

МАНУИЛОВ

Андрей Сергеевич

ПРОГРАММНЫЙ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНЫЙ ФОТОФЕРЕЗ В КОМПЛЕКСНОМ
ЛЕЧЕНИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

14.01.04 – внутренние болезни

14.01.21 – гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург

2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном военном образовательном учреждении высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Научные руководители:

Тишко Валерий Владимирович – доктор медицинских наук, доцент

Захаров Михаил Владимирович – кандидат медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты:

Зоткин Евгений Германович – доктор медицинских наук профессор, первый заместитель директора ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой»

Воинов Валерий Александрович – доктор медицинских наук профессор, профессор кафедры пульмонологии ФПО ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

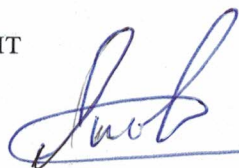
Защита диссертации состоится «18» мая 2020 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 215.002.06 на базе Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова (194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке и на официальном сайте Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова.

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук доцент



Яковлев Владимир Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Совершенствование настоящих и поиск новых методов лечения ревматических заболеваний является наиважнейшей задачей современной ревматологии [Насонов Е. Л. и др., 2017]. Недостаточная эффективность и побочные явления противоревматических препаратов требуют развития новых технологий, обуславливающих селективное воздействие на клетки иммунной системы [Ratcliffe N. et al., 2015]. Классическим примером гетерогенного ревматического заболевания является ревматоидный артрит (РА). Применение противоревматической терапии существенно оптимизировало дальнейший прогноз трудоспособности и жизни пациентов страдающих РА [Smolen J. et al., 2017]. Однако, несмотря на это обстоятельство, даже оптимально подобранная базисная терапия не в состоянии скорректировать клеточный гомеостаз организма, поэтому в лечении РА необходимо использование не только лекарственных средств, но и методов, связанных с избирательной обработкой моноклеарных клеток периферической крови, представляется весьма актуальным [Schwartz J. et al., 2016].

В связи с этим одним из наиболее активно развивающихся и перспективных направлений современной медицины являются методы эфферентной терапии [Воинов В.А., 2011; Ipe T., Pham H., Williams L., 2018]. К числу таковых относится экстракорпоральный фотоферез (ЭКФ), который с успехом занял свое место в комплексном лечении пациентов с аутоиммунными заболеваниями (атопический дерматит, псориаз, болезнь Крона, системная склеродермия, дерматомиозит), Т-клеточной лимфомы кожи, острых и хронических форм реакции трансплантат против хозяина [Just U., Knobler R., 2015]. Целесообразность его применения определяется выраженным иммуномодулирующим действием при хорошей переносимости [Caruano M., 2015]. При этом, несмотря на его широкое использование в терапии многих заболеваний и синдромов с нарушением иммунореактивности, механизм лечебного действия крайне сложен и остается не до конца изученным [Bittenbring J., Reichrath J., 2015].

Известно, что нарушение механизмов программируемой клеточной гибели, а именно «дефицит апоптоза» активированных лимфоцитов, представляется как ведущее патогенетическое звено РА [Сибиряк С.В. и др., 2006; Krammer P., Arnold R., Lavrik I., 2007]. Одним из механизмов действия ЭКФ на мононуклеарные клетки периферической крови является активация внутриклеточных каспаз, отвечающих как за индукцию апоптоза, так и за синтез некоторых провоспалительных цитокинов [Heshmati F., 2014; Alfred A. et al., 2017; Schneiderman J., 2017]. Таким образом, метод ЭКФ, может оказывать значительное влияние на патогенез заболевания, как компонент комплексного лечения РА [Adamski J. et al., 2015; Kuzmina Z. et al., 2015].

Использованию ЭКФ в терапии аутоиммунных заболеваний посвящено значительное количество публикаций, однако их данные противоречивы, а исследования применения ЭКФ в комплексном лечении РА представлены единичными публикациями. Все это определяет актуальность проводимого исследования.

Цель исследования

Изучить клинико-патогенетическую значимость программного экстракорпорального фотофереза в комплексном лечении пациентов с ревматоидным артритом.

Задачи исследования

1. Исследовать уровни апоптоза лимфоцитов как критерии эффективности экстракорпорального фотофереза.

2. Выполнить сравнительную оценку клинико-лабораторных показателей на фоне программного экстракорпорального фотофереза и метотрексата в комплексном лечении пациентов с ревматоидным артритом с монотерапией метотрексатом.

3. Оценить влияние программного экстракорпорального фотофереза в сочетании с метотрексатом на показатели качества жизни, связанные со здоровьем пациентов с ревматоидным артритом в сравнении с монотерапией метотрексатом.

Научная новизна исследования

Проведено углубленное клинико-иммунологическое обследование пациентов с РА до и после применения каждого цикла (две процедуры через день) экстракорпорального фотофереза. Впервые выполнена сравнительная оценка клинико-лабораторных эффектов у пациентов с РА, получавших комплексное лечение программным ЭКФ и метотрексатом (МТ) (основная группа) и монотерапией МТ (контрольная группа). Изучены показатели качества жизни, связанные со здоровьем, у пациентов с РА на фоне комплексной терапии с применением программного ЭКФ и МТ.

На основании результатов диссертационного исследования впервые разработана схема программного применения ЭКФ в комплексном лечении РА, а также определены показания для его использования в клинической практике. С помощью проточной цитофлуориметрии исследованы уровни апоптоза лимфоцитов *in vitro* как критерии эффективности ЭКФ.

Теоретическая и практическая значимость

Разработана на клеточном (лимфоцитарном) уровне схема комплексного лечения РА с программным ЭКФ. Определена потребность в количестве процедур ЭКФ, их периодичность в комплексной терапии РА, что позволяет купировать высокую активность заболевания и обеспечить более длительную ремиссию.

Методология и методы исследования

В исследование было включено 47 пациентов с РА, находившихся на лечении в клиниках факультетской терапии, нефрологии и эфферентной терапии Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова в 2016–2019 гг.

