УДК 575 : 612 – 083

РОЗРОБКА ТА ВПРОВАДЖЕННЯ ОСНОВНИХ ПРИНЦИПІВ ПАТОГЕНЕТИЧНОГО АНАЛІЗУ

Фролов О.К., д.мед.н., професор, Федотов Є.Р., асистент, Копійка В.В., асистент

Запорізький державний університет

Методологічні узагальнення, зроблені в останні півтора десятиліття рядом вітчизняних (Г.М.Драннік [1], Г.М.Бутенко [2], Л.В.Ковальчук, А.Н.Чередєєв [3]) і закордонних імунологів [4], привели до формування патогенетичного підходу до аналізу імунної системи замість емпіричного. Він передбачає вивчення основних етапів імуногенезу: впізнавання, активація, проліферація, диференціровка, міграція, ефекторні реакції з регуляцією на кожному з етапів за принципом зворотного зв'язку. У патогенетичному підході нами запропонований один з напрямків: аналіз новоутворення і міграції активованих лімфоцитів (які пройшли відповідні етапи імуногенезу або імуноцитопоезу), який повинен стати базовим при будь-якому імунологічному обстеженні. У його основу закладений ряд принципів.

1-й принцип. Превалювання морфогенетичної функції імунної системи над цензорною за енергоструктурними витратами. Під морфогенетичною (структурною, гістогенетичною) функцією розуміється специфічне розпізнавання лімфоцитами аутоантигенів і наступна регуляція метаболізму, проліферації, диференціації й апоптозу клітин усіх тканин на всіх етапах онтогенезу, сприяючи розгортанню генетичної програми індивідуума [5]. Імуноморфогенез здійснюється через Т-диференціюючі лімфоцити із фенотипом Тх і низькоавідні аутоантитіла без цитотоксичної функції. Під цензорною (цитотоксичною) функцією розуміється специфічне впізнавання й усунення чужорідних антигенів (паразитичних організмів, власних трансформованих клітин) у ході цитотоксичних імунних реакцій (кілінг, фагоцитоз).

На користь доказу даного принципу може служити ряд аргументів. По-перше, порівняльний об'єм соматичних клітин, що потребують із боку імунної системи морфогенетичного контролю, значно більше ніж антигенів, із якими контактує в конкретний момент організм, у той час як імунна відповідь дозозалежна. По-друге, протягом онтогенезу тимус проходить двократну інволюцію: відносну - в 3-му триместрі вагітності й абсолютну - відразу після досягнення статевого розвитку, тобто в періоди завершення активного морфогенезу [6]. У цьому зв'язку частота активованих післяпроліферативних лімфоцитів у периферичній крові в новонароджених дітей складає 35-45% у порівнянні з такою у дорослих - 20-25% [7]. По-третє, фізіологічна вагітність протікає при достатній різниці між матір'ю і плодом за алоантигенами батька HLA-системи, через яку здійснюється морфогенетична функція імунної системи [8]. По-четверте, при будь-якій імунній відповіді клітинна і гуморальна реакції містять неспецифічний компонент, що значно перевищує специфічний до антигену, що визвав дану відповідь: у 5-6 разів збільшується титр неспецифічних імуноглобулінів, а в периферичній крові кількість активованих післяпроліферативних лімфоцитів збільшується на 10-20%, тоді як частота специфічних до конкретного антигену серед них менше 1% [9].

2-й принцип. Включення в аналізовані етапи імуногенезу популяційних і субпопуляційних особливостей міграції лімфоцитів з урахуванням їх органної тропності і можливістю тимчасового депонування в місцях порушення антиген-структурного гомеостазу (АСГ). За нашими даними, у дорослих осіб біля 70-85% усіх лімфоцитів периферичної крові складає багаторазово рециркулюючий пул і 15-30% - новоутворених, що недавно ввійшли у рециркуляцію з центральних і периферичних органів імунної системи [10]. При цьому в людини весь клітинний склад лімфоцитів обмінюється протягом 30 хвилин.

З периферичної крові лімфоцити проникають у лімфоїдні органи і далі в різні ділянки регіонарних до них органів через високий ендотелій післякапілярних венул (ВЕПВ) шляхом рецепторно-лігандних взаємовідносин. Останнє є специфічним для популяцій і субпопуляцій лімфоцитів. Так, виявлена різниця в рециркуляції Т- і В-лімфоцитів і їх активних фракцій. Інтактні Т-лімфоцити рециркулюють набагато швидше, ніж В-лімфоцити. Ауто/антигенне навантаження різко прискорює новоутворення активованих лімфоцитів, змінює їх швидкість (зменшує) і напрямок міграції, призводить до їх тимчасового депонування в осередках порушення АСГ. При цьому виявлена органна тропність міграції лімфоцитів. Насамперед розрізняють два головних пули рециркулюючих лімфоцитів: 1) локальну імунну систему слизових (ЛІСС) - травний, сечостатевий і респіраторний тракти; 2) локальну імунну систему шкіри (ЛІСШ) і скелетної мускулатури.

