

Мамытова Э. М.

Кыргызская ГМА им. И. К. Ахунбаева, г. Бишкек, Кыргызстан

ДИНАМИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ОТВЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ В РАННЕМ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ ПЕРИОДЕ

У 28 больных с ЧМТ средней степени тяжести исследовано состояние клеточного и гуморального иммунитета на основе учёта клеток CD3, CD4, CD8, CD16 (NK), CD20 с оценкой экспрессии Fas (CD95) лимфоцитов и основных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИФН- γ , ФНО- α в остром периоде на 1 и 10 сутки.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, экспрессии Fas (CD95) лимфоцитов, субпопуляции лимфоцитов, цитокины.

Введение. Черепно-мозговая травма (ЧМТ) продолжает оставаться в центре внимания отечественных и зарубежных исследователей, так как является одной из наиболее частых причин летальности и инвалидности пострадавших. Это обусловлено как самой тяжестью повреждения головного мозга, так и сопутствующими нарушениями в работе различных органов и систем организма [10, 13]. В настоящее время ни у кого не вызывает сомнений тот факт, что иммунная система играет важную роль в патогенезе травматической болезни головного мозга [6, 7, 10, 12].

Известно, что посттравматические иммунные нарушения у пациентов с ЧМТ характеризуются изменением количественных показателей одной из важнейших субъединиц иммунной системы – лимфоцитов периферической крови. Количественные изменения выражаются в снижении общего числа иммунокомпетентных клеток, а также В- и Т-лимфоцитов [6, 7, 10, 12, 14], нарушении соотношения Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток с изменением иммунорегуляторного индекса [7, 17].

Вместе с тем, для современной диагностики иммунных нарушений необходима информация о функциональном состоянии иммунокомпетентных клеток. Самые разнообразные проявления функциональной активности иммуноцитов сводятся к единому базисному процессу – к активации клеток и, как следствие этого, к изменению их мембранного рецепторного репертуара. В первую очередь изменяется плотность экспрессии так называемых маркеров активации или активационных антигенов. Одним из активационных

антигенов, заслуживающих изучения является CD95 (Fas/APO-1) рецептор, опосредующий апоптоз [4], выявляемый на активированных В-лимфоцитах и части Т-хелперов [16].

Известно, что системные реакции при воспалении опосредуются различными дистантно действующими медиаторами – цитокинами, простагландинами, кининами, гормонами, среди которых ведущую роль играют провоспалительные интерлейкины [1, 9, 11].

Провоспалительные цитокины (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6) и иммунорегулирующие как ИФН- γ усиливают продукцию и увеличивают выраженность воспалительных процессов, где ФНО- α является мощным индуктором апоптоза клеток, а апоптотические клетки, которые не стали жертвой быстрого фагоцитоза, начинают выделять цитокины.

Следовательно, провоспалительные цитокины играют одну из ведущих ролей в ходе воспалительной реакции. Не менее важным компенсаторным механизмом является рост содержания противовоспалительных цитокинов, одним из которых является ИЛ-4, которые имеют протекторное влияние, стимулируют иммунную защиту, вызывают пролиферацию и регенерацию в очаге воспаления и организме в целом, способствуют выздоровлению.

Целью нашего исследования явилось изучение активности цитокинов, функционального состояния клеточного и гуморального звена иммунитета (Т-лимфоцитов (CD3+клетки), Т-хелперов (CD4+ клетки), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+ клетки), натуральных киллеров (CD-16), В-лимфоцитов (CD-20),

Mamytova E. M.

DYNAMICS OF THE IMMUNOLOGICAL RESPONSE IN PATIENTS WITH TRAUMATIC BRAIN INJURY IN THE ACUTE POSTTRAUMATIC PERIOD

In 28 patients with traumatic brain injury of moderate severity investigated cellular and humoral immunity on the basis of accounting cells CD3, CD4, CD8, CD16 (NK), CD20, Fas (CD95) expression evaluation and lymphocytes and major cytokines IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α in the acute period 1 and day 10.

Keywords: traumatic brain injury, the expression of Fas (CD95) lymphocytes, lymphocyte subpopulations, cytokines.

