

ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ HLA-DR-АНТИГЕНОВ НА МОНОЦИТАХ У ДЕТЕЙ И ЕЕ КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПРИ СЕПСИСЕ

Зурочка А.В.¹, Котляров А.Н.¹, Кувайцев М.В.¹,
Квятковская С.В.¹, Зурочка В.А.¹, Рябова Л.В.¹,
Хайдуков С.В.²

¹ ГОУ ВПО Челябинская государственная медицинская академия, г. Челябинск

² Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Резюме. Временный иммунодефицит часто связывают с патофизиологическими состояниями, такими как инфаркт миокарда, серьезные травмы или хирургические вмешательства. Однако нет четкого диагностического критерия указывающего на присутствие или отсутствие временного иммунодефицита. Была предложена методика для мониторинга септического состояния пациентов с открытыми травмами и в послеоперационный период с использованием метода проточной цитометрии. Принцип оценки септического состояния заключается в измерении экспрессии HLA-DR антигенов на поверхности моноцитов периферической крови. Критерием оценки состояния пациента при сепсисе служит относительное количество моноцитов, экспрессирующих HLA-DR, и благоприятным прогнозом считается, если количество позитивных клеток превышает 40% на 5 день после госпитализации и проведения соответствующей терапии. Этот метод может найти широкое применение для оценки и мониторинга септического состояния пациентов.

Ключевые слова: проточная цитометрия, HLA-DR антигены, многопараметровый анализ, сепсис.

Zurochka A.V., Kotlyarov A.N., Kuvaytsev M.V., Kvyatkovskaya S.V., Zurochka V.A., Ryabova L.V., Khaidukov S.V.

CHANGES OF HLA-DR ANTIGEN EXPRESSION ON MONOCYTES IN CHILDREN AND THEIR CLINICAL SIGNIFICANCE IN SEPSIS

Abstract. Temporary immunodeficiency is often associated with various pathological conditions, such as myocardial infarction, severe trauma, or major surgery. However, there are no clinical criterions indicative for presence or absence of such immune deficiency. Meanwhile, clinical signs of infectious complications may be absent because of deficient immune response.

A technique for monitoring septic conditions in the patients with open traumas and during post-surgical period has been proposed, employing a flow-cytometric approach. The evaluation principle for septic conditions consists of measuring expression of HLA-DR antigens at the surface of peripheral blood monocytes.

As a criterion of patient evaluation in septic state, a relative amount of monocytes expressing HLA-DR may be applied, and the disease prognosis is considered as favorable, if the amounts of positive cells exceed 40% by day 5 after the patient was admitted to the hospital, and an adequate treatment was carried out. This technique may find wide application for estimation and monitoring of septic conditions in the patients. (*Med. Immunol.*, vol. 10, N 4-5, pp 379-388)

Адрес для переписки:

Хайдуков Сергей Валерьевич
Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Тел.: (495) 336-02-55, +7 (985) 103-41-62.
E-mail: khsv@ibch.ru; khsergey54@mail.ru

Введение

Временные дефекты иммунитета часто связывают с патологическими состояниями, такими как инфаркт миокарда, серьезные травмы или хирургические вмешательства [15]. Дефекты иммунитета в их самой серьезной форме,

иммунопаралич, могут представлять значительную угрозу для жизни пациента [20]. Однако нет четкого диагностического критерия, способного указать на присутствие или отсутствие дефектов иммунитета, заканчивающиеся параличом иммунной системы, особенно тогда, когда клинические признаки развития такого инфекционного осложнения могут отсутствовать. Поэтому необходим некий лабораторный маркер, который может позволить на ранних стадиях диагностировать временную иммунодепрессию у пациентов с высоким риском возникновения инфекционных септических осложнений.

Достаточно часто нарушения активности моноцитов наблюдаются при септическом шоке. Исследования патогенеза септического шока все более и более сосредотачиваются на роли иммунной системы, поскольку изменения ее функций являются главным фактором риска для развития серьезных инфекций у пациентов, которые подвергались хирургическому вмешательству. Так, многочисленные отклонения механизмов иммунной защиты возникают у пациентов, находящихся в критическом состоянии, в послеоперационный период. К ним относятся понижение экспрессии моноцитами антигенов главного комплекса гистосовместимости класса II (HLA-DR), измененная активация Т-клеток, пониженный хемотаксис и фагоцитоз нейтрофилов. Данные нарушения были описаны также и при раневых инфекциях и травмах [13, 18].

