

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИВЕННОГО ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ КРОВИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ СПОСОБНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ И АУТОРОЗЕТКООБРАЗОВАНИЕ КАПИЛЛЯРНОЙ КРОВИ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Кулова Л.А.¹, Бурдули Н.М.¹, Гутнова С.К.¹

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России. РСО – Алания г. Владикавказ, ул. Пушкинская 40, laurakul@mail.ru

Цель: оценить влияние внутривенного лазерного облучения крови на агрегационную способность тромбоцитов и межклеточные взаимодействия у больных ревматоидным артритом. **Материалы и методы:** обследованы 130 больных с достоверным диагнозом ревматоидный артрит в возрасте от 18 до 80 лет. 100 пациентам помимо базисной терапии, осуществлялся десятидневный курс внутривенной лазерной терапии, которая проводилась аппаратом «Матрикс - ВЛОК» («Матрикс» Россия), чередованием через день двух излучающих головок: КЛ-ВЛОК с длиной волны 0,63 мкм мощностью излучения на конце световода 1,5-2,0 мВ - в течение 15 минут и КЛ-ВЛОК-365 с длиной волны 0,365 мкм, мощностью излучения на конце световода 1,5-2,0 мВ - в течение 5 минут. Курс внутривенного лазерного облучения крови составлял 10 дней без перерыва на выходные дни. Контрольную группу составили 30 пациентов, идентичных по полу и возрасту, которые получали только медикаментозную терапию. Исследуемые показатели определялись до и после лечения. **Результаты:** полученные данные свидетельствуют об улучшении показателей агрегационной способности тромбоцитов и межклеточных взаимодействий форменных элементов у больных ревматоидным артритом.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, тромбоциты, межклеточные взаимодействия, лазерная терапия

THE INFLUENCE OF INTRAVENOUS LASER IRRADIATION OF BLOOD ON THE FUNCTIONAL ABILITY OF PLATELETS AND AUTO-ROSETTE CAPILLARY BLOOD IN RHEUMATOID ARTHRITIS

Kulova L.A., Burduli N.M., Gutnova S.K.

State budgetary educational institution of higher professional education "North-Ossetian state medical Academy Ministry of health of Russia. RNO - Alania, Vladikavkaz, Pushkinskaya street 40, laurakul@mail.ru

Purpose: evaluate the effect of intravenous laser irradiation of blood platelet aggregation and cell-cell interactions in patients with rheumatoid arthritis. **Material and methods:** 130 patients with rheumatoid arthritis type 2 groups. 30 patients – control group and the other (main group) – 100 patients had daily intravenous laser blood irradiation for 10 days. Laser therapy was made with laser therapeutic device “Matrix – Vlok” (firm Matrix, Russia), interleaving a two radiating heads: wavelength 0,63 μm, output power at the lightguide tip 1, 0 – 1, 5 mW - 15 minutes and wavelength 0.365 μm, output power at the lightguide tip 1, 0 – 1, 5 mW - for 5 minutes. The course of intravenous laser irradiation of blood was 10 days without a break for the weekend. The test parameters were determined before and after treatment. **Results:** The findings suggest that improvement in platelet aggregation and cell-cell interactions formed elements in patients with rheumatoid arthritis

Keywords: rheumatoid arthritis, platelet, cell interactions, laser therapy

Ревматоидный артрит приобретает все большую значимость в современной ревматологии. Это связано с высокой распространенностью заболевания, ранней инвалидизацией, преждевременной смертностью от сердечно-сосудистой патологии, вследствие изменения реологических свойств крови, ускоренного атерогенеза, а также наличия системного поражения внутренних органов [2,3].

В патогенезе ревматоидного артрита важная роль отводится тромбоцитам, которые являются не только клетками первичного звена гемостаза, но и играют значительную роль в

развитии различных патологических процессов, таких как аутоиммунное воспаление. Иммунокомплексное поражение сосудистой стенки приводит к активации тромбоцитов, адгезивных белков субэндотелия, угнетению просвертывающих механизмов, что создает тромбозоопасную ситуацию в целом [1,8-10].

