УДК 616. 25 - 002 : 575

ПРОЛІФЕРАТИВНА ТА МІГРАЦІЙНА АКТИВНІСТЬ ЦИРКУЛЮЮЧИХ ЛІМФОЦИТІВ У ХВОРИХ ЕКСУДАТИВНИМ ПЛЕВРИТОМ ЗАПАЛЬНОГО ТА МЕТАСТАТИЧНОГО ХАРАКТЕРУ

Лупиніс О.В., Фролов О.К.

У розвитку та перебізі ексудативних плевритів запального та метастатичного характеру істотну роль відіграє імунна система [1,2]. Для оцінки важкості захворювання та розробки адекватної терапії необхідна об'єктивна оцінка стану імунітету. Відомо, що імунна система поряд з нервовою та ендокринною контролює антигенструктурний гомеостаз за допомогою цензорної та морфогенетичної функцій [3,4]. Безперервний контроль та регуляція антигенструктурного гомеостазу з боку імунної системи передбачає постійний лімфоцитопоез та імуногенез в центральних та периферичних лімфоїдних органах, який забезпечує наробітку клонів сенсибілізованих лімфоцитів, що виконують свої цензорні та морфогенетичні функції в процесі спрямованої міграції. Оцінити проліферативну та міграційну активність циркулюючих лімфоцитів можна за допомогою цитогенетичного, цитоморфометричного та авідного розеткового методів, які тестують залишкові ознаки активації лімфоцитів у лімфоїдних органах, а саме частоту асоціацій акроцентричних хромосом в лімфоцитах, розмір лімфоцитів, авідність Т-лімфоцитів до еритроцитів барану [5,6].

Метою нашої роботи став аналіз напруги імунітету залежно від етіології та патогенезу ексудативного плевриту.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Обстежені дві групи хворих ексудативним плевритом (ЕП) різної етіології. Перша група - хворі віком від 27 до 69 років з ЕП запального характеру (6 чол.). Друга група - хворі віком 38-73 роки з ексудативним плевритом канцерозної етіології з локалізацією первинної пухлини в легенях (6 чол.), у молочній залозі (8 чол.), в яєчниках (3 чол.). Контрольну групу складали 21 донор станції переливання крові (практично здорові люди).

У обстежених осіб здійснювався забір венозної крові в пробірки з гепарином (20 од/мл), а у хворих додатково обстежували плевральний ексудат (ПЕ).

Для цитоморфометричного аналізу з венозної крові та ПЕ стандартним способом виготовляли мазки. З метою вивчення розподілу частот розмірних класів лімфоцитів у мазках під мікроскопом (ок х 7, об х 100) вимірювали діаметр 200 лімфоцитів за допомогою окуляр-мікрометру і складали варіаційний ряд розмірних класів лімфоцитів з інтервалом 1,0 мкм.

Із залишеної крові виділяли лімфоцити на фікол-верографиновому градієнті з щільністю 1,077 г/мл [7]. Одну їх частину використовували для постановки реакції розеткоутворення з еритроцитами барану (ЕБ) [7] з додаванням 20% ембріональної телячої сироватки для отримання оптимальної ліганд-рецепторної взаємодії між ЕБ та Т-лімфоцитами. Окрім обрахування абсолютної та відносної кількості Е-РУК як при загальноклінічному методі додатково вираховували кількість високоавідних Т-лімфоцитів, які прикріпили 8 та більше ЕБ (КЛ≥8 ЕБ). З другої частини лімфоконцентрату ставили культуру лімфоцитів, стимульовану фітогемаглютиніном Діфко П (20 мкг/мл). Після 50-54 годин культивування, коли лімфоцити поділяються перший раз і їх цитогенетична характеристика відповідає їх стану до культивування [8], виготовляли препарати хромосом стандартним способом [9]. На кожному препараті в 100 метафазних пластинках вивчали асоціації акроцентричних хромосом (ААХ), використовуючи загальноприйняті критерії [10]. Вивчені лімфоцити розподіляли за класами (КЛ) у залежності від кількості асоціацій акроцентричних хромосом, яка коливалась від 0 до 10. З отриманого різноманіття виділяли частку лімфоцитів без асоціацій та з двома асоціюючими акроцентриками (КЛ 0+2 ААХ), вважаючи їх ранніми (знов утвореними) активованими Т-лімфоцитами [11].

Статистичну обробку даних проводили з використанням t критерія Ст'юдента.

