63,3	90,0
ПРОТОТИП	83,3	100,0
ЗАЯВЛЯЕМЫЙ СПОСОБ	88,3	100,0

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ иммунологической диагностики раннего ревматоидного артрита путем выделения лимфоцитов из венозной крови, инкубирования их с агрегированным иммуноглобулином G, внесения люминесцирующей сыворотки конъюгированной с флюоресцини-

зотиоционатом, регистрации уровня флюоресценции, отличающейся тем, что рассчитывают показатель антигенспецифической пролиферативной активности В-лимфоцитов и при значении показателя, равном 160 условных единиц и более, диагностируют ранний ревматоидный артрит.

Выпущено отделом подготовки официальных изданий