Исследование было одобрено независимым этическим комитетом Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (протокол № 217 от 25.12.2018 г.) и соответствовало требованиям Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных и медицинских исследований с участием человека», утвержденных приказом № 200н Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 года.

Настоящее исследование представлено наблюдательным, продольным дизайном с проспективным видом направленности. Изучено влияние ЭКФ на патогенетические механизмы, клинико-лабораторные данные и показатели качества жизни, связанные со здоровьем пациентов с РА в течение года программного лечения (вид исследования – «случай-контроль»).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. У пациентов с ревматоидным артритом уровни раннего и позднего апоптоза лимфоцитов являются критериями эффективности экстракорпорального фотофереза.

2. Программный экстракорпоральный фотоферез является эффективным методом в составе комплексного лечения пациентов с высокой степенью активности ревматоидного артрита позволяющий ускорить наступление ремиссии в сравнении с монотерапией метотрексатом.

3. Комплексное лечение с применением программного экстракорпорального фотофереза значительно улучшает показатели качества жизни, связанные со здоровьем у пациентов с ревматоидным артритом по сравнению с монотерапией метотрексатом.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Основные результаты исследования доложены на III конференции Национального общества специалистов в области гемафереза и экстракорпоральной гемокоррекции с международным участием «Лечебный гемаферез и экстракорпоральная гемокоррекция: достижения и надежды» (Санкт-Петербург, 2017 г.); XIII Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения в многопрофильном лечебном учреждении» (Санкт-Петербург, 2018 г.); IV конференции Национального общества специалистов в области гемафереза и экстракорпоральной гемокоррекции с международным участием «Лечебный гемаферез и экстракорпоральная гемокоррекция: достижения и надежды» (Самара, 2019 г.); III Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы высокотехнологичной помощи в терапии» (Санкт-Петербург, 2019 г.).

Реализация результатов исследования

Результаты проведенного исследования внедрены в лечебно-диагностическую работу клиник нефрологии и эфферентной терапии, факультетской терапии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова. Основные научно-практические положения диссертации используются в учебном процессе для теоретической и практической подготовки врачей различных специальностей.

Публикации

По результатам диссертационного исследования опубликовано 4 научные работы из них 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК для опубликования основных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук.

Личное участие автора в исследовании

Автором сформулированы и разработаны дизайн, цель, задачи и гипотеза исследования. Работа выполнена на основании результатов обследования и лечения 47 пациентов с РА. В ходе диссертационного исследования автором разработана схема программного применения ЭКФ в комплексном лечении РА и определены показания к ней. Самостоятельно выполнены отбор пациентов для включения в исследование, углубленное клинико-лабораторное обследование до и после каждого цикла ЭКФ; назначение и коррекция базисной противоревматической терапии; наблюдение пациентов в динамике; оценка клинико-лабораторных показателей и переносимости лечения. Все полученные материалы автором проанализированы и обработаны статистическими методами; сформулированы основные положения, практические рекомендации и выводы.

Структура и объём диссертации.

Диссертация изложена на 96 страницах машинописного текста, состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы и списка литературы. Работа иллюстрирована 13 рисунками и 17 таблицами. Список литературы содержит 128 источников (34 – на русском языке и 94 – на иностранном (английском) языке).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Обследование, лечение и наблюдение за пациентами с РА осуществлялось на базе клиник нефрологии и эфферентной терапии и факультетской терапии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова с 2016 по 2019 гг. Диагноз РА устанавливался на основании критериев Американской коллегии ревматологов (ACR, 2010) и Европейской антиревматической лиги (EULAR, 2010).

Первая часть исследования направлена на выявление клинико-иммунологических особенностей пациентов с РА, представлена проспективным и продольным дизайном.

Критерии включения в диссертационное исследование: возраст пациентов от 18 до 76 лет; 2-я–3-я степень активности РА; письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения из диссертационного исследования: возраст пациентов моложе 18 и старше 75 лет; РА без признаков активности; наличие острых инфекционных и паразитарных заболеваний; сопутствующие онкологические заболевания; беременность и лактация.

После постановки диагноза РА всем пациентам в качестве базисного противовоспалительного препарата «первой линии» был назначен МТ в дозе от 10 до 25 мг/нед с последующей оценкой эффективности и переносимости проводимой терапии.

Всех пациентов разделили на основную (ОГ) и контрольную группу (КГ).

В ОГ были включены 20 пациентов с РА, получающих МТ подкожно (п/к) в дозировке 10–25 мг в неделю в сочетании с ЭКФ в программном режиме (две процедуры в 2,5–3 месяца в течение 1 года). В КГ вошли 27 пациентов с РА, получающих монотерапию МТ п/к в дозировке 10–25 мг в неделю.

Каждые три месяца проводилась оценка эффективности лечения на основании динамики клинико-лабораторного индекса DAS 28_{срб}. В случае достижения хорошего или удовлетворительного ответа схема терапии сохранялась, а при отсутствии ответа (динамика клинико-лабораторного индекса

DAS $28_{\text{срб}} < 0,6$ баллов) пациентам при хорошей переносимости увеличивалась общая дозировка МТ на 2,5–5 мг.

У пациентов, не ответивших на монотерапию МТ или при возникшей его непереносимости, была произведена его замена на другие противоревматические препараты, либо добавлены глюкокортикостероиды для достижения ремиссии или низкой активности болезни и исключением их из исследования.

Основная группа включала в себя 20 пациентов с РА, их средний возраст составил $59,8 \pm 7,9$ лет. В группе преобладали пациенты женского пола (60 %), ранней клинической стадии (60 %), с высокой клинико-лабораторной активностью (70 %), II рентгенологической стадией по Штейнброкеру (60 %), III функциональным классом (65 %), с наличием ревматоидного фактора (РФ) (75 %) и антител к циклическому цитруллинсодержащему пептиду (АЦЦП) (85 %).

Контрольная группа представлена 27 пациентами с РА, средний возраст которых составлял $57,3 \pm 12,2$ лет. По полу, клинической стадии, клинико-лабораторной активности и функциональному классу группы были сопоставимы.

