На правах рукописи

ЕФРАТОВА Елена Сергеевна

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ**

**ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ**

**ЛИХОРАДКЕ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ**

14.00.10 – Инфекционные болезни

14.00.36 – Аллергология и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата

медицинских наук

Санкт-Петербург - 1998

Работа выполнена в Самарском Государственном Медицинском

Университете

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор Рощупкин В.И.

Официальные оппоненты:

 доктор медицинских наук, профессор Подлевский А.Ф.

 доктор биологических наук Полевщиков А.В.

Ведущая организация: Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова.

Защита диссертации состоится “\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_” 1998 года в “\_\_\_” часов на заседании диссертационного совета Д 106.03.05 в Военно-медицинской академии (194044, Санкт-Петербург, ул. Лебедева, д.6)

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Военно-медицинской академии.

Автореферат разослан “\_\_\_” \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 1998 года

Ученый секретарь диссертационного совета Ляшенко

доктор медицинских наук, профессор Юрий Иванович

**ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Борьба с вирусными инфекциями входит в разряд одной из наиболее актуальных проблем современной медицины. Особую категорию данных заболеваний составляют зоонозные инфекции, имеющие определенные ареалы распространения в дикой природе. К их числу относится геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) - эндемичное для Средневолжского региона заболевание, вызываемое представителями рода хантавирусов и проявляющееся у человека в форме остро протекающей инфекции с признаками острой почечной недостаточности (ОПН) и выраженных геморрагических проявлений (В.И.Рощупкин, А.А.Суздальцев, 1990). Учитывая возможность тяжелого течения заболевания, поражающего наиболее трудоспособную возрастную категорию населения, трудности проведения интенсивной терапии при коррекции тяжелой почечной недостаточности, неоднозначный подход к целесообразности глюкокортикостероидной терапии, выбранная тема исследований является актуальной.

Основополагающими в генезе ОПН при ГЛПС в настоящее время признаны иммунопатологические механизмы (В.И.Рощупкин, 1969; А.А.Суздальцев, Л.Н.Еланская, Л.Н.Новомлинцева, 1988; E.J.Joiken, J.Lahdevirta, J.Collan, 1978). Механизмы почечной недостаточности при ГЛПС В.И.Рощупкин (1968 г.) в своей гипотезе аутоиммунного повреждения объяснил как проявления гуморального иммунного ответа, направленного против продуктов деструкции тканей, развивающейся под действием вируса. Данные о значении гуморального типа иммунного реагирования при ГЛПС подтверждаются результатами исследования В-системы лимфоцитов, дающей значительную динамику в ходе указанной инфекции (О.А.Алексеев, 1990; Ф.С.Жарская, 1987; R.M.Lewis, H.W.Lee, A.F.See et al., 1991). Сведения о состоянии Т-клеточного ответа при ГЛПС весьма скудны и подчас исследования проводились недостаточно совершенными методами (Л.Н.Новомлинцева, 1984; Ф.С.Жарская, О.А.Конева, 1985; Q.Gao, X.N.Wang, 1989; C.Huang, B.Jin, M.Wang et al., 1994). Имеются в научной литературе и сведения о роли отдельных субпопуляций лимфоцитов/макрофагов крови в иммунном ответе при ГЛПС (Г.А.Мавзютова, 1996; M.Linderholm, L.Bjermer, P.Juto et al, 1993; A.Markotic, S.Rabatic, A.Gagro et al., 1998). Однако патогенетическое влияние данных клеток на продолжительность и тяжесть течения инфекционного процесса, зависимость от периода заболевания не нашло в них достаточного отражения, что подчеркивает актуальность проведенного нами исследования.

В данной работе основным объектом изучения служат лимфоидно-макрофагальные клетки крови больных ГЛПС, а выполнена она с точки зрения клинико-лабораторного иммунологического исследования. Это научное направление - клиническая иммунология - чрезвычайно бурно развивается в последние годы и у нас в стране и за рубежом. Его актуальность подтверждается большим монографическим материалом, подчеркивается в работах ведущих иммунологов последних лет (Р.В.Петров с соавт., 1982, Р.И.Сепиашвили с соавт., 1997, J.Brostoff et al., 1994, I.Roitt et al., 1996).

Определенную значимость проблеме придают методические подходы к ее выполнению. В последние годы разработаны довольно точные и высокоспецифичные методы определения количественного состава субпопуляций лимфоцитов/макрофагов в крови больных с различными заболеваниями иммунопатологического генеза (Р.М.Хаитов с соавт., 1986, 1995, А.Н.Чередеев, Л.В.Ковальчук, 1997). Иммунодиагностическое значение использования подобных современных методик при вирусных инфекциях, в частности, ГЛПС, делает работу актуальной в методическом плане.

**ЦЕЛЬ РАБОТЫ.** Определить иммунодиагностическую и прогностическую значимость динамики изменений со стороны субпопуляционного состава лимфоцитов/макрофагов в крови больных ГЛПС в соответствии с периодами заболевания, степенью его тяжести и применением глюкокортикостероидных препаратов.

**ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:**

1. Провести группировку клинических, клинико-лабораторных и биохимических признаков у больных ГЛПС в соответствии с периодами и фазами заболевания, степенью тяжести и применением глюкокортикостероидных препаратов.
2. Определить общий характер изменений со стороны субпопуляций лимфоцитов/макрофагов крови при ГЛПС, а также возможность влияния пола и возраста больных на иммунологические показатели.
3. Определить динамику иммунологических сдвигов, их специфичность при ГЛПС и соответствие клиническим признакам при легкой, среднетяжелой (с применением и без применения кортикостероидных препаратов) и тяжелой (с применением и без применения кортикостероидных препаратов) формах заболевания.
4. Подтвердить иммунодиагностическую значимость выявленных изменений при ГЛПС в зависимости от периода, степени тяжести заболевания и особенностей лечения.
5. Определить прогностические критерии динамики изменений иммунного статуса для развития неблагоприятных и осложненных форм течения ГЛПС.