Для вивчення впливу пухлинних маркерів на проліферацію та перерозподіл постпроліферативних активованих лімфоцитів за допомогою імуноферментного аналізу в сироватці крові (СК) та плевральній рідині визначали концентрації пухлинних маркерів (ПМ):

раково-ембріонального антигену (СЕА), пухлинних антигенів СА-125, СА 19-9, муциноподібного пухлино-асоційованого антигену (МСА), нейроспецифічної енолази (НСЕ). Біологічні рідини перед дослідженням центрифугували. Усі дослідження виконувались у двох дублях твердофазним імунопероксидазним методом типу "сендвіч" на основі моноклональних антитіл з подвійною специфічністю, використовуючи стандартні методики фірми - поставника (сумісне російсько-швейцарське підприємство "ДІА-плюс"). Статистична обробка результатів проведена з використанням непараметричного критерію Вілкоксона-Манна-Уітні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

При порівнянні концентрацій ПМ в СК у хворих з неспецифічними та метастатичними плевритами найбільш суттєві відмінності встановлені для СЕА при ракові легенів (його вміст при запальних плеврітах 3,91±1,45 нг/мл, при метастатичному - 19,92±4,75 нг/мл), для МСА при раку молочної залози (6,50±1,03 О/мл - при запальних плевритах та 28,01±2,39 О/мл при метастатичних), для СА - 125 при раку яєчників (66,27±13,07 О/мл та 209,66±24,71 О/мл відповідно) (таблиця 1). Вміст ПМ в ексудаті перевищував їх концентрації в СК від 1,5 до 4 разів. Найбільш збільшувався рівень СЕА при раку легенів (5,96±2,31 нг/мл при запальному та 45,33±8,43 нг/мл при метастатичному плевриті) та СА-125 при раку яєчників (222,00±34,22 О/мл та 513,08±52,1 О/мл відповідно). За середнім арифметичним концентрація ПМ у хворих злоякісними захворюваннями перевищувала аналогічні концентрації у хворих неспецифічними плевритами, за винятком вмісту НСЕ.

У результаті цитогенетичних досліджень у ФГА-стимульованих культурах Т-лімфоцитів у всіх групах хворих встановлено збільшення частки КЛ 0+2 ААХ в ПЕ порівняно з кров'ю в 1,5-2 рази (таблиця 2). При аналізі частоти КЛ 0+2 ААХ в периферичній крові встановлені відмінності в різних груп хворих. У більшості хворих раком легень та запальними ЕП частота КЛ 0+2 ААХ у крові була нижчою, ніж у контрольній групі, тоді як у хворих раком молочної залози, а особливо у хворих на рак яєчників частота даних цитогенетичних класів була вища, ніж у донорів.

Аналіз розмірних класів лімфоцитів виявив у всіх груп хворих збільшення в периферичній крові частки малих лімфоцитів з діаметром до 6,0 мкм (таблиця 2). Відповідно в них знижувався і середній діаметр лімфоцитів. Найбільша кількість КЛ≤6,0 мкм спостерігалась у хворих запальним ексудативним плевритом (49,5±9,1%), а серед ексудативного плевриту канцерозного походження у хворих на рак яєчників (42,2±3,8%). При порівнянні цитоморфометричних показників крові та ПЕ виявлені такі ж великі контрасти, як і при цитогенетичних дослідженнях, а саме збільшення в ПЕ частки КЛ≤6,0 мкм в 1,5 рази порівняно з кров'ю. Максимальна кількість малих лімфоцитів була у хворих раком яєчника - 67,0±3,5%.

Відносна кількість Т-лімфоцитів, виявлена за допомогою Е-РУК, майже не відрізнялась між групами хворих та показниками донорів, за винятком хворих раком легенів та раком яєчника, де вона перевищувала показники інших груп (таблиця 2). У той же час абсолютні показники Е-РУК у хворих були нижчими ніж у групи порівняння, що підтверджується дослідженнями інших авторів при запальних захворюваннях легенів та канцерозних процесах [12, 13]. Більш інформативним був аналіз частоти високоавідних класів Т-лімфоцитів. У периферичній крові всіх груп хворих спостерігалось збільшення КЛ≥8 ЕБ, максимальні значення цього показника в крові були у хворих раком яєчника - 52,3±5,3% при 35,0±1,8% в контролі. Кількість високоавідних Т-лімфоцитів у ПЕ залежала від локалізації патологічного процесу. У ПЕ хворих раком яєчника частота КЛ ≥8 ЕБ дещо перевищувала показник крові, а у хворих запальними ЕП майже не відрізнялась від такого показника у крові. Кількість високоавідних Т-лімфоцитів у хворих з раком легенів та раком молочної залози була нижчою, ніж у крові.

