

ІМУННИЙ СТАТУС ДІТЕЙ З ДОПЕЧІНКОВОЮ ФОРМОЮ ПОРТАЛЬНОЇ ГІПЕРТЕНЗІЇ

Джума К.А., Притула В.П., Годік О.С., Іщенко М.І.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

Ключові слова: портальна гіпертензія, імунний статус, діти

За сучасними поглядами портальна гіпертензія є поліорганним захворюванням, що характеризується стійким порушенням як спланхнічного, так і системного кровообігу, які призводять до формування колатеральної портосистемної мережі [4,5,10]. Розвиток ускладнень портальної гіпертензії свідчить про перехід захворювання у стадію декомпенсації, для якої характерне поєднання варикозно розширених вен стравоходу та шлунка з епізодами кровотеч, жовтяниці, набряково-асцитичний синдром, хронічна портосистемна енцефалопатія. Крім того, часті рецидивуючі вірусні й грибкові інфекції верхніх дихальних шляхів та шкіри свідчать про наявність вторинних імунологічних порушень у таких хворих.

Спроби лікування імунологічних ускладнень, які спостерігаються у 90% хворих на портальну гіпертензію дітей, мали місце ще на початку ХХ ст. Тоді імунологічні порушення зводили до лейкоцитопенії, а останню пояснювали виключно підвищеним розпадом формених елементів крові в збільшеній селезінці у відповідь на зниження функціональної активності купферівських клітин печінки – гіперспленізмом [2,3,8,9]. Тому єдиним ефективним імунокорегуючим методом вважалась спленектомія.

Однак, аналізуючи ранні та віддалені результати спленектомій з приводу гіперспленізму при допечінковій портальній гіпертензії, було встановлено, що у 50% випадків у ранньому постопераційному періоді виникали гнійно-септичні ускладнення: сепсис, менінгіт, пневмонії, нагноєння післяопераційної рани [6,7,9]. У віддаленому періоді не зникали явища гіперспленізму – у периферійній крові спостерігалось лише незначне підвищення кількості лейкоцитів [1,3,10].

Механізм збереження гіперспленізму після спленектомії був вивчений за допомогою радіоізотопних методів. Було виявлено, що після спленектомії значно підвищувалось накопичення колоїду з міченим радіоактивним ізотопом ^{99m}Tc кістковим мозком у порівнянні з неопераваними дітьми [3,5]. Отже, підвищення функціональної активності ретикулоглістотарної системи кровотворних органів пояснює вторинний постспленектомічний гіперспленізм. А численні дослідження імунологічного статусу дітей після спленектомії виявили зниження вмісту імунорегуляторних субпопуляцій лімфоцитів, пригнічення нейтрофільного фагоцитозу, порушення синтезу імуноглобулінів [3, 11].

Останніми роками було доведено, що спленектомія не справляє позитивного впливу на імунний статус дітей з допечінковою формою портальної гіпертензії, а навпаки

спричиняє зниження антиінфекційної резистентності і підвищує ризик розвитку септичних станів.

Таким чином, необхідність пошуку імунокорегуючої терапії для покращення стану імунної системи у дітей з допечінковою формою портальної гіпертензії до операції обумовлює необхідність поглибленого вивчення сутності і патогенезу імунологічних змін у таких пацієнтів.

Мета дослідження

Встановити характер і ступінь порушень з боку імунної системи у хворих на допечінкову форму портальної гіпертензії дітей.

Задачі дослідження:

- дослідити зміни клітинної ланки імунної системи – субпопуляції лімфоцитів;
- вивчити стан гуморальної ланки імунної системи – імуноглобуліни, циркулюючі імунні комплекси;
- оцінити стан факторів неспецифічного захисту – фагоцитозу та НСТ-тесту;
- визначити основні імунопатологічні синдроми;
- визначити провідні фактори, які спричиняють імунопатологічний процес.

Клінічна характеристика пацієнтів.

У дослідження включено 17 хворих з допечінковою формою портальної гіпертензії віком 1,5-16 років. Серед них 8 хлопчиків і 9 дівчаток. Спленомегалію було виявлено у 16 (94,1%) хворих. Вторинний гіперспленізм, що визначався поєднанням спленомегалії та панцитопенії в периферійній крові, спостерігався у 15 (88,2%) пацієнтів. Вираженість вторинного гіперспленізму характеризувалася ступенем тромбоцитопенії периферійної крові: помірний (кількість тромбоцитів 150-100 Г/л) зареєстровано у 13 (76,5%) пацієнтів; виражений (кількість тромбоцитів менше 100 Г/л) – у 2 (11,8%) хворих.