Дані особливості переважної міграції активованих лімфоцитів необхідно враховувати при оцінці імунного статусу, так як забір крові для дослідження робиться з пальця або вени – периферичних відділів серцево-судинної системи. Так, нами виявлено, що при патології внутрішніх органів, контрольованих ЛІСС у напружені етапи відновлення АСГ, у периферичній крові спостерігається лімфопенія і зменшується кількість активованих лімфоцитів, фагоцитів, що невірно трактується як вторинний імунодефіцит. Якщо ж імунні реакції розгортаються на периферії регіонарних до ЛІСШ, то в цей період має місце лімфоцитоз у крові, а також збільшується кількість активованих лімфоцитів [7]. Таким чином, різна динаміка імунокомпетентних клітин у крові (у бік зменшення або збільшення) може спостерігатися при однаковій силі імунної відповіді на порушення АСГ. Органний хомінг лімфоцитів також здійснюється завдяки специфічності й рецепторно-лігандним взаємовідносинам з ВЕПВ.

3-й принцип. Визначення рівня новоутворення (активованих) лімфоцитів у ході лімфоцитопоезу і імуногенезу від довгостроково циркулюючих (анамнестичних) лімфоцитів, як відображенння напруги імунної системи. Інформативна комбінація двох груп методів: 1) за стадіоспецифічними активними антигенами за допомогою моноклональних антитіл (МКАТ) до CD-25, CD-71, CD-95, HLA-DR на Т-лімфоцитах та ін.; 2) за загальноклітинними морфологічними і метаболічними ознаками. Однак, слід мати на увазі, що активні CD-антигени проявляються на клітинах протягом короткого періоду мітотичного циклу. Тому частота CD^+-активних лімфоцитів у периферичній крові в нормі низька (0,5-3%). Діагностично значимого рівня (5-15%) у крові їх кількість досягає при сильних імунологічних зрушеннях. Тому частота лімфоцитів, що активуються і реєструються за допомогою CD-тестів, не відбиває загальну імунологічну реактивність у процесах гісто- та імуногенеза.

У цьому зв'язку набуває діагностичної значущості друга група методів, заснованих на ознаках, що зберігаються визначений час на циркулюючих лімфоцитах. Нами виділена і вивчена патогенетична значимість чотирьох таких залишкових ознак активації лімфоцитів: частота асоціацій акроцентричних хромосом (ААХ); розмір клітин; авідність Т-лімфоцитів до еритроцитів барана (ЕБ); інтенсивність люмінесценції лімфоцитів, флуорохромованих акридиновим оранжевим (АО) у спектрі 640 нм. Ці ознаки стали основою для розробки відповідних методів [11]: 1) цитогенетичного – за частотою класів лімфоцитів (КЛ) без асоціацій і з двома акроцентриками в асоціації (КЛ 0 + 2 ААХ); 2) цитоморфометричного – за частотою КЛ із діаметром до 6,0 мкм (КЛ ≤ 6,0 мкм); 3) авідного розеткового – за частотою КЛ, що приєднали більше 8 ЕБ (КЛ ≥ 8 ЕБ); 4) люмінесцентного – за аналізом інтенсивності люмінесценції (І) при 640 нм (І 640 нм).

За допомогою кореляційно-регресивного аналізу частот зазначених класів активованих лімфоцитів у дослідах in vitro (короткострокова і тривала культура лімфоцитів) і при клінічних дослідженнях виявлена патогенетична значимість кожного із зазначених класів. Цитогенетичні і цитоморфометричні класи (КЛ 0+2 ААХ і КЛ ≤ 6,0 мкм) більше відбивають проліферативні етапи імуногенезу. Так, лімфоцити після антигенної і/або мітогенної стимуляції активуються і проліферують 4-6 разів залежно від імунологічної ситуації. У них руйнуються асоціації акроцентриків за рахунок реорганізації ядра і зменшується діаметр клітини, тому що за короткі проміжки інтерфази цитоплазма не встигає відновитися. Зазначені післяпроліферативні класи активованих лімфоцитів позитивно середньо і сильно корелюють між собою (r = 0,5 – 0,8). Однак між КЛ 0 + 2 ААХ і КЛ ≤ 6,0 мкм є істотна функціональна різниця. Так, цитоморфометричний КЛ ≤ 6,0 мкм складає високодиференційований, активно мігруючий пул клітин внутрішнього середовища. Цитогенетичний КЛ 0 + 2 ААХ об'єднує як малі (КЛ ≤ 6,0 мкм), так і частину середніх (КЛ 7 – 9 мкм) і великих (КЛ ≥ 10 мкм) лімфоцитів тому, що асоціації акроцентриків руйнуються вже через три мітози, а напружені (посилені) реакції імунітету супроводжуються зрушенням лімфоцитарної формули вліво, тобто виходом у рециркуляцію незрілих клітин. Вони за діаметром можуть складати пул середніх і великих лімфоцитів.

