

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СОГЛАСОВАНО

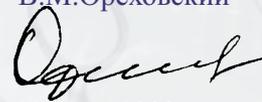
Заместитель начальника
Главного управления кадровой политики,
учебных заведений и науки Н.И. Доста



18 мая 1999 г.

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель
министра здравоохранения
В.М.Ореховский



18 мая 1999 г.

Регистрационный № 139-9812

ДИАГНОСТИКА НАРУШЕНИЙ СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Витебск 1999

Учреждение-разработчик: Витебский филиал научно-исследовательского клинического института радиационной медицины и эндокринологии

Автор: канд. мед. наук В.Н. Матвеевко

Рецензенты: д-р мед. наук, проф. Д.К. Новиков, д-р мед. наук Э.А. Доценко, д-р мед. наук, проф. Л.П. Титов, канд. биол. наук Н.А. Кузовкова

Методические рекомендации рассчитаны на врачей-иммунологов, эпидемиологов, терапевтов, гематологов, врачей, занимающихся диспансеризацией пострадавшего от аварии на ЧАЭС населения и др.

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
ЭТАПНОСТЬ ОБСЛЕДОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ИММУНОПАТОЛОГИИ	13
КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ	17
КЛАССИФИКАЦИЯ СПЕЦИАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА	20
Т-клеточная система иммунитета	21
В-клеточная система иммунитета	21
Система фагоцитов (нейтрофилов)	22
КАРТА ЛАБОРАТОРНОЙ ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА	23
ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА	26
Выбор биологического материала для исследования	27
Выделение мононуклеаров периферической крови	29
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК	30
Интерпретация результатов иммунофенотипирования лимфоцитов	32
Исследование цитокинового звена иммунитета	33
Индукция синтеза цитокинов	33
Методы определения цитокинов	33

ВВЕДЕНИЕ

Иммунная система, как и система кроветворения, высокочувствительна к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды (Sunders C.L. et al., 1983; Зубрихина Г.Н. и др., 1994). При обследовании около 1,5 тыс. людей, перенесших атомную бомбардировку в Хиросиме, были найдены изменения в числе лимфоцитов крови, принадлежащих к Т-клеточным субпопуляциям, CD19-позитивных В-клеток и CD16-позитивных НК-лимфоцитов (Kusunoki J et al., 1988). С увеличением возраста пострадавших эти изменения не только не исчезали, но все более нарастали.

Данные об изменениях в состоянии иммунной системы у лиц, участвовавших в ликвидации последствий аварии (ЛПА) на ЧАЭС и подвергшихся облучению в дозах 0,2–0,5 Гр разноречивы (Лютых В.П. и Долгих А.П., 1997). В литературе часто отсутствуют сведения о дозовых нагрузках. Наиболее часто выявляемые иммунологические изменения при воздействии доз до 0,2 Гр представляют собой дисбаланс субпопуляционного состава Т-лимфоцитов и супрессию гуморального звена иммунитета у 1/3 наблюдаемого контингента (Орадовская Н.В., 1992).

Проведенное нами иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови (Матвеевко В.Н. и др., 1997) у 133 участников ЛПА на ЧАЭС показало статистически значимое уменьшение по сравнению с показателями контрольной группы общего числа Т-лимфоцитов. Значительно снижалось число Т-супрессорных клеток. Как известно, уменьшение числа и активности Т-супрессоров предрасполагает к развитию аутоиммунных заболеваний и ослаблению функции иммунологического надзора в виде распознавания и элиминации дефектных и опухолетрансформированных клеток.

Наиболее заметным изменением в субпопуляционном составе лимфоцитов участников ЛПА было уменьшение в 2–3 раза числа В-лимфоцитов (CD19, CD20, CD22-антигенэкспрессирующие клетки), ответственных за синтез антител и гуморальное звено иммунитета в целом, что совпадало с обнаруженным другими авторами снижением уровня основных классов иммуноглобулинов (Касьянов А.Д., Морозов В.Т., 1991).

В связи с уменьшением числа Т- и, особенно, В-лимфоцитов нами не найдено удвоение количества ни Т-, ни В-лимфоцитов (так называемые, нуль-клетки). Это может быть признаком поступления в циркуляцию менее зрелых, менее дифференцированных лимфоцитов. Ослабление способности иммунной системы к адекватной стимуляции может отражать и уменьшение почти в 2 раза числа клеток, имеющих рецепторы к интерлейкину-2, и в 1,5 раза клеток, экспрессирующих антигены главного комплекса гистосовместимости второго класса, которые обычно присутствуют на В-клетках и появляются на Т-клетках при их активации. Вместе с тем, в периферической крови участников ЛПА возрастает экспрессия на лимфоцитах антигена CD95, который является участником клеточного апоптоза, предвестником запрограммированной смерти клетки.

У ликвидаторов аварии на ЧАЭС, страдающих хроническим гепатитом В, нами найдено еще более резкое снижение Т-лимфоцитов, особенно Т-хелперов (Matveenko V.N., Kalinin A.L., 1997, 1998).

При дозах облучения 0,2–0,5 Гр в течение года или при хроническом воздействии за 10 лет с мощностью дозы 0,05–0,15 Гр/год возникают изменения в иммунном статусе, которые характеризуются как иммунологическая недостаточность. При больших дозах и продолжительности воздействия ионизирующего излучения отклонения в клеточном и гуморальном звеньях иммунитета описываются как иммунодефицитные. Тем не менее, отчетливой зависимости изменений отдельных показателей иммунной системы от дозы облучения в исследуемом диапазоне, по имеющимся данным, выявить не удастся.