Во второй части исследования оценивались клинико-лабораторные эффекты как комплексного лечения с программным применением ЭКФ, так и монотерапией МТ у пациентов с РА. Дизайн этой части работы соответствует наблюдательному исследованию «случай-контроль» по положению до и после применяемых методов лечения.

У пациентов устанавливали: интенсивность болевого синдрома в суставах, продолжительность утренней скованности в минутах, число припухших и болезненных суставов, подсчитывали клинико-лабораторный индекс Disease Activity Score (DAS $28_{\text{срб}}$). Анализ показателей качества жизни (КЖ), связанных со здоровьем у пациентов с РА проводился с помощью русской версии опросника SF-36, который содержит восемь основных шкал [Новик А.А., Ионова Т.И., 2002].

В исследовании применяли расширенный комплекс лабораторных и биохимических маркеров. Наряду с привычными лабораторными методиками в исследовании используются специальные иммунологические маркеры, позволяющие оценить состояние иммунологического статуса пациентов.

Ревматоидный фактор исследовали в сыворотке крови иммунотурбидиметрическим методом на биохимическом анализаторе «Cobas Integra» фирмы «Rosh» (Швейцария), за положительный результат принимали РФ > 20 МЕ/мл. Иммуноглобулины (Ig) М, G, А определяли иммунотурбидиметрически на анализаторе «Biosystems BTS-350» (Испания) реактивами «BioSystems» (Испания). Количество циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке периферической крови измеряли спектрофотометрически на колориметре «КФК-2МП» (Россия) при длине волн 260–280 нм выделяемых светофильтрами в реакции осаждения 5% раствором полиэтиленгликоля фирмы «Sigma» (США), полученные данные выражали в условных единицах. АЦЦП в периферической крови определяли в соответствии с иммуноферментной методикой с помощью реактивов фирмы «Axis Shield Diagnostics» (Великобритания), а также методом лазерной нефелометрии на анализаторе «BN-100» фирмы «Dade Behring» (Германия). За положительный результат принимали более 20 ед/мл.

Из инструментальных исследований использовались: электрокардиография, рентгенография органов грудной клетки в 2-х проекциях, стоп и кистей (каждые 12 месяцев), рентгенография других суставов с признаками артрита по показаниям, эхокардиография и ультразвуковое исследование органов брюшной полости и почек по показаниям для верификации системных проявлений.

Схемы применения процедур экстракорпорального фотофереза. На основании рекомендаций Американского общества афереза (ASFA) от 2016 года, определены показания и схемы проведения процедур ЭКФ для определенных нозологий. Для применения ЭКФ при ревматических заболеваниях (системная склеродермия, псориатический и ревматоидный артрит) резистентных к стандартной базисной терапии, разработан универсальный протокол, утвержденный ASFA. Схема проведения ЭКФ представлена двумя процедурами через день (циклом) с повторным применением через 8–12 недель в течении 12 месяцев. Кратность циклов определялась на основании клинико-лабораторного ответа у пациентов, получавших ЭКФ. Если был определен положительный ответ,

то лечение осуществлялось программно – цикл с интервалом 8–12 недель в течении 12 месяцев.

Методика проведения ЭКФ. Для выделения лейкоцитов из периферической крови применяли клеточный сепаратор «Spectra Optia» фирмы «Terumo BTL» (США) по утвержденному протоколу с контролем клинического анализа крови перед выполнением процедуры цитафереза, внося в память аппарата данные общего количества лейкоцитов и тромбоцитов, а также уровень гематокрита.

Расчет границы раздела сепаратором клеточных масс рассчитывали по формуле: $60 - (0,2 \times \text{лейкоциты} + 0,08 \times \text{тромбоциты})$ с обработкой от 0,6 до 2,5 объемов циркулирующей крови. За одну процедуру получали от 100 до 130 мл клеточного концентрата мононуклеаров, к которому добавляли 0,9 %-ный раствор натрия хлорида, доводя общий объем полученной суспензии до 300 мл.

В качестве фотосенсибилизатора использовали раствор 8-метоксипсоралена в дозе 200 нг/кг, добавляя его к полученной клеточной массе, находящейся в специализированном герметичном пакете, проницаемом для ультрафиолетовых лучей с экспозицией 15–20 минут в темном помещении.

Затем обработанную фотосенсибилизатором клеточную массу облучали на аппарате для фотофереза «Macogenic G2» фирмы «Macopharma» (Франция). Время облучения составляло от 5 до 15 минут (рассчитывалось аппаратом индивидуально для каждой процедуры) при общей дозе экспозиции 2 Дж/см². Далее проводили реинфузию полученной клеточной взвеси пациенту.

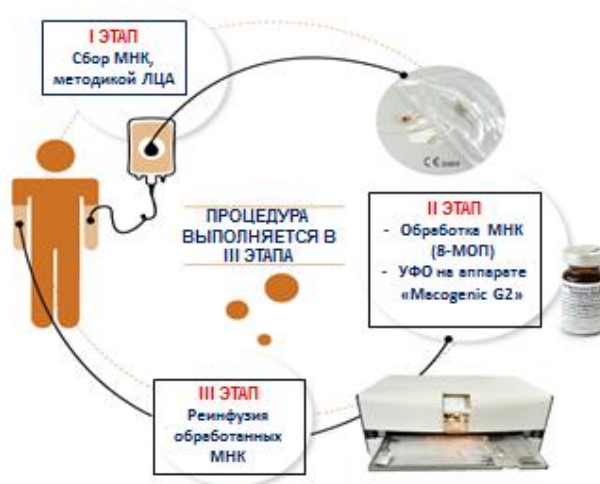


Рисунок 1 – Схема выполнения процедуры экстракорпорального фотофереза

Методика исследования уровней апоптоза лимфоцитов. Полученную клеточную массу дважды отмывали полной культуральной средой (ПКС), приготовленной на основе RPMI–1640 («Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) фирмы «Биолот» (Санкт-Петербург), 50 мкг/мл гентамицина («Биолот», Санкт-Петербург) и 2 ммоль/л L–глутамин («Биолот», Санкт-Петербург). Концентрацию клеток определяли при помощи гемоцитометра. Для постановки экспериментов в лунки 24–луночных планшетов фирмы «Sarstedt» (Германия) вносили по 1000 мкл клеточной суспензии ($2,5 \times 10^6$ клеток в мл) в ПКС и инкубировали 24, 48 и 72 часа при 37°C в атмосфере 5% CO₂. По завершении инкубации клетки ресуспендировали в охлажденном забуференном фосфатами физиологическом растворе (ЗФР), содержащем 2% ЭТС, переносили в пробирки для проведения проточной цитофлюориметрии на аппарате фирмы «Beckman Coulter» (США) и дважды отмывали избытком ЗФР.

Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием комплекта программ «Statistica 10.0 for Windows StatSoft» (США). Графическое представление первичных данных и результатов их статистического анализа выполнялись специальными программами Box Whisker Plot «Statistica 10.0 for Windows StatSoft» (США) и Graph Pad Prism 4.00 for Windows «Graph Pad Prism Software Inc.» (США).

Основные результаты исследования

Для оценки жизнеспособности лимфоцитов в ходе проведения процедур ЭКФ мы оценивали относительную концентрацию живых лимфоцитов в полученной клеточной массе цитаферезом (рисунок 2).

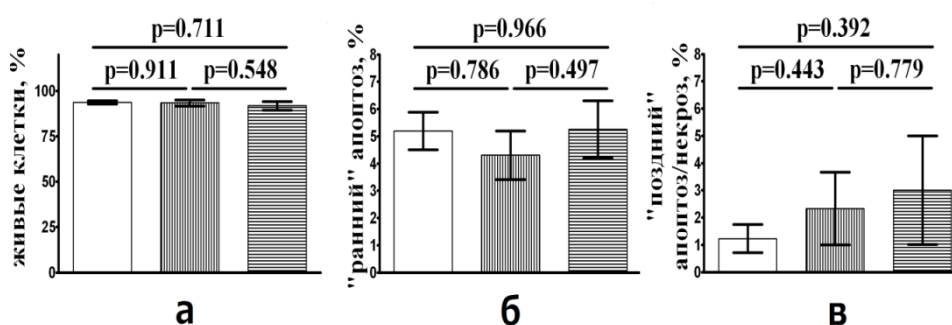


Рисунок 2 – Относительная концентрация живых лимфоцитов (а), лимфоцитов на ранних (б), поздних (в) уровнях апоптоза перед культивированием *in vitro*

Примечания:

Белым цветом обозначены свежесыведенные лимфоциты периферической крови; вертикальной штриховкой – лимфоциты периферической крови, предназначенные для ЭКФ; горизонтальной штриховкой – лимфоциты периферической крови после проведения ЭКФ. Результаты приведены в виде среднего и ошибки среднего; указана достоверность различий согласно t-критерию Стьюдента.

Как видно на рисунке 2, проведение процедур ЭКФ не оказывает значимого воздействия на жизнеспособность лимфоцитов. Так, относительная концентрация живых лимфоцитов в пробах после сепарации мононуклеаров периферической крови составляла $93,57 \pm 0,89$ %, что значимо не отличалось как от проб, предназначенных для ЭКФ, так и от проб после процедуры ($93,36 \pm 1,69$ % и $91,74 \pm 2,41$ %).

Для оценки эффективности ЭКФ мы оценивали кинетику апоптоза, а также проницаемость мембран лимфоцитов и мембранный потенциал митохондрий с помощью проточной цитофлюориметрии *in vitro* (рисунок 3).

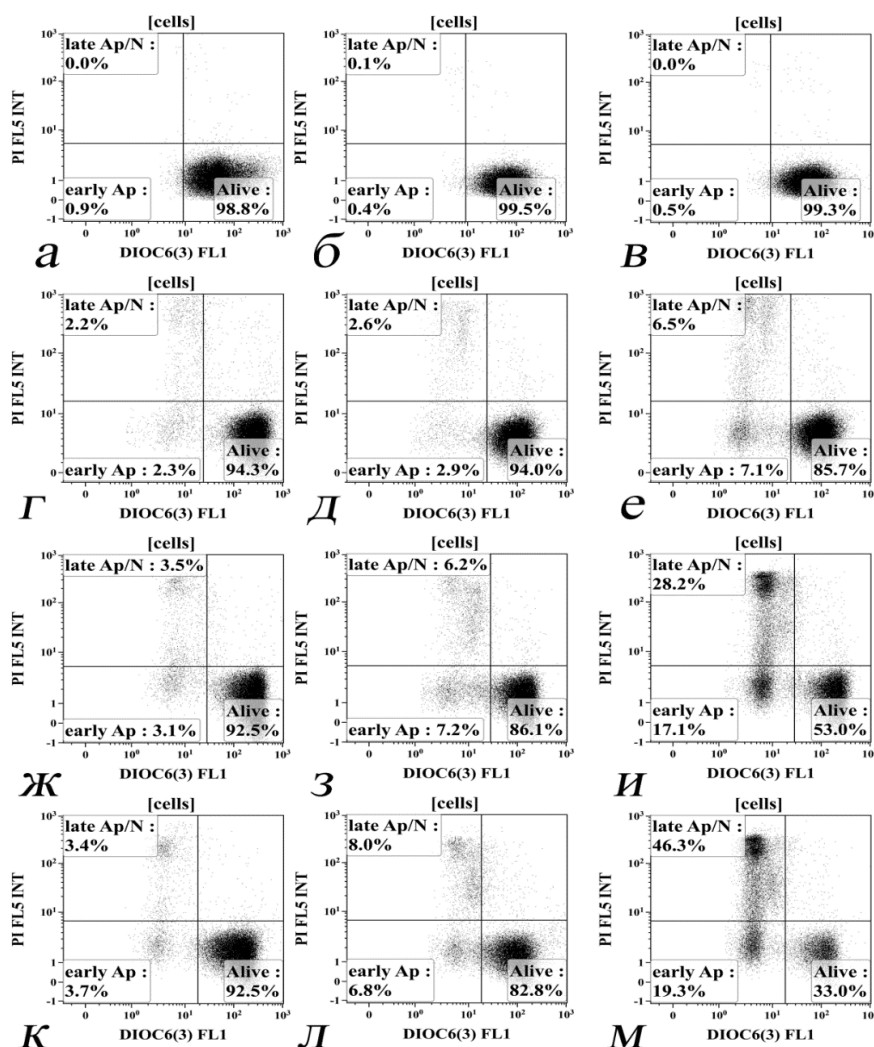


Рисунок 3 – Определение уровней апоптоза лимфоцитов в ходе проведения процедур ЭКФ