иммунорегуляторного индекса (ИРИ), а также экспрессии активационного антигена CD95 (Fas/APO-1) на лимфоцитах периферической крови пациентов с средне-тяжелой ЧМТ (СЧМТ) в раннем посттравматическом периоде, как начальном этапе формирования иммунных нарушений.

Материал и методы. Клиническая часть работы выполнена на базе отделений нейротравматологии № 1 и 2 Национального Госпиталя Министерства Здравоохранения Кыргызской республики (НГ МЗ КР). Всего были обследованы 28 пациентов с СЧМТ (9-12 баллов по ШКГ) ЧМТ. Возраст пациентов варьировал от 21 до 70 лет и в среднем составлял 46,8 года. Среди травмированных было 26 мужчин и 2 женщины. Забор венозной крови проводился дважды: в течение первых суток после травмы, затем на 10 сутки пребывания в стационаре. Направленные иммунокорректирующие мероприятия обследуемым больным не назначались.

Исследовали уровень цитокинов сыворотки крови (интерлейкины IL-1 β ; IL-4; IL-6; α -ФНО, γ -ИФН) с помощью иммуноферментных тест-систем производства фирмы «Вектор Бест» (г. Новосибирск).

Фенотипическую характеристику субпопуляций лимфоцитов выполняли с помощью моноклональных антител фирмы «Сорбент» (Россия), в непрямом иммунофлуоресцентном тесте. В работе использовали следующие моноклональные антитела: СД-3 – для определения Т-лимфоцитов; СД-4 – для определения Т-хелперов; СД-8 – для определения Т-супрессор-цитотоксических лимфоцитов; СД-16 – для определения натуральных киллеров; СД-20 – для определения В-лимфоцитов, СД-95 – для определения маркера негативной активации (Fas-рецептор), ИРИ – для определения иммунорегуляторного индекса. Полученные из крови больных мононуклеары метили моноклональными антителами, согласно рекомендации и инструкции фирмы-изготовителя в объеме 0,1 мл. Учитывали реакции на проточном цитофлуориметре Becton Dickinson.

В качестве контрольной группы исследовали кровь 20 клинически здоровых добровольцев (средний возраст – 50 лет).

Статистическую обработку полученных результатов проводили по методу Стьюдента. Результаты выражали в виде $M \pm m$. Статистические расчеты проводили с использованием пакета программ «Statistica» (StatSoft-Russia, 1998).

Результаты и их обсуждение. Наши исследования показали, что при СЧМТ уже в первые 48 часов происходит достоверное уменьшение содержания количества Т-лимфоцитов (в 1,2 раза) и Т-хелперов (в 1,7 раза) в периферической крови пострадавших при сравнении с контролем. Достоверное снижение количества CD4+ клеток наблюдалось и на 10-е сутки наблюдения относительно референтной нормы. Поскольку Т-хелперы определяют интенсивность и направленность иммунологических реакций их уменьшение в периферической крови возможно связано

с рециркуляцией лимфоцитов и участием этих клеток в иммунологических реакциях в зонах воспаления.

При ЧМТ наблюдалось увеличение пула Т-цитотоксических лимфоцитов (CD8+) на 10 сутки наблюдения, в то время как в первые дни поступления количество CD8+ лимфоцитов не отличалось от контрольного значения.

Таблица 1

Субпопуляционная структура лимфоцитов периферической крови больных с СЧМТ

Показатель	1 день	10 день	Доноры
CD3+	31,8 \pm 1,9 *	38,6 \pm 3,2	40,5 \pm 1,3
CD4+	18,7 \pm 0,9 *	20,6 \pm 2,4 *	32 \pm 0,9
CD8+	14 \pm 3,7	15,9 \pm 1,45 *	11,8 \pm 0,4
CD16+	16,7 \pm 1,2 *	19,9 \pm 1,9 *	5 \pm 0,2
CD20+	18,4 \pm 1,1	22,9 \pm 2,4 *	16 \pm 0,9
CD95+	19,1 \pm 1 *	21,9 \pm 1,6 *	8,3 \pm 0,1
ИРИ	1,5 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	1,5 \pm 0,5

Примечание: различия показателей достоверны по сравнению с таковыми: * – в контрольной группе.

