

ОЦЕНКА ОБЩЕГО ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ СУБАТРОФИЕЙ ГЛАЗА

В данной работе приведены результаты иммунологического обследования пациентов с посттравматической субатрофией глазного яблока. Выявлены наиболее характерные особенности иммунного статуса этого контингента больных, выражающиеся в повышении количества иммунокомпетентных клеток, приводящих к запуску аутоагрессивных изменений в организме.

Ключевые слова: посттравматическая субатрофия, увеит, энуклеация, иммунная система, лимфоциты, активационные рецепторы, цитотоксичность, аутоантителообразование, моноклональные антитела, свободно-радикальные процессы.

Актуальность

По данным Министерства здравоохранения РФ (1999 г.) ежегодно в России выполняется порядка 7,5-8 тысяч энуклеаций глаз, из которых до 80,6% приходится на посттравматическую субатрофию [3]. Между тем энуклеация глаза для больных, особенно женщин и детей, является тяжелой психической травмой; функциональные же результаты протезирования при анофтальме уступают таковым при протезировании субатрофичных глаз [2,1,4].

Как известно, одним из ведущих патогенетических механизмов субатрофии является вялотекущий воспалительный процесс иммунного генеза в травмированном глазу. Повреждение гематофтальмического барьера приводит к развитию аутоиммунного воспалительного процесса, связанного с запуском клеточного и гуморального ответа на ткани глаза. Главная роль в патогенезе формирования аутоагрессии принадлежит накоплению пула сенсibilизированных лимфоцитов по отношению к тканеспецифическим антигенам глаза (роговицы, хрусталика и сетчатки) и, как следствие, развитие цитотоксических клеточных реакций и гуморального ответа в результате синтеза антигенспецифических антител. Хирургическое вмешательство, как повторная травма, может явиться фактором рецидива иммунного воспаления, в самом тяжелом случае приводящего к развитию симпатической офтальмии. Поэтому оперативное лечение последствий травмы органа зрения необходимо проводить в периоде ремиссии на наиболее благоприятном иммунологическом фоне, исключая наличие цитотоксических процессов в организме и при отсутствии гуморальных реакций. В этой связи представляется важным не только определение гуморального и клеточного ответа к тканеспецифическим анти-

генам глаза, но и оценка общих параметров иммунного статуса пациента для исключения риска развития аутоиммунного процесса.

Цель исследования

Изучение особенностей иммунного статуса пациентов с диагнозом посттравматической субатрофии глазного яблока.

Материалы и методы

Исследования проводились 26 пациентам с посттравматической субатрофией глазного яблока, у которых увеит протекал, преимущественно, в хронической вялотекущей форме. Возраст пациентов составил от 5 до 61 года, из которых до 40 лет было 21 пациент, детей – 3. Сроки после травмы составили от 3 до 24 лет. Развитию субатрофии глаза предшествовали проникающие ранения: корнеосклеральной локализации у 12 пациентов, склеральной – у 8, роговичной – у 6. Полностью зрение отсутствовало у 15 пациентов, у 7 определялась неправильная светопроекция и у 3 – правильная светопроекция.

Взятие крови осуществляли строго натошак из локтевой вены в строго стерильных условиях. Для иммунологического исследования отбиралось 4 мл крови в пробирку VACUETTE-K₃EDTA для постановки общеклинического анализа крови и иммунофенотипирования лимфоцитов, 10 мл в пробирку VACUETTE-Lithium Heparin для постановки реакции фагоцитоза, НСТ-теста, оценки бласттрансформации лимфоцитов и в пробирку VACUETTE-Serum Clot Activator для определения количества сывороточных иммуноглобулинов, антигенспецифических антител, острофазных белков и цитокинов.

Общеклинические методы исследования проводились с использованием гематологичес-

кого анализатора AcTDiff2 (Beckman Coulter, США).

Имунофенотипирование лимфоцитов проводили с использованием панели моноклональных антител фирмы BeckmanCoulter и Caltag (США). Результаты учитывались на однолазерном проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США).

Клеточный ответ на митогены и тканеспецифические антигены глаза проводилась в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) по методу, описанному Gaines H. et al., 1996 [11]. Учет реакции также проводился на проточном цитофлуориметре через 3 суток культивирования клеток с митогенами. Наличие клеточного ответа учитывали по индексу стимуляции – отношению количества пролиферирующих лимфоцитов в исследуемых образцах к количеству клеток в контрольных культурах.

Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли по способности клеток поглощать частицы латекса (диаметр частицы 1,49 мкм).

Определение общей окислительно-восстановительной активности нейтрофилов проводили в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест). Кислородный взрыв оценивали в покоящихся нейтрофилах и в клетках, активированных зимозаном.

Уровни содержания сывороточных IgG, IgA и IgM определяли иммунохимическим методом с помощью биохимического анализатора SYNCHRON CX 5 PRO (Beckman Coulter).

Количественное содержание общего ИЛ-6 определяли в анализаторе ACCECS 2 (Beckman Coulter).

В качестве методов статистической обработки результатов были применены стандартные методы параметрической и непараметрической статистики с использованием программы STATISTICA 6.0. [8].

Результаты и обсуждение

В ходе проведенного обследования было выявлено, что общеклинические показатели анализа крови пациентов (количество лейкоцитов, параметры лейкоцитарной формулы, показатель СОЭ) не выходят за рамки общепринятых нормативов, принятых для России и Республики Башкортостан. Поэтому наибольший интерес для исследования представляло изучение показателей субпопуляционной структуры лимфоцитов, отражающей особенности иммунной системы для данной патологии. В данной работе оценивалось количество основных субпопуляций лимфоцитов, так и экспрессия мембранных активационных маркеров на этих клетках. Результаты расценивались нами как предварительные и сравнивались с нормативными иммунологическими показателями, принятыми для здоровых людей Поволжского и Уральского региона России, а также внутрилабораторными нормами ВЦГПХ (табл.1).

Как видно из таблицы, количество основных субпопуляций лимфоцитов (Т- и В-лимфоци-

Таблица 1. Показатели иммунофенотипирования лимфоцитов у пациентов с посттравматической субатрофией глазного яблока

| Показатель | Нормативные показатели, % | Показатели у пациентов, М±SD, % |
|--|----------------------------|---------------------------------|
| CD3+CD16-(Т-лимфоциты) | 53–82 | 72,4±6,52 |
| CD3+CD4+(Т-хелперы) | 35–55 | 39,9±9,23 |
| CD3+CD8+(Цитотоксические Т-лимфоциты) | 18–35 | 29,8±6,9 |
| Соотношение CD4+/CD8+(ИРК) | 1,4–2,3 | 1,45 |
| CD19+(В-лимфоциты) | 6–21 | 10,4±3,88 |
| CD3-CD16+CD56+(NK-клетки) | 9–23 | 15,2±5,1 |
| CD3-CD8+(активированные NK) | 1,5–6 | 6,8±2,83 |
| CD3+CD16+(ТНК-клетки) | 0–10 | 20,0±8,9 |
| CD4+CD25+(Рецептор ИЛ-2 на Т-лимфоцитах) | 7–17 | 10,8±4,91 |
| CD25+(суммарный) | 13–25 | 15,1±6,81 |
| CD4+HLA-DR+(активированные Т-лимфоциты) | 1–5 | 3,3±1,96 |
| HLA-DR+(суммарный) | 6–22 | 21,2±8,02 |
| CD38+8+ | 1–15 | 21,1±8,17 |
| CD5+19+ | Не более 1/3 от числа В-Лф | 3,9±2,26 |

ты) не выходило за пределы нормативных показателей. Соотношение количества активных Т-хелперов к содержанию числа цитотоксических лимфоцитов (CD⁻4⁺/CD8⁺, иммунорегуляторный коэффициент) не было нарушено. Признаков гиперэкспрессии активационных рецепторов, CD25⁺ и HLA-DR⁺ (основной маркер гистосовместимости II класса, показатель антиген-презентативного процесса) также не отмечалось. Активация Т-клеточного звена иммунитета, описанная рядом исследователей [10,5] характерна для развития острых увеальных процессов. Исследуемая нами группа включала в себя пациентов, имеющих длительный «стаж» заболевания (до 24 лет), патологический процесс у них перешел в вялотекущую форму.

Количество натуральных киллеров CD3–CD16⁺CD56⁺ также не выходило за пределы нормальных значений, однако обращает на себя внимание, что отмечалось увеличение популяции клеток с фенотипом CD3–CD8⁺, характерным для НК в их активированном состоянии. Активация НК является одним из основных признаков развития аутоагрессии [9]. Наиболее выраженной особенностью для исследуемой группы явилось высокое количество CD3-позитивных клеток (Т-лимфоциты) с одновременной рецепцией CD16⁺, являющегося «профессиональным» маркером натурального киллера. В последние годы многими исследователями этой уникальной группе клеток уделяется большое внимание в плане оценки риска развития аутоиммунных заболеваний [12].