Клинико-гематологическое обследование 1365 человек, работавших вахтовым методом в 10–30 км зоне ЧАЭС в течение 1–5 лет (дозы облучения 0,25–0,75 Гр) показало, что транзиторная лейкопения (ниже 4000 клеток в мкл) обнаружена у 7% обследованных, стойкая лейкопения выявлена у 2% (Отчет Всесоюзного научного центра радиационной медицины, Киев, 1990). Выявлены случаи уменьшения количества лимфоцитов и базофилов (Чекалина С.И. и соавт., 1995). При индивидуальных дозах от 0,02 до 0,37 Гр большая часть гематологических показателей у обследованных участников ликвидации последствий аварии на ЧАЭС через 2–3 года нормализовалась (Любченко П.Н. и соавт., 1991). Таким образом, можно предположить, что малые дозы ионизирующего излучения (0,1–0,3 Гр в год) оказывают повреждающее действие на плюрипотентные клетки-предшественники гемопоэза, что выражается в неустойчивой картине периферической крови.

Проведенное нами клиническое обследование 1206 (1050 мужчин и 156 женщин) участников ЛПА на ЧАЭС первого года (с 26 апреля 1986 г. по 25 апреля 1987 г.) с использованием амбулаторных карт спецдиспансера Витебского филиала научно-исследовательского клинического института радиационной медицины и эндокринологии (ВФ НИКИ РМЭ) показало, что 49,0% мужчин и 68,6% женщин имели признаки иммунологического дисбаланса (см. табл. 1). Причем большая часть из них (32,3% мужчин и 26,3% женщин) имела клинические признаки иммунодефицитного состояния в виде хронических инфекционно-воспалительных заболеваний: хронические обструктивные и необструктивные бронхиты, хронические фарингиты, ларингиты, риниты, синуситы, повторные ОРЗ, ОРВИ, пневмонии, хронические гепатиты В и С, хронические неспецифические заболевания мочевыводящих путей и др.

Группы риска по иммунологическому дисбалансу среди ликвидаторов аварии на ЧАЭС (первого года)

Пол	Возраст в момент аварии (лет)						Всего	
	Средний (45–60) (1926–1940 г.р.)		Зрелый (30–44) (1941–1955 г.р.)		Молодой (18–29) (1956–1968 г.р.)			
Без клинических признаков иммунологического дисбаланса								
Муж.	48/124	38,7%	189/409	46,2%	298/517	57,6%	535/1050	51,0%
Жен.	14/35	40,0%	15/55	27,3%	20/66	30,3%	49/156	31,4%
С клиническими признаками иммунологического дисбаланса								
Муж.	76/124	61,3%	220/409	53,8%	219/517	42,4%	515/1050	49,0%
Жен.	21/35	60,0%	40/55	72,7%	46/66	69,7%	107/156	68,6%
<i>1. С клиническими признаками хронического инфекционно-воспалительного синдрома</i>								
Муж.	50/124	40,3%	142/409	34,7%	149/517	28,8%	339/1050	32,3%
Жен.	9/35	25,7%	17/55	30,9%	15/66	22,7%	41/156	26,3%
<i>2. С сочетанным хроническим инфекционно-воспалительным и аллергическим синдромом</i>								
Муж.	12/124	9,7%	38/409	9,3%	25/517	5,2%	77/1050	7,3%
Жен.	4/35	11,4%	9/55	16,4%	20/66	30,3%	33/156	21,6%
<i>3. С аллергическим синдромом</i>								
Муж.	3/124	2,4%	30/409	7,3%	40/517	7,7%	71/1050	6,8%
Жен.	5/35	14,3%	11/55	20,0%	7/66	10,6%	23/156	14,7%
<i>4. С аутоиммунным синдромом</i>								
Муж.	5/124	4,0%	11/409	2,7%	5/517	1,0%	21/1050	2,0%
Жен.	2/35	5,7%	5/55	9,1%	4/66	6,1%	11/156	7,0%
<i>5. С онкологическими заболеваниями</i>								
Муж.	4/124	3,2%	4/409	1,0%	2/517	0,4%	10/1050	1,0%
Жен.	1/35	2,9%	0/55	0,0%	0/66	0,0%	1/156	0,0%
<i>6. С лимфопролиферативными заболеваниями</i>								
Муж.	3/124	2,4%	3/409	0,7%	0/517	0,0%	6/1050	0,6%
Жен.	0/35	0,0%	0/55	0,0%	0/66	0,0%	0/156	0,0%

Примечания: 1. В числителе — число лиц с указанным видом иммунопатологии, в знаменателе — общее число обследованных, рядом процентное отношение. 2. У некоторых лиц встречались 2 и более синдромов, поэтому в сумме может быть более 100%.

Из-за своей многочисленности была выделена группа ликвидаторов, у которых наряду с хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями были эпизоды аллергических реакций и хронические аллергические заболевания (7,3% мужчин и 21,6% женщин). Аллергические реакции и заболевания без инфекционно-воспалительного фона были выявлены у 6,8% мужчин и 14,7% женщин. Аутоиммунные заболевания за 12 лет после аварии развились у 2,0% мужчин (21) и 7,0% женщин (11). Злокачественные онкозаболевания выявлены у 1,0% мужчин (10) и 0,6% женщин (1). Лимфо- и миелопролиферативные заболевания выявлены у 0,6% обследованных (6 мужчин).

