

УДК 57.083.3

ЯВОРСЬКИЙ В.В.

Харківська медична академія післядипломної освіти, кафедра анестезіології, інтенсивної терапії, трансфузіології та гематології

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ІМУНОЛОГІЧНОЇ РЕАКТИВНОСТІ У ПЕРВИННИХ ТА КАДРОВИХ ДОНОРІВ ЗАЛЕЖНО ВІД ДОНОРСЬКОГО СТАЖУ

Резюме. Метою даного дослідження було провести порівняльний аналіз імунологічної реактивності в первинних та кадрових донорів залежно від донорського стажу. У результаті проведеного дослідження було встановлено, що при визначенні рівнів імунокомпетентних клітин у крові первинних донорів на початковому етапі істотних відмінностей досліджуваних параметрів від контрольних показників не зафіксовано. Відбувалося невірогідне щодо вихідного рівня зниження абсолютної кількості теофілін-резистентних Т-лімфоцитів в крові (на 12,2 %; $p = 0,0000362$) за рахунок обох імунорегуляторних субпопуляцій. На відміну від первинних, у кадрових донорів не спостерігалось істотного зменшення процентного вмісту в крові теофілін-резистентних Т-лімфоцитів і індекс імунорегуляції залишався на контрольному рівні, будучи при цьому вірогідно нижчим за аналогічний показник в первинних донорів (на 22,1 %; $p = 0,000385$).

Ключові слова: донори, плазмаферез, імунологічна реактивність.

Актуальність

За даними літератури, при донорії плазми істотно змінюється специфічна реактивність організму, зокрема активність факторів клітинного імунітету. Спостерігається зниження загальної кількості Т-лімфоцитів ($CD3^+$) до $44,0 \pm 1,7$ % порівняно з $65,2 \pm 2,1$ % у групі тварин-донорів, ймовірно, за рахунок зменшення кількості Т-лімфоцитів із хелперною функцією ($CD4^+$) і збільшення кількості Т-лімфоцитів із супресорною функцією ($CD8^+$), а також NK-клітин ($CD16^+$ і $CD56^+$) — клітин із цитотоксичною активністю [3]. Було виявлено дисбаланс в імунорегуляторних субпопуляціях ($CD4^+/CD8^+$), що відіграв роль штучного імунодефіциту, — вторинний Т-клітинний імунодефіцит [1].

За даними Н. Buhring [5], на перший та сьомий день після донорії плазми шляхом мануального плазмаферезу може виникнути зниження показників Т-клітинної ланки імунної системи: зменшення як загальної кількості Т-лімфоцитів ($CD3^+$), так і кількості субпопуляцій Т-лімфоцитів із хелперною ($CD4^+$) і супресорною ($CD8^+$) функціями, що, ймовірно, в основному пояснюється високим рівнем норадреналіну й адреналіну, які спричиняють імунодепресивну дію.

На 21-й день у таких донорів відзначена тенденція до збільшення кількості $CD8^+$, тоді як кількість Т-лімфоцитів із хелперною активністю ($CD4^+$) залишалася зниженою [8]. Стійке зменшення кількості Т-хелперів і збільшення кількості Т-супресорів зумовили зниження імунорегуляторного індексу порівняно з нормою. Більше за все мануальний плазмаферез впливає на NK-клітини ($CD16^+$, $CD56^+$), про що свідчить негативна динаміка їх кількості [2].

На 3-й місяць загальна кількість Т-лімфоцитів залишалася зменшеною (за рахунок невеликої кількості Т-лімфоцитів із хелперною функцією), тоді як відзначене раніше зниження вмісту клітин із цитотоксичною активністю ($CD8^+$, $CD16^+$, $CD56^+$) у цей же період змінилося збільшенням, що перевищує показники донорів. До кінця 1-го року рівні $CD3^+$ і $CD4^+$, як і раніше, були значно нижчими за норму, тоді як рівень $CD16^+$ перевищував її, а $CD4^+$ — повністю їй відповідав [7].

З огляду на те, що імунна система, як система «швидкого реагування», тісно пов'язана зі стрес-системами, ймовірно, при сильному стресовому впливі (мануальний плазмаферез, некадрові донори) активація осі «гіпоталамус — гіпофіз — надниркові залози» викликає гіперпродукцію глюкокортикоїдів, що призводить до імунодепресії [6]. Метою даного дослідження було провести порівняльний аналіз імунологічної реактивності в первинних та кадрових донорів залежно від донорського стажу.

