

УДК:616-097:616.211-006-001.8

**ПОКАЗНИКИ СИСТЕМОЇ ТА ЛОКАЛЬНОЇ
ІМУНОЛОГІЧНОЇ РЕАКТИВНОСТІ
У ХВОРИХ НА РЕСПІРАТОРНИЙ ПАПІЛОМАТОЗ***САМБУР М.Б., ЗАБОЛОТНИЙ Д.І., САВЧЕНКО Т.Д.,
КРИВОХАТСКАЯ Л.Д., ЗАЄЦЬ Т.А., ТИМЧЕНКО М.Д.,
ТИМЧЕНКО С.В., СИДОРЕНКО Т.В., ШУКЛІНА Ю.В.*

ДУ «Інститут отоларингології ім.проф.О.С.Коломійченка НАМН України», Київ

Одним із найважливіших чинників, які визначають стійкість або чутливість до вірусів папілом людини (ВПЛ), є стан імунологічної реактивності організму, включаючи продукцію імунорегуляторних цитокінів, серед яких особливе значення має система інтерферону. Як показано багатьма клініко-імунологічними дослідженнями персистуюча інфекція порушує імунологічну реактивність організму, призводить до формування вторинного імунодефіцитного стану, що значною мірою впливає на клінічний перебіг захворювань та ефективність лікування [1-3]. Метою нашого дослідження стало визначення показників системного та локального імунітету у хворих на респіраторний папіломатоз.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження стану системи імунітету були проведені у 16 хворих на респіраторний папіломатоз (РП), а саме на папіломатоз гортані та глотки. Отримані дані співставляли з аналогічними показниками у 10 практично здорових осіб контрольної групи.

Дослідження показників крові хворих здійснювали, одержуючи сироватку крові та виділяючи мононуклеарні клітини в градієнті щільності фіколл-верографіну. Системну імунологічну реактивність хворих оцінювали, визначаючи субпопуляційний склад лімфоцитів крові (кількість CD3⁺, CD4⁺ та CD8⁺ клітин) за допомогою реакції розеткоутворення з частками, покритими моноклональними антитілами до лімфоцитарних CD - маркерів [4], а також рівень функціональної активності природних цитотоксичних клітин (ПЦК) [5], вміст імуноглобулінів класів М, G, А [6], циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) в сироватці крові [7]. Стан локального імунітету в області ротоглотки оцінювали, визначаючи концентрацію гамма-інтерферону методом імуноферментного аналізу за допомогою набору реактивів «ИФА-IFN-гамма» та рівень специфічних IgE-антитіл до антигенів сполучної тканини (АСТ) в секреті ротоглотки хворих, для виявлення яких застосовували тест непрямой деградації тучних клітин [8].

Систему інтерферону (ІНФ) крові вивчали, використовуючи метод індукції інтерферону у

мікрокількостях нерозведеної крові в модифікації [9]. Як індуктор для α -ІФН використовували вірус хвороби Ньюкасла (вакцинний штам Н) 10ТДЦ на клітину, γ -інтерферон стимулювали за допомогою мітогену фітогемаглютинину (ФГА) «Difco» в концентрації 5-10 мкг/мл. Крім того, вивчали спонтанну продукцію інтерферону клітинами крові хворих. Оптимальний час для стимуляції α -ІФН – 24 год., γ -ІФН – 42-72 год. при температурі 37°C. Активність інтерферону оцінювали за пригніченням цитопатичної дії тест вірусу (вірус везикулярного стоматиту) штам Індіана в культурі клітин Нер-2.

Оптичним густину вимірювали при довжині хвилі 570 нм.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням непараметричного критерію U Вілкоксона-Манна-Уїтні за допомогою пакету програм для статистичної обробки біометричних даних WinPEPI та за методом кутового перетворення Фішера [10]. Статичну обробку даних інтерферонного статусу хворих проводили, визначаючи вірогідність різниці середньої величини за допомогою критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Як відомо, серед клітинних реакцій реактивності у хворих на РП важливу роль як для перебігу, так і для прогнозу захворювання відіграють показники функціональної активності природних цитотоксичних клітин.

Проведені дослідження показали, що показники рівнів природної цитотоксичної активності (ПЦА) мононуклеарних клітин периферичної крові хворих із респіраторним папіломатозом за середніми значеннями не відрізнялись суттєво від аналогічних показників у осіб контрольної групи (табл.1).

Проте, приймаючи до уваги велику варіабельність цих показників у хворих на РП, було проведено індивідуальний аналіз одержаних даних. Отримані результати, наведені в таблиці 2, показали, що тільки у 21 % хворих із РП визначались нормальні рівні ПЦА клітин крові, у 33% пацієнтів вони були підвищені, а у 46 % осіб – знижені.