Несмотря на относительную малочисленность женщин среди обследованных (в 7 раз меньше, чем мужчин), отчетливо прослеживаются некоторые особенности. Среди женщин на 20% больше лиц с признаками иммунологического дисбаланса за счет, главным образом, того, что среди них в 2 раза больше лиц с аллергическим статусом, в 3 раза больше лиц со смешанным иммунодефицитным аллергическим статусом и с выявленными аутоиммунными заболеваниями.

Кроме перечисленных, нами выявлены и некоторые возрастные особенности. Все ликвидаторы были распределены на 3 возрастные группы по возрасту в 1986 г., на момент аварии, 18–29, 30–44, 45–59 лет, (соответственно в 1998 г., на момент исследования, им было 30–41, 42–56, 57–71). Среди мужчин лица с клиническими признаками иммунологического дисбаланса составили в младшей возрастной группе 42,4%, средней — 53,8%, старшей — 61,3%, что соответствовало росту заболеваемости хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями у мужчин с возрастом. У женщин такой закономерности выявить не удалось, причем, напротив, отмечался рост сочетанных инфекционно-воспалительных аллергических состояний в младшей возрастной группе.

В связи с изложенным, постоянный контроль за состоянием иммунной системы у людей, подвергшихся радиационному воздействию аварии на ЧАЭС, и их потомства необходим и важен для оценки состояния их здоровья, прогнозирования возможного развития патологических процессов и должен предшествовать выбору адекватных методов иммунокоррекции.

С.А. Кетлинский и Н.М. Калинина (1998) считают, что основную роль в коррекции вторичных иммунодефицитных состояний могут сыграть эндогенные иммуномодуляторы (ИМ) организма человека, которые представляют собой олигопептиды, обладающие свойством усиливать пролиферацию и функцию иммунокомпетентных и аксессуарных клеток и их предшественников в костном мозге, в результате чего активируется и врожденный, и приобретенный иммунитет. Эндогенные иммуномодуляторы включают интерлейкины (ИЛ), рецепторные ИЛ (РАИЛ), интерфероны (ИФН), колониестимулирующие факторы (КСФ), факторы некроза опухолей (ФНО), хемокины, тимозины- α , β , γ и, возможно, другие.

Большинство из ИМ синтезируется в клетках только в ответ на антигены и индукторы. Высокие уровни ИМ характерны для острых инфекционных, аутоиммунных и аллергических заболеваний. Низкие уровни ИМ отмечены при хронических инфекционных заболеваниях, иммунодепрессивных и предсептических состояниях, злокачественных опухолях. Поэтому при острых заболеваниях могут быть эффективны антагонисты иммуномодуляторов, при хронических заболеваниях с иммунодефицитным состоянием показана заместительная терапия. Однако надо помнить, что иммунотерапия может приводить не только к выздоровлению, но и к развитию рикошетных иммунопатологических состояний.

Выбор лечебных средств зависит от того, нарушение каких иммунокомпетентных клеток преобладает, что определяется в ходе исследования иммунного статуса. При нарушениях Т-клеточного звена можно использовать тактивин, тимоген, ИФН- γ , ИЛ-2, левамизол, циметидин, азимиксон, имутиол, изопреказин, тафтсин, бестатин, ОК-432. При дефекте макрофагального звена используют мурамилдипептид (МДП), ликолипид, лентинан, зимозан, аубзидан, пептолак, лактолен, ИФН- α , продигиозан, интерлок, БЦЖ. Недостаточность В-клеточного иммунитета компенсируется за счет активации Т-хелперов и макрофагов. При дефектах системы комплемента показано переливание плазмы.

При тяжелых вторичных иммунодефицитах, возникших в результате действия ионизирующего излучения и химиотерапии, эффективны средства стимуляции костного мозга: гранулоцитарно-макрофагальный или гранулоцитарный колониестимулирующие факторы (ГМ-КСФ, Г-КСФ), ИЛ-3.

Актуальность проблемы выявления иммунопатологических состояний для медицинской науки и практического здравоохранения Беларуси связана с проживанием в республике более 110 тыс. официально зарегистрированных ликвидаторов аварии на ЧАЭС, большинство из которых находится в репродуктивном возрасте и имеют детей, рожденных после аварии, либо могут их иметь. Кроме того, в республике имеется большая группа населения, отселенная с загрязненных радионуклидами территорий и более 2 млн человек, продолжающих проживать на территориях, в разной степени загрязненных долгоживущими радионуклидами.

Кроме того, в настоящее время, спустя 12 лет после аварии, несмотря на большое число иммунологических исследований, проведенных в послеаварийный период, до сих пор отсутствуют общепринятые представления об изменениях в иммунной системе. В первую очередь, это связано с отсутствием унифицированной программы обследования.

В основе патологии системы иммунитета лежит измененная иммунная реакция на антигены, которая вместо нормоэргической становится гипоэргической при иммунодефицитах, гиперэргической при аллергических и аутоиммунных (аутоаллергических) заболеваниях. Отдельной группой представлены заболевания с опухолевой трансформацией клеток системы крови и иммунитета — лейкозы и лимфомы.

