

**ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ У ХВОРИХ
НА РОЗСІЯНИЙ СКЛЕРОЗ****Національний медичний університет імені Данила Галицького (м. Львів)****natla@ukr.net**

Дане дослідження є фрагментом планової НДР «Клініко-патогенетичні особливості хвороб нервової системи різного ґенезу (розсіяний склероз, епілепсія, вертеброневрологічні патології, хвороба Паркінсона) в мешканців Західноукраїнського регіону» (№ державної реєстрації: 0109U000018).

Вступ. Розсіяний склероз (РС), згідно сучасних уявлень, це мультифакторне хронічне прогресуюче захворювання, яке характеризується ураженням центральної нервової системи, провідним патофізіологічним механізмом якого є запалення та аутоімунні процеси [5,7]. Велика кількість досліджень присвячена складному і неоднозначному характеру клініко-імунологічних взаємовідносин при різних формах РС [2,4,6]. Імунологічні підходи в діагностиці, терапії, профілактиці розсіяного склерозу широко використовуються в практичній медицині. Однак механізми імунопатогенезу РС ще не є остаточно розкритими. Імунні реакції при цьому захворюванні проявляються відхиленнями у функціонуванні клітинної та гуморальної ланок імунітету.

Метою дослідження було вивчити стан клітинного імунітету у хворих на розсіяний склероз із різним типом перебігу захворювання.

Об'єкт і методи дослідження. Обстежено 68 хворих з верифікованим діагнозом розсіяний склероз (РС) на основі критеріїв MacDonaldetal віком від 19 до 65 років (37 жінок, 29 чоловіків) [6]. Первинно прогресуючий тип перебігу встановлено у 19 пацієнтів, вторинно-прогресуючий – у 23, ремітуючо-рецидивуючий тип перебігу – у 26 пацієнтів. Контрольну групу склали 80 практично здорових чоловіків-добровольців віком 25-45 років. Для досліджень показників клітинного імунітету проводили забір венозної крові. Визначали популяційний і субпопуляційний склад лімфоцитів крові з використанням моноклональних антитіл до диференціальних антигенів лімфоцитів: CD3⁺ (Т-лімфоцити), CD4⁺ (Т-хелпери), CD8⁺ (Т-кілери/супресори), CD19⁺ (В-лімфоцити), CD56⁺ (NK клітини), в реакції непрямої імунофлюоресценції з антитілами міченими ФІТЦ (реактиви фірми «Сорбент»). З метою визначення процесів ранньої активації лімфоцитів визначали експресію на поверхні лімфоцитів CD25⁺. Розраховували співвідношення CD4⁺/CD8⁺, CD3⁺/CD19⁺, CD3⁺/CD56⁺, проліферативних індекс CD3⁺/CD25⁺. Результати досліджень аналізували методом варіаційної статистики за допомогою програми STATISTICA 6 (Statsoft, USA). Значення представлені у вигляді середньоарифметичних чисел (M), стандартних похибок середнього (m), n – об'єм вибірки. Кожен

показник тестували на нормальний розподіл за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. У залежності від умов експерименту та розподілу даних відмінності між групами оцінювали за допомогою парного або непарного t критерію Стьюдента і непараметричних критеріїв Манна-Уїтні [1].

Результати досліджень та їх обговорення. У результаті наших досліджень показано, що при розсіяному склерозі загальна кількість лейкоцитів крові становила 8,64±0,7Г/л, що на 33% більше від контролю. У пацієнтів з первинно-прогресуючим типом перебігу РС загальна кількість циркулюючих лейкоцитів була у 1,46 рази більше контролю, у групі з вторинно-прогресуючим типом – у 1,42 рази, а при ремітуючо-рецидивуючому типі перебігу – на 29% більше контролю. За нашими даними, при РС в периферичній крові зменшується кількість еозинофільних гранулоцитів, лімфоцитів (РС 24,65±2,0%, контрольна група 34,0±1,51%) збільшена відносна кількість нейтрофілів до 68,72±2,7 % (контрольна група 55,2±2,0 %), відносна кількість паличкоядерних нейтрофілів (РС 5,21±0,4%, контрольна група 2,01±0,18%) порівняно з контролем. Такий процес є характерним для розгорнутої клінічної картини запального процесу [5]. Лейкограма не відрізнялася залежно від типу перебігу РС.