Примечания:

На оси абсцисс отмечена концентрация липофильного красителя DiOC₆(3); на оси ординат – концентрация ДНК-связывающего красителя PI. «Alive» – живые клетки с фенотипом DiOC₆(3)^{bright}PI⁻; «early Ap» – лимфоциты на ранних уровнях апоптоза (DiOC₆(3)^{dim-to-neg}PI⁻); «late Ap/N» – лимфоциты на поздних уровнях апоптоза (фенотип DiOC₆(3)^{dim-to-neg}PI⁺). Относительная концентрация лимфоцитов приведена в процентах от общего числа изученных клеток в исследуемых пробах.

Гистограммы а, г, ж, к – свежесыведенные лимфоциты периферической крови на сроках 0, 24, 48 и 72 часа инкубирования *in vitro*; гистограммы б, д, з, л – лимфоциты периферической крови, предназначенные для ЭКФ на сроках 0, 24, 48 и 72 часа инкубирования *in vitro*; гистограммы в, е, и, м – лимфоциты периферической крови после ЭКФ на сроках 0, 24, 48 и 72 часа инкубирования *in vitro*.

Выполнение процедур ЭКФ способствовало снижению жизнеспособности лимфоцитов периферической крови еще на ранних этапах наблюдения. Действительно, уже через 24 часа после начала исследования количество лимфоцитов с фенотипом $DiOC_6(3)^{bright}PI^-$ достоверно значимо ($p=0,017$) уменьшалась с $99,74\pm 2,41\%$ до $83,35\pm 2,05\%$. Последующее культивирование *in vitro* сопровождалось снижением данного фенотипа до $60,78\pm 3,64\%$ ($p<0,001$) и $40,72\pm 4,45\%$ ($p<0,001$) через 48 и 72 часа инкубации. Принципиальным отличием проб, обработанных ЭКФ, от проб для сравнения явился значительный рост доли лимфоцитов, пребывающих на ранних уровнях апоптоза. Так, уже через 24 часа после начала исследования образцов данный параметр достоверно ($p=0,023$) превзошел значения отметки 0 часов ($9,67\pm 1,68\%$ против $5,24\pm 1,05\%$). При дальнейших наблюдениях (48 и 72 часа) происходило достоверное повышение процентной доли лимфоцитов этой популяции ($17,00\pm 1,59\%$ при $p<0,001$ и $18,43\pm 2,11\%$ при $p<0,001$). Следует отметить, что процентные доли погибших клеток – фенотип $DiOC_6(3)^{dim-to-neg}PI^-$ – между отметками 0 и 24 часа достоверно не различались ($3,00\pm 1,99\%$ и $6,99\pm 1,08\%$ соответственно при $p=0,134$). Последующее культивирование *in vitro* сопровождалось достоверным приростом погибших клеток до $22,22\pm 2,81\%$ ($p<0,001$) и $40,83\pm 4,01\%$ ($p<0,001$) через 48 и 72 часа.

Выявлен значительный рост доли лимфоцитов, пребывающих на ранних уровнях апоптоза, уже через 24 часа после проведения ЭКФ, что подтверждается данными, полученными [Schmid D. et al., 2015]. Особо следует отметить, что запуск процессов программированной клеточной гибели связан с самой процедурой ЭКФ. Через 48 и 72 часа после проведения ЭКФ, отмечалось повышение процентной доли лимфоцитов, находящихся на различных уровнях апоптоза, что подтверждается результатами, полученными [Taverna F. et al., 2015].

Таким образом результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что экстракорпоральный фотоферез на клеточном уровне вызывает индукцию апоптоза в лимфоцитах периферической крови с

максимальными показателями раннего и позднего апоптоза на третьи сутки инкубации *in vitro*.

Полученные нами данные подтверждают, что включение в состав комплексного лечения ЭКФ влияет на одно из патогенетических звеньев РА – нарушение процесса апоптоза лимфоцитов.

Для определения динамики эффективности лечения использовали универсальный модифицированный клинико-лабораторный индекс DAS 28, утвержденный EULAR [Aletaha D. et al., 2010], основанный на оценке припухлости и болезненности 28 суставов (коленных, локтевых, плечевых, лучезапястных, пястно-фаланговых, проксимальных межфаланговых), интенсивности боли по визуально-аналоговой шкале (ВАШ) и одного из лабораторных показателей (скорость оседания эритроцитов или С-реактивный белок), характеризующих воспалительную активность. В нашем исследовании в подсчете индекса DAS 28, использовали С-реактивный белок, как более точный показатель воспалительной активности [Wolfe F. et al., 1997].

Как показано на рисунке 4, комплексное лечение программным экстракорпоральным фотоферезом и метотрексатом (ПЭКФ+МТ) в сравнении с монотерапией МТ приводит к достоверно значимому ($p=0,03$) снижению клинико-лабораторного индекса DAS 28_{срб} через 3 месяца терапии.