HLA-DR принадлежит к молекулам главного комплекса тканевой совместимости класса II (МНС класс II), ответственных за представление антигена Т-клеткам. Моноциты у здоровых индивидуумов экспрессируют на своей поверхности молекулы HLA-DR в высокой плотности и легко определяются при помощи метода проточной цитометрии. Однако моноциты с уменьшенной или отсутствующей экспрессией молекул HLA-DR не могут выполнять свою антигенпредставляющую функцию [27] и не обладают способностью продуцировать воспалительные медиаторы в ответ на соответствующие стимулы [21]. В свою очередь уменьшение экспрессии HLA-DR на моноцитах коррелирует с увеличением риска инфекционных и других осложнений для пациентов с серьезной травмой [6] или серьезными ожогами [23]. Аналогичный эффект наблюдали при панкреатите [22], при осложнениях в сердечно-легочной хирургии [25], после трансплантации [10, 12, 16] и у пациентов после нейрохирургического удаления опухоли [4]. Значительное снижение экспрессии HLA-DR на моноцитах может служить тестом для иденти-

фикации временной иммунодепрессии у пациентов, которая является весьма опасной в связи с возможностью инфекционных осложнений. Кроме всего перечисленного выше, уменьшение экспрессии HLA-DR на моноцитах коррелирует с клиническими результатами у пациентов с сепсисом [20, 26].

У пациентов с беспрецедентно быстрым восстановлением после серьезной травмы или операции уровень экспрессии HLA-DR на моноцитах падал в течение нескольких часов после травмы или операции, но восстанавливался до нормального уровня в течение недели. Тогда как в тех случаях, когда развивалась инфекция, возвращение экспрессии HLA-DR к норме занимало 3 и более недель. С другой стороны, у пациентов с инфекцией и последующим сепсисом, приведшим к смерти, экспрессия HLA-DR резко снижалась и никогда не возвращалась к нормальному уровню [9, 11].

Kawasaki T. с соавт. показали, что экспрессия HLA-DR на моноцитах и их ответ на LPS значительно снижены в результате хирургического стресса во время операции. Эти результаты могут частично объяснить ухудшение механизмов защиты пациента [13].

Некоторые авторы связывают процесс снижения экспрессии HLA-DR с усилением продукции IL-10, поскольку сыворотка пациентов с сепсисом снижает экспрессию HLA-DR, а моноклональные антитела к IL-10 блокируют этот эффект [8]. Активно влияют на снижение экспрессии HLA-DR антигенов и глюкокортикоиды [17].

Таким образом, снижение экспрессии моноцитами HLA-DR антигенов, которые играют критическую роль в представлении антигена Т-хелперам, является показателем развивающейся инфекции в послеоперационный период [24], а диагностика HLA-DR в течение первых 2 дней после операции может служить показателем для применения более раннего терапевтического вмешательства [6].

Клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о том, что пациенты с низкой экспрессией HLA-DR на моноцитах должны получать терапию с использованием иммуномодуляторов, таких как IFN γ [19], растворы, обогащенные глутамином [5], мурамилсодержащие гликопептиды [14] и т.д., чтобы стимулировать иммунную систему и в первую очередь моноциты.

Все перечисленные выше данные привели к тому, что была предложена методика для мониторинга септического состояния пациентов с открытыми травмами и в послеоперационный период с использованием метода проточной цитометрии [7, 19].

Принцип оценки состояния пациента при сепсисе заключается в измерении экспрессии HLA-DR антигенов на поверхности моноцитов, и для этого используется цельная периферическая кровь. Анализ проводят на двух окрашенных образцах, один из которых является контрольным. Для локализации моноцитов применяют CD14, который представляет собой рецептор эндотоксина (липополисахарид (LPS) [28]) и является одним из основных маркеров для моноцитов. Экспрессию HLA-DR измеряют в многопараметровом анализе и сравнивают с контрольным образцом, где вместо моноклональных антител к HLA-DR применяют неспецифические антитела того же изотипа.