Основною причиною звернення хворих у стаціонар були кровотечі з варикозно розширених вен стравоходу або шлунка – 14 (88,2%) дітей. У всіх хворих вказано на диспептичні явища: нудоту, поганий апетит, метеоризм. Хворі скаржилися на загальну слабкість, важкість у лівому підбер'ї, кровоточивість слизових оболонок носа, ясен.

Анемію мали 15 (88,2%) хворих, з них легкого ступеня – 5 (29,4%), середнього ступеня – 7 (41,1%), важкого ступеня – 3 (17,7%).

В період дослідження у пацієнтів не відмічалось інфекційних захворювань та супутньої патології, яка значно могла впливати на імунний статус дітей. За даними біохімічного дослідження, у хворих не було виявлено порушень метаболічних функцій печінки.

Матеріали та методи дослідження

Імунологічний статус вивчали двічі: при первинному поступленні хворих у клініку та при повторній госпіталізації безпосередньо перед оперативним лікуванням – порто-системним шунтуванням. Середні значення двох досліджень порівнювали із загальноприйнятими віковими стандартами імунологічних показників.

Для оцінки стану імунної системи у хворих збирали імунологічний анамнез, використовували загальноприйнятні лабораторні методи – лейкоцитарна формула, коагулограма та комплекс імунологічних методів, що включав вивчення субпопуляційного складу імунокомпетентних клітин периферійної крові, визначення в сироватці крові імуноглобулінів (Ig) та циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), дослідження функціональної активності імунокомпетентних клітин та факторів неспецифічного захисту.

Субпопуляційний склад імунокомпетентних клітин визначали за допомогою моноклональних антитіл методом імунофлюорисценції. Прямий метод флюоресценції полягає у використанні анти- CD+/- моноклональних антитіл. До яких приєднана флюорисцентна мітка (флюорисциу ізотіоціанат-ФІТЦ), який дає в ультрафіолетових променях зелене свічення. Результати підраховували з використанням флюорисцентного мікроскопу. Визначали наступні показники: абсолютний та відносний вміст лімфоцитів з маркерами диференціації CD3+ – Т-лімфоцити, CD22+ – В-лімфоцити; CD4+ – Т-хелпери, CD8+ – Т-супресори, CD16+ – NK-клітини (природні кілери).

Вміст основних класів сироваткових імуноглобулінів IgG, IgA, IgM визначали стандартним турбидиметричним методом за допомогою автоматичного біохімічного аналізатора “Мікролаб 300”.

Вміст середньомолекулярних ЦІК визначали методом, що ґрунтується на преципітації ЦІК з використанням 5% розчину поліетиленгліколю.

Для оцінки факторів неспецифічного захисту визначали фагоцитуючу спроможність лейкоцитів крові: лейкоцити, виділені із периферичної крові, змішували із сус-

пензією латексу і інкубували 30 -60 хвилин. У фіксованих фарбованих мазках підраховують відсоток фагоцитуючих клітин (фагоцитарне число – ФЧ) та кількість латексних часточок, поглинутих одним фагоцитом (фагоцитарний індекс – Фі). Рівень активності фагоцитів оцінювали за допомогою НСТ-тесту, при цьому визначали середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) та відсоток НСТ-позитивних клітин. Даний тест характеризує окислювально-відновлювальний потенціал нейтрофілів. У основі реакції лежить відновлення в цитоплазмі нейтрофілів нітросинього тетразолію до дифармозину під впливом супероксидного аніону, який утворюється при активації клітини. При змішуваних краплі крові із розчином нітросинього тетразолію (НСТ) останній шляхом піноцитозу потрапляє до нейтрофілів, накопичується в фагоцитарних вакуолях, і після активації нейтрофілів латексом розчинний барвник НСТ перетворюється у нерозчинний темносиній формазан.

Для статистичної обробки результатів дослідження використовували програму “Microsoft Of?ce Excel 2007”. Оцінку вірогідності різниці між досліджуваною групою проводили з використанням параметричного критерію Ст’юдента та непараметричного критерія Колмогорова-Смирнова.