Односпрямована динаміка КЛ 0+2 ААХ та КЛ≤6,0 мкм вказує на функціональну спільність цих класів. Вони відносяться до ранніх постпроліферативних активованих лімфоцитів, що вийшли в рециркуляцію з лімфоїдних органів після серії (6-10 раз) мітотичних ділень. Рухи хромосом при мітозі порушують асоціації акроцентриків [11], внаслідок чого ранні постпроліферативні лімфоцити не мають ААХ або мають їх мінімум. Мітотичні цикли, що швидко проходять один за одним, приводять до зменшення розміру клітин за рахунок цитоплазми, яка не встигає відновлюватись на протязі короткої (8-12 годин) інтерфази. Тому лімфоцити, що виходять в циркулююче русло мають малі розміри (до 6,0 мкм в діаметрі) [5]. Класи активованих лімфоцитів КЛ 0+2 ААХ та КЛ ≤6,0 мкм характеризують проліферативну та міграційну активність різних субпопуляцій лімфоцитів : КЛ 0+2 ААХ - ФГА-чутливі лімфоцити, до яких відноситься більшість Т-лімфоцитів, а КЛ≤6,0 мкм - всі ранні постпроліферативні зрілі активовані субпопуляції Т- і В-лімфоцитів, тому аплітуда коливань останнього класу є більшою, ніж у цитогенетичного. Виявлені нами чіткі відмінності цитогенетичних та цитоморфометричних показників лімфоцитів відбувались в результаті їх підвищеної проліферативної активності та перерозподілу в периферичній крові та ПЕ. Масивне антигенне вогнище, що знаходиться в легенях, приводить до підвищеного витрачання комітованих ефекторних та регуляторних лімфоцитів в імунологічних реакціях, що особливо характерно для онкологічних хворих, а також змінює шляхи міграції активованих лімфоцитів. Як наслідок цього, відбувається додатковий імуногенез та імунопоез в

центральних та периферичних лімфоїдних органах, про що свідчить збільшення КЛ 0+2 ААХ та КЛ ≤6,0 мкм. Знов утворені постпроліферативні активовані лімфоцити скупчуються в ПЕ в результаті їх міграції та депонуванні в антигенних вогнищах з метою виконання імунологічних функцій.

Збільшення в крові хворих відносної кількості високоавідних Т-лімфоцитів свідчить про високу щільність CD2 рецептора на мембранах цих клітин, бо саме він зв'язується з ЕБ. CD2 структура приймає участь в антигеннезалежній активації та проліферації Т-лімфоцитів, а також в їх адгезії до інших клітин [14]. Щільність CD2 структури висока на тимоцитах і Т-лімфоцитах, що проходять проліферацію та диференціровку [15]. Таким чином, високоавідні Т-лімфоцити (КЛ≥8 ЕБ) є активованими. Підвищення в крові КЛ ≥8 ЕБ пов'язано з напругою імунітету. Запальні та канцерогенні процеси супроводжуються наявністю великої різновидності і великих доз чужерідних антигенів та аутоантигенів за рахунок розпаду тканин. У відповідь на порушення антигенструктурного гомеостазу наступає підвищена активація і проліферація комітованих лімфоцитів, про що і свідчить підвищення КЛ≥8 ЕБ в периферичній крові. Зниження кількості високоавідних Т-лімфоцитів у ПЕ у хворих раком легенів та раком молочної залози відбувається внаслідок виконаних CD2 рецептором своїх функцій (адгезія, активація).