Таблиця 1

Показники клітинного імунітету у хворих на РП

Показники	Хворі на РП	Контрольна група
ПЦА, %	25,6 (0,0-96,0)	26,5 (20,3-34,5)
CD3 ⁺ -лімфоцити, %	57,8 (42,0- 73,0)	53,8 (40,0-65,0)
CD4 ⁺ -лімфоцити, %	31,2 (22,0-46,0)	36,6 (30,0-48,8)
CD8 ⁺ -лімфоцити, %	16,4 (10,0-21,0)	20,1 (14,0-28,0)
ІРІ	1,9 (1,30-3,17)	1,8 (1,50-2,16)

Примітки: 1- в дужках подані межі коливань;

Таблиця 2

Кількість хворих на РП з різними рівнями ПЦА клітин крові

Рівні ПЦА	Кількість хворих, %
нормальні	21
підвищені	33
знижені	46

Крім того було показано, що відносна кількість Т-лімфоцитів, їх CD4⁺-, CD8⁺- субпопуляцій та індекс імунологічної реактивності (ІІР) у хворих на РП суттєво не відрізняються від значень аналогічних показників у обстежених осіб контрольної групи.

Стан гуморальних механізмів захисту хворих на РП оцінювали, визначаючи вміст сироваткових імуноглобулінів різних класів та циркулюючих імунних комплексів.

Аналіз досліджень вмісту сироваткових імуноглобулінів різних класів показує, що у хворих на

РП при порівнянні з даними здорових донорів визначається збільшення кількості сироваткового ІgM, (табл. 3). Вміст ІgА також має тенденцію до збільшення, що визначається за рахунок підвищення концентрації цього імуноглобуліну більше, ніж до 2,5 г/л у 6 пацієнтів (40% хворих). Показник вмісту сироваткового ІgG у більшості пацієнтів не виходив за межі фізіологічних значень.

Визначення концентрації циркулюючих імунних комплексів показало, що у хворих на РП показники ЦІК суттєво перевищують такі у осіб контрольної групи (табл.3).

Таблиця 3

Показники гуморального імунітету хворих на РП

Показники		Хворі на РП	Контрольна група
ІgM, г/л	СЗ	1,5*	1,1
	МК	0,6 – 3,1	0,5-1,6
ІgG, г/л	СЗ	11,2	12,0
	МК	7,2 – 15,5	10,5-15,0
ІgА, г/л	СЗ	2,3	1,8
	МК	0,7 – 5,9	1,0-2,4
ЦІК, од.опт.щільн	СЗ	64,1*	28,1
	МК	7,0-155,0	0-62,0

Примітки: 1. СЗ-середні значення; 2.МК-межі коливань; 3. *- достовірність розбіжностей ($p_{0,05}$) порівняно з контролем.

Дослідження показників інтерферонового статусу у хворих на РП вивчали за: кількістю циркулюючого в крові сироваткового інтерферону; рівнем продукування α -ІФН мононуклеарами крові *in vitro* під впливом вірусного індуктора та рівнем продукції γ -ІФН *in vitro* під дією мітогена – фітогемаглютинину.

Результати вивчення показників інтерферонового статусу, наведені в таблиці 4, вказують на те, що середньоквадратичні титри α - та γ -інтерферонів у хворих були знижені і достовірно

відрізнялись від показників в контрольній групі. Аналіз показників спонтанної продукції та загального рівня сироваткового інтерферону свідчить про їх вірогідне збільшення у хворих на РП у порівнянні з аналогічними показниками у осіб контрольної групи.

Визначення кількісного вмісту γ -ІФН в секреті ротоглотки хворих на РП засвідчило тенденцію до збільшення його вмісту на тлі маніфестації клінічних проявів захворювання (табл.5).

Таблиця 4

Показники інтерферонового статусу у хворих на РП

Показники	Середні титри інтерферону, од/мл	
	Контрольна група	Хворі на РП
Рівні продукції ІФН- α	34,8 \pm 2,5	13,2 \pm 2,4*
Рівні продукції ІФН- γ	14,6 \pm 1,7	6,3 \pm 1,6*
Рівні спонтанної продукції ІФН- α	2,3 \pm 2,0	4,2 \pm 1,6*
Рівні сироваткового ІФН- γ	7,3 \pm 1,7	12,4 \pm 2,0*

Примітка: 1. *-результати, які вірогідно відрізняються від контролю

Таблиця 5

Вміст γ -інтерферону в секреті ротоглотки хворих на РП

Статистичні показники	Концентрація γ -інтерферону, пг/мл	
	Контроль	Хворі на РП
Середнє значення	10,5	19,8
Межі коливань	0 – 25	0 – 62,9

Відомо, що довготривале та глибоке ушкодження тканин внаслідок формування та росту новоутворень сприяє виникненню реакцій аутосенсibiliзації. Зважаючи на те, що при формуванні папілом верхніх дихальних шляхів ушкоджується не тільки епітеліальні, а й прилеглі структури сполучної тканини, було проведено дослідження вмісту специфічних до антигену сполучної тканини (АСТ) Ig E - антитіл в секреті ротоглотки хворих.

Отримані дані показали, що специфічні до АСТ IgE - антитіла у хворих на РП виявляються вірогідно частіше (у 50,0% випадків, P < 0,05), ніж у осіб контрольної групи (11,8% випадків).