Високоавідні розеткові КЛ ≥ 8 ЕБ відбивають стадії активації Т-лімфоцитів при імуногенезі, так як основне функціональне навантаження CD-2 структури полягає в альтернативному Аг-рецептору проведенні активуючого сигналу в цитоплазму клітини. Інтенсивність люмінесценції лімфоцитів із використанням АО при 640 нм (І 640 нм) відбиває стан білок-синтетичної системи клітини за рівнем наявності одноланцюгових нуклеїнових кислот. Тому даний тест є специфічним для всіх стадій імуногенезу, але в основному його початкових етапів: активації, бласттрансформації, проліферації.

В остаточному підсумку методи 1 і 2 груп не виключають, а взаємодоповнюють один одного при патогенетичному аналізі динаміки новоутворення і міграції активованих лімфоцитів.

4-й принцип. Структурно-функціональна багаторівневість (ієрархічність) імунної системи. Залежно від цілей досліджень в аналіз включають відповідні рівні:

1) системний рівень – включає усю сукупність її центральних і периферичних органів у цілому і зв'язок імунної системи з іншими гомеостатичними системами (нервовою й ендокринною);

2) органний рівень – включає аналіз окремих центральних і периферичних органів імунної системи. Починаючи з цього рівня, необхідно враховувати органну тропність рециркуляції популяцій лімфоцитів;

3) тканинний рівень – враховує особливості лімфопоезу і мієлопоезу;

4) популяційний рівень – передбачає аналіз популяцій у лімфоїдній тканині - Т-, В-лімфоцитів, натуральних кілерів; у мієлоїдній тканині - моноцитів, гранулоцитів (нейтрофілів, еозинофілів, базофілів - тучних клітин, мегакаріоцитів);

5) субпопуляційний рівень – у даний час окреслений для Т-лімфоцитів ($Тх_1$, $Тх_2$ і Т-к), В-лімфоцитів (В1 і В2), макрофагів (гістіоцити, альвеолярні, перитоніальні, шкірні (клітини Лангерганса), лімфоїдних органів, остеокласти, мікроглія);

6) клональний рівень – характерний тільки для субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів і представлений репертуаром, що постійно оновлюється, антигенспецифічних клонів, об'єднаних мережними ідіотип-антиідіотип взаємодіями.

Виходячи зі структурно-функціональних рівнів імунної системи, її аналіз також повинен проводитися на рівневій методологічній градації, оскільки для кожного рівня проводиться добір відповідних імунологічних методів із визначеною розрішаючою здатністю (інформативністю). Спочатку визначається клінічна або експериментально-біологічна доцільність аналізу того або іншого імунологічного рівня. Після чого підбираються і розробляються відповідні методи.

