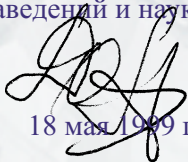


МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СОГЛАСОВАНО

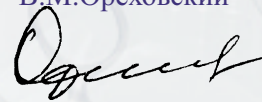
Заместитель начальника
Главного управления кадровой политики,
учебных заведений и науки Н.И. Доста



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.

Диагностика нарушений состояния иммунной системы

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 | Индукцированная | 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.