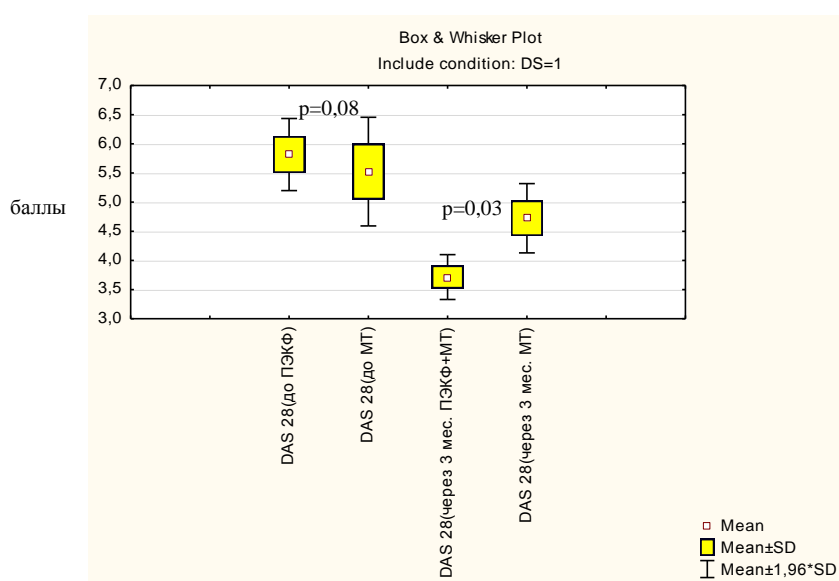


Рисунок 4 – Динамика индекса DAS 28_{срб} у пациентов с РА на фоне назначенной терапии

В основной группе исследуемых пациентов отмечен хороший клинико-лабораторный ответ (динамика $DAS\ 28_{срб} > 1,2$ баллов), что не требовало коррекции количества процедур ЭКФ и дозы МТ. При этом у 12 (60 %) пациентов зарегистрирована низкая, а у 8 (40 %) пациентов – умеренная степень активности болезни.

У 17 (62,9 %) пациентов КГ выявлен удовлетворительный ответ на монотерапию МТ (динамика $DAS\ 28_{срб}$ от 0,6 до 1,2 баллов), что соответствовало умеренной степени активности РА. У 10 (37,1 %) пациентов КГ отсутствовал ответ на монотерапию МТ (динамика $DAS\ 28_{срб} < 0,6$ баллов) и зарегистрирована высокая степень активности болезни. Всем пациентам контрольной группы увеличена доза МТ до 25–30 мг в неделю для достижения ремиссии или низкой степени активности заболевания («лечение до достижения цели»).

Как показано на рисунке 5, комплексное лечение (ПЭКФ+МТ) в сравнении с монотерапией МТ приводит к достоверно значимому ($p=0,04$) снижению клинико-лабораторного индекса $DAS\ 28_{срб}$ через 6 месяцев терапии.

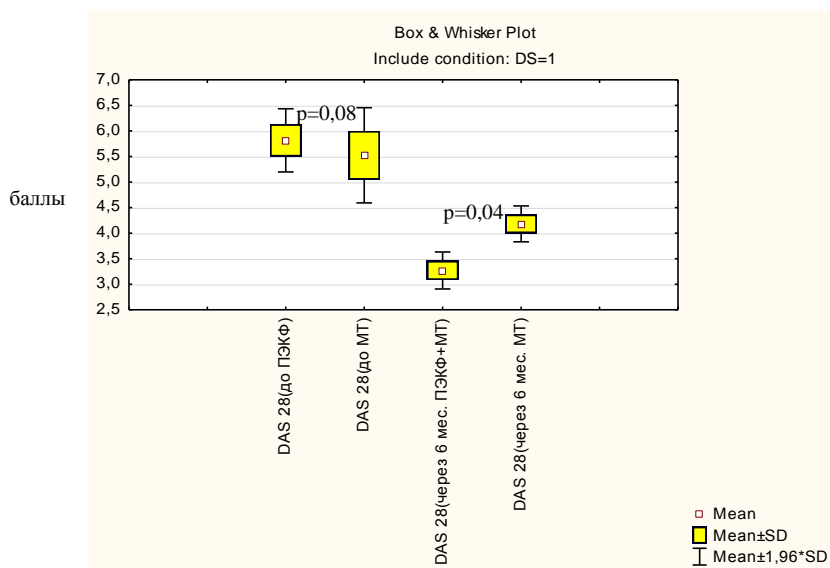


Рисунок 5 – Динамика индекса $DAS\ 28_{срб}$ у пациентов с РА на фоне назначенной терапии

В основной группе пациентов через 6 месяцев отмечен хороший клинико-лабораторный ответ (динамика $DAS\ 28_{срб} > 1,2$ баллов), что не требовало коррекции дозы МТ и лечение было продолжено в прежних индивидуально эффективных

дозировках. При этом у 4 (20 %) пациентов зарегистрирована умеренная, а у 16 (80 %) пациентов – низкая степень активности болезни.

В контрольной группе у 8 (30,6 %) пациентов через 6 месяцев зарегистрирована высокая степень активности болезни и отсутствие ответа на монотерапию МТ (динамика DAS 28_{срб} < 0,6 баллов), что потребовало замену препарата на другие базисные противоревматические средства и исключения этих больных из исследования. У 19 (70,4 %) пациентов КГ выявлен удовлетворительный ответ на монотерапию МТ (динамика DAS 28_{срб} от 0,6 до 1,2 баллов) и зарегистрирована низкая и умеренная степень активности болезни на фоне монотерапии МТ.

Как показано на рисунке 6, комплексное лечение (ПЭКФ+МТ) в сравнении с монотерапией МТ приводит к достоверно значимому ($p=0,01$) снижению клинико-лабораторного индекса DAS 28_{срб} через 12 месяцев терапии.