Критерием оценки состояния пациента при сепсисе служит относительное количество моноцитов, экспрессирующих HLA-DR, и благоприятным прогнозом считается, если количество позитивных клеток превышает 40% на 5 день после госпитализации и проведения соответствующей терапии. Данный критерий был получен в результате статистической обработки результатов цитометрического анализа моноцитов периферической крови у пациентов, госпитализированных с септическим шоком. Было показано, что в течение 48 часов после госпитализации экспрессия HLA-DR на моноцитах была значительно снижена у септических пациентов ($25 \pm 4\%$) по сравнению со здоровыми донорами ($89 \pm 1\%$). С другой стороны, сравнение экспрессии HLA-DR на моноцитах между выжившими пациентами и в последствии погибшими не выявила значительного различия в первые 48 часов после госпитализации. Однако экспрессия HLA-DR на моноцитах на 5 день после госпитализации была значительно более высокой ($> 40\%$) у оставшихся в живых пациентов, что свидетельствовало о восстановлении их иммунологического статуса [19].

Все выше описанные исследования, как правило, проводили на взрослых пациентах, в то же время данные по оценке уровня экспрессии HLA-DR антигенов моноцитами у детей с хирургическим сепсисом отсутствуют. Для подтверждения значимости данного критерия развития септического состояния и выявления особенностей его изменения было проведено исследование уровня экспрессии HLA-DR антигенов на моноцитах периферической крови у детей с диагнозом «тяжелый сепсис».

Материалы и методы

Исследование уровня экспрессии HLA-DR антигенов на моноцитах периферической крови у детей с диагнозом «тяжелый сепсис» проводили на 2-3 сутки и на 10-14 день после поступления

в стационар. Диагноз «сепсис» ставился клинически на основе наличия вторичных пиемических очагов (абсцессы, флегмоны, остеомиелит и т.д.), полиорганной недостаточности и подтверждался лабораторно на основе положительного теста на прокальцитонин (100% пациентов), посева бактерий из пиемических очагов и крови. Бактерии были выделены из крови у 38% пациентов (5 человек), из них в 4 случаях *S. aureus*, в 1 — *E. coli*; из пиемических очагов у 84,6% пациентов, из них у 8 человек был выделен *S. aureus*, у 2 — *E. coli* и у 1 — *Ps. aeruginosa*.

Общий анализ крови исследовали по стандартной методике на гематологическом анализаторе LH-500 («Beckman Coulter», США). Исследование иммунофенотипа мононуклеаров периферической крови проводили методом прямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD45, CD56 и HLA-DR меченых изотиоцианатом флюоресцеина (ФИТЦ) и фикоэритрином (PE) («Beckman Coulter», США). Окрашенные клетки анализировали при помощи проточного цитометра Cytomics FC-500 («Beckman Coulter», США), в многопараметрическом анализе с поэтапным гейтированием [3]. Фагоцитарную активность клеток оценивали по методу, описанному И.С. Фрейдлин [2]. Способность фагоцитов восстанавливать нитросиний тетразолий в диформаза (НСТ-тест) оценивали методом А.Н. Маянского и соавт. [1]. Иммуноглобулины и фрагменты комплемента оценивали методом ИФА-анализа с использованием тест-систем ООО «Хема-медика» (Санкт-Петербург, Россия) и ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург, Россия) соответственно. Результаты исследований подвергали математической обработке с применением пакета прикладных программ «Statistica for Windows 6.0». Достоверность отличий оценивалась по критериям Wilcoxon. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате проделанной работы было обследовано 3 группы пациентов (табл. 1-4). Первую группу составили 16 детей на фоне полного здоровья (контрольная группа), средний возраст $5,2 \pm 2,3$ лет. Во вторую и третью группу (исследования проводились на одних тех же пациентах в динамике) вошли 13 детей с диагнозом «сепсис», забор крови у которых осуществлялся при поступлении (на 2-3 сутки) и через 10 дней, соответственно, на фоне комплексной интенсивной терапии с применением полиоксидония в стандартных дозировках препарата, средний возраст в этих группах составил $4,8 \pm 2,3$ лет.