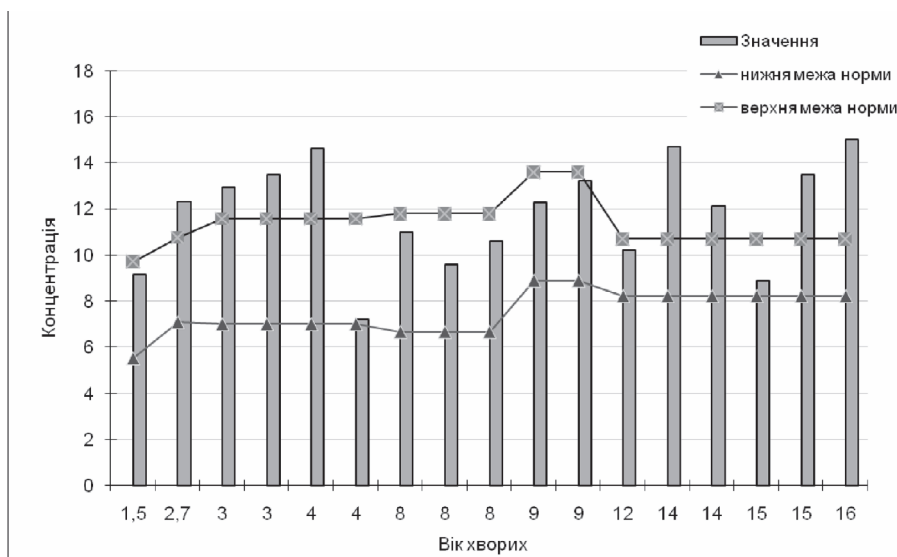
Результати та обговорення

При вивченні показників гуморального імунітету встановлено, що вміст сироваткового IgG незначно, в середньому на 20% (1,9±0,45 г/л), але статистично достовірно перевищує стандартні вікові показники у молодшій віковій групі (n=4) та у старшій віковій групі (n=4) (гіст. 1).

Вміст сироваткового IgM значно перевищує верхню межу стандартних показників майже у всіх пацієнтів (n=16) (94%), у частини дітей (n=7) – в 2-3 рази, а у частини (n=9) – в 4-7 разів (гіст. 2). Спостерігається значна варіабельність значень концентрації IgM – коефіцієнт варіації в одній віковій групі становить 58,2. Спостерігається незначне підвищення показників сироваткового Ig A у n=10 (58,8%) 1,5-2 рази, та він значно підвищений у n=4 (23,5%) у 3-4 рази (гіст. 3).