Также важным фактором развития аутоагрессии в организме является активация популяции цитотоксических лимфоцитов CD8⁺, несутая на мембранах рецептор CD38⁺ [7]. В нашей группе обследуемых этот показатель также превышал нормативные значения.

Что касается экспрессии рецептора CD5⁺ на В-лимфоцитах, являющимся показателем аутоантителообразования – в данной группе обследуемых был получен большой разброс данных. Необходимо отметить, что оценка этого показателя является очень важной для каждого конкретного клинического случая и должна проводиться в сочетании с анализом других иммунологических показателей.

Анализ митогенного ответа лимфоцитов на Т– и В-клеточные стимуляторы (PHA, ConA и PWM) не выявил отличий от показателей здо-

ровых людей. Этот вид исследования считается важным в рамках исключения иммунодефицитных состояний [13] и, возможно, не является показательным для пациентов с посттравматической субатрофией глаза.

Оценка функциональных показателей нейтрофильного звена является обязательным требованием для оценки неспецифического звена иммунитета. Нарушения фагоцитоза и формирования свободно-радикальных процессов в этих клетках являются причинами развития многих иммунопатологических состояний. В частности усиление эффекта кислородного взрыва в этих клетках может осуществлять цитотоксическое действие на клетки и ткани организма, что является одной из причин развития аутоиммунного процесса [6]. В обследуемой группе показатели фагоцитарной активности нейтрофилов соответствовали нормальным значениям. Однако, оценка оксидативных показателей в этих клетках, оцениваемая в НСТ-тесте, выявила их высокую вариабельность. Разброс данных составил от 1 до 26% (при норме 1 – 9%). Этот факт также свидетельствует о необходимости индивидуального подхода к назначению оперативного вмешательства, проведению предоперационного лечения.

Также высокий коэффициент вариабельности (CV=67,8) был получен для определения показателя воспалительного процесса в сыворотке крови – уровня ИЛ-6. Разброс данных составил от 0,51 до 9,19 Пкг/мл (норма 1 – 4,5 Пкг/мл). Содержание сывороточных иммуноглобулинов IgG, IgA и IgM в обследуемой группе соответствовало нормальным значениям.

Заключение

Таким образом, исходя из вышеизложенных особенностей иммунного статуса пациентов с посттравматической субатрофией глаза, а именно, увеличением количества лимфоцитов цитотоксического ряда, повышенной экспрессией активационных рецепторов на этих клетках, усилением свободно-радикальных процессов в нейтрофилах, – следует строго индивидуально подходить к хирургическому лечению этих пациентов, учитывать иммунологические факторы риска возникновения симпатической офтальмии. Результаты послеоперационных исследований иммунного статуса и методы иммуннокоррекции у пациентов с посттравматической субатрофией глаза будут опубликованы в последующих работах.

11.02.2013

Список литературы:

1. Вериге Е.Н. Патогенез, клиника, профилактика и лечение посттравматической субатрофии глаза. – Авторефер. дис...докт. мед.наук. -М.,1986. -46с.
2. Галимова Л.Ф., Мулдашев Э.Р., Муслимов С.А., Сибиряк С.В., Рыжов В.А. Косметические результаты хирургического лечения посттравматической субатрофии глазного яблока с применением биоматериалов Аллоплант и с последующим протезированием// Вестник офтальмологии. – 2000. – Т. 116. – N 6. – С. 28-31
3. Давыдов Д.В. Медико-биологические аспекты комплексного использования биоматериалов у пациентов с анофтальмом.// Автореф. дисс. ...доктора мед. наук. – М.-2000-46с.
4. Друянова Ю.С., Вериге Е.Н., Беглярбекян Е.Н. О протезировании субатрофичных и атрофичных глаз//Вестн.офтальмологии.-1981.-N4.-С.62-64
5. Ермакова Н.А. Общие представления о патогенезе увеитов//Российский медицинский журнал.-2003. -№4. -С.141
6. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии. Санкт-Петербург, «Интермедика», 2002. – 600 с.
7. Луговская С.А. Почтарь М.Е., Тупицын Н.Н. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов. М., 2005. – 166с.
8. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ STATISTICA. М.: Меди-аСфера, 2002. – 312с.
9. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. Цитометрический анализ в клинической иммунологии. Екатеринбург, 2011. – 221с.
10. Chan C.C., Mochizuki M., Palestine J. Kinetics of T-lymphocyte subsets in the eyes of Lewis rats with experimental autoimmune uveitis. // Cell immunology – 1985. – Vol. 96. – P. 430 – 434
11. Gaines H, Andersson L, Biberfeld G. A new method measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry//J. Immun. Methods, 1996, 195, P.63-72
12. Mercer J.C., Ragin M.J., August A., Natural killer T cells: rapid responders controlling immunity and disease, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2005,37: 1337–1343.
13. Stites D.P. Clinical laboratory methods for detection of cellular immunity // Basic and clinical immunology / Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. – Norwalk, Connecticut: Appleton and Lange, 1994.