ТАБЛИЦА 1. ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ С ХИРУРГИЧЕСКИМ СЕПСИСОМ ДО И НА 10 СУТКИ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ. РЕЗУЛЬТАТ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Параметры обследования	Статистические показатели	Контроль n = 16	2-3 сут. после поступления в стационар n = 13	10 сут. после поступления в стационар n = 9	Направленность сдвигов*		
					2-3 сут./ контр.	10 сут./ контр.	10 сут./ 2-3 сут.
Количество лейкоцитов крови	M±m	7,21±0,44	18,23±1,19 p₁ < 0,05	14,73±0,79 p₂ < 0,05 p₃ < 0,05	↑	↑	↓
Процент лимфоцитов	M±m	50,0±2,0	35,0±5,0 p₁ < 0,05	49,0±6,0	↓	0	0
Процент моноцитов	M±m	8,0±0,5	7,0±0,6	8,0±0,7	0	0	0
Процент сегментоядерных нейтрофилов	M±m	36,0 ± 3,0	48,0 ± 4,0	40,0±7,0	0	0	0
Процент палочкоядерных нейтрофилов	M±m	3,0±0,7	13,0±1,2 p₁ < 0,05	5,0±0,86 p₃ < 0,05	↑	0	↓
Процент эозинофилов	M±m	3,0±0,6	1,0±0,3 p₁ < 0,05	8,0±1,9 p₃ < 0,05	↓	0	↑
Процент базофилов	M±m	0±0	0±0	0±0	0	0	0
Процент юных нейтрофилов	M±m	0±0	0±0	0±0	0	0	0
Абсолютное количество лимфоцитов	M±m	3,8±0,4	6,0±0,7 p₁ < 0,05	6,6±0,8 p₂ < 0,05	↑	↑	0
Абсолютное количество моноцитов	M±m	0,6±0,07	1,2±0,16 p₁ < 0,05	1,3±0,14 p₂ < 0,05	↑	↑	0
Абсолютное количество гранулоцитов	M±m	3,1±0,2	11,1±1,5 p₁ < 0,05	7,8±0,6	↑	0	0

Примечания.p₁ – достоверность различий показателей между септическими больными на 2-3 день и контрольной группой;p₂ – достоверность различий показателей между септическими больными на 10 сутки и контрольной группой;p₃ – достоверность различий показателей между септическими больными на 10 и 2-3 сутки;

*0 – отсутствие сдвигов.

Исследование показало, что во второй группе пациентов по сравнению с группой контроля выявлено наличие лейкоцитоза $18,23 \pm 1,19 \times 10^9$ кл/л. При этом отмечено повышение содержания палочкоядерных форм нейтрофилов до $13,0 \pm 1,2\%$ и снижение количества лимфоцитов до $35,0 \pm 5,0\%$ на фоне повышения их абсолютного количества. Также отмечалось повышение абсолютного количества как гранулоцитов, так и моноцитов (табл. 1).

Со стороны фагоцитарной функции нейтрофилов выявлено снижение интенсивности фагоцитоза до $1,45 \pm 0,15$ (в группе контроля $2,17 \pm 0,15$) и повышение спонтанного индекса НСТ до $0,72 \pm 0,06$ (в контрольной группе $0,43 \pm 0,07$) (табл. 2). Характеризуя состояние гуморального

иммунитета можно отметить увеличение секреции IgA и активацию C5a компонента комплемента (табл. 3).

Оценка субпопуляций лимфоцитов периферической крови выявила повышение абсолютного содержания лимфоцитов, в частности В-лимфоцитов (CD3-CD19⁺), а также и моноцитов (CD45⁺CD14⁺). В популяции NK-клеток (CD3-CD16⁺CD56⁺) наблюдалось снижение их процентного содержания относительно нормы. Анализ моноцитарной популяции выявил снижение относительного количества моноцитов экспрессирующих молекулы HLA-DR до $29 \pm 3,9\%$, в то время как в группе контроля было $89,2 \pm 1,2\%$ (табл. 4).

На 10 сутки у детей с диагнозом «сепсис» сохранялись вышеописанные изменения с неко-

ТАБЛИЦА 2. ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ С ХИРУРГИЧЕСКИМ СЕПСИСОМ ДО И НА 10 СУТКИ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ. РЕЗУЛЬТАТ ИССЛЕДОВАНИЙ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ

Параметры обследования	Статистические показатели	Контроль n = 16	2-3 сут. после поступления в стационар n = 13	10 сут. после поступления в стационар n = 9	Направленность сдвигов*		
					2-3 сут./ контр.	10 сут./ контр.	10 сут./ 2-3 сут.
Активность фагоцитоза нейтрофилов, %	M±m	54,69±2,79	48,1±2,86	51,8±3,75	0	0	0
Интенсивность фагоцитоза нейтрофилов, усл. ед.	M±m	2,17±0,15	1,45±0,15 p₁ < 0,05	2,07±0,21	↓	0	0
ФЧ нейтрофилов	M±m	3,95±0,14	2,98±0,25	4,04±0,33	0	0	0
НСТ спонтанная активность, %	M±m	32,38±4,43	47,1±3,46	31,4±4,93	0	0	0
НСТ спонтанная индекс, усл. ед.	M±m	0,43±0,07	0,72±0,06 p₁ < 0,05	0,43±0,07	↑	0	0
НСТ индуцированная активность, %	M±m	52,13±3,53	55,9±4,35	55,8±5,97	0	0	0
НСТ индуцированная индекс, усл. ед.	M±m	0,67±0,05	0,71±0,09	1,5±0,67	0	0	0

Примечания.p₁ – достоверность различий показателей между септическими больными на 2-3 день и контрольной группой;

*0 – отсутствие сдвигов.

ТАБЛИЦА 3. ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ С ХИРУРГИЧЕСКИМ СЕПСИСОМ ДО И НА 10 СУТКИ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ. РЕЗУЛЬТАТ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Параметры обследования	Статистические показатели	Контроль n = 16	2-3 сут. после поступления в стационар n = 13	10 сут. после поступления в стационар n = 9	Направленность сдвигов*		
					2-3 сут./ контр.	10 сут./ контр.	10 сут./ 2-3 сут.
IgA, г/л	M±m	1,12±0,21	2,82±0,45 p₁ < 0,05	3,03±0,57 p₂ < 0,05	↑	↑	0
IgM, г/л	M±m	3,2±0,36	3,33±0,42	5,65±0,79 p₂ < 0,05 p₃ < 0,05	0	↑	↑
IgG, г/л	M±m	14,47±1,92	18,1±2,1	26,2±2,09 p₂ < 0,05 p₃ < 0,05	0	↑	↑
C1q, нг/мл	M±m	493,2±33,9	651±50	741±68 p₂ < 0,05	0	↑	0
Анафилотоксин C3a, нг/мл	M±m	446,9±27	398,8±50	433±52	0	0	0
Анафилотоксин C5a, нг/мл	M±m	23,8±1,82	46,0±7,67 p₁ < 0,05	52,0±20,0 p₂ < 0,05	↑	↑	0

Примечания.p₁ – достоверность различий показателей между септическими больными на 2-3 день и контрольной группой;p₂ – достоверность различий показателей между септическими больными на 10 сутки и контрольной группой;p₃ – достоверность различий показателей между септическими больными на 10 и 2-3 сутки;

*0 – отсутствие сдвигов.

ТАБЛИЦА 4. ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ С ХИРУРГИЧЕСКИМ СЕПСИСОМ ДО И НА 10 СУТКИ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ. РЕЗУЛЬТАТ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ

Параметры обследования	Статистические показатели	Контроль n = 16		2-3 сут. после поступления в стационар n = 13		10 сут. после поступления в стационар n = 9		Направленность сдвигов*		
		отн. (%)	абс.	отн. (%)	абс.	отн. (%)	абс.	2-3 сут./ контр.	10 сут./ контр.	10 сут./ 2-3 сут.
Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD19 ⁻)	M±m	69,75±1,73	2723±343	61,62±3,4	3748±493	75,87±2,15 p₃ < 0,05	5189±918 p₃ < 0,05	0	0	↑
Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	M±m	37,56±1,39	1467±193	37,4±2,3	2253±294	41,34±1,96	2912±603	0	0	0
Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	M±m	23,62±1,6	938±158	19,36±1,6	1190±193	23,68±2,11	1579±289	0	0	0
Соотношение (CD4/CD8)	M±m		1,71±0,14		2,11±0,23		1,95±0,32	0	0	0
Т-NK-лимфоциты (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	M±m	2,06±0,34	88,0±24,0	0,73±0,18	37,0±8,0	0,61±0,2	32,7±10,2 p₂ < 0,05	0	↓	0
NK-лимфоциты (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	M±m	11,7±1,3	426±54	6,13±1,3 p₁ < 0,05	411±101	7,5±1,2 p₂ < 0,05 p₃ < 0,05	526±115	↓	↓	↑
В-лимфоциты (CD3 ⁺ CD19 ⁺)	M±m	16,95±1,13	647±75	28,4±3,6	1637±314 p₁ < 0,05	14,6±1,6 p₃ < 0,05	998±248 p₃ < 0,05	↑	0	↓
Т-лимфоциты (Tx+Tc)	M±m	61,17±2,09		56,74±3,71		65,02±1,84		0	0	0
Лимфоциты (T+B+NK)	M±m	98,58±0,37		96,16±1,0		97,99±0,7		0	0	0
Т-лимфоциты CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	M±m	1,95±0,27	68±9	2,66±0,47	147±32	4,7±1,4	246±61 p₂ < 0,05	0	0	0
Моноциты (CD45 ⁺ CD14 ⁺)	M±m		387±46		932±476		1196±1570	↑	↑	0
Моноциты (HLA-DR ⁺)	M±m	89,2±1,2	348±41	29±3,9 p₁ < 0,05	354±56	49±9,5 p₂ < 0,05	516±111	↓	↓	0

