

П. Н. ДЕРЯБИН, Е. А. КУСТОВА, Б. Х. ХАБИЖАНОВ

ОЦЕНКА ОСНОВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА У ДЕТЕЙ С СИСТЕМНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Известно, что в этиопатогенезе СЗСТ важнейшую роль играет нарушение иммунных процессов [1].

В основе этих нарушений лежат дисфункция как Т-, так и В-лимфоцитов и нарушение процессов их взаимодействия [2]. В настоящее время для определения уровня экспрессии поверхностных дифференцировочных антигенов лимфоцитов все более широко применяется иммунофенотипирование лимфоцитов (ИФТ) методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител. Важным и надежным критерием оценки В-системы иммунитета при различных воспалительных и аутоиммунных заболеваниях является определение уровня иммуноглобулинов [3]. Для СЗСТ также характерны нарушения факторов неспецифической системы защиты организма, в первую очередь нарушение фагоцитоза [4]. Снижение активности фагоцитирующих клеток приводит к повышению содержания циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и их персистенции в высоких титрах, что приводит к их отложению в тканях (клубочки почек, сосуды кожи и т.д.), приводящему к активации комплемента, инфильтрации тканей полиморфноядерными лейкоцитами и высвобождению медиаторов воспаления. Это обуславливает повреждение (тромбоз) сосудов, одно-го из ведущих звеньев патогенеза многих СЗСТ [5].

Цель исследования – определение основных показателей иммунного статуса у детей с СЗСТ и подходов к оценке полученных результатов по некоторым из них.

Материалы и методы

Обследовано 113 детей в возрасте от 3 до 16 лет с СЗСТ в стадии обострения, находившихся на стационарном лечении в НЦПДХ, в том числе 20 детей с ревматизмом, 25 с системной красной волчанкой (СКВ), 29 с ювенильным ревматоидным артритом (ЮРА), 12 с системной склеродермией, 9 с дерматомиозитом, и 18 с другими системными заболеваниями соединительной ткани, и 17 условно здоровых детей, которые составили контрольную группу.

Основные популяции лимфоцитов определяли при

помощи лазерной проточной цитометрии с применением моноклональных антител и “двойной метки” [6]. Исследование проводили на проточном цитофлуориметре FacsCalibur (Becton Dickenson) в программе CellQuest с набором моноклональных антител *Simultest IMK-Plus Lymphocyte* по стандартной методике [6]. Уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови определяли по методу G. Mancini (см. [7]), циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) определяли методом преципитации с 3,5% раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ); фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали по их способности поглощать *Staphylococcus epidermidis* по общепринятому методу, как описано ранее [7]. При статистической обработке полученных результатов использовали методы частного сравнения серий, частотного и дисперсионного анализов, с определением средних арифметических величин и их средних квадратических ошибок [8]. Статистическую обработку результатов выполняли при помощи программы Biostat.

Результаты и их обсуждение

Результаты определения основных субпопуляций лимфоцитов у детей при их поступлении в стационар приведены в табл. 1. Как видно из приведенных данных, в контрольной группе условно здоровых детей относительное содержание субпопуляций лимфоцитов CD3+ (Т-лимфоциты), CD4+ (Т-хелперы), CD8+ (Т-цитотоксические лимфоциты) и CD16+56+ (натуральные киллеры), а также показатель иммуно-регуляторного индекса (соотношение CD4+/CD8+) находились в пределах нормативных показателей (референтных границ), указанных производителем. Однако относительное содержание субпопуляций лимфоцитов CD19+ (В-лимфоциты) и CD3+HLA-DR+ (активированные Т-лимфоциты) было меньше нижнего уровня нормальных значений этих показателей (референтные границы), указанных производителем моноклональных антител [6]. Следовательно, предложенные производителем нормативы содержания этих субпопуляций лимфоцитов нельзя использовать для оценки результатов обследования у больных детей. Поэтому в дальней-