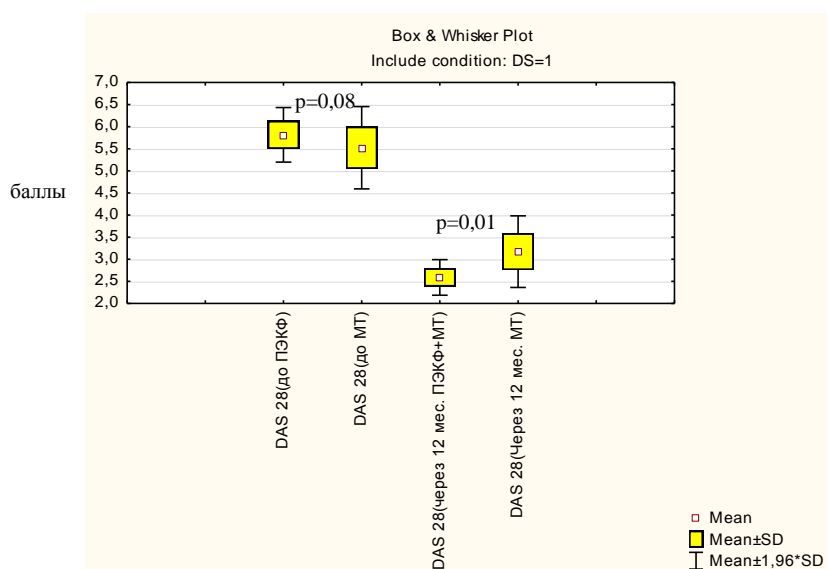


Рисунок 6 – Динамика индекса DAS 28_{срб} у пациентов с РА на фоне назначенной терапии

В основной группе через 12 месяцев у 11 (55 %) пациентов зарегистрирована низкая степень активности болезни, а у 9 (45 %) пациентов – достигнута ремиссия по критериям EULAR на фоне ПЭКФ+МТ. В контрольной группе через 12 месяцев у 7 (36,8 %) пациентов зарегистрирована умеренная, а у 12 (63,2 %) пациентов – низкая степень активности РА на фоне монотерапии МТ 25–30 мг в неделю.

Для оценки лабораторных эффектов программного экстракорпорального фотофереза оценивались показатели клинического анализа крови и острофазовых показателей.

Выявлены достоверно значимые различия между основной и контрольной группой после трех месяцев лечения по уровню гемоглобина ($p=0,05$), СРБ ($p=0,04$), СОЭ ($p=0,003$) и фибриногену ($p=0,02$). Достоверно значимое снижение концентрации маркеров воспаления (СОЭ, СРБ) отмечается у пациентов основной исследуемой группы на фоне комплексной терапии (ПЭКФ+МТ) через три месяца с нарастанием эффекта в течение года в сравнении с монотерапией метотрексатом. На фоне лечения ПЭКФ+МТ отмечается достоверно значимое снижение «острофазовых» показателей (СОЭ, СРБ) с дальнейшей тенденцией к референсным значениям. Эти данные связаны с более ранним и стойким противовоспалительным эффектом комплексного лечения (ПЭКФ+МТ).

У всех пациентов с РА отмечался повышенный уровень Ig G, РФ, АЦЦП и всех видов ЦИК, что подтверждает нарушение регуляции гуморального звена иммунитета. Выявлены достоверно значимые различия между ОГ и КГ после трех месяцев лечения по уровню Ig G ($p=0,05$), высокомолекулярным ЦИК ($p=0,03$), среднемолекулярным ЦИК ($p=0,01$) и низкомолекулярным ЦИК ($p=0,01$). Более выраженное влияние на регуляцию гуморального звена иммунитета посредством снижения уровня Ig G, РФ, АЦЦП, высокомолекулярных, среднемолекулярных и низкомолекулярных ЦИК отмечается у основной группы пациентов с нарастанием эффекта в течение года при включении в комплексное лечение ПЭКФ+МТ в сравнении с монотерапией метотрексатом. Учитывая полученные данные, что процедуры ЭКФ снижают аутоагрессию лимфоцитов к собственным тканям и лабораторно подтверждаются снижением уровня маркеров гуморальных реакций (РФ, АЦЦП и всех видов ЦИК) за счет достоверно значимого уменьшения синтеза иммуноглобулина G через 3 месяца комплексного лечения с нарастанием иммуномодуляторного эффекта в течение года.

Для оценки эффективности проводимого лечения сравнивались показатели качества жизни, связанные со здоровьем в исследуемых группах пациентов.

Хочется отметить, что до лечения все показатели КЖ, связанные со здоровьем, у исследуемых групп пациентов были значимо ниже в сравнении со здоровыми людьми, что соответствует опубликованным данным [Новик А.А., Ионова Т.И., 2002; Койлубаева Г.М., 2005; Чудецкая В.Р., 2006].

В нашем исследовании комплексная терапия (ПЭКФ+МТ) положительно влияла на показатели общего физического здоровья (физическое функционирование, ролевое физическое функционирование, ролевое эмоциональное функционирование, жизненную активность и боль) через 3 месяца от начала лечения с увеличением данных показателей в течение года в сравнении с монотерапией МТ. В большей степени отмечено улучшение показателей общего физического здоровья у ОГ, что связано с более выраженным противовоспалительным эффектом комплексного лечения (ПЭКФ+МТ) в сравнении с монотерапией МТ.

Экстракорпоральный фотоферез зарекомендовал себя как метод с высоким профилем безопасности. Развитие нежелательных явлений зарегистрировано у 20% пациентов, самыми распространенными из них были симптомы (общая слабость, головокружение) связанные с перфузией 2–3 объемов циркулирующей крови через клеточный сепаратор, которые проходили самостоятельно через несколько часов после проведения процедуры.

Международные исследования подтверждают высокий уровень безопасности экстракорпорального фотофереза [Voss C., 2010; Ire T., Pham H., Williams L., 2018].

Таким образом, ЭКФ зарекомендовал себя как метод с хорошими терапевтическими возможностями, лечебные эффекты которого нарастают с течением времени (12 месяцев программного лечения). Комплексная терапия (ПЭКФ+МТ) приводит к статистически значимому снижению активности РА, нормализации «острофазовых» и иммунологических показателей, а также улучшению показателей КЖ, связанных со здоровьем. Частота развития нежелательных явлений при включении ЭКФ в комплексное лечение РА остается

невысокой в сравнении с другими неселективными методиками эфферентной терапии, что подтверждает высокий профиль безопасности [Voss С., 2010].