Сведения об авторах:

Галимова Лилия Фуатовна, кандидат медицинских наук, офтальмохирург высшей категории, заведующая хирургическим отделением №2

Курчатова Нэлли Наилевна, кандидат биологических наук, заведующая клинико-иммунологической лабораторией

Степанов Михаил Владимирович, биолог КДЛ

Юсупова Рина Шаидовна, кандидат биологических наук, врач-лаборант

Усманова Алина Фларитовна, врач

UDC 617.7

Galimova L.F., Kurchatova N.N., Stepanov M.V., Yusupova R.Sh., Usmanova A.F.

E-mail: morphoplant@mail.ru

EVALUATION OF THE GENERAL IMMUNE STATUS AT PATIENTS WITH POST-TRAUMATIC EYE SUBATROPHY

In this report there are represented the results of the immunological examination of patients suffering from post-traumatic eyeball subatrophy. There were revealed the most characteristic peculiarities of the immune status of the patients such as increase of the number of immuno-component cells resulting in the start of the auto-aggressive changes in the organism.

Key words: post-traumatic subatrophy, uveitis, enucleation, immune system, lymphocytes, activation receptors, cytotoxicity, autoantibody formation, monoclonal antibodies, free-radical processes.

Bibliography:

1. Verigo E.N. Pathogenesis, clinic, prophylaxis and treatment of the eyeball post-traumatic subatrophy. – Author's abstract ... doc. of medical sciences. – M. 1986. – 46p.
2. Galimova L.F., Muldashev E.R., Muslimov S.A., Sibiriyak S.V., Ryzhov V.A. Cosmetic results of the surgical treatment of the eyeball post-traumatic subatrophy with the use of alloplant biomaterials and subsequent prosthetics // Journal of ophthalmology. – 2000. – V.116. – N. 6. – P. 28-31.
3. Davydov D.V. Medical and biological aspects of the alloplant biomaterial complex usage in anophthalmic patients // Author's abstract ... doc. of medical sciences. – M. 2000. – 46 p.
4. Друянова Ю.С., Вериге Е.Н., Беглярбекян Е.Н. Протезирование субатрофичных и атрофичных глаз // Журнал офтальмологии. – 1981. – N. 4. -P.62-64.
5. Ermakova N.A. General concepts about uveitis pathogenesis. // Russian medical journal. – 2003. – N.4. – P.141.
6. Karpishchenko A.I. Medical laboratory technologies. Saint-Petersburg, «Intermedica», 2002. – 600 p.
7. Lugovskaya S.A., Pochtar M.E., Tupytsin N.N. Immunophenotyping in hemoblastosis diagnostics. M., 2005. – 166 p.
8. Rebrova O.Yu. Statistical analyses of medical data. Use of the Statistica applied programmes. M.: MediaSpera, 2002. – 312 p.
9. Khaidukov S.V., Zurochka A.V., Chereshnev V.A. Cytometric analyses in clinical immunology. Ekaterinburg, 2011 – 221 p.
10. Chan C.C., Mochizuki M., Palestine J. Kinetics of T-lymphocyte subsets in the eyes of Lewis rats with experimental autoimmune uveitis. // Cell immunology – 1985. – Vol. 96. – P. 430 – 434.
11. Gaines H, Andersson L, Biberfeld G. A new method measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry//J. Immun. Methods, 1996, 195: 63-72.
12. Mercer J.C., Ragin M.J., August A., Natural killer T cells: rapid responders controlling immunity and disease, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2005,37: 1337–1343.
13. Stites D.P. Clinical laboratory methods for detection of cellular immunity // Basic and clinical immunology / Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. – Norwalk, Connecticut: Appleton and Lange, 1994.