Матеріали та методи дослідження

Для вирішення поставлених задач на базі Харківського обласного центру служби крові було проведено клінічне дослідження. У дослідження були включені 36 донорів плазми усіх груп крові за системою АВ0 віком $40,7 \pm 1,1$ року, донорський стаж становив $5,8 \pm 2,4$ року, серед них були 12 (33,3 %) жінок та 24 (66,7 %) чоловіки.

Автоматичний плазмаферез проводився на апараті «Autopheresis-C» фірми Baxter (США) методом

© Яворський В.В., 2013

© «Медицина невідкладних станів», 2013

© Заславський О.Ю., 2013

мембранної фільтрації. Об'єм заготовленої плазми становив $750,0 \pm 55,0$ мл за один сеанс. Інтервали між донорціями становили 14, 21, 28 та 45 діб, між циклами — 30, 60, 90 діб, кількість циклів — 1, 2, 3, 4, кількість донорцій — 4, 5, 6. Дослідження проводили в сім етапів: під час першої плазмодачі, через три, шість, дев'ять, дванадцять, п'ятнадцять та вісімнадцять місяців.

Залежно від донорського стажу було виділено дві групи: I група — первинні донори (15 осіб) та II група — кадрові донори (21 особа). Кожну групу дослідження було розділено на три підгрупи: I⁴ та II⁴ — чотири донорції, I⁵ та II⁵ — п'ять донорцій та I⁶ та II⁶ — шість донорцій відповідно.

За допомогою двоколірної проточної лазерної цитометрії з використанням моноклональних анти-тіл (Caltag laboratories, США) проводили фенотипування популяцій Т-лімфоцитів із визначенням відносного та абсолютного вмісту в крові Т-лімфоцитів (CD3⁺19⁻), субпопуляції Т-хелперів/індукторів — CD4⁺8⁻ і Т-супресорів/кілерів — CD4⁺8⁺. Для оцінки їх активності використовували показник інтенсивності флуоресценції (ІФ). Фагоцитарну активність нейтрофілів гранулоцитів та моноцитів периферійної крові й нейтрофілів визначали за їх здатністю до поглинання часток латексу (підраховували показник фагоцитозу (кількість фагоцитуючих клітин) і фагоцитарне число (показник активності кожної окремої клітини)) та рівнем кисеньозалежного метаболізму, що оцінювали в НСТ-тесті.

Для обробки отриманих результатів було використано нестаціонарний нейроміжсегментний аналіз головних компонент, в основі якого лежить алгоритм навчання нейронної мережі Т. Сенгера, що забезпечує компроміс між фільтруючими та слідкуючими властивостями процедур обчислення головних компонент нестаціонарних масивів даних. Використання інших традиційних методів статистичної обробки не дає змогу визначити закономірності впливу донорції плазми.

Обговорення отриманих результатів

При порівняльному аналізі імунологічної реактивності диференційованих Т-лімфоцитів кадрових

та первинних донорів було виявлено, що первинна донорія плазми не впливала на стан CD3 (рис. 1). Надалі впродовж трьох місяців було констатовано зниження ($p = 0,000375$) цього показника на 25,0 %, через шість місяців — на 28,5 % ($p = 0,000805$) та через дев'ять — на 31,6 % ($p = 0,000247$) відносно вихідного рівня в I групі дослідження. Отримані дані визначали те, що показник CD3 в II групі мав тенденцію до зростання на 18,1 % ($p = 0,00476$) через три місяці від початку донорії щодо вихідного рівня, а на наступних етапах знижувався на 7,6 % ($p = 0,00354$) порівняно з попереднім етапом.

Первинна реакція Т-лімфоцитів була протилежно спрямованою залежно від стажу донорства: у первинних донорів визначалось пригнічення лімфоцитів периферичної крові, а у кадрових, навпаки, їх активність із виходом до периферичного кровотоку. Через рік після початку дослідження в обох групах було зафіксовано однакову тенденцію до зростання CD3 — на 4,5 % в I групі ($p = 0,000461$) та на 10,1 % у II групі ($p = 0,000284$). Така тенденція зберігалась до кінця дослідження, і зазначений показник мав мінімальні коливання. Слід зауважити, що хоча подана динаміка CD3 в обох групах дослідження й мала розбіжності, все ж таки абсолютні значення залишалися в межах фізіологічної норми. Поряд із цим протилежно спрямована зміна Т-лімфоцитів свідчила про реакцію первинних донорів під час перших донорцій плазми крові на проведену процедуру як запальну відповідь. Динамічна стійкість до сеансів плазмаферезу вироблялась повільно, впродовж дев'яти місяців поспіль. Як свідчили отримані дані, у кадрових донорів такої запальної відповіді не відбувалось, а виявлені коливання відповідали фізіологічному стану донорів.