**НАУЧНАЯ НОВИЗНА. -** Впервые проведено изучение субпопуляционного состава лимфоцитов/макрофагов в крови больных ГЛПС путем детального анализа его соответствия отдельным периодам в течении заболевания; определены закономерности динамики иммунологических сдвигов;

- установлена зависимость динамики иммунологических сдвигов от степени тяжести заболевания;

- выявлены варианты иммунологической перестройки организма больного при ГЛПС в соответствии с особенностями индивидуального иммунного реагирования;

- определены специфические для ГЛПС иммунодиагностические признаки;

- разработаны иммунодиагностические критерии оценки патогенеза ГЛПС у больных с разной степенью тяжести заболевания и формой иммунного реагирования;

- разработаны иммунопрогностические критерии неблагоприятного течения и развития осложненных форм ГЛПС;

- разработаны иммунологические показания и противопоказания для назначения кортикостероидных препаратов при тяжелых формах ГЛПС.

**ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.**

1. Обосновано использование в лабораторной диагностике при ГЛПС методов определения субпопуляционного состава лимфоцитов/макрофагов в крови больных.

2. Установлены иммунодиагностические критерии развития инфекционного процесса при ГЛПС в соответствии с периодами, фазами и степенью тяжести заболевания.

3. Определены критерии дифференциальной диагностики ОПН вирусного и токсического генеза.

4. Разработаны схемы иммунопатогенеза для легкого, среднетяжелого и тяжелого течения ГЛПС.

5. Выявлены иммунологические показания и противопоказания для назначения кортикостероидных препаратов при тяжелых формах ГЛПС.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Количественный состав и динамика изменений со стороны субпопуляций лимфоцитов/макрофагов в крови больных ГЛПС могут служить диагностическим и прогностическим критерием развития различных клинических форм ГЛПС.
2. Оценка количественного состава и динамики изменений субпопуляционного состава лимфоцитов/макрофагов крови при ГЛПС требует учета индивидуальных особенностей иммунного реагирования организма больного.
3. Оценка количественного состава и динамики изменений со стороны субпопуляций лимфоцитов/макрофагов в крови больных ГЛПС помогает в выработке показаний и противопоказаний к назначению кортикостероидных препаратов.

РЕАЛИЗАЦИЯ И АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

По теме диссертации опубликовано 13 работ, все в центральной печати. Материалы исследований были доложены на заседании Областной ассоциации инфекционистов (Самара, 1997г.), на 1-ой и 2-ой Национальных конференциях Российской Ассоциации Аллергологов и Клинических иммунологов (Москва, 1997, 1998), на итоговой научной конференции профессорско- преподавательского состава военно-медицинского факультета СамГМУ (Самара, 1997г.), итоговой годичной конференции центральной научно-исследовательской лаборатории СамГМУ (Самара, 1997г.), на III (Израиль, 1997) и IV (Сочи, 1998) Международном конгрессах по иммунореабилитологии, на II республиканской научно-практической конференции (Ижевск, 1998).

Материалы работы включены в учебный материал для преподавания курса инфекционных болезней и микробиологии с иммунологией и вирусологией на соответствующих кафедрах Самарского государственного медицинского университета (СамГМУ). Иммунодиагностические и прогностические критерии, разработанные по ходу выполнения работы, используются в практике клиники инфекционных болезней СамГМУ и Самарского областного диагностического центра.

Первичная апробация диссертации проведена на совместном заседании кафедры инфекционных болезней, микробиологии с курсом клинической иммунологии и вирусологии СамГМУ.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА РАБОТЫ

Диссертация представлена на 177 страницах машинописного текста и состоит из введения; обзора литературы; главы, посвященной материалам и методам исследования; 3 глав собственных наблюдений; главы обсуждения полученных результатов; выводов; практических рекомендаций и указателя литературы. Работа иллюстрирована 27 таблицами, 60 рисунками. Указатель литературы включает 207 источников, из них 99 отечественных и 108 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Всего обследовано 180 человек. Под наблюдением находилось 125 больных ГЛПС в возрасте от 15 до 68 лет. Большинство больных (76%) входили в возрастную группу до 45 лет. Среди обследованного контингента преобладали мужчины (83%). Отдельную группу составляли 11 пациентов с почечной недостаточностью неинфекционной (токсической) природы (группа сопоставления). В нее вошли больные с ОПН, развившейся вследствие интоксикации суррогатами алкоголя и наркотическими веществами, лекарственными препаратами и другими токсическими продуктами. В контрольную группу входили 44 клинически здоровых донора соответствующих возрастных групп.

Диагноз ГЛПС ставился на основании характерной клинической картины заболевания с учетом данных эпиданамнеза и лабораторных исследований. Серологическое подтверждение диагноза ГЛПС с помощью РНИФ в парных сыворотках проведено выборочно у 70 больных (56%).

Заболевание протекало в легкой форме в 35% случаев, в среднетяжелой – в 35% и тяжелой – в 30%. У 12% больных среднетяжелой формой и у 22% больных тяжелой формой в состав комплексной терапии входили глюкокортикостероидные препараты. Показаниями к назначению кортикостероидов (КС) при ГЛПС считалось течение заболевания с угрозой развития выраженной почечной недостаточности, затянувшимся олигурическим периодом, развитием инфекционно-токсического шока или выраженными менингоэнцефалитическими проявлениями (Г.С.Ковальский, Т.В.Ковальская, 1965, В.И.Рощупкин, А.А.Суздальцев, 1995).

При характеристике отдельных периодов болезни мы руководствовались классификацией В.И.Рощупкина (1970), согласно которой в течении болезни выделялись следующие периоды: начальный (1-3 день болезни), олигурический (с 2-4 по 8-11 день болезни), полиурический (с 7-13 по 15-22 день болезни) и реконвалесценции (до 30-35 дня с начала болезни). Согласно упомянутой классификации, в олигурическом периоде выделялась первая фаза (температура тела высокая, почечные проявления умеренно выражены) и вторая, когда температура тела чаще всего снижалась, а проявления почечного синдрома достигали максимума. Продолжительность первой (лихорадочной) фазы - со 2-3 по 6-7 дни болезни, второй (безлихорадочной) – до 10-11 дня болезни. В полиурическом периоде выделялась первая фаза, сопровождавшаяся высоким уровнем мочевины и креатинина сыворотки крови, и вторую (с 13-14 до 19-22 дня болезни), когда в большинстве случаев нормализовался уровень мочевины и креатинина, а выраженная полиурия еще сохранялась.