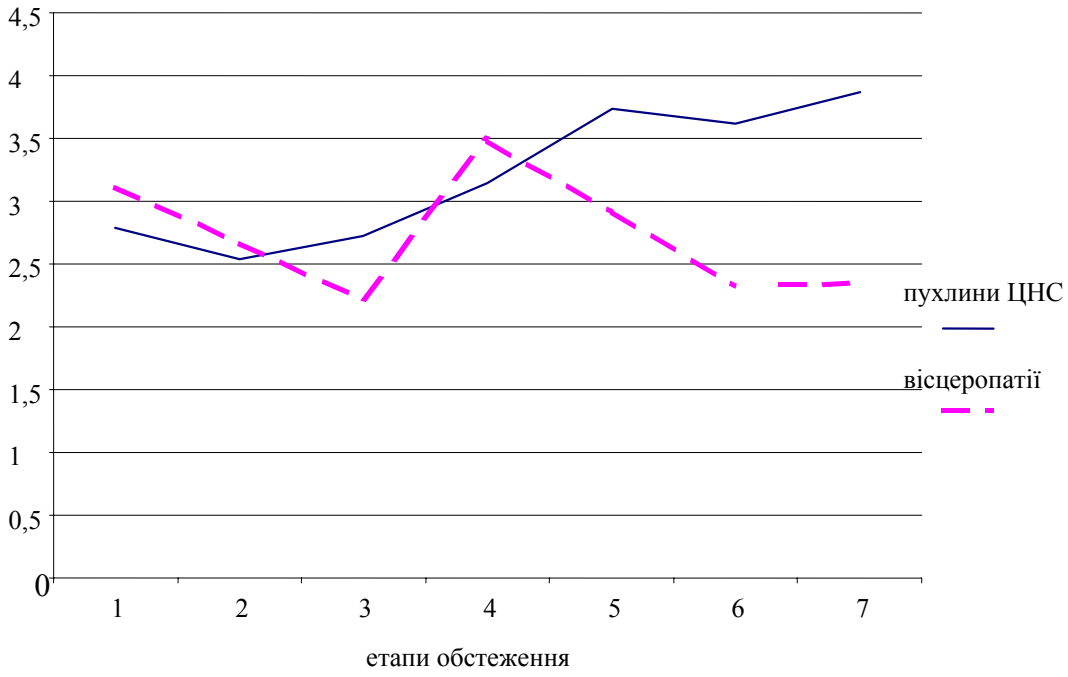
У даний час при вивченні участі імунної системи в патогенезі інфекційних і неінфекційних хвороб, в основному, досліджуються її популяційний і субпопуляційний рівні. Дані дослідження стали популярними особливо з розробкою гибридомної технології одержання МКАТ. Однак цей методичний рівень має свої обмеження, так як відображає стереотипну реакцію імунної системи на будь-яке порушення АСГ. Виявляється інформація про кількісні співвідношення популяцій і субпопуляцій лімфоцитів, тоді як будь-яка патологія супроводжується порушенням АСГ і альтерацією клітин у конкретних органах, системах. Тому без аналізу участі клонального імунологічного рівня інформація буде неповною, тому що гомеостатичні реакції імунної системи антигенспецифічні при реалізації морфогенетичної і цитотоксичної функцій. У набір методів клонального рівня входять ті з них, за допомогою яких вивчається реакція лімфоцитів на тканинні і паразитарні антигени (наприклад, визначення до даного антигену (аутоантигену) кількості сенсибілізованих лімфоцитів, титрів антитіл).

Наприклад, клональний рівень аналізу імунітету стосовно хламідійної інфекції також включає його морфогенетичну і цитотоксичну функції. Для аналізу інтенсивності цитотоксичної (антихламідійної) функції імунітету необхідний наробіток диагностикумів на основі родових (групових) антигенів Chlamydia; видових антигенів до C.trachomatis, C.psitaci, C.phneumoniae і по можливості до їх серотипів. Диагностикуми необхідні для визначення титрів антитіл, сенсибілізованих лімфоцитів (наприклад, у мікроРБТЛ з АО). Однак слід враховувати, що цитотоксичний (антибактеріальний) імунітет до даної внутрішньоклітинної інфекції розвивається слабкий і нестійкий, а з урахуванням її тропності до епітелію слизової, Аг-специфічні лімфоцити депонуються в осередках запалення і стають недоступними для аналізу у випадку взяття зразка крові. У цьому зв'язку набуває важливого значення аналіз морфогенетичної (репаративної) функції імунітету шляхом аналізу аутосенсибілізованих лімфоцитів і аутоантитіл до тканин уражених органів. Як уже відзначалося вище (1-й принцип) енергоструктурний об'єм репаративної аутореактивності буде значно вищий. Тому підвищиться інформативність патогенезу хламідійної інфекції. Використання ж наборів тканинних антигенів дозволить реєструвати генералізацію інфекційного процесу і її рівень.

5-й принцип. Послідовна багатоетапність імунологічного моніторингу, обумовлена динамічністю імунологічних реакцій як відбиток патогенезу захворювання. Даний принцип передбачає проведення імунологічного обстеження на основних етапах захворювання: початок, клінічний розпал, реконвалесценція або хронізація захворювання. На кожному з цих етапів спостерігаються специфічні особливості новоутворення і міграції активованих лімфоцитів, їх ефекторних реакцій. Так, в оперованих хворих із приводу пухлин ЦНС (1 група) і вісцеропатій (виразки шлунково-кишкового тракту, гінекологічні захворювання) (2 група) динаміка імунокомпетентних клітин (ІКК) у крові на етапах обстеження значно відрізнялася (рис. 1). Хоча об’єм енергоструктурних витрат у хворих 2-ї групи в напружений період репарації хірургічної альтерації більший, ніж у 1-й, у них мало місце зниження в крові активованих ІКК за рівнем І 640 нм, тоді як у оперованих на ЦНС цей показник підвищувався. Ці відзнаки, в основному, обумовлені різницею переважної міграції і депонування активованих ІКК у ЛІСШ (у 1 групи) і ЛІСС (у 2 групи).