Аналогічну динаміку було виявлено при аналізі динаміки Т-хелперів (рис. 2). У I групі дослідження вже через три місяці було виявлено зниження ($p = 0,000371$) CD4 на 37,2 % порівняно з вихідним рівнем. Така тенденція зберігалась впродовж наступних місяців із зниженням ($p = 0,0000218$) на 46,6 % відносно вихідного рівня. Відновлення пулу Т-хелперів відбувалось в означеній гру-

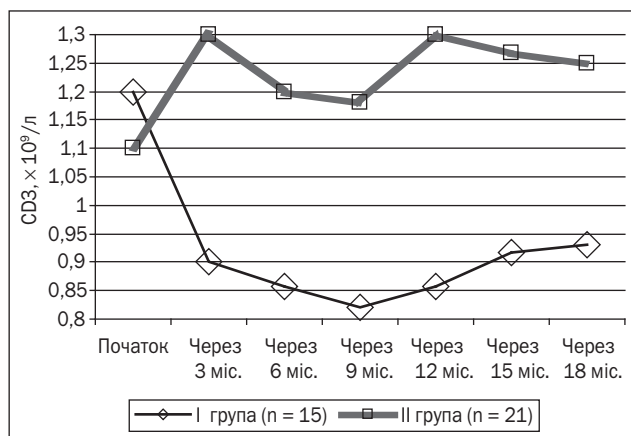


Рисунок 1. Порівняльний аналіз рівнів CD3 у групах дослідження

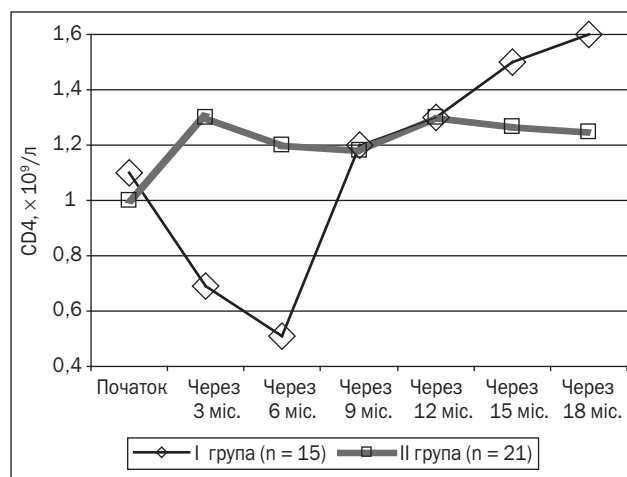


Рисунок 2. Порівняльний аналіз рівнів CD4 у групах дослідження

пі через дев'ять місяців із зростанням на 85,9 % ($p = 0,000419$) порівняно з мінімальним значенням. Цей процес не зупинявся, і кількість Т-хелперів відновлювалась в І групі впродовж всіх заключних етапів дослідження.

На противагу цьому в ІІ групі дослідження вірогідних ($p = 0,5$) коливань $CD4$ виявлено не було. Тобто в групі первинних донорів реакцією Т-хелперів на вилучення певної частки плазми з кровотоку була відносна недостатність клітинного імунітету. Зауважується, що виявлені коливання відбувались в межах фізіологічної норми і не могли свідчити про порушення імунітету, а визначали коливання окремих гілок гуморального імунітету, які були обумовлені відносною гіпопротеїнемією.

У кадрових донорів внаслідок регулярної стимуляції кісткового мозку, зменшення пулу білка в периферичному кровотоці не призводило до ефективного зниження гуморального імунітету. Водночас хвилеподібні коливання Т-лімфоцитів у ІІ групі дослідження визначали реакцію на фізичне зменшення об'єму циркулюючої плазми. Підтвердженням цього була динаміка Т-супресорів.

Через три місяці після початку донорії плазми в І групі дослідження було зафіксовано зниження $CD8$ на 18,5 % ($p = 0,000461$), через шість місяців — на 14,4 % ($p = 0,0000404$) та через дев'ять місяців — на 28,1 % ($p = 0,000221$) порівняно з вихідним рівнем (рис. 3).

