

Voronkova O. S., Voronina N. O., Polishko T. M., Vinnikov A. I.
Immune status of the lupus-test positive patients

УДК 577.27+612.017

О. С. Воронкова, Н. О. Вороніна, Т. М. Полішко, А. І. Вінніков

*Дніпропетровський національний університет,
Дніпропетровська міська клінічна лікарня № 4*

СТАН ІМУНОГРАМИ ПАЦІЄНТІВ, ПОЗИТИВНИХ У ЛЮПУС-ТЕСТІ

Розглянуто зміни показників імунного статусу пацієнтів, позитивних за люпус-тестом. Охарактеризовано експресію деяких рецепторів на поверхні лімфоцитів периферійної крові. Розраховано кореляцію для показників тесту відновлення тетразолію нітросинього та рівня експресії CD₉₅-рецептора (рецептора апоптозу).

Changes in immune status of the lupus-test positive patients are presented. The expression of some lymphocytic surface receptors in the peripheral blood is characterised. Correlation between the NST-test index and the level of CD₉₅-receptor expression (apoptosis receptor) was calculated.

Вступ

Аутоімунні хвороби – специфічний вид розладів, що виникають в організмі людини внаслідок аутоімунних процесів, порушення толерантності до власних антигенів та імунної відповіді на нормальні клітини та тканини організму.

Одне з важливих питань при вивченні аутоімунних захворювань – їх значущість для вагітних і процесу виношування дитини, адже за умов вагітності імунна система має бути пригніченою, аби не заподіяти шкоди матері та плоду. Аутоімунні ж хвороби, навпаки, призводять до розвитку “агресії”, яка закінчується невиношуванням вагітності, в деяких випадках – “звичним невиношуванням вагітності”, діагнозом, який свідчить не лише про фізіологічний розлад, а і про психічну травму.

Загальний показник фетальних втрат при аутоімунних процесах у вагітних становить 18–33 % [1; 6; 7]. Розвиток цієї патології у вагітних жінок визначається надлишковим синтезом специфічних антитіл проти власних антигенів. Найчастіше – це антитіла до фосфоліпідів мембран власних нормальних клітин, які отримали загальну назву антифосфоліпідні. Визначення цих антитіл є одним із важливих діагностичних тестів при вагітності, який дозволяє слідкувати за її розвитком і у визначений час приймати важливі рішення щодо захисту здоров'я матері та дитини.

© О. С. Воронкова, Н. О. Вороніна, Т. М. Полішко, А. І. Вінніков, 2007

24

Певну цікавість викликають такі діагностичні маркери, як експресія рецепторів на поверхні лімфоцитів, за якими визначають популяційну та субпопуляційну належність лімфоцитів, експресію рецепторів до апоптозу та активність фагоцитозу. Встановлено, що завершальною стадією апоптозу є фагоцитування апоптотичних тілець. Але це поглинання можливе лише за умов “опсонізації” решток специфічними, переважно антифосфоліпідними, антитілами [9–14]. Іноді деякі дефекти призводять до того, що апоптотичні тільца не утилізуються макрофагами, а накопичуються в периферійних органах і тканинах. Це спричиняє подальшу індукцію синтезу аутоантитіл аутореактивними В-клітинами, що, у свою чергу, викликає деградацію тканин, де накопичені апоптотичні тільца [14]. Тобто аномалії апоптозу призводять до подальшої стимуляції імунної відповіді та концентрації антифосфоліпідних антитіл, завдяки чому і відбувається розвиток одного з патологічних станів, відомого як антифосфоліпідний синдром [11].

Одним із непрямих методів, що дозволяє лікарю попередньо звернути увагу на можливість розвитку аутоімунного процесу, є люпус-тест, або визначення вовчакового антикоагулянту (ВА).

Матеріал і методи досліджень

У досліді вивчено деякі імунологічні показники венозної крові, отриманої від вагітних жінок із підозрою на аутоімунний розлад. Кров поділили на дві групи за ознакою відповіді у люпус-тесті: I – кров з негативною відповіддю на ВА, $n = 9$ (контроль); II – кров із позитивною пробою на ВА, $n = 24$ (дослідна група). Визначення ВА проводили за стандартною методкою, рекомендованою компанією – виробником препарату [2].

Визначення рівнів експресії рецептора CD₉₅ (рецептор апоптозу) та типових рецепторів Т- і В-клітин на поверхні лімфоцитів проводили за допомогою моноклональних антитіл [5; 8]. Рівень фагоцитозу визначали у тесті відновлення тетразолію нітросинього [2]. Статистичну обробку даних [4] проведено із застосуванням критерію Стюдента ($\alpha = 0,05$).