6-й принцип. Клінічна інтепретація імунологічних показників згідно зі стереотипністю імунітету на відновлення порушеного АСГ. Даний принцип передбачає обов'язкове співставлення імунограми з видом і локалізацією патології, періодом захворювання, характером проведеної терапії, а також

конституціональними особливостями обстежуваного. Остаточний висновок про стан резистентності обстежуваного можна зробити тільки за комплексним аналізом імунограми і за даними інших лабораторних методів, а також клінічними даними. При цьому для індивідуального аналізу зрушень імунологічних показників у конкретного хворого спочатку необхідно вивчити динаміку цих показників при гомеостатичному, "нормальному" (без ускладнень) перебігу конкретної патології або досліджуваного фізіологічного стану. Для цього в репрезентативної групи не ускладнених хворих (або здорових у визначеному режимі) вивчається динаміка показників, що нас цікавлять. Після чого з нею порівнюються показники конкретного обстежуваного і робиться висновок про слабку, середню або сильну імунореактивність.



1 - до операції; 2 - премедикація; 3 - індукція; 4 - початок операції; 5 - кінець операції; 6 - доба після операції; 7 – тиждень після операції

Рис. 1 - Інтенсивність люмінесценції (ІЛ) при І 640 нм лімфоцитів крові, флуорохромованих АО в оперованих хворих з приводу пухлин ЦНС і вісцеропатій

Таким чином, аналіз новоутворення і міграції активованих лімфоцитів, як новий базовий напрямок патогенетичного підходу в імунології, з урахуванням запропонованих принципів дозволить об'єктивно й оперативно вивчати стан відповідних структурно-функціональних рівнів імунної системи окремих індивідуумів, а отже, визначати важкість захворювання, ступінь порушення АСГ, розробляти патогенетичну імунотропну терапію й успішно контролювати її ефективність. Тільки при цьому імунологічні показники наблизяться за інформативністю до біохімічних даних.

ЛІТЕРАТУРА

1. Богатирьова Р.В., Драннік Г.М., Горбань Є.М., Волянський Ю.Л. Клінічна імунологія в Україні: стан та перспективи наукових розробок //Імунологія та алергологія.-1998.-№4.-С.3-9.
2. Бутенко Г.М. Иммунология старения //Імунологія та алергологія.-1998.-№1.-С.26-29.
3. Ковальчук Л.В., Чередеев А.Н. Патогенетический принцип оценки иммунной системы человека: дальнейшее развитие //Клиническая лабораторная диагностика.-1995.-№6.-С. 78-80.
4. Hong R. // Immunol. Invest.-1987.-Vol. 16.-P. 453-499.
5. Бабаева А.Г. Лимфоциты как регуляторы пролиферации и дифференцировки клеток нелимфоидных органов // Вестник АМН СССР.-1990.-№2.-С. 43-45.
6. Гистология /Под ред. В.Г.Елисеева.-М.: Медицина, 1972.-616с.
7. Фролов А.К., Арцимович Н.Г., Сохин А.А.. Иммуноцитогенетика.-М.: Медицина, 1993.-240с.
8. Говалло В.И. Иммунология репродукции.-М.: Медицина, 1987.-340с.

9. Фролов А.К., Федотов Е.Р., Копейка В.В., Фролова Л.А. Определение уровня миграции лимфоцитов при патогенетическом анализе иммунной системы. Тезисы 5-й научно-практической конференции «Актуальні питання алергології, клінічної і лабораторної імунології", 20-22 листопада 2000 р. // Імунологія та алергологія.-2000.-№2-3.-С. 69.

10. Фролов А.К., Федотов Е.Р., Копейка В.В., Грицаенко Ю.М. Основные принципы патогенетического анализа иммунной системы человека // Аллергология и иммунология.-Т.1.-№2, сентябрь 2000 г.-М.: Медицина-Здоровье.

11. Фролов А.К. Патогенетический анализ состояния иммунной системы по динамике новообразования и миграции активированных лимфоцитов во внутренней среде организма. Методические рекомендации. - Запорожье, ЗГУ, 1999.-32с.