Зростання рівня Т-супресорів ($p = 0,000172$) відбувалось в цій групі через рік після початку дослідження на 24,0 % порівняно з вихідним рівнем. При цьому зазначений процес не припинявся впродовж всіх кінцевих етапів дослідження, максимальне значення було досягнуто через 18 місяців від початку донорії плазми — $0,760 \pm 0,023 \times 10^9/\text{л}$. Неважко побачити, що в ІІ групі дослідження початкові етапи супроводжувались тенденцією до зростання $CD8$ на 9,5 % ($p = 0,00462$) через три місяці та на 21,4 % ($p = 0,000182$) — через шість місяців відносно вихідного рівня. Через дев'ять місяців було зафіксовано зниження ($p = 0,0207$) зазначеного показника на 23,5 % відносно попереднього етапу дослідження. Кінцеві етапи характеризувались невірогідними ко-

ливаннями $CD8$ ($p = 0,00283$). Слід зауважити, що така динаміка зазначеного показника відбувалась в межах фізіологічної норми і в жодному випадку не виходила за її межі, а отже, вираженого імуносупресивного ефекту донорії плазми не спричиняла.

Пригнічення Т-супресорів у первинних донорів, скоріше за все, свідчило про неспроможність відтворення адекватного гуморального імунітету, який був викликаний плазмоекстракцією. У кадрових донорів регулярна донорія плазми, навпаки, сприяла активації гуморальної ланки імунітету, що в межах функціональної активності підтримувала бар'єрні функції. Тобто плазмоекстракція у первинних донорів призводила до тимчасового пригнічення імунологічної реактивності тривалістю дев'ять місяців, а у кадрових, навпаки, до її активації протягом шести місяців.

Відсутність критичної перебудови імунологічної реактивності підтверджувалось стабільністю теофілін-чутливих лімфоцитів і їх відношенням до резистентних лімфоцитів. Упродовж всього терміну дослідження у донорів обох груп це співвідношення становило 1 : 3. Коливання рівнів Т-супресорів у первинних донорів в цілому не впливали на супресивну активність, і тому реактивність імунної системи залишалась в цілому стабільною.

Певне зниження кількості Т-лімфоцитів периферичної крові супроводжувалося істотним збільшенням відсоткового та абсолютного вмісту в крові активних розеткоутворюючих клітин у кадрових донорів на 46,4 % ($p = 0,00000745$), у первинних — на 27,7 % ($p = 0,0000819$). При дослідженні в первинних донорів Т-лімфоцитів було встановлено вірогідне зниження відносного й абсолютного вмісту в крові теофілін-чутливих розеток порівняно з показниками кадрових донорів (на 24,6 %, $p = 0,00000261$, і 34,6 %, $p = 0,000629$, відповідно). Відносний вміст теофілін-резистентних Т-лімфоцитів не змінювалося, що призводило до збільшення індексу імунорегуляції до $4,53 \pm 0,29$ порівняно з $3,26 \pm 0,31$ у групі кадрових донорів ($p = 0,0000928$). Разом з тим абсолютний вміст у крові теофілін-резистентних Т-лімфоцитів у кадрових донорів було нижчим за вихідний рівень — на 10,3 % ($p = 0,000817$).

При дослідженні рівнів імунокомпетентних клітин в крові у первинних донорів на початковому етапі захворювання істотних відмінностей досліджуваних параметрів від контрольних показників не зафіксовано. Можна відзначити тільки тенденції в зміні деяких показників. Відбувалося невірогідне щодо вихідного рівня зниження абсолютної кількості теофілін-резистентних Т-лімфоцитів в крові (на 12,2 %; $p = 0,0000362$) за рахунок обох імунорегуляторних субпопуляцій. На відміну від первинних, у кадрових донорів не спостерігалось істотного падіння процентного вмісту в крові теофілінрезистентних Т-лімфоцитів і індекс імунорегуляції залишався на контрольному рівні, будучи при цьому вірогідно нижчим за аналогічний показник у первинних донорів (на 22,1 %; $p = 0,000385$). Вміст активних лімфоцитів тільки на 14,5 % ($p = 0,000495$) перевищував

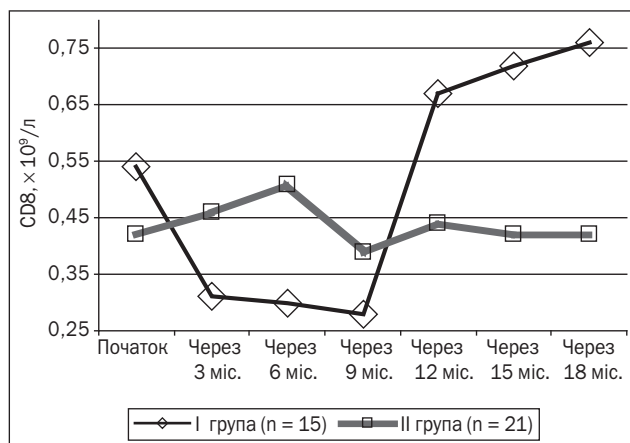


Рисунок 3. Порівняльний аналіз рівнів $CD8$ у групах дослідження

контрольный рівень і було вірогідно нижчим за аналогічний показник у первинних донорів (на 21,9 %; $p = 0,0000838$).