Високий рівень лейкоцитів забезпечує нормальний рівень циркулюючих лімфоцитів, тому абсолютна кількість лімфоцитів в усіх групах була в межах норми. Порівнюючи по групах, у хворих на первинно-прогресуючу та вторинно-прогресуючу форму перебігу РС абсолютна кількість лімфоцитів не відрізняється від показника контролю, при ремітуючо-рецидивуючому типі є нижчою на 20 % від контрольного значення.

Вивчення фенотипового складу лімфоцитів периферичної крові хворих на РС показало відмінності від контролю (**табл. 1**).

Так, при РС встановлено зниження абсолютної кількості Т-хелперів на 28%, збільшення кількості Т-цитотоксичних лімфоцитів на 38% порівняно з контролем. Відповідно вірогідно знижується співвідношення CD4⁺/CD8⁺ (**табл. 2**). Аналогічна тенденція спостерігалася і у групах з різним типом перебігу РС. У більшій мірі була знижена абсолютна кількість CD4⁺-лімфоцитів (на 31%) у групі з ремітуючо-рецидивуючим типом перебігу. Такий перерозподіл Т-хелперів та Т-цитотоксичних лімфоцитів у периферичній крові свідчить про активний запальний процес, про переважання в патогенезі РС запальних механізмів.

Таблиця 1.

Фенотиповий склад лімфоцитів периферичної крові хворих на розсіяний склероз з різним типом перебігу захворювання, M±m

Групи Показники	Контрольна група, n=80	Розсіяний склероз, n=68	Первинно-прогресуюча форма РС, n=19	Вторинно-прогресуюча форма РС, n=23	Ремітуючий-рецидивуюча форма РС, n=26
Лейкоцити	6,5±0,6	8,64±0,7*	9,5±0,8*	9,22±0,8*	8,37±0,7*
Лімфоцити	2,0±0,2	1,83±0,1	1,84±0,09	1,91±0,1	1,59±0,1*
CD3 ⁺ , %	59,2±2,1	59,31±2,3	58,25±1,3	58,4±1,25	57,0±1,12
CD3 ⁺ , Г/л	1,44±0,08	1,08±0,09	1,1±0,08*	1,25±0,05	1,01±0,09*
CD4 ⁺ , %	39,0±1,9	36,3±0,56	36,0±1,08	36,6±1,04	35,72±1,18*
CD4 ⁺ , Г/л	0,93±0,05	0,67±0,05*	0,69±0,06*	0,79±0,06*	0,64±0,05*
CD8 ⁺ , %	19,6±1,6	21,2±0,31	22,0±0,4*	21,78±0,67	21,17±0,87
CD8 ⁺ , Г/л	0,29±0,02	0,40±0,03*	0,41±0,03*	0,47±0,04*	0,38±0,02*
CD19 ⁺ , %	18,4±1,6	23,24±0,32*	23,75±0,6*	22,21±0,98*	23,82±0,54*
CD19 ⁺ , Г/л	0,36±0,02	0,45±0,02*	0,43±0,04*	0,44±0,04*	0,41±0,03*
CD56 ⁺ , %	10,25±1,0	17,7±0,42*	20,5±1,4*	18,41±0,83*	19,56±0,91*
CD56 ⁺ , Г/л	0,15±0,01	0,36±0,06*	0,34±0,02*	0,41±0,03*	0,44±0,03*
CD25 ⁺ , %	6,5±0,5	25,9±0,55*	24,0±1,1*	26,2±1,8*	24,9±0,95*
CD25 ⁺ , Г/л	0,18±0,02	0,42±0,02*	0,39±0,04*	0,48±0,03*	0,42±0,04*

Примітка. * – вірогідність відмінності від показника контролю (p<0,05).

Зниження CD3⁺ характерне для загострення РС а нормалізація при ремісії РС. Одночасно встановлено підвищення відносної та абсолютної кількості В-лімфоцитів та NK-клітин, відповідно зниження

CD25⁺лімфоцитів зростала в 1,8 рази порівняно з контролем. Нами встановлено, що при розсіяному склерозі посилюється експресія CD25⁺ на лімфоцитах, що свідчить про їх активацію внаслідок антиген-

Таблиця 2.