Внутрисосудистое розеткообразование имеет место в крови здоровых людей. Количество эндогенных ауторозеток составляет в норме у взрослых людей $1,4 \pm 0,4$ на 200 лейкоцитов. Известно, что за ауторозетку принимается клеточная ассоциация, образованная моноцитом, либо нейтрофилом и плотно прилегающими к нему эритроцитами, число которых составляет 4 - 6, а иногда - 6-8. При патологических состояниях нередко наблюдаются явления экзоцитарного лизиса эритроцитов, входящих в состав ауторозеток, представляющего собой наличие участков цитоплазмы, лишенных гемоглобина. Явление экзоцитарного лизиса эритроцитов является завершающей стадией внутрисосудистого розеткообразования и возникает в результате выхода из розеткообразующих гранулоцитов и моноцитов и внедрения в эритроциты лизосомальных ферментов и других цитотоксических веществ и повреждения ими эритроцитарных мембран и части прилегающей цитоплазмы. Размеры ауторозеток значительно превышают диаметр капилляров, что может быть важным компонентом нарушения состояния микрогемодинамики. При соматических заболеваниях как острых, так и обострении хронических, динамика повышения в периферической крови числа ауторозеток и ауторозеток с лизисом в целом отражает тяжесть клинического состояния больного [4,5].

Ревматоидный артрит является весьма дорогостоящим заболеванием с социально-экономической точки зрения, так как современные стандарты лечения этого заболевания требуют применения таких дорогостоящих лекарственных средств, как цитостатики и генно-инженерные биологические препараты, способных вызвать целый ряд тяжелых нежелательных побочных эффектов. Дальнейший поиск новых методов лечения, в том числе и немедикаментозных невозможен без учета влияния на некоторые патогенетические механизмы развития ревматоидного артрита.

В последние годы все более широкое применение в клинической медицине находит низкоинтенсивное лазерное излучение. Однако, многие механизмы действия лазерного излучения у больных ревматоидным артритом остаются не изученными. В этой связи целью нашего исследования явилось изучение влияния низкоинтенсивного лазерного излучения на агрегационную способность тромбоцитов и межклеточные взаимодействия у больных ревматоидным артритом [6].

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 130 пациентов с достоверным диагнозом ревматоидный

артрит в возрасте от 18 до 80 лет (средний возраст 50,3 года), из них 18 пациентов (13,8%) – мужского пола, 112 пациентов (86,2%) – женского пола. Диагноз ревматоидный артрит устанавливался согласно рекомендациям ACR/EULAR (American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism 2010 г.), что включает полиартрит с поражением мелких суставов кистей, симметричность поражения, наличие утренней скованности в суставах, характерную рентгенологическую картину (согласно модифицированной классификации Stein broker).

Все больные случайным методом были разделены на две группы: контрольную (30 человек) и основную (100 человек). Пациенты контрольной группы получали традиционную медикаментозную терапию в соответствии со стандартом лечения ревматоидного артрита. Пациентам основной группы помимо традиционной терапии проводился курс внутривенного лазерного облучения крови. Внутривенная лазерная терапия проводилась аппаратом «Матрикс - ВЛОК» («Матрикс» Россия), чередованием через день двух излучающих головок: КЛ-ВЛОК с длиной волны 0,63 мкм мощностью излучения на конце световода 1,5-2,0 мВ, - в течение 15 минут и КЛ-ВЛОК-365 с длиной волны 0,365 мкм, мощностью излучения на конце световода 1,5-2,0 мВ - в течение 5 минут, в непрерывном режиме излучения. Курс внутривенного лазерного облучения крови составлял 10 дней без перерыва на выходные дни.

Обследование больных проводили утром в первый – второй день госпитализации и через 2-5 дней после окончания курса лазерной терапии.