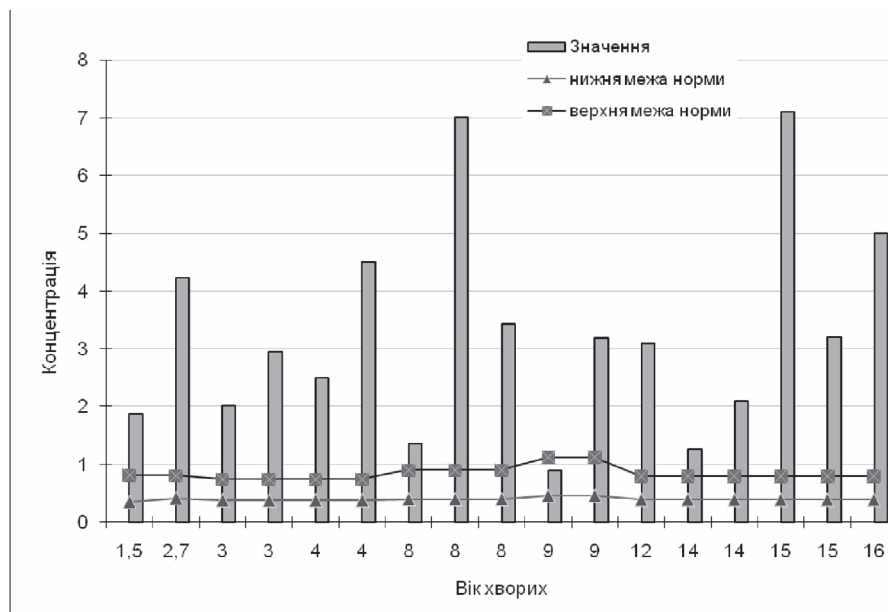
Гістограма 1

Вміст сироваткового Ig G у хворих на портальну гіпертензію, г/л



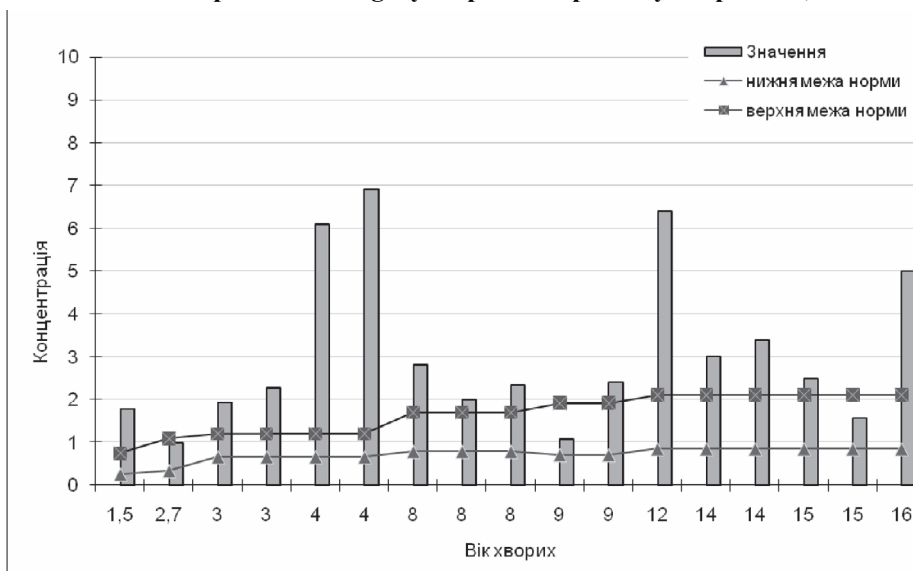
Гістограма 2

Вміст сироваткового Ig M у хворих на портальну гіпертензію, г/л



Гістограма 3

Вміст сироваткового Ig A у хворих на портальну гіпертензію, г/л



Всі обстежені діти мали достатній рівень імуноглобулінів за результатами двох обстежень, щоб зробити висновок, що ці діти не мали генетичного дефіциту гуморальної ланки імунітету. Клінічні та імунологічні зміни у них мають характер вторинного імунодефіциту, що пов'язаний з основним захворюванням.

Підвищення показників IgM, IgA, та IgG у дітей свідчить про підвищення антигенного навантаження на імунну систему з боку органів травлення внаслідок шунтування крові насиченої антигенами у системний портальний кровоток. Найбільше підвищення імуноглобуліну M може свідчити про роль умовно патогенної кишкової флори як фактора антигенемії. Зазвичай імуноглобулін M бере участь в первинній імунній відповіді, виконує функцію бактеріолізину та антигін проти грамнегативних бактерій, переважно більшість яких є

в складі мікрофлори кишківника. Незначне підвищення сироваткового імуноглобуліну A може свідчити про те, що антигени кишківника більше впливають на продукцію секреторного імуноглобуліну, який цікаво було б визначити і порівняти його рівень з рівнем сироваткового імуноглобуліну. Секреторний імуноглобулін A знаходиться в великій кількості в секретах органів травлення, де існує найвище бактеріальне навантаження на систему травлення. Ще один висновок випливає з отриманих даних дослідження: серед пацієнтів не було жодного з генетичним селективним дефіцитом імуноглобуліну A, який зустрічається часто, з частотою 1:600 в популяції. До IgG відносять антитіла проти грам-позитивних бактерій, вірусів та токсинів. Тому незначне підвищення імуноглобуліну IgG може свідчити про перевагу імунної відповіді на грамнегативну флору.

Імуноглобуліни відіграють важливу роль в антибактеріальному та антитоксичному імунітеті. До операції, можливо, необхідно проведення дезінтоксикаційної терапії з використанням сорбентів, ферментів, пробіотиків та пребіотиків з метою зниження антигенного впливу на імунітет та профілактики гнійно-септичних ускладнень. Додаткове введення імуноглобулінів пацієнтам після операції може покращити антибактеріальний та антитоксичний імунітет. Імуноглобуліни здатні нейтралізувати патогени, іммобілізувати бактеріальні клітини, блокувати адгезію бактерій та грибків до епітелію, інактивувати циркулюючі в крові токсичні речовини. Ефект нейтралізації приводить до формування імунних комплексів, які або видаляються із організму з біологічними секретами, або фагоцитуються макрофагами селезінки та печінки.