Оценка степени тяжести заболевания проводилась с учетом клинических и биохимических критериев (В.И.Рощупкин, 1969, Г.С.Ковальский, 1970). Для тяжелой формы ГЛПС характерны были высокая степень уремии (мочевина выше 19 ммоль/л, креатинин выше 300 мкмоль/л), снижение суточного диуреза менее 300 мл в сутки, геморрагические проявления в виде кровотечений и гематом различной локализации, макрогематурии, геморрагической сыпи (В.И.Рощупкин, 1969; J.V.Pether, G.Lloyd, 1993; B.Settergren, P.Juto, B.Trollfors et al., 1989). Нельзя не отметить, что существует ряд клинических признаков, уже в ранние сроки болезни предвещающих развитие тяжелых форм ГЛПС. К ним относятся мучительные боли в пояснице и животе; резкое снижение остроты зрения на фоне сильной головной боли, сухости во рту и жажды; упорная рвота; выраженный геморрагический синдром (А.А.Суздальцев, 1992), неврологическая симптоматика (O.A.Alexeyev, V.G.Morozov, 1995). Тахикардия и артериальная гипертензия (В.И.Рощупкин, А.А.Суздальцев, 1990) являются также прогностически неблагоприятными. Из лабораторных показателей тяжести заболевания следует отметить выраженный лейкоцитоз, массивную протеинурию, ранние проявления уремии (А.А.Суздальцев, 1992; B.Settergren, P.Juto, B.Trollfors et al., 1989). Среднетяжелая форма характеризовалась умеренными проявлениями уремии (мочевина от 8,5 до 19 ммоль/л, креатинин от 135 до 300 мкмоль/л) и геморрагического синдрома, диурез находился в пределах от 300 до 900 мл в сутки. Легкой форме соответствовали нормальные показатели мочевины и креатинина, отсутствие геморрагических проявлений, незначительное снижение суточного диуреза. У всех больных велось динамическое наблюдение за изменениями показателей общего анализа крови и мочи, суточного диуреза, проводились пробы по Зимницкому и Нечипоренко. В процессе наблюдения за больными особое внимание обращалось на наличие остаточных явлений в период реконвалесценции в виде стойкой артериальной гипертензии, затянувшейся гематурии, астеновегетативных проявлений и других клинических и лабораторных признаков.

Уровень мочевины в сыворотке крови изучался с помощью цветной реакции с диацетилмонооксином (В.В.Меньшиков с соавт., 1987, C.L.Crocker, 1967, W.Marsh et al., 1965), определение же креатинина в сыворотке крови проводилось по цветной реакции Яффе (В.В.Меньшиков с соавт., 1987, R.Richerich, 1969).

Все находившиеся под наблюдением лица были подвергнуты иммунологическому тестированию. С этой целью общепринятым методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина (Pharmacia chemical, Uppsala, Sweden) проводилось выделение фракции лимфоцитов/макрофагов из периферической крови. Изучение субпопуляционного состава лимфоцитов крови объектов исследования осуществлялось иммуноферментным методом при помощи диагностического набора “Комплект моноклональных антител (МКА) для оценки иммунного статуса человека иммуноферментным методом” (НПО “Диагнотех”). Были использованы следующие МКА: DT-anti-CD3 (специфичность - зрелые Т-клетки); DT-anti-CD4 (Т-хелперы/индукторы); DT-anti-CD8 (супрессорные/цитотоксические Т-клетки); DT-anti-CD16 (NK-клетки, гранулоциты, макрофаги); DT-anti-CD22 (В-лимфоциты); DT-anti-HLA-DR (специфичность - мономорфная детерминанта антигенов гистосовместимости II класса). В качестве коньюгата использовался антимышиный иммуноглобулин, меченный ферментом пероксидазой.

Математическая и статистическая обработка полученных данных проводилась на персональном компьютере IBM AT с помощью пакета программ Microsoft Excel и пакета статистических программ SPSS, а также оригинальных авторских программ. С целью комплексной оценки субпопуляционного состава лимфоцитов/макрофагов крови был применен корреляционный и системный многофакторный анализ (М.В.Углова, Б.А.Углов, 1987).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов/ макрофагов крови при ГЛПС.

В процессе проведения исследований было детально проанализировано содержание основных субпопуляций лимфоцитов/ макрофагов в крови больных ГЛПС, причем анализ показателей иммунного статуса осуществлялся в строгом соответствии с клиническими данными: учитывались степень тяжести, периоды и фазы заболевания, проведение гормонотерапии (последняя не использовалась при легком течении данной инфекции).

Динамика общего количества лимфоцитов и моноцитов в крови больных показала относительно малую диагностическую значимость данных показателей при ГЛПС. Было также установлено отсутствие достоверной половой и возрастной зависимости динамики иммунологических параметров при данном заболевании.

Более информативным оказался анализ содержания отдельных субпопуляций среди лимфоидно-макрофагальных клеток крови больных ГЛПС.

Динамика показателей для CD3-субпопуляции зависела от степени тяжести и периода развития ГЛПС. При легком течении ГЛПС изменений со стороны CD3- субпопуляции не наблюдалось. При среднетяжелом течении заболевания в олигурический период регистрировалось достоверное снижение показателя только в первую фазу (в 1,2 раза), если не применялись КС-препараты, и в обе фазы (в 1,3 раза) - на фоне КС-терапии. При тяжелом течении ГЛПС число CD3+-лимфоцитов уменьшалось во вторую фазу независимо от применения гормонов (в 1,3 раза).