Результати та їх обговорення

Проведення скринінгових та підтверджувальних тестів на наявність ВА включало визначення каолінового часу, тромбопластинового часу з розведеним тромбoplastином (ТЧРТ) та лебетоксового часу.

Встановлено, що у групі жінок, які мали показання звичного невиношування вагітності, результати всіх трьох тестів достовірно перевищували норму.

Каоліновий час (КЧ) достовірно збільшується у жінок II групи, порівняно з показниками жінок з I групи у 1,48 разів, що свідчить про наявність ВА. У підтверджувальних тестах встановлено, що при додаванні контрольної нормальної плазми не відбувалося нормалізації часу зсідання, а при додаванні тромбоцитину спостерігалось повне відновлення зсідання.

Вивчення тромбoplastинового часу із застосуванням “розведеного” тромбoplastину дало результат, близький до патологічного (перевищення показників у групі ризику у 1,19 разів більше порівняно з контрольною групою). Підтверджувальні тести виявили, що при додаванні тромбоцитину відбувається відновлення часу зсідання крові, а при додаванні контрольної нормальної плазми достовірних змін у патологічному рівні гіпокоагуляції немає.

Тест із визначенням лебетоксового часу (ЛЧ) також показав, що у крові жінок II групи наявний ВА. Відмічено достовірне гальмування зсідання у 1,32 разів у

II групі порівняно з I групою. Тести другого етапу (підтверджувальні) показали, що дійсно має місце факт наявності ВА, бо при додаванні тромбоцитину відбувається зменшення показника ЛЧ до значень норми, а при проведенні тесту з нормальною плазмою рівень гіпокоагуляції лишається майже незмінним.

У досліді з визначення кореляції між показниками тесту відновлення нітросинього тетразолію та експресії CD₉₅-рецептора на поверхні лімфоцитів як робочу сформульовано гіпотезу про відсутність кореляції між цими показниками. Не обов'язково клітина, що експресує CD₉₅R, буде утилізована. Наприклад, за умов стимуляції лімфоцита інтерлейкіном-2 він активується – “життя” клітини триває ще деякий час. Також необов'язково активація макрофагів пов'язана з відповіддю на аутоантиген чи на зовнішній антиген. Ця ланка клітин активується у відповідь на будь-яку антигенну стимуляцію. Тобто рівень активації фагоцитів не повинен співпадати з рівнем експресії CD₉₅R.

Під час досліду отримано дані про зміни цих показників у групі з 33 жінок, 24 з яких мали позитивну відповідь у люпус-тесті.

Відмічено, що у жінок II групи показник відновлення НСТ майже удвічі знижений порівняно з нормою. Але статистично достовірної різниці між показниками у вагітних із нормальним перебігом процесу та у вагітних із позитивною пробою на ВА не зареєстровано.

Показник НСТ-тесту у жінок з нормальним перебігом вагітності становить 10,40±1,57 %, а у вагітних із позитивною пробою на ВА – 5,54±1,76 %. У I групі рівень експресії CD₉₅-рецептора становив 10,60±2,38 %, а у II – 18,54±3,19 %.

Для групи ВА-позитивних жінок кореляції ($r_{x,y} = 0,073$) між цими двома показниками не існує. Тобто отримане попереднє підтвердження гіпотези про незалежність даних показників апоптоз дійсно може мати місце у розвитку АФС. Якби параметри змінювалися узгоджено, не було б підстави для виникнення патології. Збільшення рівня експресії CD₉₅R на тлі зниження рівня активності макрофагів може бути однією з вірогідних причин розвитку синдрому.

Для групи жінок, що мали негативну відповідь у люпус-тесті, спостерігається дуже низький ступінь взаємозумовлених змін ($r_{x,y} = -0,344$). Слід враховувати, що у цієї групи жінок не відмічено зниження активності макрофагів, на відміну від групи жінок із позитивним ВА-тестом. Даний факт може свідчити на користь того, що власне дефект фагоцитозу, а не надмірна активація апоптозу, є однією з можливих причин виникнення та розвитку аутоімунітету.

Отже, для жінок з позитивним ВА-тестом кореляція не спостерігається, а у групі жінок із нормальним перебігом вагітності з'являється тенденція до лінійної негативної залежності.