Список литературы

1. Джукаев А.А. Влияние прерывистого тромбоцитоза на организм донора: Автореф. дисс... канд. мед. наук. — 2007.
2. Диковенко Е.А. Реакция крови обезьян на кровопускание в отдаленные сроки после облучения / Диковенко Е.А., Петрова А.С. // Вопросы радиобиологии и механизма действия противолучевых средств. — 2007. — № 4. — С. 35-39.
3. Жеребцов А.А. Современные методы инфузионно-трансфузионной терапии при заболеваниях внутренних органов / Жеребцов А.А. // Вестник Службы крови России. — 2008. — № 1. — С. 9-15.

4. Зав'ялов В.П. Структурно-функціональна класифікація та еволюція цитокінів / Зав'ялов В.П. // Вісник РАМН. — 2010. — № 2. — С. 8-10.

5. Buhring H. Expression of novel surface antigen of early hematopoietic cell / Buhring H., Seifert M. // Annual Academy Science. — 2009. — Vol. 30. — P. 25-39.

6. Cable R.G. Hb screening of blood donors: how close is close enough? / Cable R.G. // Transfusion. — 2003. — Vol. 43. — P. 306-308.

7. Cook J.D. The quantitative assessment of body iron / Cook J.D., Flowers C.H. // Blood. — 2003. — Vol. 101. — P. 3359-3364.

8. Escobar G. Experimental basis for the use of red cell transfusion in the management of anaemic thrombocytopenic patients / Escobar G., Garibo M., Mazzaro R. // Transfusion. — 2008. — Vol. 28. — P. 406-411.

Отримано 06.03.13 □

Яворский В.В.

Харьковская медицинская академия последипломного образования, кафедра анестезиологии, интенсивной терапии, трансфузиологии и гематологии

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ У ПЕРВИЧНЫХ И КАДРОВЫХ ДОНОРОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДОНОРСКОГО СТАЖА

Резюме. Целью данного исследования было провести сравнительный анализ иммунологической реактивности у первичных и кадровых доноров в зависимости от донорского стажа. В результате проведенного исследования было установлено, что при определении уровней иммунокомпетентных клеток в крови у первичных доноров на начальном этапе заболевания существенных различий исследуемых параметров от контрольных показателей не зафиксировано. Происходило недостоверное по отношению к исходному уровню снижение абсолютного количества теофиллин-резистентных Т-лимфоцитов в крови (на 12,2 %, $p = 0,0000362$) за счет обеих иммунорегуляторных субпопуляций. В отличие от первичных, у кадровых доноров не наблюдалось существенного снижения процентного содержания в крови теофиллин-резистентных Т-лимфоцитов и индекс иммунорегуляции оставался на контрольном уровне, будучи при этом достоверно ниже аналогичного показателя у первичных доноров (на 22,1 %, $p = 0,000385$).

Ключевые слова: доноры, плазмаферез, иммунологическая реактивность.

Jaworski V.V.

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Department of Anesthesiology, Intensive Care, Transfusion and Hematology, Kharkiv, Ukraine

COMPARATIVE ANALYSIS OF IMMUNOLOGICAL REACTIVITY IN PRIMARY AND REGULAR DONORS DEPENDING ON THE DONOR EXPERIENCE

Summary. The aim of this study was to carry out a comparative analysis of immunological reactivity in primary and regular donors depending on donor experience. As a result of this research, it was determined that the study of the levels of immune cells in the blood of the primary donor in the initial stage of the disease hadn't revealed significant differences of investigated parameters of control indices. There was a nonsignificant, relative to baseline, reduction of the absolute number in theophylline-resistant T-lymphocytes in the blood (12.2 %, $p = 0.0000362$) by means of both immunoregulatory subpopulations. Unlike regular donors, in primary donors was not observed a significant reduction in the percentage of theophylline-resistant T-lymphocytes in the blood and immunoregulation index remained at the control level, while being significantly lower than the same indicator in primary donors (22.1 %, $p = 0.000385$).

Key words: donors, plasmapheresis, immunological reactivity.