CD4-субпопуляция в наибольшей степени проявляла зависимость от периода инфекционного процесса при ГЛПС. Снижение количества Т-хелперных клеток наблюдалось в олигурию при всех вариантах клинического течения данного заболевания. Наиболее значительным (в 1,2-1,8 раза) оно было при среднетяжелых формах. Переход заболевания в стадию полиурии сопровождался повышением этого параметра до нормальных цифр в большинстве случаев легких форм заболевания, при среднетяжелом течении последний оставался сниженным до окончания полиурического периода. Варианты тяжелого течения ГЛПС сочетались с низким количеством CD4+-клеток только в условиях гормонотерапии, тогда как у больных, не подвергавшихся КС-терапии, переход в стадию реконвалесценции характеризовался повышением содержания Т-хелперов в крови в 1,3 раза.

Величина падения уровня CD8+-клеток проявлялась по-разному при заболеваниях различной степени тяжести. Так, при легких и среднетяжелых вариантах течения изменения корригировались во вторую фазу полиурии. При тяжелых формах они были характерны, в основном, для олигурии (в 1,5 раза), а в стадию реконвалесценции в 1,6 раза превышали нормативы. Особенно четко эти изменения отмечались у пациентов в отсутствие гормонотерапии.

Средние показатели числа CD22+-клеток (неактивированных В-лимфоцитов) давали отклонение от нормальных величин, примерно соответствующее динамике предыдущего показателя. Отличие заключалось в некотором запаздывании нормализации данных при легком и среднетяжелом течении ГЛПС, в то время как при тяжелых формах заболевания содержание СD22-позитивных клеток соответствовало таковому в контрольной группе уже во вторую фазу полиурического периода.

Способность клеток лимфоидно-макрофагального ряда к экспрессии CD16 маркера также снижалась при ГЛПС на протяжении олигурического и полиурического периодов при всех формах заболевания, кроме тяжелого течения, когда, начиная со второй фазы полиурии, этот показатель превышал по значениям таковой у здоровых лиц в 1,7-2,3 раза.

Динамика содержания HLA-DR+-клеток в крови при ГЛПС в значительной мере повторяла изменения со стороны СD16-субпопуляции.

Учитывая тот факт, что содержание отдельных лимфоидно-макрофагальных клеток крови менялось в ходе ГЛПС в зависимости от стадии заболевания, степени тяжести инфекционного процесса и введения в схему лечения КС - препаратов, нами был проведен поиск такого принципа классификации данных, который в сочетании с корреляционным анализом результатов позволил бы более детально охарактеризовать участие отдельных CD- субпопуляций в реализации иммунного ответа. С этой целью нами была произведена оценка статистической значимости каждого из показателей содержания CD-субпопуляций в крови больных ГЛПС. В олигурический период заболевания отрицательную корреляцию с характерными биохимическими признаками ГЛПС – ростом уровня мочевины и креатинина сыворотки крови, проявил только один иммунологический показатель – число CD22+-клеток в крови больных. В результате этой и других серий статистических исследований было решено провести группировку показателей содержания CD-субпопуляций в крови больных ГЛПС соответственно трем интервалам значений для CD22+-клеток по шкале распределения частот: низкое (<21%), умеренное (21-32%) и высокое (>32%) содержание CD22+-лимфоцитов. Поскольку CD22-маркер экспрессируется только неактивированными В-клетками, за исходную гипотезу было принято предположение о том, что низкое содержание CD22+-лимфоцитов свидетельствует о выраженной активации этих клеток в ходе иммунного процесса, а высокое, наоборот, об их депрессивном состоянии.

Анализ соотношения иммунологических показателей при легком течении ГЛПС.

При легком течении ГЛПС (Рис.1) группировка данных в соответствии с количеством CD22+-клеток выявила гораздо больше различий между показателями, чем было зарегистрировано по всей совокупности данных. Высоких значений CD22+-лимфоцитов в олигурическом периоде при легком течении ГЛПС мы не наблюдали.

 А Б В

 периоды заболевания периоды заболевания периоды заболевания

Рис.1. Коэффициенты отклонения для CD22+ (Ряд1), CD3+ (Ряд2), CD4+ (Ряд3), CD8+ (Ряд4), CD16+ (Ряд5), HLA-DR+ (Ряд6) клеток при легком течении ГЛПС на фоне исходно низкого (А), умеренного (Б) содержания CD22+-лимфоцитов в олигурическом периоде и с повышением их числа в полиурическом (В) периоде.

При низком содержании CD22+-лимфоцитов (<21%) количество CD3+-клеток в олигурическом периоде соответствовало нормальным значениям (62,3 + 1,9 %), а CD4-, CD8- и CD16- субпопуляции показывали стабильно низкие значения (уменьшались соответственно в 1,5; 1,6 и 1,9раза). Cитуация менялась только во второй фазе полиурического периода, когда CD8+-лимфоциты давали отрицательный “пик” значений (в 1,8 раза), а число CD16+-клеток начинало резко возрастать (на 77%). Это совпадало с ростом CD22+-лимфоцитов, а также HLA-DR+-клеток. Очевидно, что повышение числа клеток, экспрессирующих HLA-DR маркер, связано с двумя последними субпопуляциями. В клиническом течении заболевания в этих случаях мы ни разу не отмечали отклонений от типичного течения заболевания, характерного для ГЛПС легкой степени тяжести: восстановление суточного диуреза, исчезновение болевого синдрома наступало в обычные сроки (5-7 дней).