Содержание в крови естественных киллерных клеток СД-16+ лимфоцитов у больных с ЧМТ в первые дни наблюдения достоверно повышалось в 3,3 раза по сравнению с контролем (здоровые лица). На 10 день процентное содержание СД-16+NK- лимфоцитов продолжает нарастать и превышало физиологическую норму в 4 раза.

Эти изменения закономерно дополняют картину угнетения Т-клеточного звена с повышением выработки цитотоксических клеток и натуральных киллеров (CD16) и отражают остроту воспалительного процесса.

Содержание в крови В-лимфоцитов (СД-20+) в первые сутки после травмы было увеличено незначительно по сравнению с группой контроля, на 10 день посттравматического периода тенденция к нарастанию данного показателя иммунограммы сохранялась. Процентное содержание В-лимфоцитов на 10 сутки наблюдения достоверно (в 1,5 раза) превышало физиологическую норму.

Значимого сдвига ИРИ периферической крови относительно физиологической нормы отмечено не было в течение всего исследуемого периода. На 10 сутки наблюдения у больных с СЧМТ иммунорегуляторный индекс (соотношение CD4+/CD8+ лимфоцитов) был понижен за счет уменьшения числа Т-хелперов.

Таким образом, наши исследования показали, что СЧМТ всегда сопровождается изменениями показателей клеточного иммунитета. На основании полученных результатов исследований можем сделать заключение об активации клеточно-опосредованных механизмов иммунитета, особенно киллерного звена, на фоне умеренного Т-клеточного иммунодефицита.

Поскольку одним из иммунорегуляторных механизмов является апоптоз, то следующим этапом исследований была оценка экспрессии CD95 на лимфоцитах крови, как мембранного маркера готовности к апоптозу. Изучение процессов апоптоза выступает неотъемлемой частью изучения иммунопатологи-

ческих процессов на данный час [15]. В связи с этим была произведена оценка относительного количества лимфоцитов в периферической крови, экспрессирующих Fas-рецептор.

Оценка уровня CD95 (Fas) лимфоцитов выявила высоко значимое его повышение в группе больных с СЧМТ. На протяжении всего периода иммунологического мониторинга за пациентами прослеживалось статистически достоверное увеличение содержания CD95+лимфоцитов. Известно, что экспрессия клетками CD95 отражает лишь готовность клетки к рецепции апоптогенного сигнала и повышается она при активации клетки. Снижение активности процессов апоптоза при выраженной активации лимфоцитов приводит к развитию аутоиммунной и онкопатологии. Для ЧМТ характерна высокая готовность к удалению нежизнеспособных клеток, их обновлению, замене и дифференцировке в процессе апоптотической реакции. [2, 5, 15].

Наши исследования показали, что при активном остром воспалительном процессе, имеющем место при ЧМТ наряду с активацией иммунокомпетентных клеток уровень клеток, экспрессирующих Fas-рецептор, повышен в течение первых 10 дней.

Следующим этапом было определение участия цитокинов в регуляции иммунного ответа при ЧМТ. Содержание IL-1 β в сыворотке крови в первые дни наблюдения было повышенным в 2,8 раза при сравнении с показателем нормы, что, очевидно, было связано с особенностями этого цитокина как «стартового» при любом воспалении [13]. Через 10 дней концентрация этого цитокина снизилась незначительно по сравнению с исходными значениями, не достигая значений физиологической нормы.

Таблица 2

Уровень цитокинов периферической крови больных с СЧМТ

Показатель	1 день	10 день	Доноры
ИЛ-1	9,4 \pm 2,1 *	7,3 \pm 1,6 *	3,3 \pm 0,4
ИЛ-4	2,2 \pm 0,8	2,8 \pm 0,4 *	1,3 \pm 0,2
ИЛ-6	13 \pm 3 *	16 \pm 7,3 *	3 \pm 0,4
ИФН	62,1 \pm 10,2 *	63,4 \pm 8,8 *	9,2 \pm 0,5
ФНО	7,3 \pm 1,3 *	6,6 \pm 0,9 *	2,6 \pm 0,35

Примечание: различия показателей достоверны по сравнению с таковыми: * – в контрольной группе.