Примечания.p₁ – достоверность различий показателей между септическими больными на 2-3 день и контрольной группой;p₂ – достоверность различий показателей между септическими больными на 10 суток и контрольной группой;p₃ – достоверность различий показателей между септическими больными на 10 и 2-3 сутки;

* 0 – отсутствие сдвигов.

торой положительной динамикой по сравнению с контрольной группой. Но происходило дальнейшее снижение абсолютного содержания Т-NK-лимфоцитов ($CD3^+CD16^+CD56^+$). Однако было отмечено увеличение абсолютного количества лимфоцитов, несущих маркеры поздней активации ($CD3^+HLA-DR^+$). Данный показатель свидетельствовал в пользу того, что происходила активация всего клеточного звена иммунной системы.

При сравнении третьей группы со второй отмечалось снижение количества лейкоцитов крови до $14,73 \pm 0,79 \times 10^9$ кл/л и уменьшение содержания палочкоядерных форм нейтрофилов до $5 \pm 0,86\%$, т.е. нарастала эозинофилия. Со стороны субпопуляционного состава лимфоцитов имело место увеличение Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^-$) и продолжалось дальнейшее падение как процентного, так и абсолютного содержания Т-NK-лимфоцитов ($CD3^+CD16^+CD56^+$). Однако происходило увеличение абсолютного количества NK-лимфоцитов ($CD3^-CD16^+CD56^+$). В В-лимфоцитарном ($CD3^-CD19^+$) звене наблюдалось снижение как в процентном, так и в абсолютном содержании. Снижалось абсолютное количество гранулоцитов. Напротив повысилось до $49 \pm 9,5\%$ количество моноцитов, экспрессирующих молекулы HLA-DR (табл. 4). Оценка фагоцитарного звена иммунной системы выявила снижение НСТ спонтанного индекса до уровня контрольной группы (табл. 2). Со стороны гуморального звена иммунной системы был выявлен рост концентрации иммуноглобулинов классов М и G (табл. 3).

Таким образом, у детей с сепсисом без учета экспрессии на моноцитах молекул HLA-DR отмечается классическая картина, характерная для острого воспаления с формированием де-

прессии Т-клеточного звена иммунной системы. Иное значение приобретают выше приведенные результаты с учетом данных по состоянию экспрессии HLA-DR на моноцитах. У пациентов с диагнозом «сепсис» отмечено существенное снижение данного показателя в первые сутки развития заболевания. Только к 10 суткам доля моноцитов, экспрессирующих молекулы HLA-DR, начинает переходить границу риска развития сепсиса (40%), несмотря на проводимую интенсивную терапию, в том числе и иммунокорригирующую (полиоксидоний). При этом нужно отметить, что данный показатель остается значительно ниже нормы. Поэтому именно данный критерий может служить надежным иммунологическим маркером оценки состояния пациента при сепсисе, с одной стороны, и надежным показателем эффективности проводимой терапии — с другой.

Рассмотрим конкретные примеры как нормального распределения молекул HLA-DR на моноцитах, так и при септической патологии. На рисунке 1 приведены типичные гистограммы распределения клеток периферической крови. В гистограмме А (рис. 1А) выбрана зона моноцитов (гейт А) по морфологическим признакам (размеры и гранулярность). Как видно на гистограмме Б, где показано распределение клеток по CD45 и CD14 по выбранному гейту, 98,0% клеток имеют фенотип $CD45^+CD14^+$, т.е. являются моноцитами. Следует отметить, что разбиение гистограммы на квадранты сделано с использованием негативного контроля. В дальнейшем, используя данное логическое ограничение по моноцитарному гейту, анализ проводили исключительно на популяции моноцитов. Гистограмма на рисунке 2 представляет собой распределение моноцитов в зависимости от экспрессии молекул