При умеренном содержании CD22+-лимфоцитов в крови (21-32%) в олигурическом периоде легких форм ГЛПС отмечалось стабильное снижение показателей (CD8+ в 1,4 раза, CD16+ в 1,8 раза) без выраженных изменений в период полиурии. Однако в тех случаях легкого течения ГЛПС, когда в первую фазу полиурического периода CD22+-клетки давали повышение уровня, стабильность субпопуляционного состава резко нарушалась: нарастало количество CD4+ (в 1,4 раза), CD8+ (в 1,5 раза) и CD16+-клеток (в 2,2 раза). Причем, если первые две категории лимфоцитов начинали показывать нормальные значения, то CD16+-клетки количественно возрастали столь резко, что значительно перекрывали этот параметр в контрольной группе. Подобная динамика иммунологических показателей сопровождалась неблагоприятными клиническими проявлениями: стойкой артериальной гипертензией, обострением фоновых почечных заболеваний, ростом частоты остаточных явлений в период реконвалесценции. Учитывая отмеченные закономерности, нами было высказано предположение об определяющей роли гуморального иммунного ответа в случаях легкого течения заболевания: чем активнее клетки, осуществляющие эту форму иммунного ответа на ранних стадиях заболевания, тем благоприятнее течение ГЛПС. Анализ корреляционных связей между отдельными субпопуляциями подтвердил это предположение. Действительно, при легком течении заболевания в олигурический период активное участие в корреляции приобретали CD22+-лимфоциты, CD16+-клетки, коррелирующие с HLA-DR+ (макрофаги!), а в первую фазу полиурии – еще и CD4+ - то есть все клетки, отвечающие за гуморальный иммунный ответ. Во вторую фазу полиурии наблюдалась отрицательная корреляция CD16+-клеток с CD3+ при отсутствии в составе корреляционных пар HLA-DR+, что дает основание предполагать рост активности естественных киллеров - ЕК - (СD16+ вне связи с HLA-DR+) на этой стадии инфекционного процесса.

Таким образом, совокупность приведенных выше клинико-лабораторных данных позволила выделить два варианта иммунной перестройки организма при легком течении ГЛПС, влияющих на его клиническую картину.

Первый вариант: неосложненное течение, когда количество CD22+-клеток в крови не превышало 32% в олигурическом периоде и оставалось на этом уровне в полиурический период. При данном варианте активность лимфоцитов, определяющих клеточный иммунный ответ, была невелика (относительно низкое содержание CD8+ и CD16+-клеток в крови). Наши наблюдения позволяют считать, что рассматриваемый вариант легкого течения ГЛПС на протяжении всего заболевания, сопровождается выраженными проявлениями гуморального иммунного ответа. В какой степени эти реакции могут носить противовирусный или аутоиммунный характер, в данной работе вряд ли можно доказать. Отметим только, что корреляции между интенсивностью зарегистрированных изменений иммунного статуса и величиной титров специфических антител к хантавирусу нами отмечено не было. Это обстоятельство в большей степени свидетельствует в пользу аутоиммунного процесса.

Второй вариант: отклонение от типичного течения, когда исходно невысокое количество CD22+-клеток возрастало в первую фазу полиурического периода с последующим значительным ростом числа клеток, несущих CD16-маркер в корреляции с HLA-DR+-клетками. Мы предполагаем, что, начиная с перехода в полиурию, интенсивность гуморального иммунного ответа сохранялась почти исключительно за счет эффекторных механизмов элиминации антигенов с участием макрофагов, тем более, что особых изменений со стороны лимфоцитов, участвующих в клеточном иммунном ответе, мы здесь не отмечали.

В целом гипотетические представления о взаимосвязи клинических особенностей легкого течения ГЛПС и иммунологических проявлений данной формы заболевания представлены в схеме на Рис.2.(стр.17)

Анализ соотношения иммунологических показателей при среднетяжелой форме ГЛПС.

При среднетяжелом течении, также как и при легких формах ГЛПС, мы выделили два варианта клинического течения инфекционного процесса с различиями в иммунопатогенезе, а основным иммунологическим критерием такого различия служила динамика в количестве CD22+-клеток. При этом мы не сталкивались со случаями высокого содержания данной субпопуляции в крови больных. Иными словами, в схеме иммунопатогенеза среднетяжелого течения ГЛПС также четко проявляется зависимость от индивидуальных особенностей иммунного реагирования организма больного (Рис.3).

А Б В

периоды заболевания периоды заболевания периоды заболевания

Рис.3. Коэффициенты отклонения для CD22+ (Ряд1), CD3+ (Ряд2), CD4+ (Ряд3), CD8+ (Ряд4), CD16+ (Ряд5), HLA-DR+ (Ряд6) клеток при среднетяжелом течении ГЛПС на фоне исходно низкого (А), умеренного (Б) содержания CD22+-лимфоцитов в олигурическом периоде и с повышением их числа в полиурическом (В) периоде.

Для низкого содержания CD22+-клеток (<21%) наиболее характерным было сочетание с низким уровнем CD4+-субпопуляции на протяжении олигурического периода и первой фазы полиурии (уменьшение в 1,6 раза). Затем величины показателя нарастали и к периоду реконвалесценции достигали нормальных значений. Этот рост на протяжении второй фазы полиурии и реконвалесценции совпадал с выраженным уменьшением числа неактивированных В-лимфоцитов (CD22+) (в 1,6 раза). Что касается остальных субпопуляций, то они демонстрировали стабильное снижение. Таким образом, развитие гуморального иммунного ответа при среднетяжелом течении ГЛПС даже в наиболее благоприятном варианте как бы запаздывало по сравнению с легкими формами болезни.