Феномен внутрисосудистого розеткообразования изучался по методу Д.И. Бельченко (1990 г). Натощак, в утренние часы, с использованием игл — скарификаторов производился забор капиллярной крови с 4 пальца кисти. Каплю крови наносили на предметное стекло, сверху проводили шлифовальным стеклом под углом 45 градусов к предметному стеклу. Подводя стекло к капле ждали, пока кровь расплывется вдоль ребра, затем легким движением проводили шлифовальным стеклом вперед, не отрывая его, пока капля не иссякнет. Мазок имел желтоватый цвет и оканчивался в виде усов. В течение 30 минут проводилась фиксация мазков в смеси Никифорова, состоящей из этилового спирта 96 градусов и эфира в равных частях. Окраска мазков проводилась по Романовскому — Гимзе. Краску наливали на мазок высоким слоем и выдерживали на ровной поверхности в течение 35 минут, затем промывали водой и высушивали на воздухе. Подсчет ауторозеток проводили методом микроскопии в окрашенных мазках. Ауторозетки находили в самом тонком слое, ближе к концам мазка. За ауторозетку принимали клеточную ассоциацию, образованную нейтрофилом с плотно прилегающими к его поверхности трех и более эритроцитов. Производился подсчет ауторозеток с экзоцитарным лизисом, характеризующийся деструкцией мембран

эритроцитов. Подсчет производился в абсолютном количестве, а также в процентах на 200 лейкоцитов.

Изучение агрегационных свойств тромбоцитов проводилось с помощью анализатора агрегации тромбоцитов «AP 2110» фирмы SOLAR турбодиметрическим методом по Борну.

В качестве индуктора агрегации применялся адреналин в дозе 5 мкг/мл. Проводился анализ таких параметров агрегационной кривой, как степень агрегации, скорость агрегации и время агрегации, а также качественная оценка агрегационной кривой.

Полученные данные были обработаны с использованием программы STATISTICA 7,0.

Для оценки статистической значимости различий средних в случаях двух выборок использовали t – критерий (критерий Стьюдента). Различия считались достоверными при вероятности ошибки $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения

Для оценки исходного состояния агрегационной функции тромбоцитов проводилось сравнительное исследование агрегации тромбоцитов у здоровых лиц и пациентов с ревматоидным артритом. Полученные данные показали, что при поступлении в стационар у пациентов с ревматоидным артритом имеют место патологические изменения агрегационных свойств тромбоцитов, которые носят неоднородный характер. При этом у большинства обследуемых имеет место увеличение функциональной активности тромбоцитов (гиперагрегация). Одновременно с этим у части больных отмечалось наличие как патологически подавленной, так и нормальной агрегационной способности тромбоцитов.

Все больные ревматоидным артритом, исходя из выраженности исходных агрегационных нарушений были разделены на три подгруппы: с избыточной агрегационной функцией (*1-я подгруппа*), с нормальной агрегационной функцией (*2-я подгруппа*), со сниженной агрегационной функцией (*3-я подгруппа*).

Параметры агрегационной кривой у пациентов 1 подгруппы представлены в таблице 1.

Таблица 1

Динамика показателей агрегационной способности тромбоцитов у больных с исходной гиперагрегацией (подгруппа 1)

Показатель	Здоровые	Контрольная группа		Основная группа	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Степень агрегации, %	61,05±1,5	78,9±3,4 ^{***}	74,4±2,1	86,7±2,9 ^{***}	62,3±2,1 ^{***}
Скорость агрегации, %/мин	16,1±1,3	45,2±2,9 ^{***}	39,9±1,5	47,8±4,5 ^{***}	17,9±1,6 ^{***}

Время агрегации, мин	8,3±1,2	6,1±0,4	6,3±0,3	6,2±0,3	8,0±1,3
-----------------------------	---------	---------	---------	---------	---------

[^]p<0,05 [^]"p<0,01 [^]'''p<0,001 по сравнению с группой здоровых

[^]*p<0,05 [^]**p<0,01 [^]***p<0,001 различия до и после лечения в группах

Так, в основной группе величина СтА составила 86,7 ±2,9 (p<0,01), в контрольной группе — 78,9±3,4 (p<0,001 при сравнении с нормой). Существенно повышена скорость агрегации (45,2±2,9 — в контрольной и 47,8±4,5 — в основной, p <0,001 при сравнении с нормой) при достоверном укорочении времени агрегации до 6,2±0,3 %/мин (p<0,05 при сравнении с нормой) — в основной и 6,1±0,4 %/мин (p = 0,1) — в контрольной.