Так как все другие заболевания могут рассматриваться как частные формы проявления указанных выше, то цель диагностики нарушений состояния иммунной системы может быть конкретизирована как выявление лиц:

- имеющих иммунодефицитное состояние (главным образом, вторичный иммунодефицит);
- склонных к аутоиммунным заболеваниям;
- имеющих проявления аллергических заболеваний;
- с лейкозами и лимфомами (лимфопролиферативными заболеваниями);
- с опухолями других локализаций.

ЭТАПНОСТЬ ОБСЛЕДОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ИММУНОПАТОЛОГИИ

Для выявления среди участников ЛПА на ЧАЭС групп риска по иммунологическому дисбалансу целесообразно использование алгоритма, описанного в книге Д.К. Новикова, В.И. Новиковой «Оценка иммунного статуса», Минск, 1996 (см. табл. 2).

Последовательность этапов диагностики иммунопатологических состояний
(Новиков Д.К., Новикова В.И., 1996)



Первый этап. Выяснение жалоб и сбор анамнеза. Например: при иммунодефицитах (ИД) в анамнезе рецидивирующие инфекции, специфическая локализация и характер которых могут указывать на вид ИД.

Второй этап. 2а. Клиническое обследование, включающее результаты осмотра больного с оценкой состояния кожных покровов и видимых слизистых оболочек. Важными признаками при ИД являются гнойные процессы, вирусные и грибковые поражения; при аллергических заболеваниях — сыпи, кожный зуд. Оценка состояния органов кроветворения и иммунитета включает лимфоузлы, миндалины, тимус, селезенку, периферическую кровь, костный мозг. Лимфаденопатия, гиперплазия миндалин, атрофия лимфоузлов, гепатомегалия, спленомегалия являются важнейшими признаками иммунопатологии.

2б. *Клинико-лабораторные исследования.* Включает анализ крови, мочи. Изменения в периферической крови могут быть характерными для инфекционно-воспалительных процессов (лейкоцитоз, сдвиг влево в структуре ядра нейтрофилов), хронического воспаления (лимфоцитоз), аллергии (эозинофилия), иммунодефициты (лимфопения), лейкоза (бласты в крови).

2в. *Инструментальное обследование.* Включает УЗИ, которое используется для определения размеров тимуса, селезенки, печени, внутригрудных и внутрибрюшных лимфоузлов; рентгенографию и эндоскопию внутренних органов, стерильную пункцию и трепанобиопсию, морфологическое исследование биоптатов лимфоидных и лимфоэпителиальных органов.

Третий этап. Этот этап предусматривает использование специальных методов иммунологического обследования, необходимых для уточнения вида иммунопатологии и диагноза, в конечном итоге.

При массовых обследованиях анамнестические данные обобщаются в специальных анкетах. По результатам анкетирования формируются первичные группы риска. Анкеты пациентов первичных групп риска анализируются врачом-иммунологом, который определяет необходимость применения специфических методов оценки иммунного статуса. Р.В. Петров и др. в 1981 г. предложили выявление иммунодефицитных состояний по тестам первого и второго уровня. К тестам первого уровня были отнесены определение общего количества лейкоцитов и лимфоцитов, количества Т-лимфоцитов методом Е-РОК и В-лимфоцитов методом М-РОК, определение иммуноглобулинов в сыворотке или плазме крови методом Манчини, оценка фагоцитоза нейтрофилами частиц латекса. К тестам второго уровня отнесены остальные более сложные иммунологические методы.

Это деление является условным и по мере оснащения иммунологических лабораторий начинают использоваться новые чувствительные методы, включая определение Т- и В-лимфоцитов и их субпопуляций методами проточной цитометрии после связывания клеток с моноклональными антителами, мечеными флуоресцентным красителем, определение цитокинового звена иммунитета и др. Эффективной признана система динамического наблюдения за иммунным статусом избранной популяции населения (иммунологический мониторинг) для оценки влияния неблагоприятных факторов внешней среды, которые могут вызывать вначале транзиторные, а затем стойкие иммуномодуляции, служащие основой развития иммунопатологии.

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

Ориентировочный клинический диагноз, современные представления об иммунопатогенезе соответствующего заболевания позволяют сузить объем иммунологических исследований и сделать поиск более целенаправленным (Тотолян А.А., Фрейдлин И.С., 1997). При рецидивирующих бактериальных инфекциях следует искать дефекты фагоцитирующих клеток или молекул, способствующих фагоцитозу (иммуноглобулины, компоненты системы комплемента). При вирусных и грибковых заболеваниях следует искать дефекты клеточного иммунитета: количества и функциональной активности Т-лимфоцитов, моноцитов/макрофагов, естественных киллеров.

При клинических признаках аллергии немедленного типа следует информативно выявлять в сыворотке антитела изотипа IgE, что позволяет уточнить диагноз, идентифицировать причинно-значимый аллерген, проконтролировать эффективность гипосенсибилизирующей терапии. У больных коллагенозами (ревматоидный артрит, системная красная волчанка) активность процесса наиболее четко отражается уровнем циркулирующих иммунных комплексов, который коррелирует с уровнем аутоантител и связан обратной зависимостью с уровнем комплемента в сыворотке.

Для конкретизации объема специальных иммунологических исследований мы рекомендуем использовать апробированный нами перечень клинических синдромов, предложенный Р.В. Петровым и др. в 1988 г.:

1. Инфекционный синдром (рецидивирующие, хронические, часто повторяющиеся инфекции):

- Гнойные поражения кожи и подкожной клетчатки.
- Грибковые поражения кожи, слизистых (кандидозы, микозы, рецидивирующие стоматиты).