Особенностью иммунологической перестройки при данном варианте течения ГЛПС служила и определенная последовательность вовлечения лимфоцитов в клеточный иммунный ответ. В олигурическом периоде наибольшее отклонение в сторону уменьшения показателей обнаруживали СD16+-клетки на фоне нормальных величин со стороны клеток, экспрессирующих НLА-DR маркер (то есть речь идет о ЕК, не несущих этот маркер в составе рецептора). Снижение их количества регистрировалось не только при ГЛПС, но и при среднетяжелых формах ОПН токсической природы. Учитывая этот факт, а также неспецифический характер взаимодействия ЕК с клеточными мишенями и способность их к участию как в реакциях противовирусной защиты, так и в аутоиммунных процессах, возникает предположение о том, что в ранние периоды ГЛПС эти клетки являются участниками механизмов аутоиммунного повреждения в почках. Начиная с олигурии и в первую фазу полиурического периода, наблюдалось снижение уровня СD4+-лимфоцитов. На фоне отсутствия в этот период динамики со стороны клеток, отвечающих за гуморальный иммунный ответ, можно думать об участии в клеточных реакциях Тh1, которые относятся к категории СD4+. Эти клетки вместе с СD16 субпопуляцией с высокой степенью достоверности коррелируют с уровнем мочевины и креатинина в олигурическом периоде ГЛПС. Со второй фазы полиурического периода доминирующую роль в клеточных реакциях, судя по динамике и обилию корреляционных связей, занимали СD8+-клетки (цитотоксические Т-лимфоциты). Изменения со стороны этих клеток при среднетяжелых формах относятся к числу специфичных признаков для ГЛПС, так как, во-первых, показывают высокую корреляционную взаимосвязь с уровнем мочевины при данном заболевании, а во-вторых, также как и СD22+-лимфоциты, не снижаются при ОПН другой этиологии.

Умеренное содержание СD22+-клеток (21-32%) в крови больных среднетяжелыми формами ГЛПС изменяло иммунологический фон при данном заболевании в сторону еще большего преобладания клеточных иммунных реакций. Последние достигали максимума развития с участием всех заинтересованных субпопуляций (СD4+, СD8+, СD16+) еще в первую фазу олигурического периода. СD22+-лимфоциты практически не имели динамики и показывали довольно стабильный уровень на протяжении всего заболевания, из всех признаков гуморального иммунного ответа можно указать только на некоторую корреляцию в динамике НLА-DR+ и СD16+ клеток (макрофагов) в течение первой фазы полиурического периода. Преобладание клеточного иммунного ответа мы связывали с большим разнообразием клинических проявлений и развитием осложнений в течении ГЛПС: из 25 человек, отнесенных в указанную подгруппу, только у одного не было установлено каких-либо особенностей по сравнению с группой больных со среднетяжелым течением ГЛПС на фоне исходно низкого содержания СD22+-клеток. В остальных случаях имели место явления менингизма, более выраженные и длительные проявления интоксикации (головная боль, тошнота, рвота, астеновегетативные нарушения) и болевого синдрома (интенсивные боли в пояснице и животе), артериальная гипертензия, отставание нормализации лабораторных показателей. В рамках данной группы больных целесообразно выделить категорию из 4 человек, у которых во вторую фазу полиурического периода наблюдалось стойкое возрастание уровня СD22+-лимфоцитов выше 32%. Все эти пациенты имели особенности в течении заболевания в виде выраженного геморрагического синдрома (петехиальная сыпь, носовые кровотечения, субсклеральные гематомы и др.), а один из них еще и в виде угрозы развития острой сердечно-сосудистой недостаточности (стойкое снижение артериального давления на протяжение всего периода олигурии). Наиболее значительные изменения в иммунограммах проявлялись в виде интенсивного роста показателей содержания СD8+ и СD16+-клеток в крови (соответственно на 156 и 149%), начиная со второй фазы полиурического периода. Отмечено четкое соответствие динамики этих показателей, которому сопутствовало увеличение со стороны СD4+ и НLА-DR+-клеток. Соответствие этих иммунологических признаков определенным клиническим изменениям позволяет нам с той или иной степенью достоверности интерпретировать их как очень резко выраженную форму клеточного иммунного ответа, протекающую в сосудистом русле с участием цитотоксических Т-лимфоцитов и ЕК.

Итак, среднетяжелое течение ГЛПС с иммунопатогенетической точки зрения (схема на Рис.4) (стр.18) отличается от легкого течения преобладанием механизмов клеточного иммунного ответа. Вариант повышения числа СD22+-клеток не столько в олигурию, сколько в полиурический период мы трактовали как преобладание клеточных реакций, протекающих в сосудистом русле. Контроль доли специфических (Tctl – опосредованных) или неспецифических (ЕК – опосредованных) механизмов в этом процессе целесообразно осуществлять, ориентируясь на количество СD8+-клеток в крови больных, которое при благоприятном течении заболевания либо стабильно остается на низких цифрах, либо проявляет динамику к снижению.

Анализ соотношения иммунологических показателей при тяжелой форме ГЛПС.

Тяжелые формы ГЛПС показали большее разнообразие как клинических, так и соответствующих им иммунопатологических вариантов течения заболевания**.** Здесь также велика диагностическая роль такого критерия как уровень в крови СD22+-лимфоцитов, причем последний показатель приобретает не только диагностическую, но и прогностическую значимость, поскольку еще в олигурический период позволяет предположить возможность развития разнообразных осложнений, в том числе и угрожающих жизни больного (инфекционно-токсический шок, кровотечения различной локализации, затяжная анурия). Об этом свидетельствует тот факт, что количество СD22+-лимфоцитов проявляло высокую корреляционную взаимосвязь с важнейшим биохимическим критерием степени тяжести данного заболевания - уровнем креатинина сыворотки крови. Эта корреляция носила отрицательный характер, то есть низкие уровни указанных клеток сочетались с наиболее высокими биохимическими показателями и отражали адекватность иммунного ответа на высокую степень тяжести патологического процесса.

Низкое содержание СD22+-клеток (<21%) в крови (Рис.5) в олигурический период при тяжелом течении ГЛПС, как и при остальных формах заболевания, являлось прогностически наиболее благоприятным (неосложненным) с клинической точки зрения. Оно сопровождалось неуклонным ростом числа HLA-DR+-клеток, которое достигало максимума к первой фазе полиурии.

А Б В



 периоды заболевания периоды заболевания периоды заболевания

Рис.5. Коэффициенты отклонения для CD22+ (Ряд1), CD3+ (Ряд2), CD4+ (Ряд3), CD8+ (Ряд4), CD16+ (Ряд5), HLA-DR+ (Ряд6) клеток при тяжелом течении ГЛПС на фоне исходно низкого (А), умеренного (Б) и высокого (В) содержания CD22+-лимфоцитов в олигурическом периоде.