При качественном анализе агрегационных кривых отмечается отсутствие двухфазности, которая отражает нормальный ход агрегации, ускоренное формирование фазы «плато», крутой подъем кривой, значительное повышение уровня подъема. Это является отражением быстрого и значительного выхода из тромбоцитов внутритромбоцитарных биологически активных веществ, которые способствуют усилению и ускорению агрегации, вовлечению новых тромбоцитов в процесс агрегации и, в конечном итоге, формированию необратимой фазы процесса агрегации (плато на агрегационной кривой). Подобные изменения свидетельствует о нарушенной, избыточной агрегации тромбоцитов в ответ на стандартные дозы индуктора. Таким образом, в процессе внутрисосудистого свертывания крови степень участия тромбоцитарного звена гемостаза при РА значительно увеличивается. Гиперагрегация тромбоцитов не только способствует повышению вязкости крови, но и потенцирует микроциркуляторные нарушения за счет секреции вазоконстрикторных субстанций активированными тромбоцитами.

2-я подгруппа (таблица 2) пациентов с ревматоидным артритом характеризуется отсутствием патологических сдвигов, агрегационная способность тромбоцитов не нарушена, показатели агрегации соответствуют нормальным значениям, агрегационная кривая при качественном анализе также не изменена.

Таблица 2

Динамика показателей агрегационной способности тромбоцитов у больных с исходно нормальной агрегацией (подгруппа 2)

Показатель	Здоровые	Контрольная группа		Основная группа	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Степень агрегации, %	61,05±1,5	61,4±1,3	60,4±1,7	60,8±1,2	57,9±2,8
Скорость агрегации, %/мин	16,1±1,3	15,9±1,4	16,3±1,3	16,1±1,2	16,7±1,4

Время агрегации, мин	8,3±1,2	8,1±0,9	8,3±0,7	8,3±1,4	8,1±1,8
-----------------------------	---------	---------	---------	---------	---------

Степень агрегации у больных 2-й подгруппы составляет 61,4±1,3% и 60,8±1,2% в контрольной и основной группе соответственно. Скорость агрегации, как в контрольной (15,9±1,4%/мин), так и в основной группе больных (16,1±1,2%/мин) оставалась в пределах нормальных значений. Время агрегации в обеих группах обследуемых пациентов не отличалось от времени агрегации тромбоцитов в группе здоровых лиц, и составило 8,1±0,9 мин и 8,1±1,4 мин в контрольной и основной группе соответственно. При качественном анализе агрегатограмм наблюдается нормальная двухфазная агрегационная кривая. Нормальная агрегационная активность тромбоцитов свидетельствует о сбалансированности проагрегантных и антиагрегантных регуляторных влияний у данной группы больных, нормальной реактивности тромбоцитов в ответ на стандартные дозы индуктора агрегации.

В *3-й подгруппе* больных ревматоидным артритом (*таблица 3*) до лечения регистрировалась патологически подавленная агрегационная функция тромбоцитов. Все характеристики функциональной способности тромбоцитов были достоверно снижены по сравнению с нормой.

Так, степень агрегации тромбоцитов была значительно ниже нормы и составила 39,2±3,8% в контрольной и 35,7±3,3% в основной группе (p<0,05). Отмечалось увеличение времени агрегации (до 9,7±0,5 мин в контрольной и 9,8±0,7 мин в основной группе, p<0,05) и снижение скорости агрегации тромбоцитов (8,1±0,2%/мин и 8,9±0,5 %/мин в контрольной и основной группе соответственно (p<0,05).