Вплив антигенного вогнища на проліферацію та міграцію активованих лімфоцитів підтверджується односпрямованістю кількісних змін КЛ 0+2 ААХ, КЛ≤6,0 мкм та КЛ≥8 ЕБ в периферичній крові та ПЕ у онкологічних хворих та концентрацій ПМ в цих біологічних рідинах. Так, збільшення концентрацій ПМ у СК при раку легенів: СЕА, НСЕ та СА 19-9, при раку молочної залози: СА-125, МСА та при раку яєчників: СА-125, МСА та СА 19-9, супроводжується збільшенням у периферичній крові частки КЛ 0+2 ААХ (при раку яєчників та молочної залози), КЛ≤6,0 мкм та КЛ≥8 ЕБ (у всіх групах хворих) внаслідок підвищеної проліферації лімфоцитів. Спостережене перевищення вмісту ПМ в ПЕ порівняно з СК пояснюється механізмом утворення ПЕ. ПЕ формується внаслідок пропотівання рідкої частини крові через стінки капілярів, тому концентрація антигенів у ПЕ буде складатися частково з їх вмісту в СК та зі злущування з метастатичних вогнищ. Підвищення кількості ПМ в ПЕ також супроводжується збільшенням показників активованих лімфоцитів в результаті їх перерозподілу з наступним накопиченням в ПЕ. Найбільші відмінності по вмісту ПМ виявлені для СА-125 у хворих раком яєчника. Його кількість в СК в 6 разів перевищує показники донорів, а в ПЕ його концентрація ще збільшилась порівняно з СК в 2,5 разів. Ці дані співпадають з максимальними значеннями показників активованих лімфоцитів в периферичній крові та ПЕ у цієї групи хворих порівняно з іншими.

ВИСНОВКИ

1. За допомогою цитогенетичного, цитоморфометричного та авідного розеткового методів в периферичній крові у хворих запальними та метастатичними ЕП виявлено збільшення частки КЛ 0+2 ААХ (за винятком хворих на ЕП запального характеру та хворих раком легенів), КЛ≤6,0 мкм та КЛ≥8 ЕБ, що свідчить про підвищення темпів проліферації лімфоцитів.

2. Збільщення кількості активованих лімфоцитів в 1,5-2 рази в ПЕ порівняно з кров'ю відображує їх перерозподіл внаслідок міграції та депонування в антигенних вогнищах.

3. У онкологічних хворих підвищення частки активованих лімфоцитів в крові, а особливо в ПЕ, узгоджувалось зі збільшенням концентрацій ПМ в цих біологічних рідинах.

4. Варіації вивчених показників залежали від етіології ЕП та локалізації первинної пухлини: найбільша частка активованих лімфоцитів була у хворих раком яєчника.

5. Рівень активованих лімфоцитів КЛ 0+2 ААХ, КЛ≤6,0 мкм, КЛ≥8 ЕБ дозволяє оцінювати важкість та прогноз захворювання, контролювати ефективність проведеного лікування.

Таблиця 1 - Вміст пухлинних маркерів в СК і ПЕ хворих ексудативним плевритом різної етіології

ПМ	Об'єкт дослід-ження	Групи обстежених				Референтні концентрації фірми-поставника
		Запальні ексудативні плеврити	ЕП метастатичного характеру			
			Рак легенів	Рак молочної залози	Рак яєчників	
СЕА	СК	3,91 ±1,45	19,92 ±4,75	9,43 ±3,05	1,63 ±0,56	5 нг/мл
	ПЕ	5,96 ±2,31	45,33 ±8,43	14,07 ±3,19	2,17 ±0,25	
СА-125	СК	66,27 ±13,07	32,94 ±4,68	72,39 ±28,51	209,66 ±24,71	35 О/мл
	ПЕ	222,00 ±34,22	123,05 ±30,87	145,86 ±27,03	513,08 ±52,1	
НСЕ	СК	13,95 ±3,04	25,87 ±5,71	12,24 ±5,35	18,18 ±4,11	15 нг/мл
	ПЕ	16,83 ±4,40	29,20 ±6,49	10,31 ±1,54	9,95 ±1,39	
МСА	СК	6,5 ±1,03	3,17 ±0,52	28,01 ±2,39	5,88 ±0,58	10 О/мл
	ПЕ	8,67 ±2,95	5,99 ±1,24	31,00 ±2,58	19,22 ±1,93	
СА 19-9	СК	9,62 ±2,96	47,44 ±22,56	6,46 ±3,61	68,20 ±13,51	37 О/мл
	ПЕ	16,6 ±11,85	31,64 ±14,45	4,87 ±3,11	32,69 ±12,40	

Таблиця 2 - Цитогенетичні, цитоморфометричні та розеткові показники циркулюючих лімфоцитів у хворих ЕП різної етіології