Концентрация IL-4 в сыворотке крови, определенная в первые сутки наблюдения повышалась незначительно, и не отличалась статистически достоверно от значений практически здоровых лиц. Через 10 дней уровень ИЛ-4 повысился относительно исходных цифр и стал в 2,1 раза выше референтной нормы. Это может быть объяснено активацией противовоспалительных стимулов в ответ на растущие провоспалительные воздействия [8].

Концентрация IL-6 в первые дни посттравматического периода была значительно повышенной (в 4,3 раза) по сравнению с уровнем здоровых лиц, а через

10 дней продолжала нарастать относительно исходных значений и превышала в 5,3 раза значения референтной формы. Такое повышение указывает на более выраженную активацию синтеза IL-6 и, следовательно, более широкое вовлечение его в воспалительный процесс при ЧМТ. ИЛ-6 является цитокином вторичного каскада, синтез которого запускается ФНО- и IL-1 β . Основными функциями ИЛ-6 является запуск антилообразования В-лимфоцитами и индукция острофазного воспалительного ответа: выработка гепатоцитами печени белков острой фазы воспаления [13].

Значения содержания γ -IFN в первые дни после травмы в сыворотке крови исследованных больных были значительно выше референтной нормы – в 6,7 раза. На 10 сутки наблюдения происходило дальнейшее повышение содержания γ -IFN относительно исходных цифр, и превышало физиологическую норму в 7 раз. γ -IFN имеет свойства как противовоспалительных, так и провоспалительных цитокинов, наиболее значимый механизм его действия связан с участием этого цитокина в регуляции Т-клеточного звена иммунитета. В последнее время развитие иммунодефицитного состояния при многих патологических состояниях объясняют повышением апоптоза иммунокомпетентных клеток [8]. Вероятно, обнаруженное нами у больных повышение уровня γ -IFN в периферической крови индуцирует γ -IFN – опосредованный механизм апоптоза клеток иммунной системы. При изучении нами субпопуляций лимфоцитов было обнаружено развитие Т-клеточного иммунодефицита, что, возможно свидетельствовало об усилении клеточного апоптоза при ЧМТ.

Содержание ФНО- α в первые дни наблюдения увеличилось в 2,8 раза по сравнению с нормой, а через 10 дней его уровень снизился относительно исходных значений и превышал в 2,5 раза референтную норму.

Наши данные отразили достоверное увеличение уровня исследуемых провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, γ -IFN и ФНО- α в первые и 10-е сутки относительно физиологической нормы. Противовоспалительный цитокин ИЛ-4 был достоверно повышен относительно референтной нормы только на 10-е сутки наблюдения.

При оценке воспалительного процесса по соотношению динамики про- и противовоспалительных цитокинов установлено, что в первые дни посттравматического периода активируется иммунный ответ, который осуществляется за счет активации провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, γ -IFN и ФНО- α и является ответом на травматическое повреждение и началом развития воспаления. Активизация провоспалительных цитокинов свидетельствует о пролиферации Т-лимфоцитов, необходимых для иммунного ответа. При отчетливой реакции роста провоспалительных цитокинов в первые дни после травмы, на 10-е сутки после травмы отмечается разнонаправленная реакция данных медиаторов воспаления со снижением одних цитокинов (ИЛ-1 и ФНО- α), которые остаются все-таки

выше контрольных значений; и дальнейшим повышением концентрации других (ИЛ-6, γ -IFN). Снижение концентрации ИЛ-6, γ -IFN на 10-сутки возможно свидетельствует о некотором стихании воспалительной реакции, что также осуществляется и за счет роста концентрации противовоспалительного цитокина ИЛ-4.