Диагностика нарушений состояния иммунной системы

- Гнойные заболевания ЛОР-органов (отиты, синуситы, флегмонозные ангины, перитонзиллярные абсцессы).
- Заболевания бронхолегочной системы (пневмонии, бронхиты, бронхопневмонии).
- Воспалительные заболевания мочевыводящих путей.
- Рецидивирующие повторные лимфадениты, хронические тонзиллиты, лимфаденопатия.
- Гастроэнтеропатия с диареей и дисбактериозом.
- Гепатит, хроническое носительство HBs-антигена.
- Лихорадка неясной этиологии, длительный субфебрилитет.
- Частые ОРВИ (более 3–4 раз в году).
- Рецидивирующий герпес.

II. Аллергический синдром:

- Атопический дерматит, нейродермит, экзема в сочетании с повышенной чувствительностью к ОРВИ.
- Астматический бронхит, аллергические риниты, синуситы, бронхиальная астма, поллиноз, крапивница, отек Квинке.

III. Аутоиммунный синдром:

- Ревматоидный артрит.
- Дерматомиозит, склеродермия, системная красная волчанка.
- Системные васкулиты.
- Аутоиммунный агранулоцитоз, гемолитическая анемия, тромбоцитопения.
- Неспецифический язвенный колит.
- Аутоиммунный тиреоидит.
- Рассеянный склероз.
- Миастения.

IV. Лимфопролиферативный синдром:

- Острые и хронические лейкозы.
- Лимфогранулематоз, неходжкинские лимфомы.

V. Наследственная отягощенность (наличие в семье во всех поколениях):

- Установленные формы иммунодефицитных состояний.
- Повышенная частота злокачественных новообразований.
- Аутоиммунные заболевания.

Хронические инфекционные заболевания, часто рецидивирующие с неблагоприятным исходом.

КЛАССИФИКАЦИЯ СПЕЦИАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА

Получение моноклональных антител к различным CD-антигенам открыло дополнительные возможности для идентификации популяций и субпопуляций иммунокомпетентных клеток, что важно для диагностики миело- и лимфопролиферативных заболеваний, иммунодефицитов, контроля за качеством лечения. Экспрессия CD-антигенов на поверхности клеток, однако не отражает их функциональной активности. Поэтому все большее значение по мере совершенствования методов приобретает определение цитокинов, отражающих и регулирующих их функциональную активность и осуществляющих кооперацию между клетками.

С разработкой и внедрением этих новых методов оценка иммунного статуса по тестам 1-го и 2-го уровней, предложенная в 1981 г. Р.В. Петровым и др. и сыгравшая свою положительную роль, стала нуждаться в усовершенствовании. Современному состоянию развития иммунодиагностики наиболее соответствует подразделение всех методов на скрининговые и уточняющие (Кетлинский С.А. и Калинина Н.М., 1998). Первые используются для фиксирования нарушений в иммунной системе, вторые — для установления механизмов, задействованных в их реализации.

Т-клеточная система иммунитета

Скрининговые методы:

- определение общего числа лимфоцитов;
- определение процентного и абсолютного числа зрелых Т-лимфоцитов — CD3(+) и двух основных субпопуляций — хелперов CD4(+) и киллеров/супрессоров CD8(+), при этом предлагается учитывать количество их менее зрелых предшественников: «двойных негативов» — CD3(+) CD4(-) CD8(-) и «двойных позитивов» — CD3(+) CD4(+) CD8(+);
- исследование ответа Т-лимфоцитов на ФГА в реакции бластной трансформации (РБТЛ).

Уточняющие методы:

- определение «активационных маркеров» CD25 и HLA-DR на Т-лимфоцитах;
- исследование продукции цитокинов: гамма-интерферона, ИЛ-2, 4, фактора некроза опухоли, ИЛ-6 in vivo и in vitro;
- изучение пролиферативного ответа в РБТЛ на специфический антиген;
- изучение процессов апоптоза Т-лимфоцитов методом определения CD95.

В-клеточная система иммунитета

Скрининговые методы:

- определение процента и абсолютного количества В-лимфоцитов — CD20(+) или CD19(+);
- определение уровней неспецифических иммуноглобулинов А, М, G, Е в сыворотке крови;
- определение циркулирующих в крови иммунных комплексов;
- исследование ответа в РБТЛ на В-клеточный митоген.

Уточняющие методы:

- определение специфических иммуноглобулинов А, М, G, Е в сыворотке крови;

Диагностика нарушений состояния иммунной системы

- определение продукции ИЛ-6 in vivo и in vitro;
- определение секреторного иммуноглобулина А.

Система фагоцитов (нейтрофилов)

Скрининговые методы:

- оценка абсолютного числа нейтрофилов;
- исследование интенсивности поглощения микробов фагоцитами (процент клеток-фагоцитов и средняя способность к поглощению каждого фагоцита);
- бактерицидность фагоцитов по НСТ-тесту.

Уточняющие методы:

- интенсивность хемотаксиса (миграции) фагоцитов;
- исследование адгезионной способности нейтрофилов к пластику и оценка числа клеток с адгезионными молекулами CD11/CD18 на мембране.

Результаты лабораторной оценки иммунного статуса с использованием скрининговых и уточняющих методов исследования иммунитета могут быть представлены в виде карты.