Таблица 3

Динамика показателей агрегационной способности тромбоцитов у больных с исходной гипоагрегацией (подгруппа 3)

Показатель	Здоровые	Контрольная группа		Основная группа	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Степень агрегации, %	61,05±1,5	39,2±3,8 ^{'''}	49,1±1,8	35,7±3,3 ^{'''}	57,9±1,1 ^{***}
Скорость агрегации, %/мин	16,1±1,3	8,1±1,2 ^{'''}	11,7±1,4	8,9±0,5 ^{'''}	16,8±1,8 ^{***}
Время агрегации, мин	8,3±1,2	9,7±0,5	8,9±1,9	9,8±0,7	8,4±1,6

['] p<0,05 ^{''} p<0,01 ^{'''} p<0,001 по сравнению с группой здоровых

^{*} p<0,05 ^{**} p<0,01 ^{***} p<0,001 различия до и после лечения в группах

Система регуляции агрегационного состояния крови является физиологической адаптивной системой, которая участвует во всех физиологических и патологических процессах организма, однако при наличии достаточного функционального резерва, не возникает ни лабораторных, ни тем более, клинических признаков нарушения баланса внутрисистемных регуляторных влияний, что выражается в виде нарушений функционирования двух основных эффекторных звеньев – клеточного (тромбоцитарного) и плазменного (гуморального). Таким образом, гиперагрегацию или гипоагрегацию тромбоцитов у больных РА можно расценивать как признак дисбаланса системы регуляции агрегатного состояния крови. В этой связи целесообразна оценка эффективности традиционной терапии и внутривенного лазерного облучения крови на функциональную активность тромбоцитов у пациентов ревматоидным артритом.

Качественный анализ агрегационных кривых после лечения подтверждает количественные сдвиги показателей агрегации. Так, у больных основной группы после лечения кривая приобретает двухфазный характер, с четко выраженным нарастанием степени светопропускания после внесения индуктора, высоким уровнем фазы «плато». Данные изменения соответствуют нормальной агрегации. У пациентов контрольной группы после лечения кривая монопиковая, с медленным и незначительным подъемом, что отражает сохраняющееся подавление агрегации тромбоцитов.

Таким образом, исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что независимо от направления исходного сдвига показателей агрегации тромбоцитов, внутривенное лазерное облучение крови нормализует функциональную активность тромбоцитов. У больных с избыточной функциональной активностью на фоне внутривенного лазерного облучения крови происходит снижение степени и скорости агрегации, тогда как при исходном подавлении агрегационной способности отмечается восстановление функциональной активности тромбоцитов в виде повышения степени, скорости агрегации, восстанавливается нормальная структура агрегационной кривой. В то же время нам представляется важным тот факт, что внутривенное лазерное облучение крови практически не влияет на исходно нормальную активность тромбоцитов.

Нарушения в системе микроциркуляции могут быть связаны не только с патологией самих микрососудов, но и с нарушением тока крови и различными реологическими расстройствами, связанными с внутрисосудистой агрегацией форменных элементов крови.

В этой связи целесообразно будет изучение межклеточных взаимодействий, а именно эндогенного ауторозеткообразования капиллярной крови. В таблице 4 представлена динамика ауторозеткообразования у больных основной и контрольной групп.

**Динамика показателей ауторозеткообразования капиллярной крови у больных
ревматоидным артритом до и после лечения**

	Основная группа		Контрольная группа		р'
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	
Общее число ауторозеток	15,1±0,4	15,9±0,1	13,2±1,8	18,1±0,5**	0,001
Нейтрофильные ауторозетки	11,1±0,3	14,8±0,4***	10,9±0,9	10,3±0,8	0,001
Розетки с экзоцитарным лизисом	4,2±0,2	0,3±0,1***	5,7±0,6	6,1±0,9	0,001

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 различия до и после лечения в группах

р' - достоверность показателей после лечения между основной и контрольной группой.