Деякі індекси співвідношення лімфоцитів периферичної крові хворих на розсіяний склероз з різним типом перебігу захворювання, M±m

Групи Показники	Контрольна група, n=30	РС, n=68	Первинно-прогресуючий, n=19	Вторинно-прогресуючий, n=23	Ремітуючий-рецидивуючий, n=26
CD4/CD8	2,05±0,2	1,71±0,1*	1,63±0,1*	1,65±0,1*	1,69±0,1*
CD3/CD19	3,21±0,21	2,55±0,11*	2,45±0,2*	2,6±0,12*	2,39±0,12*
CD3/CD56	5,7±0,46	3,35±0,21*	2,84±0,21*	3,17±0,16*	3,07±0,25*
Проліферативний індекс	8,0±0,5	2,62±0,1*	2,81±0,1*	2,63±0,12*	2,42±0,15*

співвідношення CD3⁺/CD19⁺ та CD3⁺/CD56⁺. Деякі автори вказують на те, що при РС не змінюється кількість В-лімфоцитів крові [3,5]. Наші дослідження показали збільшення кількості циркулюючих лімфоцитів у хворих на РС незалежно від типу перебігу захворювання. Відомо, що при РС активація Т-хелперів I типу призводить до зростання рівня IL-2, який є фактором проліферації лімфоцитів, у тому числі В-лімфоцитів та NK-клітин. При РС відбувається поліклональна активація В-лімфоцитів. Проаналізувавши імунограми хворих на РС, можна сказати, що клітинний імунітет відображає активний запальний процес.

До активаційних антигенів (диференціальних), експресія яких пов'язана із проходженням клітинами певного етапу клітинного циклу відносять CD25⁺ [4,6]. CD25⁺ є раннім активаційним маркером, який відповідає за процес активації проліферації лімфоцитів, експресується на активованих Т- та В-лімфоцитах. Індуктором його експресії на лімфоцитах є IL2. У хворих на розсіяний склероз кількість

ної стимуляції. Активовані Т-лімфоцити здатні проникати через гемато-енцефалічний бар'єр. Запуск проліферативної відповіді Т-лімфоцитів є каскадним процесом ключову роль в якому відіграє IL-2, як ростовий фактор, і рецептор до IL-2 – молекула CD25⁺. CD25⁺ є α-субодиницею складного рецепторного комплексу до IL-2. Із порушенням експресії CD25⁺ на лімфоцитах пов'язують розвиток ряду аутоімунних порушень. На експресію CD25⁺ впливає IL-2. CD25⁺ також експресують регуляторні (депресорні) Т-лімфоцити, функцією яких є супресія активності автореактивних Т-лімфоцитів. Тому збільшення кількості CD25⁺лімфоцитів у крові можна розглядати, як зростання числа активованих Т-лімфоцитів в число яких можуть входити Т-лімфоцити регуляторні.

Одночасно з тим, CD8⁺лімфоцити розглядають як цитотоксичні клітини протипухлинного та протівірусного імунного захисту, які провокують гіперчутливість сповільненого типу. Тому значення індексу CD4⁺/CD8⁺ набуває не імунорегуляторного значення, а значення індексу, який відображає від-

ношення регуляторних процесів, які представляють Т-хелпери, до ефекторних, що забезпечуються Т-цитотоксичними лімфоцитами. Разом із тим у науковій літературі досі зустрічаються висновки про те, що підвищення рівня CD8⁺лімфоцитів свідчить про супресію імунної відповіді.

CD56⁺лімфоцити є природними кілерами (NK-клітини), які можуть безпосередньо знищувати клітини-мішені і є також представниками противірусного та протипухлинного імунітету. У результаті проведених досліджень встановлено збільшення відносної кількості NK-клітин при розсіяному склерозі у 1,7 рази, абсолютної кількості – у 2,4 рази (p<0,05) порівняно з контролем. Відомо, що IL-2, який синтезу-

ється Т-хелперами I типу, стимулює проліферацію та посилює цитотоксичну активність NK-клітин.