Обстежений контингент	Досліджений матеріал	Цитогенетичний показник	Цитоморфометричні показники		Розеткові показники		
		КЛ 0+2 ААХ, %	КЛ≤6,0 мкм, %	Середній діаметр лімфоцитів, мкм	КЛ≥8 ЕБ, %	Кількість Т-лімфоцитів	
						%	10^9/л
Запальні ЕП	Кров	22,6±1,4	49,5±9,1	6,63±0,14	47,4±5,1	69,4±6,7	0,78±0,08
	ПЕ	44,2±2,5	57,3±6,1	6,37±0,07	46,3±4,3	79,5±7,1	
Рак легенів	Кров	21,8±1,5	32,6±5,6	7,22±0,21	46,3±3,8	75,3±3,7	1,09±0,11
	ПЕ	44,4±1,8	53,3±2,7	6,62±0,12	30,6±2,5	67,4±4,6	
Рак молочної залози	Кров	31,2±2,1	33,4±1,7	7,46±0,10	46,6±1,8	71,4±1,5	0,93±0,18
	ПЕ	45,2±3,5	54,2±1,8	6,58±0,09	42,6±3,1	73,3±1,7	
Рак яєчників	Кров	33,8±2,9	42,2±3,8	7,16±0,22	52,3±5,3	75,8±1,6	0,73±0,12
	ПЕ	46,5±4,3	67,0±3,5	6,18±0,08	56,3±5,8	78,7±1,8	
Контрольна група	Кров	25,8±1,1	18,5±1,1	7,53±0,08	35,0±1,8	65,2±1,8	1,07±0,05

ЛІТЕРАТУРА

1. Абраменко И.В., Скляренко А.М., Евсевьева А.И. Характеристика иммунокомпетентных и опухолевых клеток в плевральном экссудате больных раком легкого при развитии метастазов //Экспериментальная онкология.-1992.-Т.14, №4.-С.56-60.
2. Любинец О.В. Иммунологические исследования плеврального выпота в диагностике экссудативного плеврита //Пульмонология. - К.:Здоров'я, 1987, вып. 8.-С.103-105.
3. Ломакин М.Г. Иммунологический надзор. - М.: Медицина, 1990. - 256 с.
4. Бабаева А.Г. Лимфоциты как регуляторы пролиферации и дифференцировки клеток нелимфоидных органов// Вестник АМН СССР. - 1990. - №2. - С. 13-15.
5. Цитогенетические и цитоморфометрические параллели лимфоцитов человека/ Фролов А.К., Арцимович Н.Г., Москалец О.В. и др./ Генетика. - 1993. - Т.29,№12. - С. 2065-2073.
6. Фролов А.К. Иммуноцитопоэтические признаки циркулирующих лимфоцитов человека при патологических состояниях// Цитология и генетика. - 1994. - Т.28,№4. - С. 3-7.
7. Иммунологические методы/Под ред. Г.Фримеля : Пер. с нем. - М.:Медицина, 1987.-422с.
8. Фролов А.К. Количество ассоциирующих акроцентрических хромосом в лимфоцитах человека, проходящих первый, второй и третий митозы в культуре// Цитология. - 1985. - Т.27,№10. - С.1199-1202.
9. Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулишов Н.М., Барановская А.И. Хромосомы человека. Атлас.- М.:Медицина, 1982.-263с.
10. Фролов А.К. Частота ассоциаций акроцентрических хромосом в лимфоцитах человека при разных способах их оценки// Генетика. - 1985. - Т.21,№7. - С. 1229- 1235.
11. Фролов А.К. Цитогенетическая характеристика иммунного процесса у человека. Автореф. дис.... док. мед. наук.-М., 1985.-32с.
12. Никулин Б.А., Сафронов В.В., Бартова Л.М., Кульберг А.Я. Продукты катаболического распада клеточных рецепторов, Р-белка и показатели иммунитета при воспалительных заболеваниях легких // Иммунология.-1989.-№3.-С.83.
13. Адамян А.Т., Смольянинов Е.С., Васильев Н.Б., Удуд В.В. Типологический анализ реакции системы иммунитета у больных раком молочной железы и у здоровых женщин // Иммунология.-1989.-№5.-С.56-59.
14. Сенчило И.В. Реакция активного розеткообразования как метод оценки функции Т-лимфоцитов в клинической практике //Терапевтический архив.-1991.-Т.63.-№7.-С.135-138.
15. Ju David Tar Jan. Human lymphocyte subpopulation: gigant human red blood cell rossetes. - J. Immunol. Meth. - 1977. - V.15,№1. - P. 67-7