Таблица 1. Иммунофенотипирование основных субпопуляций лимфоцитов

Группа обследованных	Кол-во обследованных	Относительное содержание соответствующей популяции лимфоцитов*				Соотношение содержания CD4+/CD8+	Кол-во обследованных	Относительное содержание лимфоцитов CD3+HLA-DR	Кол-во обследованных	Относительное содержание лимфоцитов* CD16+56+
		CD3+	CD19+	CD4+	CD8+					
Ревматизм	20	67,3±2,7	10,3±0,7	35,9±2,5	38,9±2,5	0,9±0,09	4	5,9±0,7	20	25,3±1,8
Системная красная волчанка	23	72,0±1,9	12,7±1,1	40,8±2,0	34,9±2,9	1,2±0,08	17	11,9±2,4	23	14,7±2,1
Ювенильный ревматоидный артрит	26	65,0±1,8	12,6±0,8	37,3±1,7	32,5±1,6	1,1±0,09	13	7,4±0,9	25	19,9±2,4
Склеродермия	11	59,8±2,7	16,4±2,4	33,0±2,7	34,4±3,8	1,0±0,09	5	5,8±1,1	9	22,9±5,5
Дерматомиозит	9	63,0±0,7	16,1±6,5	32,7±6,6	29,8±5,3	1,1±0,1	4	16,7±12,6	9	21,1±5,7
Другие СЗСТ	18	67,2±2,6	13,4±1,4	36,7±2,3	34,6±2,6	1,0±0,08	7	6,9±1,2	17	21,2±2,1
Всего	107	66,8±1,0	13,2±0,7	36,9±1,0	34,4±1,1	1,1±0,05	50	9,8±1,5	103	20,5±1,1
Контрольная группа	17	76,0±1,5	6,9±0,7	47,1±1,7	28,8±1,1	1,7±0,1	17	4,1±0,5	17	15,1±1,1
Референтные нормы (от производителя)		58-85	10-23	35-50	25-35	1,5-2,0		5-10		8-19

* Здесь и в табл. 3 средняя арифметическая и ее средняя квадратическая ошибка, %.

шем анализ результатов обследования детей с СЗСТ проводился без учета нормативных показателей содержания отдельных субпопуляций лимфоцитов, приведенных производителем использованных моноклональных антител. В целом можно отметить, что у детей с СЗСТ выявлено достоверное (P<0,05) различие в содержании исследованных субпопуляций лимфоцитов периферической крови по сравнению с контрольной группой условно здоровых детей, при этом содержание субпопуляций CD19+ (B-лимфоциты), CD8+ (Т-цитотоксические лимфоциты), CD3+HLA-DR+ (активированные Т-лимфоциты) и CD16+56+ (натуральные киллеры) было выше, а содержание CD3+ (Т-лимфоциты) и CD4+

(Т-хелперы) – ниже, чем в контрольной группе. Отмечено также уменьшение иммунорегуляторного индекса.

Выявленные нами сокращение содержания Т-хелперов и увеличение содержания Т-цитотоксических лимфоцитов (супрессоров), а также обусловленное этим резкое уменьшение иммунорегуляторного индекса, характерное для иммунодефицитных состояний, связано, по-видимому, не только с самим заболеванием, но и с медикаментозной терапией (цитостатики, гормоны и др.), которую эти дети получали ранее, до настоящего поступления в стационар НЦПДХ.

Содержание сывороточных иммуноглобулинов,

Таблица 2. Оценка гуморальных показателей иммунитета и фагоцитоза

Группы обследованных	Кол-во больных	Фагоцитарный индекс, %	Фагоцитарное число	Содержание сывороточных иммуноглобулинов, г/л			Циркулирующие иммунные комплексы, у.е.
				IgG	IgA	IgM	
Ревматизм	20	40,55±3,81	3,54±0,37	12,75±0,09	2,26±0,32	1,15±0,18	9,59±0,42
Системная красная волчанка	25	44,24±2,88	5,15±0,36	11,20±0,95	2,00±0,42	1,19±0,10	8,18±0,58
Ювенильный ревматоидный артрит	29	47,76±2,47	5,14±0,24	11,85±1,06	2,12±0,35	1,27±0,16	8,58±0,41
Склеродермия	12	45,67±5,71	4,18±0,71	12,41±1,74	2,32±0,78	1,43±0,22	8,90±0,76
Дерматомиозит	9	45,44±6,30	4,57±0,65	12,90±2,29	1,98±0,48	1,88±0,33	7,37±0,46
Другие СЗСТ	18	45,44±3,74	4,64±0,42	12,73±1,37	2,08±0,27	1,53±0,22	9,37±0,50
Все	113	45,60±1,48	4,72±0,17	12,23±0,52	2,15±0,17	1,36±0,08	8,73±0,22
Контрольная группа	17	61,1±3,9	5,9±0,3	9,6±0,5	1,6±0,2	1,0±0,1	4,10±0,50