КАРТА ЛАБОРАТОРНОЙ ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА

Фамилия, имя, отчество _____

Возраст _____ Пол _____

Диагноз при направлении на обследование _____

1. Клинический анализ крови:

Лейкоциты, тыс./мкл _____ (N 4–9,5)

Лимфоциты, тыс./мкл _____ (N 1,6–2,4)

Лимфоциты, % _____ (N 18–38)

Нейтрофилы, % _____ (N 50–77)

Моноциты, % _____ (N 2–10)

Эозинофилы, % _____ (N 1–4)

Базофилы, % _____ (N 0,5–1)

Эритроциты, млн/мкл _____ (N жен-4,0–5,0; муж-4,7–6,7)

Гемоглобин, г/л _____ (N жен-120–140; муж-130–160)

Тромбоциты, тыс./мкл _____ (N 180–320)

Исследование крови на HBs-антиген _____

3. Функциональная активность лимфоцитов

	ФГА	PWM
РБТЛ (индекс стимуляции)	N 20–100	N 5–20

4. Параметры цитокинового звена иммунитета

	Продукция цитокинов		
	Спонтанная	Индуцированная	В сыворотке крови
1. ИФН- α (пг/мл)	N 30–50	N 1000–5000	N 0–50
2. ИЛ-1 β (пг/мл)	N 30–50	N 1000–5000	N 0–50
3. ИЛ-2 (ед/мл)	N 0–0,5	N 10–25	
4. ИЛ-4 (пг/мл)	N 30–50	N 1000–5000	N 0–50
5. Ил-6 (ед./мл)	N 30–50	N 1000–3000	N 0–50
6. ИЛ-8 (пг/мл)	N 30–100	N 1000–5000	N 0–50
7. ФНО- α	N 30–50	N 500–3000	N 0–50

5. Параметры гуморального звена иммунитета

Имуноглобулины сыворотки	
IgM (г/л)	N 0,5–1,9
IgG (г/л)	N 8,0–16,0
IgA (г/л)	N 1,4–4,2
IgE (КЕ/л)	N 20–100

6. Циркулирующие иммунные комплексы

ЦИК сыворотки (усл. ед.)	N 20–80
--------------------------	---------

7. Система комплемента

	Содержание компонентов комплемента в сыворотке (мг/л)
C1q	N 100–250
C3	N 700–1800
C3a	N 0,05–0,15
C4	N 200–500
C5a	N 0,01–0,03
C1 ингибитор	N 150–350

8. Система нейтрофильных гранулоцитов

	Спонтанная	Индукцированная	Индекс стимуляции
Бактерицидность (НСТ-тест, ед./млн клеток)	N 70–120	N 150–200	N 1,2–2
Адгезия (%)	N 40–55	N 70–80	
Фагоцитоз (%)	N 48–88		
Индекс фагоцитоза	N 1,3–3		
Миграция (индексы миграции)		FMLP N 2,6–2,8	ИЛ-8 N 1,7–3

ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА

Для фенотипической характеристики иммунокомпетентных клеток (ИКК) используются методы проточной цитометрии и иммунофлуоресцентной микроскопии. Для оценки функциональной активности ИКК используются реакция бласттрансформации лимфоцитов в ответ на стандартные митогены, спонтанная и индуцированная продукция цитокинов в культуре клеток цельной крови, для определения цитотоксической активности естественных киллеров — цитотоксический тест с использованием стандартных клеток-мишеней, для определения фагоцитарной активности гранулоцитов, моноцитов/макрофагов — фагоцитоз тест-объектов.

Для выявления в различных биологических материалах иммуноглобулинов разных изотипов, специфических антител и аутоантител используются методы иммунодиффузии, турбидиметрии, нефелометрии, агглютинации, иммуноферментный анализ, иммуно-электрофорез, радиоиммунный анализ; для определения цитокинов используется биологическое тестирование и иммуноферментный анализ. Активность системы комплемента выявляется гемолитическим тестом (СН50), концентрация компонентов комплемента и циркулирующих иммунных комплексов — методами турбидиметрии и нефелометрии, а депозиты ЦИК в тканях — иммунофлуоресцентным методом.

Мы не ставим своей задачей подробное описание перечисленных здесь методов и отсылаем читателей к соответствующим руководствам. А в настоящей работе остановимся лишь на наиболее современных методах определения цитокинов и иммунофенотипирования ИКК проточной цитометрией, так как в большинстве областных центров республики имеются проточные цитометры, на которых можно выполнить заключительный этап исследования, а предварительный этап — окраску выделенных лимфоцитов или лимфоцитов цельной крови специфическими флуоресцирующими моноклональными антителами доступно выполнить в любой иммунологической лаборатории.

Выбор биологического материала для исследования

Иммунная система едина и имеет свои представительства в различных органах и тканях, получая ИКК через кровь. Однако отдельные органы отделены от кровотока гистогематическими барьерами (гематоэнцефалический, гематотестикулярный и др.), что обеспечивает их некоторую обособленность. К тому же местно в очаге воспаления ИКК активируются, приобретают другие рецепторы и антигены по сравнению с клетками циркулирующей крови.