Экстракорпоральный фотоферез – это перспективный метод эфферентной терапии, который является компонентом комплексного лечения пациентов с высокой степенью ревматоидного артрита.

ВЫВОДЫ

1. Экстракорпоральный фотоферез на клеточном уровне вызывает индукцию апоптоза в лимфоцитах периферической крови с максимальными показателями уровней раннего (19,3 % при $p=0,002$) и позднего (46,3 % при $p<0,001$) апоптоза на третьей сутки инкубации *in vitro*.

2. Программное применение экстракорпорального фотофереза в комплексном лечении приводит к достоверно значимому ($p<0,05$) и стойкому снижению активности ревматоидного артрита по клинико-лабораторному индексу DAS 28_{срб}, лечебный эффект данного метода увеличивается с течением времени и через год программного лечения у 11 (55 %) пациентов зарегистрирована низкая степень активности болезни, а у 9 (45 %) пациентов – достигнута ремиссия по критериям EULAR в сравнении с монотерапией метотрексатом.

3. На фоне комплексного лечения программным экстракорпоральным фотоферезом и метотрексатом у пациентов с ревматоидным артритом отмечается достоверно значимое ($p<0,05$) снижение уровня иммуноглобулина G, ревматоидного фактора, антител к циклическому цитруллинсодержащему пептиду и всех видов циркулирующих иммунных комплексов в сравнении с монотерапией метотрексатом, что подтверждает иммуносупрессивный эффект метода на гуморальное звено иммунитета.

4. Применение программного экстракорпорального фотофереза и метотрексата в комплексном лечении пациентов с ревматоидным артритом достоверно значимо повышает показатели общего физического здоровья (ролевого физического функционирования на 20,8 %, жизненной активности – 19,4 %, физического функционирования – на 15 % и уменьшение болевого синдрома на 25,7 %) через 3 месяца с нарастанием эффекта в течение года по сравнению с монотерапией метотрексатом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Программное применение ЭКФ в составе комплексного лечения показано пациентам с высокой степенью активности РА.

2. Комплексное лечение с применением ЭКФ у пациентов с РА должно проводиться программно: две процедуры через день с интервалом в 2,5–3 месяца в течение как минимум 12 месяцев для достижения низкой степени активности или ремиссии заболевания.

3. Для оценки результатов комплексного лечения с программным применением ЭКФ пациентов, страдающих ревматоидным артритом, следует ориентироваться на динамику клинико-лабораторного индекса DAS 28_{срб}, острофазовых показателей (СОЭ, СРБ), иммунологических маркеров (Ig G, РФ, АЦЦП и всех видов ЦИК), а также показателей общего физического здоровья (ролевого физического функционирования, физического функционирования, жизненной активности и боли).

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Повышение эффективности лечения пациентов с РА и снижение побочных эффектов лекарственных средств является приоритетной задачей не только ревматологов, но и специалистов смежных специальностей. Необходимо продолжить наблюдение за пациентами с РА получающих комплексное лечение с программным применением ЭКФ больше 12 месяцев для изучения не только клинико-лабораторных эффектов, но и рентгенологического прогрессирования.

Появление генно-инженерных биологических препаратов и развитие технологий эфферентной терапии, требуют дальнейших исследований в целях определения возможности их комплексного применения для повышения эффективности лечения РА.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. **Мануилов, А.С.** Возможности биологического контроля экстракорпоральной фотохимиотерапии / А.С. Мануилов, И.В. Кудрявцев, М.К. Серебряков [и др.] // Вест. Рос. воен.-мед. акад. – 2018. – Т. 64, № 4. – С. 123–130.
2. **Мануилов, А.С.** Возможности экстракорпорального фотофереза в комплексном лечении ревматоидного артрита / А.С. Мануилов, А.Н. Бельских, С.Н. Бардаков [и др.] // Вест. Рос. воен.-мед. акад. – 2019. – Т. 65, № 1. – С. 91–95.

Другие научные публикации

3. **Мануилов, А.С.** Влияние экстракорпорального фотофереза на субпопуляционный состав и функциональную активность лимфоцитов // А.С. Мануилов, С.Н. Бардаков, М.В. Захаров [и др.] // Актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения в многопрофильном лечебном учреждении сб. матер. XIII Всероссийской научно-практической конференции – СПб.: ВМедА, 2018. – С. 144–145.
4. **Мануилов, А.С.** Программный экстракорпоральный фотоферез (ПЭФФ) при лечении больных с ревматоидным артритом // А.С. Мануилов, В.В. Тишко, А.А. Соколов [и др.] // Лечебный гемаферез и экстракорпоральная гемокоррекция: достижения и надежды; сб. тезисов IV Научно-практической конференции – Самара: АНО «Издательство СНЦ», 2019.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АЦЦП – антитела к циклическому цитруллинсодержащему пептиду
- ВАШ – визуально-аналоговая шкала
- ЗФР – забуференный фосфатами физиологический раствор
- КГ – контрольная группа
- МТ – метотрексат
- ОГ – основная группа
- ПКС – полная культуральная среда
- ПЭКФ – программный экстракорпоральный фотоферез
- РА – ревматоидный артрит
- РЗ – ревматические заболевания
- СОЭ – скорость оседания эритроцитов
- СРБ – С-реактивный белок
- ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы
- ЭКФ – экстракорпоральный фотоферез
- ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка
- DAS 28 (Disease Activity Score) – индекс активности заболевания
- ACR (American College of Rheumatology) – Американская коллегия ревматологов
- EULAR – Европейская антиревматическая лига
- Ig A – иммуноглобулин А
- Ig M – иммуноглобулин М
- Ig G – иммуноглобулин G
- In vitro – эксперимент вне живого организма
- SF-36 (Study-Short Form) – опросник оценки состояния здоровья
- PI – йодистый пропидий