Затем их количество резко падало во вторую фазу полиурического периода (в 1,4 раза) и вновь резко увеличивалось в период реконвалесценции (в 1,8 раза). Проведенные исследования показали, что описанное падение экспрессии HLA-DR маркера во вторую фазу полиурии могло быть обусловлено подъемом числа естественных киллеров (ЕК) в крови, о чем свидетельствует совпадение отрицательного “пика” HLA-DR+-клеток и положительного “пика” CD16+ (повышение в 2,3 раза).

При умеренном содержании CD22+-лимфоцитов (21-32%) в крови больных с тяжелым течением ГЛПС некоторое понижение числа HLA-DR+-клеток во вторую фазу олигурического – первую фазу полиурического периодов сочеталось с падением числа CD4+-клеток (в 1,2 раза). В этот же период отмечалось низкое содержание в крови CD8+ (в 1,3 раза) и CD16+ (в 1,7 раза) субпопуляций. Первые к периоду реконвалесценции приходили по значениям к норме, а вторые, начиная со второй фазы полиурического периода, давали очень резкий подъем и в реконвалесценцию в 1,5 раза превышали значения в контрольной группе.Изменения в иммунограмме свидетельствовали о слабо выраженном гуморальном ответе на фоне постепенного нарастания клеточных механизмов и их переходa в сосудистое русло (увеличение числа клеток в крови). Клинически отмечалось осложненное течение инфекции при явлениях инфекционно-токсического шока различной степени выраженности (26,7% больных – 4 человека). Несмотря на это у данных больных смена отдельных периодов и фаз заболевания происходило в обычные сроки и оно имело благоприятный исход.

В отличие от легкого и среднетяжелого течения ГЛПС при тяжелых формах уже во вторую фазу олигурического периода регистрировались высокие значения CD22+-клеток (>32%) и заметное их преобладание (до 72%) на последующих стадиях заболевания. На практических же примерах было продемонстрировано преобладание клинически неблагоприятных форм течения ГЛПС при данном варианте иммунной перестройки в ходе заболевания: гораздо более выраженные почечные, геморрагические и инфекционно-токсические нарушения, рост частоты остаточных явлений в реконвалесценцию. Высокое содержание СD22+-лимфоцитов в олигурическом периоде сопровождалось значительным запаздыванием специфических реакций, а на первое место выступали неспецифические защитные механизмы с участием СD16-субпопуляции. Особая роль CD16+-клеток при тяжелом течении ГЛПС и высоком cодержании CD22+-лимфоцитов проявлялась в резких подъемах первых в олигурию (в 2 раза) и периоде реконвалесценции (в 2,3 раза), а также спадом (в 1,7 раза) в первую фазу полиурии. Эти колебания не соответствовали изменениям со стороны HLA-DR+-клеток, то есть, вероятнее всего, были связаны с динамикой ЕК, не экспрессирующих HLA-DR маркер. Таким образом, при тяжелом течении прогноз развития осложнений связан не только с СD22-субпопуляцией, но и требует обязательного учета числа клеток, отвечающих за клеточные реакции (схема на Рис.6) (стр.19).

Чтобы установить, в какой степени эти наблюдения специфичны для ГЛПС, было проведено сопоставление субпопуляционного состава лимфоцитов/макрофагов во вторую фазу олигурического периода ГЛПС, когда максимально проявляется ОПН, с вариантами развития этого состояния в условиях токсического поражения почек. Сравнительный анализ тяжелых форм ОПН вирусного и токсического генеза показал, что различия отмечаются по количественному составу всех субпопуляций, кроме СD16+-клеток, однако, степень таких различий неоднозначна. Особенно велико несоответствие в количестве СD22+-клеток, снижение которых при ГЛПС таково, что различие между показателями при ОПН разной этиологии увеличивается до 60%.

А Б



Рис.7. Диаграмма соответствия интегральных показателей для субпопуляций лимфоцитов/макрофагов процентному содержанию CD22+-клеток в крови больных в олигурическом (А) и полиурическом (Б) периодах тяжелого течения ГЛПС без применения (Ряд1) и с применением (Ряд2) кортикостероидных препаратов.

Учитывая тот факт, что 70% обследованных нами больных с тяжелым течением ГЛПС получали в ходе лечения КС-препараты, а также результаты клинических наблюдений, показавшие, что в ряде случаев применение гормонов сочетается с удлинением сроков заболевания, большей выраженностью геморрагических проявлений и ростом частоты остаточных явлений в период реконвалесценции, мы сочли целесообразной выработку четких диагностических критериев для назначения гормонов. Для этого мы с помощью системного многофакторного анализа провели сопоставление интегральных показателей субпопуляционного состава лимфоцитов/ макрофагов в крови больных тяжелыми формами ГЛПС, получавших и не получавших кортикостероиды (Рис.7). Влияние последних на интегральные показатели не зависело от периода заболевания, а проявлялось в наибольшей степени только при очень низком (9-14%) и очень высоком (36 % и выше) содержании CD22+-клеток в крови, усугубляя их. Поскольку высокое содержание клеток, эксперессирующих CD22 маркер (неактивированных В-лимфоцитов), мы сочли клинически неблагоприятным признаком, то, в соответствии с данными системного многофакторного анализа, мы предположили, что в тех случаях, когда процесс активации этих клеток вследствие тех или иных причин ослаблен (число CD22+-лимфоцитов превышает 36%), назначение кортикостероидных препаратов еще больше усугубляет иммунодепрессию и приводит к развитию неблагоприятного течения заболевания.