ЦИК и показатели фагоцитоза у обследованных больных при поступлении приведены в табл. 2. Для СЗСТ характерны гипергамма-глобулиемия и повышение содержания ЦИК [4]. Как видно из табл. 2, это подтверждено полученными данными: содержание иммуноглобулинов классов G, A, M в сыворотке крови в целом у больных СЗСТ было достоверно ($P < 0,05$) выше по сравнению с контрольной группой. При анализе результатов обследования отдельных групп детей с СЗСТ выявлено следующее: по сравнению с контрольной группой детей содержание IgG повышено только у больных ревматизмом и другими СЗСТ, а содержание IgM – только у детей с дерматомиозитом и другими СЗСТ. В других группах детей с СЗСТ содержание IgG и IgM, а также содержание IgA во всех отдельных группах детей с СЗСТ не имело достоверных ($P > 0,05$) различий с этими показателями в контрольной группе детей. Это, вероятно, обусловлено относительно небольшим количеством детей в отдельных группах и относительно большим разбросом показателей содержания иммуноглобулинов. Как в целом у детей с СЗСТ, так и в отдельных группах больных зарегистрировано повышение уровня ЦИК по сравнению с контрольной группой детей. При этом достоверных различий этого показателя в отдельных группах больных СЗСТ не выявлено ($P > 0,05$), за исключением того, что в группе больных дерматомиозитом этот показатель был достоверно ($P < 0,05$) меньше, чем в группах детей с ревматизмом и другими СЗСТ.

Результаты определения показателей фагоцитоза у обследованных нами больных также характерны для СЗСТ. Как в целом у больных СЗСТ, так и в отдельных группах больных, за исключением ре-

зультатов определения ФЧ у детей с СКВ и дерматомиозитом, обнаружено снижение показателей ФИ и ФЧ по сравнению с контрольной группой.

Было интересно оценить, как изменились показатели иммунного статуса у детей с СЗСТ в динамике их лечения. С этой целью 20 детей с различными СЗСТ были обследованы при поступлении в стационар НЦПиДХ (до лечения) и перед их выпиской (после проведенного лечения). Результаты приведены в табл. 3, 4. Как видно, в данной группе больных относительное количество Т-лимфоцитов, Т-активированных и В-лимфоцитов после проведенного лечения возросло. Но если увеличение показателя относительного содержания Т-лимфоцитов можно рассматривать как благоприятный признак (он стал ближе к такому же показателю здоровых детей), то повышение содержания В- и Т-активированных лимфоцитов свидетельствовало об увеличившемся дисбалансе этих клеток. Содержание регуляторных субпопуляций лимфоцитов и показатель иммунорегуляторного индекса, а также содержание НК-клеток практически не изменились. Известно, что динамика содержания В- и Т-активированных лимфоцитов является показателем купирования воспалительных процессов [5]. У обследованных же нами больных эти показатели после проведенного лечения еще более ухудшились. Это в сочетании с сохранившимся дисбалансом других исследованных субпопуляций лимфоцитов (Т-лимфоциты, Т-хелперы, Т-супрессоры, НК-клетки) свидетельствовало о том, что, несмотря на положительную динамику клинических показателей, у этих детей после их лечения сохранился, а по отдельным показателям даже увеличился дисбаланс основных

Таблица 3. Динамика содержания основных субпопуляций лимфоцитов до и после лечения

Группа больных СЗСТ	Относительное содержание субпопуляций лимфоцитов, %						Соотношение содержания CD4+/CD8+
	CD3+	CD19+	CD4+	CD8+	CD3+HLA-DR+	CD16+56+	
До лечения	64,2±2,1	12,0±0,9	33,1±2,4	35,0±1,9	5,9±0,8	22,3±2,6	1,1±0,1
После лечения	70,2±1,8	17,8±1,1	37,3±1,6	32,4±1,3	9,6±1,5	21,7±1,9	1,2±0,1

Таблица 4. Динамика показателей гуморального иммунитета и фагоцитоза

Группы больных СЗСТ	Фагоцитарный индекс, %	Фагоцитарное число	Содержание сывороточных иммуноглобулинов			Циркулирующие иммунные комплексы, у.е.
			IgG	IgA	IgM	
До лечения	45,55±3,74	4,48±0,37	10,41±1,25	2,14±0,33	1,25±0,19	8,68±0,45
После лечения	50,2±2,57	4,82±0,39	11,22±0,9	1,96±0,24	1,13±0,13	6,33±0,43

субпопуляций лимфоцитов. Достоверных различий содержания основных классов иммуноглобулинов до и после лечения не выявлено ($P > 0,05$), не обнаружено также достоверных различий по показателям фагоцитоза. Уровень ЦИК хотя и существенно ($P < 0,05$) снизился, но по-прежнему был более достоверным ($P < 0,05$), чем у детей контрольной группы.