Выводы

1. При первичной ЧМТ среднетяжелой степени в первые сутки посттравматического периода происходит угнетение Т-клеточного звена иммунитета, что проявляется снижением в крови уровня Т-хелперов и (СД-3+) положительных клеток и активацией В-клеточного звена и натурально-киллерных субпопуляций лимфоцитов. На 10-е сутки после травмы активируется иммунный ответ, который осуществляется за счет активации всех изучаемых популяций Т-лимфоцитов, свидетельствующего о пролиферации Т-лимфоцитов, необходимых для иммунного ответа.
2. При отчетливой реакции роста провоспалительных цитокинов в первые дни после травмы, на 10-е сутки после травмы отмечается разнонаправленная реакция данных медиаторов воспаления со снижением одних цитокинов (ИЛ-1 и ФНО- α), которые остаются все-таки выше контрольных значений; и дальнейшим повышением концентрации других (ИЛ-6, γ -IFN). Снижение концентрации ИЛ-6, γ -IFN на 10-сутки возможно свидетельствует о некотором стихании воспалительной реакции, что также осуществляется и за счет роста концентрации противовоспалительного цитокина ИЛ-4.
3. Наши исследования показали, что при активном остром воспалительном процессе, имеющем место при ЧМТ наряду с активацией иммунокомпетентных клеток уровень клеток, экспрессирующих Fas-рецептор, повышен в течение первых 10 дней. Это указывает на высокую готовность к удалению нежизнеспособных клеток, их обновлению, замене и дифференцировке в процессе апоптотической реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абу Салех Аммар Ибрахим. Роль цитокинов в патогенезе черепно-мозговой травмы: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2007. 22 с.
2. Апоптоз в иммунологических процессах / Р. И. Сепиашвили, М. Г. Шубич, Н. В. Колесникова и др. // Аллергология и иммунология. 2000. № 1 (1). С. 15-23.
3. Бакунц Г. О., Ковальчук Л. В., Чекнёв С. Б. и др. Функциональная активность естественных киллеров и антитело-зависимая цитотоксичность лимфоцитов у больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения // Журн. неврол. и психиатр. им. С. С. Корсакова. 1998. № 1. С. 31-34.
4. Барышников А. Ю., Тоневицкий А. Г. Моноклональные антитела в лабораторной практике. М., 1997. С. 23-27.
5. Барышников А. Ю., Шишкин Ю. В. Иммунологические проблемы апоптоза. М.: Эдиториал УРСС, 2002. 309 с.
6. Горбунов В. И., Лихтерман Л. Б., Ганнушкина И. В. Иммунопатология травматической болезни головного мозга. Ульяновск, 1996. 268 с.
7. Долгушин И. И., Эберт Л. Я., Лифшиц Р. И. Иммунология травмы. Свердловск: Изд-во Урал. ун-та, 1989. 356 с.
8. Пичугина Л. В., Пинегин Б. В. Внутриклеточные цитокины: проблемы детекции и клиническое значение // Иммунология. 2008. № 1. С. 55-63.
9. Садова В. А. Состояние процессов липидной пероксидации и цитокиновый ответ в остром периоде черепно-мозговой травмы при право и левополушарных повреждениях головного мозга: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Челябинск, 2008. 23 с.
10. Смирнов В. С., Фрейдлин И. С. Иммунодефицитное состояние. СПб: Фолиант, 2000. С. 34-57.
11. Соколова Т. Ф. Взаимодействие иммунной, нервной и эндокринной систем при травматической болезни: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Омск, 2004. 45 с.
12. Старченко А. А. Клиническая нейроиммунология хирургических заболеваний головного мозга. СПб: Мед. изд-во, 2001. С. 56-109.
13. Фраерман А. П., Кондаков Е. Н., Кравец Л. Я. Тяжелая черепно-мозговая травма. Н. Новгород, 1995. 355 с.
14. Чеснокова И. Г. Изменения в иммунной системе при травматической болезни (клинико-патогенетическое, прогностическое значение и коррекция) // Иммунология. 2000. № 6. С. 39-42.
15. Ярилин А. А. Апоптоз и его место в иммунных процессах // Иммунология. 1996. № 6. С. 10-23.
16. Ярилин А. А. Основы иммунологии. М.: Медицина, 1999. 286 с.
17. Hansbrough J. F., Bender E. M., Zapata-Sirvent R, Anderson J. Altered helper and suppressor lymphocyte population in surgical patients: a measure of postoperative immunosuppression // Am. J. Surg. 1984. Vol. 148. P. 303-307.

Контактная информация

Мамытова Эльмира Миталиповна, тел.: +996 (551) 325-314, +996 (312) 620-311, e-mail: elmiramamytova@yahoo.com, petruha_w@mail.ru.

Сведения об авторе

Мамытова Эльмира Миталиповна – к. м. н., доцент кафедры неврологии с курсом медицинской генетики Кыргызской Государственной Медицинской Академии имени И. К. Ахунбаева, г. Бишкек, Кыргызская Республика.