Висновок

1. При розсіяному склерозі незалежно від типу перебігу захворювання спостерігається активація кілерної та гуморальної ланки імунітету.

2. У хворих на розсіяний склероз збільшена кількість CD25⁺, що свідчить про активацію лімфоцитів.

Перспективи подальших досліджень. Дослідження показників клітинного та гуморального імунітету хворих на РС є актуальним і перспективним напрямком для вивчення механізмів імунопатогенезу РС.

Література

1. Borovykov V. STATISTICA: y'skusstvo analy'za dannykh na komp'yutere. Dlya professy'onalov / V. Borovykov. – S-Pb: Py'ter, 2001. – 656 s.
2. Epy'demy'ologiy'chesky'e y'ssledovany'ya rasseyannogo skleroza / E.Y. Gusev, A.N. Bojko, Y.A. Zavaly'shy'n [y' dr.] // Metod. Rekomendacy'u' MZ RF №2003/82. – M., 2003. – 80 s.
3. Berridge M.J. Lymphocyte activation in health and disease / M.J. Berridge // Crit. Rev. Immunol. — 1997. — 17. — P. 155-178.
4. Immunology and Oxidative Stress in Multiple Sclerosis: Clinical and Basic / Genaro G. Ortiz, Fermn P. Pacheco-Moisys, Oscar K. Bitzer-Quintero [et al.] // Approach Clinical and Developmental Immunology Volume 2013, Article ID 708659, 14 pages. — <http://dx.doi.org/10.1155/2013/708659>.
5. Leist T.P. The potential role for cladribine in the treatment of multiple sclerosis: clinical experience and development of an oral tablet formulation / T.P. Leist, P. Vermersch // Curr Med Res Opin. — 2007. — № 23. — P. 2667-2676.
6. McDonald W.I. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis / W.I. McDonald, A. Compston, G. Edan [et al.] // Ann Neurol. – 2001. – V. 50 – P. 121-127.
7. Trapp B.D. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? / B.D. Trapp, K.-A. Nave // Annual Review of Neuroscience. – 2008. – V. 31. — P. 247-269.

УДК 616.832-004.2-097:612.017.1

ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ У ХВОРИХ НА РОЗСІЯНИЙ СКЛЕРОЗ

Вивчар Р. Я., Акімова В. М., Лаповець Л. Е., Кость А. С.

Резюме. В роботі вивчався стан клітинного імунітету у хворих на розсіяний склероз (РС) із різним типом перебігу захворювання. Обстежено 68 хворих з верифікованим діагнозом РС на основі критеріїв MacDonaldetal віком від 19 до 65 років (37 жінок, 29 чоловіків). Первинно прогресуючий тип перебігу встановлено у 19 пацієнтів, вторинно-прогресуючий - у 23, ремітуючо-рецидивуючий тип перебігу – у 26 пацієнтів. Контрольну групу склали 80 практично здорових чоловіків-добровольців віком 25-45 років.

Нами встановлено, що у хворих на розсіяний склероз, незалежно від типу перебігу захворювання спостерігається активація кілерної та гуморальної ланки імунітету та збільшення кількості CD25⁺, що свідчить про активацію лімфоцитів.

Ключові слова: розсіяний склероз, популяції та субпопуляції лімфоцитів.

УДК 616.832-004.2-097:612.017.1

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ РАССЕЯНЫМ СКЛЕРОЗОМ

Вивчар Р. Я., Акімова В. Н., Лаповець Л. Е., Кость А. С.

Резюме. В работе изучалось состояние клеточного иммунитета больных рассеянным склерозом (РС) с различным типом течения болезни. Обследовано 68 больных с верифицированным диагнозом РС на основании критериев MacDonaldetal возрастом от 19 до 65 лет (37 женщин, 19 мужчин). Первично прогрессирующий тип течения установлен у 19 пациентов, вторично-прогрессирующий – у 23, ремитирующе-рецидивирующий тип течения – у 26 пациентов. В контрольную группу вошли 80 практически здоровых мужчин-добровольцев возрастом 25-45 лет.

Нами установлено, что у больных рассеянным склерозом, независимо от типа течения заболевания наблюдалась активация киллерного и гуморального звена иммунитета и увеличение количества CD25⁺, что свидетельствует об активации лимфоцитов.