Поэтому при заболеваниях нервной системы (рассеянный склероз, воспалительные полирадикулонейропатии, менингиты) целесообразно исследовать спинномозговую жидкость; при заболеваниях верхних дыхательных путей (ОРЗ, риниты, ларингиты, фарингиты, заболевания полости рта) — назальный смыв, ларингеальный секрет, слюну; при заболеваниях бронхов и легких (хронический обструктивный и необструктивный бронхит, фиброз легкого, саркоидоз, бронхиальная астма) — бронхоальвеолярную жидкость; при заболеваниях мочеполовой системы (инфекции мочевыводящих путей, хронический простатит, бесплодие, амилоидоз, моноклональные гаммапатии) — мочу, эякулят, вагинальный секрет; при заболеваниях суставов (ревматоидный артрит, псориатический артрит) — синовиальную жидкость. При необходимости требуется исследование биоптатов тканей органов, лимфатических узлов, костного мозга, кожи, жидкостей других замкнутых пространств: лимфы, перитонеальной или плевральной; других экстравазкулярных секретов: секретов желудочно-кишечного тракта, молочной железы, а также пота, слезной жидкости.

Иммунологический анализ перечисленных биологических материалов предполагает обязательное параллельное измерение аналогичных иммунологических показателей крови.

Выделение мононуклеаров периферической крови

Мононуклеары выделяют из гепаринизированной крови (20 МЕ/мл), которую разводят в два раза изотоничным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) pH 7,2. Выделение клеток проводят центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографин с плотностью 1,077. Смесь фиколл-верографин можно приготовить смешав 12 частей 9% раствора фиколла (фиколл растворять на водяной бане при 60–70°C) и 5 частей 34% раствора верографина (к 20 мл ампульного лекарственного препарата верографина добавить 22 мл дистиллированной воды). В продаже имеются готовые к использованию сепарационные системы типа Ficoll-Pack (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция) или «LeucoPREP» (Becton Dickinson, США). 8 мл разведенной крови наслаивают на 3 мл сепарационной среды и центрифугируют 30 мин при 400 g. Образовавшееся в интерфазе кольцо мононуклеаров снимают пипеткой, полученную клеточную взвесь трижды отмывают ФСБ и доводят концентрацию до 2 млн клеток/мл. Для приготовления фосфатно-солевого буфера 7,52 г K_2HPO_4 , 1,32 г $NaH_2PO_4 \times H_2O$, 7,2 г NaCl, 1 г NaN_3 довести до 1 л дистиллированной водой, хранить при 2–8°C. Жизнеспособность клеток определяют методом окрашивания 0,06% трипановым синим (число окрашенных, погибших клеток не должно превышать 5–10%).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК

В выделенных моноклеарах непрямой одноцветным методом

40–50 мкл суспензии моноклеаров инкубируют с 20 мкл неконъюгированных моноклональных антител к соответствующим CD-антигенам 30–45 мин при 2–4°C. Клетки отмывают дважды от несвязавшихся антител ФСБ с центрифугированием при 1500 об./мин в течение 10 мин. К отмывтым клеткам добавляют по 20 мкл конъюгированных с ФИТЦ или ФЭ антимышиных Fab (антигенсвязывающих фрагментов) и инкубируют 30–45 мин при 2–4°C в темноте. Клетки отмывают дважды от несвязавшихся вторых антител, фиксируют добавлением 500 мкл 1% раствора параформальдегида в ФСБ при тщательном перемешивании. (Фиксатор клеток готовят растворением параформальдегида в свежеприготовленном ФСБ при осторожном нагревании до 56°C под тягой. Довести до pH $7,4 \pm 0,2$ 0,1н NaOH или 0,1 н HCl, хранить при 2–8°C). Пробирки закрывают и хранят при 2–8°C в темноте до проточно-цитометрического анализа. Следует проанализировать клетки в течение 24 ч после окраски и фиксирования. В качестве отрицательного контроля используют неспецифическое связывание меченых антимышиных Fab к лимфоцитам человека без предварительной инкубации со специфическими моноклональными антителами.

В выделенных мононуклеарах прямым одноцветным методом

Для определения субпопуляций лимфоцитов 40–50 мкл суспензии мононуклеаров, полученных вышеописанным методом, инкубируют с 10 мкл ФИТЦ (флюоресцеин-изотиоцианат) или ФЭ (фикоэритрин) — конъюгированных моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD20, CD25, HLA-DR, CD95 и другим антигенам — 30–45 мин при 2–4°C в темноте. Затем клетки отмывают дважды от несвязавшихся антител ФСБ с центрифугированием при 1500 об./мин в течение 10 мин. Мононуклеары фиксируют добавлением 500 мкл 1% раствора параформальдегида в ФСБ при тщательном перемешивании. Пробирки закрывают и хранят до проточно-цитометрического анализа, как описано выше. В качестве отрицательного контроля неспецифического связывания используют соответствующие ФИТЦ или ФЭ-конъюгированные IgG1, IgG2a мыши.

В выделенных мононуклеарах методом прямой двуцветной иммуофлуоресценции

Клетки суспензии окрашивают вначале ФИТС-конъюгированным моноклональным антителом к соответствующему CD-антигену, затем отмывают ФСБ; после чего окрашивают ФЭ-конъюгированным моноклональным антителом к другому CD-антигену, отмывают ФСБ и фиксируют добавлением 500 мкл 1% раствора параформальдегида в ФСБ.