Порівняння показників імунограми пацієнток, що виявилися позитивними у пробі на ВА, із показниками імунограми жінок із нормальним перебігом вагітності проводилося з вивченням деяких показників клітинного та гуморального імунітету.

У більшості опрацьованих джерел показники загальноприйнятої лабораторної норми – усереднення багатьох даних для загальної сукупності людей. Нами встановлено показник для дослідженого регіону.

У ході експерименту відмічено, що деякі показники мають тенденцію до зниження. Суттєво спадає рівень клітин у Т-ланці імунітету (знижується рівень Т-хелперів) виникає потенційна загроза інфекційних ускладнень. Проте, це є свідченням нормального перебігу вагітності, адже саме надмірна активація Т-хелперів і зростання їх кількості – фактори загрози переривання вагітності. Тобто в даному випадку необхідне ведення вагітної, аби завчасно запобігти розвиткові пато-

логії. За умов фізіологічної вагітності загальна кількість лімфоцитів становить середні значення норми, тобто змін на цьому рівні імунного статусу не відзначають. При патологічних процесах хоча і спостерігається деяке збільшення, загальний рівень лімфоцитів також лишається в межах норми. Достовірних відмін за рівнем цього показника у жінок I та II груп немає, а тому він не може вважатися допоміжним критерієм для клінічної діагностики захворювання.

Зниження рівня НК-клітин відбувається насамперед тому, що їх діяльність спрямована проти будь-якої клітини, яка експресує чужорідні антигени (клітини плаценти та майбутнього плоду). Тому плацента виділяє спеціальні фактори, що знижують кількість НК-клітин. Встановлено статистично достовірне зниження рівня цих клітин майже удвічі.

Тенденція до зниження чисельності популяції спостерігається і для В-клітин, але при цьому не відмічено зниження вираженості гуморального імунітету. Взагалі з гуморальної ланки імунограми інтерес становить лише IgG, що є прогностичним маркером невиношування. При зниженні концентрації цього імуноглобуліну слід шукати причину, щоб негайно вживати заходів, спрямованих на збереження вагітності. Оцінення показників популяції В-клітин можливе за двома маркерами – CD₁₉ та CD₂₂. Ми вивчали експресію маркера CD₁₉. При підрахуванні В-лімфоцитів встановлено, що у жінок I групи цей показник достовірно нижчий (в 1,7 раза), ніж у жінок II групи.

У межах норми (40–60 одиниць оптичної густини) при фізіологічній вагітності також залишається кількість циркулюючих імунних комплексів (ЦІК). Цей показник починає становити інтерес при ускладненнях вагітності аутоімунної природи. Тоді рівень ЦІК зростає майже удвічі, сягаючи верхньої межі норми. Стосовно ролі ЦІК у перебігу нормальної вагітності є дані про те, що, поступово накопичуючись, вони, сягаючи певної концентрації, викликають скорочення гладеньких м'язів матки (поряд із гормональною стимуляцією цієї ж мускулатури окситоцином), що власне і забезпечує пологовий процес. При надмірному ж їх відкладенні під час вагітності, обтяженої АФС, цей процес прискорюється в часі і може бути однією з причин невиношування вагітності.

Рівень експресії таких рецепторів поверхні лімфоцитів як до інтерлейкіну-2 та апоптозу лишається в межах норми (15–21 та 9–11 % відповідно). Це пояснюється поступовою зміною популяцій лімфоцитів та відсутністю надмірної кількості факторів активації імунної системи. При аутоімунних розладах спостерігається статистично достовірне зростання показників (у 1,6 та 1,5 раза відповідно).

Ще один показник, для якого відмічено тенденцію до зростання за умов фізіологічної вагітності, це рівень Т-супресорів. Вміст їх у зразках крові жінок I групи порівняно з II групою вищий майже у 1,5 раза.

Враховуючи зміни цього показника, кількості Т-хелперів, відмітили також зміни регуляторного індексу співвідношення кількостей цих субпопуляцій лімфоцитів. При фізіологічній вагітності цей індекс значно зменшується (до значень менше 1), що є показником стану імуносупресії, яка взагалі властива вагітності. У діагностичній клініці показник CD₄/CD₈ має особливе значення: так, при ФВ він знижується до нижньої межі норми та навіть нижче, за рахунок зниження CD₄. Нашими дослідженнями встановлено, що у I групі цей індекс становить $0,9 \pm 0,04$, у той час як у II групі – $2,1 \pm 0,03$.

Для заданого рівня значущості спостерігаються зміни між рівнями Т-хелперів та індексу CD₄/CD₈. Встановлена різниця рівня Т-супресорів між показниками норми та патології не є статистично достовірною.