Таким чином, одержані результати досліджень вказують на те, що у хворих на РП визначаються суттєві порушення показників системного та місцевого імунітету, які проявляються різноспрямованими змінами функціональної активності природних цитотоксичних клітин, порушеннями інтерферонового статусу, а саме

пригніченням продукції λ - та γ -інтерферонів, підвищенням рівня сироваткового інтерферону та спонтанної продукції інтерферону клітинами крові *in vitro*, гіперімуноглобулінеміями класів М та А, збільшенням рівня ЦІК. Крім того у хворих на РП були визначені підвищення концентрації γ -інтерферону та суттєве збільшення частоти виявлення специфічних до АСТ IgE-антитіл в секреті ротоглотки .

Одержані результати обґрунтовують перспективність використання імуномодуючих препаратів при лікуванні хворих на РП як протирецидивних засобів, здатних корегувати більшість визначених у них порушень імунологічної реактивності, на тлі яких перебігають клінічні прояви захворювання, та вказують на доцільність проведення подальшого клініко-імунологічного моніторингу та вивчення ефективності застосування таких препаратів у хворих на респіраторний папіломатоз в різні строки після курсу лікування.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Самбур М.Б., Кривохатська Л.Д., Кікоть Ю.В., Пелешенко Н.О. Інтерфероновий статус хворих на запальні захворювання верхніх дихальних шляхів на тлі активації вірусної інфекції// Імунологія та алергологія. – 2008. – №1. – С.63-64
2. Самбур М.Б., Заболотний Д.І., Савченко Т.Д., Заяц Т.А., Тимченко С.В., Тимченко М.Д., Кікоть Ю.В., Костюченко О.Л. Стан клітинного та гуморального імунітету у хворих на передракові захворювання гортані// Журн. вушних, носових та горлових хвороб.- 2011.-№4.-С.2-6.
3. Самбур М.Б., Заболотний Д.І., Савченко Т.Д., Кривохатська Л.Д., Заєць Т.А., Тимченко М.Д., Кікоть Ю.В. Динаміка змін імунного гомеостазу у хворих на передракові захворювання верхніх дихальних шляхів після комплексного лікування// Журн. вушних, носових та горлових хвороб.-№ 4 .-2012.- С.9-13
4. Новиков Д.К., Новиков П.Д. Метод определения Т- и В- лимфоцитов диагностики умами на основе моноклональных антител// Имунология.-2000.-№2.-С.31-33.
5. Мельников О.Ф., Заяц Т.А. Сравнение радиоизотопного и спектрофотометрического метода определения цитотоксичности клеток // Лаб.диагностика.-1998.-№1.-С.43-45.
6. Jerne N., Nordin A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells //Science.-1963.-v.140.-3565.-P.405.
7. Белозеров Е.С., Макарова Т.А. Преципитационный метод исследования иммунных комплексов у больных вирусным гепатитом В // Лаб. дело.-1982.-№12.-С.741-743.
8. Ишимова Л.М. Тучные клетки соединительной ткани и базофилы крови в диагностике аллергии немедленного типа. Проблемы иммунологической реактивности и аллергии. М., «Медицина», 1971, стр.146-159.
9. Інтерфероновий статус людини при вірусних інфекціях. Метод. рекомендації . Дзюблик І.В., Трохименко О.П., Кривохатська Л.Д., Ковалюк О.В. – Київська медична академія після дипломної освіти ім. П.Л.Шупика МОЗ України.-2002.-12 с.
10. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов.-Л.: Медицина, 1978.-296 с.

РЕЗЮМЕ

ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМНОЙ И ЛОКАЛЬНОЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ У БОЛЬНЫХ РЕСПИРАТОРНЫМ ПАПИЛЛОМАТОЗОМ

Самбур М.Б., Заболотний Д.І., Савченко Т.Д., Кривохатская Л.Д., Заєць Т.А., Тимченко М.Д., Тимченко С.В., Сидоренко Т.В., Шуклина Ю.В.

ДУ «Інститут отоларингології ім.проф.О.С.Коломійченка НАМН України», Київ

Исследования системной и локальной иммунологической реактивности больных респираторным папилломатозом выявили у них изменения показателей клеточного и гуморального иммунитета в виде разнонаправленных изменений функциональной активности естественных цитотоксических клеток, нарушений интерферонового статуса, гипериммуноглобулинемии классаов М и А, повышения уровня ЦИК, увеличения концентрации γ -интерферона и частоты выявления специфических IgE-антител к антигенам соединительной ткани в секрете ротоглотки.

SUMMARY

SYSTEM AND LOCAL IMMUNE REACTIVITY INDICES IN PATIENTS WITH RESPIRATORY PAPILLOMATOSIS

Sambur M.B., Zabolotny D.I., Savchenko T.D., Krivokhatskaya L.D., Zayets T.A., Timchenko M.D., Timchenko S.V., Sidorenko T.V., Shuklina Yu.V.

Investigation of systemic and local immune reactivity in patients with respiratory papillomatosis has been revealed disturbances in indices of cellular and humoral immunity such as varied changes of NK-cells functional activity, interferon system disfunction, IgM- and IgA- hyperimmunoglobulinemia, increase of immune complexes level in circulation, γ -interferon concentration and frequency of specific IgE-antibodies to connective tissue antigens determination in secretion of stomatopharynx.