Ми проводили визначення вмісту середньомолекулярних ЦІК у 16 пацієнтів (94,1%). Рівень ЦІК в середньому становив $152 \pm 3,62$ од., що у 3 рази перевищує норму – 50 од. Такі дані свідчать про надлишок антигену в організмі та функціональну недостатність антитіл. Імуноterapia, яка направлена на зменшення антигенемії та сприяла би виведенню імунних комплексів, покращувала би післяопераційний стан пацієнтів.

Збільшення кількості імунних комплексів підвищує навантаження на фагоцитарну систему організму. Ми визначали фагоцитарний індекс та фагоцитарне число у пацієнтів до операції. При індивідуальному аналізі розподілу показників у пацієнтів встановлено, що зміни у показнику фагоцитарного індексу не було ($58,4 \pm 11,7\%$), а фагоцитарне число – знижено до 6 у половини пацієнтів. Такі дані можуть свідчити про виснаження фагоцитуючих клітин та можливість використання препаратів, що покращують фагоцитоз для імунореабілітації пацієнтів до операції та після неї.

Отримані нами дані частково співпадають з даними раніше проведених досліджень [2,4,9,10], однак на основі даного алгоритму обстежень ми провели поетапну оцінку імунного статусу пацієнтів, що дає можливість перейти від емпіричних підходів до більш глибоких патогенетичних принципів. Відомо, що головними компонентами функціонування імунної системи є розпізнавання, активація, проліферація, диференціація та регуляція. Тому для оцінки кожного з цих етапів потрібен набір найбільш повно характеризуючи тестів, які ми використали. Крім того,

нами був проведений індивідуалізований аналіз окремих показників факторів гуморального імунітету, що дозволило більш детально зрозуміти закономірності імуннопатологічних процесів.

Усім пацієнтам була зроблена лейкограма. З даних наведеної гістограми 4 видно, що у половини пацієнтів ($n=8$, 50%) має місце абсолютна лейкопенія, у 4 – показник знаходиться на нижній границі вікової норми, у решти ($n=4$) – нормальний рівень лейкоцитів або перевищує норму. Такі дані свідчать про прояви гіперспленізму у дітей з до печінковою формою гіперспленізму.

Аналіз відносної кількості лімфоцитів показав, що у переважної більшості пацієнтів 12 (67%) має місце лімфопенія (відносна та абсолютна). Такі дані є проявом вторинного імунодефіциту на тлі гіперспленізму.

Аналіз середніх показників субпопуляційного складу лімфоцитів у дітей до операції показав, що у всіх пацієнтів вірогідно знижена відсоткова кількість Т-клітин ($49,7 \pm 4,7\%$) у порівнянні із стандартними віковими показниками (гіст. 7). Індивідуальний аналіз імунограм показав, що у 50% пацієнтів спостерігається зменшення кількості клітин у середньому до $(1,74 \pm 2,9)$ г/л у порівнянні з показниками норми (табл. 1).

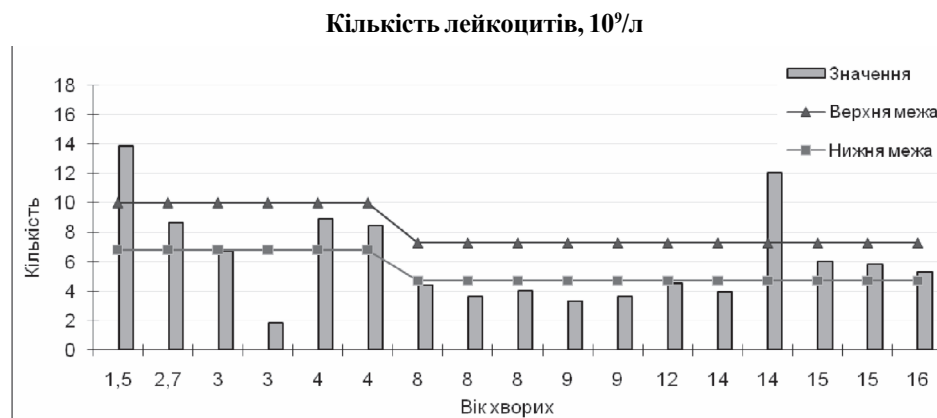
Аналіз середніх показників субпопуляційного складу лімфоцитів показав достовірне зниження загальної кількості лімфоцитів CD3+, Т-супресорів CD8+. Кількість CD16+ клітин у дітей до операції мала виражену тенденцію до збільшення. Відсоткова кількість В-лімфоцитів (CD22+) вірогідно не відрізнялася від норми (табл. 3).