В цельной крови прямым одноцветным методом

100 мкл цельной гепаринизированной венозной крови (20 МЕ/мл) инкубируют с 10 мкл ФИТЦ или ФЭ-конъюгированных моноклональных антител к соответствующим CD-антигенам 30–45 мин при 2–4°C в темноте. Клетки отмывают дважды от несвязавшихся антител ФСП с центрифугированием при 1500 об./мин в течение 10 мин. Лизирование эритроцитов производят добавлением 2 мл FACS-лизирующего раствора с перемешиванием и инкубацией 10–12 мин (не более) в темноте при комнатной температуре (20–25°C). Лизирующий раствор можно приготовить, растворив 8,28 г NH₄Cl, 1,0 г KHCO₃, 0,037 г EDTA-Na в дистиллированной воде до 1 л, pH 7,3. Перед употреблением развести указанный раствор в 10 раз. После инкубации клетки осаждают центрифугированием при 1500 об./мин в течение 10 мин и затем отмывают один раз, добавив 2 мл ФСБ. Фиксацию клеток осуществляют, как описано выше.

Интерпретация результатов иммунофенотипирования лимфоцитов

С учетом абсолютного и относительного числа разных субпопуляций лимфоцитов можно ориентировочно судить о Т-клеточном иммунодефиците (снижение CD4/CD8, CD3-, CD4-, CD25- антигенэкспрессирующих клеток). На активацию иммунной системы указывает повышение экспрессии CD25- и HLA-DR-антигенов, на переключение иммунного ответа с Т×1 на Т×2 — снижение Т-лимфоцитов и увеличение В-лимфоцитов. На наличие аутоиммунного компонента указывают повышение CD4/CD8, вследствие миграции CD8 + -клеток в орган-мишень, повышение CD16 + естественных киллеров (ЕК), появление двойных позитивных CD4(+) CD8(+)-клеток. В норме сумма Т-клеток, В-клеток и ЕК примерно равна 100%. Большое количество «нуль»-клеток указывает на тяжесть патологического процесса, в результате которого происходит сбрасывание антигенов, рецепторов или на их связывание с аутоантителами и другими молекулами.

Исследование цитокинового звена иммунитета

Продукцию цитокинов необходимо оценивать *in vivo* и *in vitro*. В норме в сыворотке крови цитокины отсутствуют. Выявление провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8) в сыворотке может указывать на воспаление, возможно также массивное поступление антигена (ФНО- α , ИФН- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-2, ИЛ-4). Спонтанная продукция цитокинов *in vitro* указывает на преактивацию клеток иммунной системы *in vivo*. Ответ на индуктор *in vitro* отражает способность лимфоцитов/моноцитов отвечать *in vivo* на антигенную стимуляцию.

Индукция синтеза цитокинов

К 0,6 мл свежей гепаринизированной крови (20 МЕ/мл) добавляют 2,4 мл среды Игла с 2 ммоль глутамина и 80 мкг/мл гентамицина. Готовят рабочие растворы индукторов синтеза цитокинов — фитогемаг-глютинаина (10 мкг ФГА/100 мкл среды Игла) и липополисахаридсодержащего препарата — продигиозана (1 мкг/100 мкл среды Игла). ФГА используется для индукции синтеза ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6. Продигиозан индуцирует синтез ИЛ-1, ИЛ-8, ФНО- α , ИФН- α .

В 96-луночный планшет для культивирования клеток в первые шесть лунок каждого ряда вносят по 100 мкл раствора ФГА, в каждые следующие шесть — по 100 мкл раствора продигиозана и среды Игла соответственно. По 100 мкл перемешанных образцов подготовленной крови вносят во все лунки и культивируют в CO₂-инкубаторе 24 ч, после чего осторожно отбирают супернатанты и исследуют на наличие цитокинов.

Методы определения цитокинов

Для определения цитокинов используют методы иммуноферментного анализа (ФНО- α , ИФН- α , ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-8), а также биологические методы (ИЛ-2, ИЛ-6).

Возможно использование российских ИФА тест-систем, разработанных ГосНИИ ОЧБ и производимыми фирмами «Протеиновый контур» и «Цитокин» (СПб.). Эти тест-системы основаны на «сэндвич»-методе твердофазного ИФА с применением пероксидазы хрена в качестве индикаторного фермента. Первые моноклональные антитела к цитокинам предварительно иммобилизованы на внутренней поверхности ячеек твердых планшетов для ИФА. В лунки вносят стандарты и образцы сыворотки, инкубируют, затем отмывают и инкубируют со вторыми моноклональными антителами. Продукт взаимодействия выявляется индикаторным механизмом в виде конъюгата пероксидазы хрена с авидином, имеющим высокое сродство к биотину, связанному со вторым антителом. После этого проводят этапы отмывки и окраски. Количественная оценка результатов производится путем построения калибровочной кривой, отражающей зависимость оптической плотности от концентрации стандартного антигена и сравнения исследуемых образцов.

Содержание ИЛ-2 определяют биологическим стандартным методом поддержания пролиферации ИЛ-2-зависимой Т-клеточной перевиваемой мышинной линии CTLL-2. ИЛ-6 определяют с помощью стандартного теста поддержания пролиферации ИЛ-6-зависимой гибридомы мыши В9. Клетки культивируют с исследуемыми и контрольными образцами сыворотки. За 18 ч до завершения культивирования в ячейки планшета вносят ^3H -тимидин в дозе 5 мКи/мл. Затем клетки снимают на нитроцеллюлозные фильтры. Уровень пролиферации клеток оценивают по интенсивности включения ^3H -тимидина с помощью бета-счетчика. Биологическую активность ИЛ-2 и ИЛ-6 рассчитывают, сравнивая полученные значения в исследуемых и контрольных образцах, и выражают в ед./мл.