В Ы В О Д Ы

1. Динамическое определение субпопуляционного состава лимфоцитов/макрофагов при ГЛПС имеет иммунодиагностическую и прогностическую ценность и отражает характер иммунологических сдвигов соответственно периодам и степени тяжести заболевания.
2. Характер изменения субпопуляционного состава лимфоцитов/макрофагов при ГЛПС не зависит от пола и возраста больного, а его ведущим критерием выступает число СD22+-лимофцитов в крови в олигурический период, а также динамика последних в период полиурии.
3. С точки зрения определения субпопуляционного состава лимфоцитов/макрофагов при ГЛПС выделение двух фаз в течении олигурического и полиурического периодов заболевания следует считать целесообразным. Одним из критериев разграничения на фазы могут служить иммунологические параметры.
4. При легкой, среднетяжелой и тяжелой формах заболевания возможно существование нескольких вариантов развития иммунного ответа, влияющих на клинический прогноз неблагоприятного течения ГЛПС.
5. При легкой форме ГЛПС иммунологическим критерием наиболее благоприятного клинического течения заболевания служит стабильное снижение числа СD22+-лимфоцитов в крови на протяжении всего заболевания.
6. При среднетяжелой форме ГЛПС иммунологические критерии неосложненного течения заболевания включают стабильное снижение числа СD22+-клеток на протяжении всего заболевания, а также отсутствие динамики в сторону повышения числа СD8+-лимфоцитов, начиная со второй фазы полиурического периода.
7. При тяжелой форме ГЛПС прогностически благоприятными иммунологическими критериями развития инфекционного процесса наряду со стабильным снижением количества СD22+-лимфоцитов на протяжении олигурического периода может быть параллельное снижение числа СD16+-клеток. Динамика со стороны указанных субпопуляций в сторону роста сверх нормативных значений на любой стадии заболевания является прогностическим признаком повышения тяжести процесса и развития осложнений.
8. Применение кортикостероидных препаратов, как правило, снижает показатели субпопуляционного состава лимфоцитов/макрофагов. Исключение составляют тяжелые формы ГЛПС на фоне нормального или повышенного содержания СD22+-клеток, когда вызванный гормонами рост иммунологических показателей сопровождается повышением риска развития осложнений.

**ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. В практику лабораторно-диагностических исследований при ГЛПС целесообразно включать определение субпопуляционного состава лимфоцитов/ макрофагов крови с использованием моноклональных антител к CD и HLA-DR маркерам этих клеток.
2. При проведении иммунодиагностики ГЛПС и определении показаний к назначению кортикостероидных препаратов необходимо учитывать индивидуальные особенности субпопуляционного состава лимфоцитов/макрофагов в крови больных. При этом целесообразно использовать количество CD22+-клеток как ведущий прогностический критерий возможности развития осложнений в течении ГЛПС.
3. При проведении дифференциальной диагностики ОПН как клинического признака ГЛПС или токсической природы целесообразно учитывать факт выраженного снижения уровня со стороны СD22 и CD8 субпопуляций как специфических признаков ГЛПС.
4. При проведении иммунодиагностики ГЛПС целесообразно ориентироваться на схему вовлечения отдельных субпопуляций лимфоцитов/макрофагов в инфекционный процесс на разных стадиях его развития и в зависимости от степени тяжести заболевания, предложенную в данной работе.
5. При назначении кортикостероидных препаратов в случаях тяжелого течения ГЛПС целесообразно учитывать, что нормальное или высокое содержание CD22+-клеток является прогностически неблагоприятным признаком.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Иммунологические критерии реабилитации при геморрагической лихорадке с почечным синдромом /тезисы доклада/ International Journal of Immunorehabilitation. Moscow. –1994.-№2.-Р.170. (Соавт. И.П.Балмасова, В.И.Рощупкин).
2. Иммуно-прогностические критерии течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) /статья/ Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии. Сборник трудов. Москва. -1997.-С.314. (Соавт. В.И.Рощупкин, В.Г.Морозов).
3. Marcers of large granular lymphocites (LGL) under the influence of epenephrine in vitro /тезисы/ Immunology Letters.-Vol.56.-№1-3.—1997.-P.100.-/P.2.03.10/ (O.V.Lavrov).
4. Изменения клеточного иммунного ответа при острой почечной недостаточности различной природы /тезисы/ International Journal of Immunorehabilitation. Moscow. –1997.-№4.-Р.6. (Соавт. В.И.Рощупкин, В.Г.Морозов).
5. Иммунодиагностические аспекты нагрузочных тестов с биогенными аминами /тезисы/ International Journal of Immunorehabilitation. Moscow. –1997.-№4.-Р.6. (Соавт. И.П.Балмасова, О.В.Лавров).
6. Immunodiagnostic aspects of loading tests with biogenic amines /тезисы/ International Journal of Immunorehabilitation. Moscow. –1997.-№5.-P.76. (I.P.Balmasova, O.V.Lavrov).
7. The changes of cell immune response in acute renal deficiency of viral etiology /тезисы/ International Journal of Immunorehabilitation. Moscow. –1997.-№5.-Р.85. (V.I.Roshchupkin, V.G.Morozov).
8. The role of renal insufficience in immunodepression mechanisms in haemorrhagic fever with renal syndrome /тезисы/ The Immunologist. –1997.-Suppl.1.-P.65. (V.I.Roshchupkin, V.G.Morozov).
9. The influence of macrophages on biogenic amines immunomoduling effects in vitro /тезисы/ Le medecin Biopatologiste.- №43-44. Paris 1997.-P.60. (O.V.Lavrov, M.F.Ivanov).
10. A major outbreak of hemorrhagic fever with renal syndrome in the Samara region, European Russia /статья/ Infection. –1998.-Vol.26.-№5.-in press (O.A.Alexeyev, A.A.Suzdaltsev, V.N.Verhovtsev).
11. Иммунные механизмы в патогенезе геморрагической лихорадки с почечным синдромом /статья/ Терапевтический архив.-1998.- в печати (О.А.Алексеев, А.А.Суздальцев).
12. CD-субпопуляции лимфоцитов и тяжесть течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) /тезисы/ Актуальные проблемы природноочаговых инфекций. Сборник материалов. Ижевск. – 1998.-С.99-100.
13. CD-субпопуляции лимфоцитов и тяжесть течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) /тезисы/ Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии. Сборник трудов. Москва. -1998.-С.412. (Соавт. В.И.Рощупкин).