Ключевые слова: рассеянный склероз, популяции и субпопуляции лимфоцитов.

UDC: 616.832-004.2-097:612.017.1

PECULIARITIES OF CELL-MEDIATED IMMUNITY IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Vivchar R. Y., Akimova V. M., Lapovets L. Y., Kost' A. S.

Abstract. Multiple sclerosis (MS), according to modern notions, is a multifactor chronic progressive disease, characterized by the damage to the central nervous system, a significant pathophysiological mechanism of which being inflammation and autoimmune processes. However, mechanisms of MS immunopathogenesis have not been studied completely.

The condition of cell-mediated immunity in patients with multiple sclerosis with different types of disease course has been studied in the research. In general, 68 patients with verified MS diagnosis based on MacDonald et al criteria aged from 19 to 65 years (37 females, 29 males) have been examined. Primary progressive type of the course has been established in 19 patients, secondary progressive course – in 23, relapsing-remitting course – in 26 patients. Control group included 80 generally healthy men-volunteers aged 25-45 years. Population and subpopulation composition of lymphocytes in the blood was determined using monoclonal antibodies to differential antigens of lymphocytes: CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD56+. To determine processes of early lymphocyte activation, expression on the surface of CD25+ lymphocytes was estimated. Correlation CD4+/CD8+, CD3+/CD19+, CD3+/CD56+ was calculated, proliferative index – (CD4++CD19+)/CD25+. The results of investigation were analyzed by the method of variation statistics by means of STATISTICA 6 (Statsoft, USA) program.

Based on our research, it has been shown that total leukocyte count in the blood in multiple sclerosis was by 33% higher than in control. In patients with primary progressive multiple sclerosis, total count of circulating leukocytes was by 1.46 times higher than in control, in relapsing-remitting course – by 29% higher than in control. According to our data, in MS amount of granulocytes and lymphocytes decreases in peripheral blood (MS 24.65±2.0%, control group 34.0±1.51%), relative amount of neutrophils is increased to 68.72±2.7 % (control group 55.2±2.0 %), relative amount of stab cells is higher (MS 5.21±0.4%, control group 2.01±0.18%) as compared with control. In patients with MS, the decrease in absolute amount of T-helpers by 28%, the increase in amount of T-cytotoxic lymphocytes by 38% in relation to control has been established. Respectively, CD4+/CD8+ correlation probably decreases. Similar tendency was also observed in groups with different types of MS course. Largely, absolute amount of CD4+ lymphocytes (31%) was decreased in the group with relapsing-remitting type of the course. Reduction of CD3+ is typical for MS exacerbation, while normalization – for MS remission. Simultaneously, the increase in relative and absolute amount of B-lymphocytes and NK-cells has been established, respectively the decrease in CD3+/CD19+ and CD3+/CD56+ correlation has been recorded. Our investigation showed elevation of circulating lymphocytes in patients with MS regardless of the type of the disease course. It has been established that expression of CD25+ on lymphocytes intensifies in multiple sclerosis, indicating their activation due to antigenic stimulation. Elevation of CD25+ lymphocytes in the blood can be regarded as the increase in amount of activated T-lymphocytes, which may include regulatory T-lymphocytes. Simultaneously, CD8+ lymphocytes are regarded as cytotoxic cells of antitumor and antiviral immune defense, which provoke delayed hypersensitivity. Thus, meaning of CD4+/CD8+ index acquires not immunoregulatory significance, but meaning of the index which presents relation of regulatory processes, represented by T-helpers, to effector ones, provided by T-cytotoxic lymphocytes. CD56+ lymphocytes are natural killers, able to destroy target cells directly, and they also represent antiviral and antitumor immunity. Based on conducted investigations, it has been established that relative amount of NK-cells in multiple sclerosis is increased by 1.7 times, absolute amount – by 2.4 times ($p < 0.05$) as compared with control.

Investigation of indices of cell-mediated and humoral immunity in patients with MS is a current issue and perspective direction for the study of MS pathogenesis mechanisms.

Keywords: multiple sclerosis, populations and subpopulations of lymphocytes.

Рецензент – проф. Литвиненко Н. В.

Стаття надійшла 12.06.2017 року