Таким образом, исследования показали, что при оценке результатов определения основных субпопуляций лимфоцитов у больных детей с использованием проточной цитометрии нельзя ориентироваться на нормативные показатели, приводимые производителем используемых моноклональных антител. Выявлен выраженный дисбаланс содержания основных субпопуляций лимфоцитов у детей с СЗСТ. Структурные и количественные изменения этих показателей зависели от формы СЗСТ. У детей с СЗСТ отмечено также увеличение содержания в сыворотке крови основных классов иммуноглобулинов и ЦИК и снижение основных показателей фагоцитоза. Проводимое лечение, несмотря на положительную динамику клинических показателей, не привело к нормализации изученных показателей иммунного статуса. Следовательно, дети с такой патологией нуждаются в дальнейшем наблюдении и контроле основных показателей иммунного статуса и, возможно, в иммунокорригирующей терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Струков А.И., Серов В.В. Патологическая анатомия. М., 1995. С. 160.
2. Каррей Хл.Ф. Клиническая ревматология. М., 1990. С. 30.
3. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммунодиагностика иммунодефицитов // Иммунология. 1997. № 3. С. 4.
4. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М., 2000. С. 294, 298, 300.
5. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. М.: ООО Медицинское информационное агентство, 2003. С. 241.
6. Руководство Simultest ИМК Plus (Becton Dickinson), 2000. С. 20.
7. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. М., 1987. С. 311.
8. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. М., 1975. С. 292.

Резюме

3 жастан 16 жасқа дейінгі 113 бала зерттелінген, оның ішінде ревматизммен – 20, жүйелі қызыл жегімен (ЖҚЖ) – 25, ювенильды ревматоидты артритпен – 29, склеродермиямен – 12, дерматомиозитпен – 9 бала бар. Зерттеуге дәнекер тіннің жүйелі ауруларымен алынған 113 баланың ішінде 17-сі шартты сау балалар және ем алғаннан кейінгі 20 бала. ДТЖА-мен ауыратын балалардың перифериялық қанындағы лимфоциттердің иммунофенотипі, иммунды статусы, нейтрофильдің фагоцитарлы белсенділігі, қан айналымындағы иммундық кешені, қан сары суындағы иммуноглобулин мөлшері, анти-ДНК, ревматоидты фактор, АСЛ-О, С-реактивті белок анықталды. Жүргізілген зерттеудің нәтижесінде барлық дәнекер тіннің жүйе аурулардың әртүрлігіне қарамастан нейтрофильдің фагоцитарлы белсенділігі төмендеген, қан айналымындағы иммундық кешендерінің және қан сары суындағы иммуноглобулиндердің мөлшері көбейген. Алынған мәліметтер жүйелі дәнекер тіннің ауруларын анықтауда осы әдістердің жеткіліксіз екенін көрсетеді, өйткені зерттелінгендердің ішінде аурудың белсенді стадиясына қарамастан оң нәтиже төменгі пайызда анықталды.

ДТЖА-мен ауыратын балалардың көрсеткіштері қалыпты референтті шекараларға сәйкес келеді, бірақ шартты сау балалардың көрсеткіштеріне сәйкес емес. Жүргізілген емнен кейін иммунды статусының көрсеткіштері қалыпты жағдайға келмеді.

Түйінді сөздер: дәнекер тіннің жүйелі аурулары, иммунофенотипті зерттеу, иммунды статус.

Summary

113 children with systemic diseases of connective tissue, 17 children relatively healthy, 20 children in dynamics after treatment were examined. The aim of the research is to defect rates of immunogramme of children with SDCT and to compare it with rates of relatively children. The results of examination of healthy children are not matching with referent boards of standarts from firms produced monoclonal antibodies. The immunogramme rates from sick children are matching with referent boards of standart, but not matching with rates given from healthy children. The providing triatment are not cause the normalization of examined rates of immune status. The aim of the research presented is to examine the rates of phagocytosis system of neutrophiles, circulating immune complexes as well as the rate of immunoglobulins in children with different nosological forms of systemic diseases of connective tissue.

Examinations showed that in all patients with SDCT was revealed the decrease of phagocytative activity of neutrophiles, rising of circulating immune complexes rates and rates of seral immunoglobulins.

Key words: systemic diseases of connective tissue, immunophenotyping, referent boards of standart.

Казахстанский медицинский университет;

Научный центр педиатрии

и детской хирургии Минздрава

Республики Казахстан, г. Алматы

Поступила 2.12.05г.