Важливі не тільки дані субпопуляційного складу лімфоцитів, а і співвідношення між ними CD4+/CD8+. У дітей з портальною гіпертензією відповідно змінам кількості CD4+ та CD8+ клітин, співвідношення CD4+/CD8+ було незначно підвищене до $1,37 \pm 0,24$.

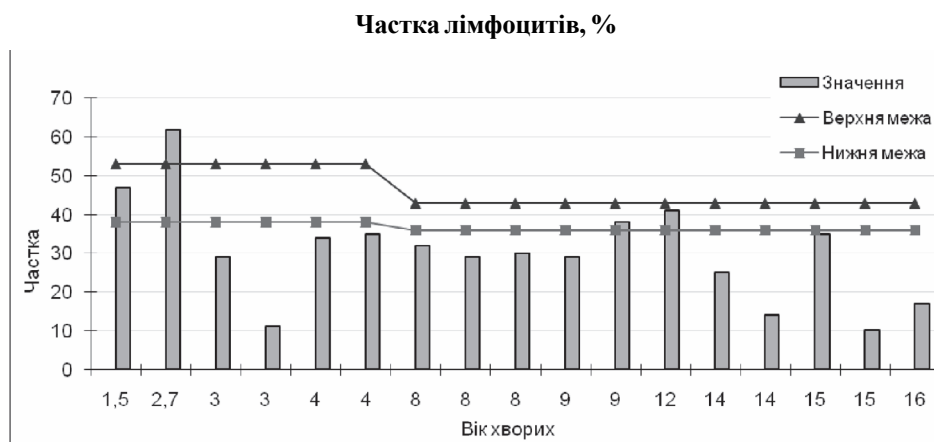
Оцінюючи показники спонтанного та стимульованого НСТ-тесту у порівнянні з нормою, спостерігається їх ріст, що свідчить про активізацію окислювальних систем фагоцитів у відповідь на підвищену антигенну стимуляцію (табл. 2).

Таким чином, проведені імунологічні дослідження показали, що у більшості дітей з ДПГ має місце напруження гуморальної ланки імунітету (IgM, та IgA) та фагоцитозу, вторинний клітинний імунодефіцит із зниженням загальної кількості лейкоцитів, лімфоцитів та субпопуляцій лімфоцитів (CD 3+, CD4+, CD8+).