Дослідження рівня експресії маркера CD₂₅ показало, що у вагітних I групи рівень його значно нижчий, ніж у жінок II групи. Це свідчить про масову активацію клонів лімфоцитів, притаманну аутоімунним станам. Встановлено достовірність змін рівнів експресії рецептора у жінок із нормальною та ускладненою вагітністю.

Рівні показників гуморальної ланки імунітету свідчать про те, що зміни концентрацій імуноглобулінів А та М хоча і є достовірними, але залишаються в межах загальної фізіологічної норми. Щодо концентрації імуноглобуліну G, то відмічене достовірне зниження його рівня – це можна вважати однією з прогностичних ознак невиношування вагітності.

Висновки

Вагітність і патології нетипові для організму відображаються на популяціях і субпопуляціях лімфоцитів периферійної крові. Зміни в основному відбуваються всередині CD₃-популяції (Т-клітини) з субпопуляціями CD₄ (Т-хелпери) та CD₈ (Т-супресори) внаслідок активації факторами росту, що активно синтезуються при вагітності. До того ж хемокіни значно впливають на клітини імунної системи. Вагомими для клінічної діагностики також є показники рівня IgG, NK-клітин, індексу CD₄/CD₈.

Встановлено відсутність кореляції між рівнем експресії рецепторів до апоптозу та рівнем фагоцитозу. На жаль, зараз не існує єдиної думки щодо стану показників імунограми, але вивчити їх у даному разі дуже важливо, адже для кожного етапу розвитку нормальної та патологічної вагітності властивий свій рівень показників імунного статусу, який відповідає послідовним пристосуванням систем макроорганізму до проявів антигенного навантаження та змін імунітету. Поряд із цим рівень Т-супресорів змінюється незначно порівняно із фізіологічною вагітністю, але порівняно з лабораторною нормою показане значне зростання.

Бібліографічні посилання

1. **Змушко Е. И.** Клиническая иммунология. – С-Пб.: Питер, 2001. – 574 с.
2. **Иммунология: Практикум** / Е. У. Пастер, В. В. Овод, В. К. Позур, Н. Е. Вихоть. – К.: Вища школа, 1989. – С. 267–280.
3. **Инструкция** по применению набора реагентов для определения антикоагулянтов волчаночного типа Люпус-тест. – Производитель: Технология-Стандарт, 2004. – 7 с.
4. **Лакин Г. Ф.** Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.
5. **Лебедев К. А.** Иммунограмма в клинической практике / К. А. Лебедев, И. Д. Понякина. – М.: Наука, 1990. – 224 с.
6. **Ройт А.** Иммунология / А. Ройт, Д. Бростофф, Д. Мейл. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
7. **Справочник** по акушерству и гинекологии / Под ред. Г. К. Степанковской. – К.: Здоров'я, 1997. – С. 88–99.
8. **Ускоренные методы** диагностики иммунного статуса / Под ред. В. С. Семеновского. – Одесса: ОГМУ, 1996. – 32 с.
9. **Apoptosis** and the antiphospholipide syndrome / J. Rauch, R. Subang, P. D'Aquill et al. // Autoimmunity. – 2000. – Vol. 15, N 2. – P. 231–235.
10. **Apoptotic cell clearance** in systemic lupus erythematosus. I. Opsonization by antiphospholipide antibodies / A. A. Manfredi, P. Rovere, G. Galati et al. // Arthritis rheumatology. – 1998. – Vol. 41, N 2. – P. 205–214.
11. **Apoptotic cell clearance** in systemic lupus erythematosus. II. Role of β 2-glycoprotein-1 / A. A. Manfredi, P. Rovere, S. Heltai et al. // Arthritis rheumatology. – 1998. – Vol. 41, N 2. – P. 215–223.
12. **Cook M. C.** B-cell biology, apoptosis and autoantibodies to phospholipides // Thrombosis research. – 2004. – Vol. 114, N 5–6. – P. 307–319.

13. **Mansen J. J.** Antiphospholipide syndrome / J. J. Mansen, D. A. Isenberg // International journal of biochemistry and cell biology. – 2003. – Vol. 35, N 7. – P. 1015–1020.
14. **Pitteni V.** Apoptosis and antiphospholipide antibodies / V. Pitteni, D. Isenberg // Seminar arthritis rheumatology. – 1998. – Vol. 28, N 3. – P. 163–178.

Надійшла до редколегії 10.09.2006