Как видно из таблицы 4, у пациентов как основной, так и контрольной группы отмечается достоверное повышение общего ауторозеткообразования, которое составило 15,1±0,4 в основной, в контрольной группе соответственно 13,2±1,8. После проведения комбинированного лечения в основной группе наблюдалось незначительное повышение общего розеткообразования 15,9±0,1, тогда как в контрольной группе имелось достоверное его повышение 18,1±0,5 (p<0,01). Причем, при исследовании микроскопической характеристики клеток, большую часть составили нейтрофильные ауторозетки (11,1±0,3 - в основной и 10,9±0,9 - контрольной группе). При исследовании обращает на себя внимание наличие розеток с экзоцитарным лизисом, составляющих 4,2±0,2 в основной группе и 5,7±0,6 - в контрольной. После лечения у пациентов основной группы наблюдается достоверное уменьшение содержания розеток с экзоцитарным лизисом 0,3±0,1 (p<0,001), в контрольное же группе наблюдается их увеличение до 6,1±0,9.

Таким образом, включение низкоинтенсивного лазерного облучения крови в комплексную терапию ревматоидного артрита сопровождается корригирующим влиянием на агрегационную способность тромбоцитов и оказывает положительный эффект на межклеточные взаимодействия, что в совокупности приводит к улучшению микроциркуляторных расстройств.

Список литературы

1. Андриенко, А.В. Вегетативно - микроциркуляторные расстройства у больных ревматоидным артритом /А.В. Андриенко, Д.С. Бубликов// *Фундаментальные исследования* . - 2013. - № 12. - С. 163-167.
2. Балабанова, Р.М. Динамика распространенности ревматических заболеваний, входящих в XIII класс МКБ-10, в популяции взрослого населения Российской Федерации за 2000-2010 гг./ Ш.Ф. Эрдес, Р.М. Балабанова // *Научно-практическая ревматология*. - 2012. - №52(3). - С. 10-
3. Балабанова, Р.М. Ревматические заболевания у взрослого населения в федеральных округах России / Р.М. Балабанова, Ш.Ф. Эрдес // *Научно-практическая ревматология*. - 2014. - №52. - С. 5-7.
4. Бельченко, Д.И. Исследование ауторозеткообразования в циркулирующей крови / Д.И. Бельченко// *Клиническая лабораторная диагностика*. - 1993. - № 3. - С. 58 - 62.
5. Бельченко, Д.И. Цитотоксическая активность клеток тромбоцитарной системы. / Д.И. Бельченко// *Иммунология*. - 2001. - № 1. - С. 55-57.
6. Гейниц, А.В. Внутривенное лазерное облучение крови / А.В. Гейниц, С.В. Москвин, А.А. Ачилов // М. - Тверь. - 2008. - 150с.
7. Гейниц, А.В. Новые технологии внутривенного лазерного облучения крови: ВЛОК+УФОК и ВЛОК - 405 / А.В. Гейниц, С.В. Москвин // М. - Тверь.- 2010. 96с.
8. Хетагурова, З.В. Лазерная терапия при ревматоидном артрите / Хетагурова, З.В., Медоева А.А. // *Успехи современного естествознания*. - 2006. - № 3 - С. 80-80
9. Dessein, P.H. Traditional and nontraditional cardiovascular risk factors are associated with atherosclerosis in rheumatoid arthritis / P. H. Dessein, B. I. Joffe, M. G. Veller // *J. Rheumatol.* - 2005. - Vol. 32. - P. 435-442.
10. Firestein, G. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis / In G. Firestein, R. Budd, E. Harris, I. McInnes, S. Ruddy, S. Sergent// *Kelley's Textbook of 110 Rheumatology*, 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier. - 2009. - vol. 2. - P. 1087-1118.
11. Huscher, D. Cost of illness in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis and systemic lupus erythematosus in Germany / D. Huscher, S. Merkesdal, K. Thiele// *Ann Rheum Dis.* - 2006 Sep. - № 65(9). - P. 1175-83.
12. Mok, C.C. Management of rheumatoid arthritis: consensus recommendations from the Hong Kong Society of Rheumatology / C.C. Mok, L.S. Tam, T.H. Chan// *Clin Rheumatol.* – 2011. - №30. - P. 303-312.

Рецензенты:

Амбалова С.А., д.м.н., профессор, ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Владикавказ;

Еналдиева Р.В., д.м.н., профессор, ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Владикавказ.