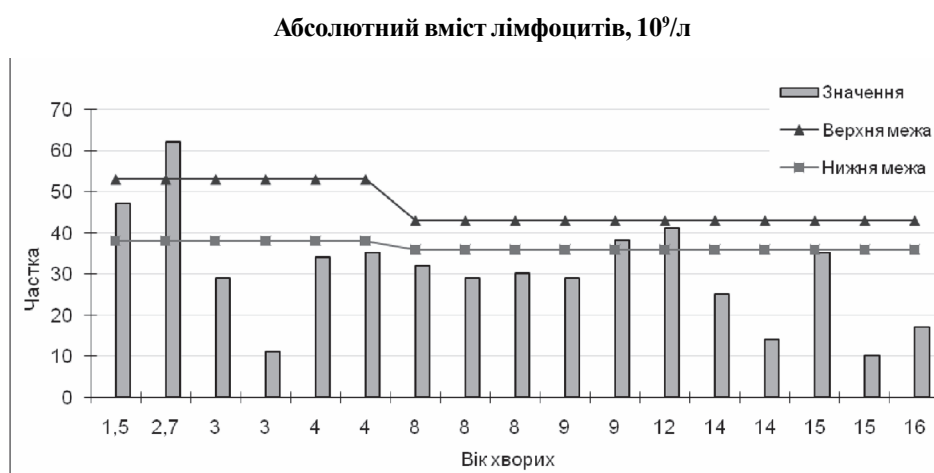
Гістограма 4



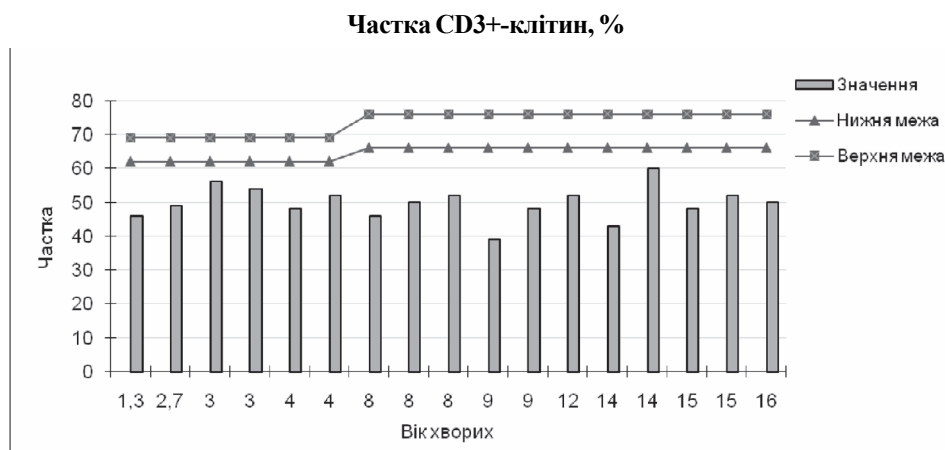
Гістограма 5



Гістограма 6



Гістограма 7



Таблиця 1

Абсолютний вміст CD3+-клітин

Середнє значення	1,18
Дисперсія	0,68
Середнє відхилення	0,6
Варіація	47,18

Таблиця 2

НСТ-тест

	Спонтанний	Стимульований
Середнє значення	55,05	64,17
Середнє відхилення	5,03	6,62

Середні показники субпопуляційного складу Т-лімфоцитів, %

Популяції клітин (%)	Пацієнти до операції (n=17)	Стандартні вікові показники
Т-лімфоцити (CD3+)	49,7±4,7	69±5 (p<0,05)
Т-хелпери (CD4+)	32,82±6,67	35,5±3 (p>0,05)
Т-супресори (CD8+)	23,2±3,93	30±3 (p<0,05)
Тх/Тк CD4+/ CD8+	1,37±0,24	1±0,5 (p>0,05)
ПК (CD16+)	22,58±3,34	12±2 (p<0,05)
В-лімфоцити (CD22 +)	18±5,4	24±4 (p<0,05)

Висновки:

1. Портальна гіпертензія у дітей супроводжується різними ступенями імунних порушень.

2. Виявлено вірогідне підвищення рівня IgM, Ig A та рівня ЦІК при нормальних показниках IgG.

3. Аналіз факторів неспецифічного захисту виявив незначне відхилення в рівні фагоцитарного числа та нормальні показники фагоцитарного індексу. Підвищення показників НСТ-тесту свідчить про підвищену активацію нейтрофілів.

4. Відсоткова кількість CD 22+ у дітей з ПГ не відрізняється від здорових, а відсоткова кількість CD16+ має тенденцію до підвищення. Вірогідне зниження виявлено в кількості відносній та абсолютній CD 3+, CD4+, CD8+ клітин та в співвідношенні CD4+/ CD8+.

5. У дітей з ДПГ виявлений вторинний клітинний імунodefіцит, лейкопенія та реакція організму (напруження гуморальної ланки імунітету та ріст НСТ) на підвищене антигенне навантаження на імунну систему.

6. Показники імунного статусу дітей необхідно враховувати при моніторингу дітей з ДПГ, для підбору імунорегулюючої терапії з метою уникнення післяопераційних ускладнень, виборі методу хірургічного лікування і тактиці подальшого ведення таких пацієнтів.

Рецензент: д.мед.н., професор Д.Ю.Кривченя

ЛІТЕРАТУРА:

1. Асламазова Е.Б. Гемопоз после операций при портальной гипертензии [Текст] / Е.Б. Асламазова, Е.И. Семёнская // Хирургия. - 1977. - №3. - С.58-63.

2. Гафаров О.А. Иммунный статус детей с внепечёночной портальной гипертензией после спленэктомии

[Текст] / О.А. Гафаров, А.Ф. Леонтьев, В.М. Сенякович // Хирургия -1992. - №11. - С.68-72.

3. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология: [пособие для студентов] [Текст] / Г.Н. Дранник [3-е изд., доп].-К.:ООО "Полиграф плюс", 2006. - 482с.

4. Калита Н.Я. Патогенез вторичного гиперспленизма при портальной гипертензии [Текст] / Н.Я. Калита, К.И. Буланов, О.Г. Котенко // Врачебное дело. - 1990. - №11. - С.60-63.

5. Павлова И.Е. Влияние спленектомии на состояние иммунной системы у больных с синдромом портальной гипертензии: отдаленные результаты [Текст] / И.Е. Павлова // Хирургия. - 1986. - №6. - С.136-141.

6. Harmanci O. Clinical characteristics of idiopathic portal hypertension [Text] / O. Harmanci, Y. Bayraktar // World J. Gastroenterol. - 2007. - Vol. 13. - P. 1906-1911.

7. Holschneider A.M. Complications of splenectomy in childhood [Text] / A.M. Holschneider, H. Kricz-Klimeck, B. Strasser, S. Daumling, B.H. Belohradsky // Z. Kinderchir. - 1982. - Vol.35. - P.130-139.

8. Eibl M. Immunological consequences of splenectomy [Text] / M. Eibl // Prog Pediatr Surg. 1985; P. 4 №18. P.139-45.

9. Koval'chuk L.V. Participation of spleen cells in regulating the production of macrophage migration inhibitory factor in mice [Text] / L.V. Koval'chuk, N.U. Sotnikova // Biull. Eksp. Biol Med. - 1981. - Vol.91. - P. 336-338.

10. Robak T. Role of the spleen in immunological processes [Text] / T. Robak, A. Pluzanska // Postepy Hig Med Dosw. - 1980. - Vol. 33. - P. 625-634.

11. Sanyal A.J. Portal Hypertension [Text] / A.J. Sanyal, V.H. Shah - New Jersey: Humana Press, 2005. - 515 p.

**ИММУННЫЙ СТАТУС ДЕТЕЙ С ДОПЕЧЁННОЙ
ФОРМОЙ ПОРТАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ**

*Джума К.А., Прытула В.П., Годик О.С., Ищенко М.И.
Национальный медицинский университет
имени А.А. Богомольца, г. Киев, Украина*

Резюме. В работе изучался характер и степень нарушений со стороны иммунной системы у детей с допечённой формой портальной гипертензии. В исследование включено 17 детей, у которых оценивали клеточное и гуморальное звено иммунной системы, факторы неспецифической защиты, определяли основные иммунопатологические синдромы. В следствие анализа полученных данных было установлено, что у большинства детей с ДПГ имеет место напряжённость гуморального звена иммунитета (IgM, Ig A) и фагоцитоза, вторичный клеточный иммунодефицит со снижением общего количества лейкоцитов, лимфоцитов и субпопуляций лимфоцитов (CD 3+, CD4+, CD8+). Таким образом, показатели иммунного статуса необходимо учитывать при мониторинге детей с ДПГ, для подбора иммунокорректирующей терапии с целью предотвращения послеоперационных осложнений, выборе метода хирургического лечения и тактике дальнейшего ведения таких пациентов.

Ключевые слова: портальная гипертензия, иммунный статус, дети.

**IMMUNE STATUS IN CHILDREN WITH
EXTRAHEPATIC PORTAL HYPERTENSION**

*Kristina A. Dzhuma, Vasyl P. Prytula,
Oleg S. Godik, Maja I. Ishenko
National O.O. Bohomolets Medical University,
Kyiv, Ukraine*

Summary. The paper is focused on the features and grade of changes in the immune system under the extrahepatic portal hypertension. The investigation was performed on 17 children, in whom the cell, humoral and unspecific parts of immune system were evaluated. The leading pathological factors were defined. It was established that there is significant tension in the humoral part (IgM, Ig A) and phagocytosis, secondary cell immune deficiency with decreasing of general number of lymphocytes and subpopulations of lymphocytes (CD 3+, CD4+, CD8+). Therefore, the parameters of immunogramme should be considered while monitoring such category of patients, selection of the immunocorrective therapy for prevention of postoperative complications and for the further management under extrahepatic portal hypertension.

Keywords: portal hypertension, immune status, children.