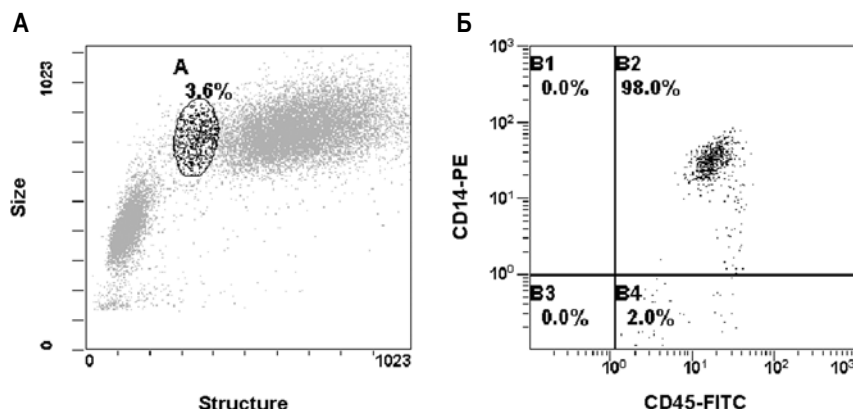


Рисунок 1. Анализ распределения клеток по CD45 и CD14. Гистограмма А – распределение клеток по морфологическим параметрам. Гистограмма Б – распределения клеток по CD45 и CD14, попадающих в гейт А

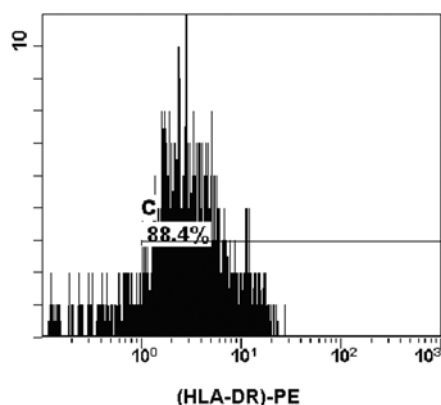


Рисунок 2. Пациент В. Нормальная экспрессия молекул HLA-DR на моноцитах периферической крови. Анализ проводили по моноцитарному гейту

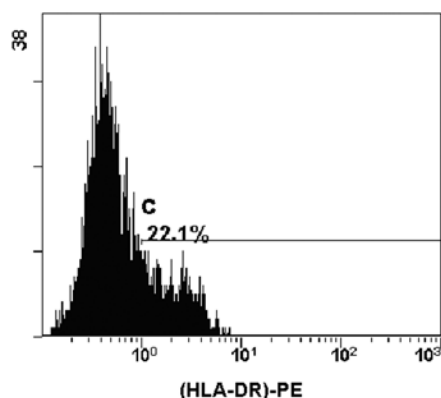


Рисунок 3. Больной С. Диагноз «сепсис», 2 сутки от момента заболевания. Экспрессия молекул HLA-DR на моноцитах периферической крови. Анализ проводили по моноцитарному гейту

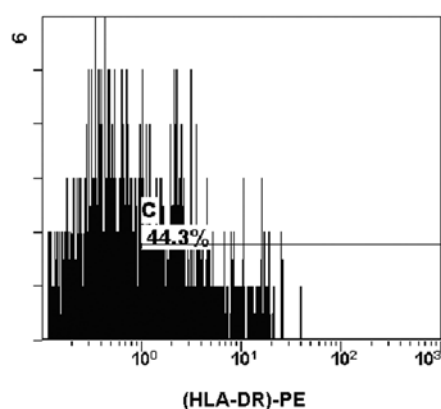


Рисунок 4. Больной С. Диагноз «сепсис», 10 суток от момента заболевания. Экспрессия молекул HLA-DR на моноцитах периферической крови. Анализ проводили по моноцитарному гейту

HLA-DR и характерна для пациентов с отсутствием сепсиса, т.е. около 90%. На рисунке 3 приведены гистограммы для пациента С. на 2 день после госпитализации с диагнозом «сепсис». Анализ был проведен по стандартной схеме, и количество позитивных клеток составляло 22,1%. На рисунке 4 приведены гистограммы для того же пациента на 10 день, и количество позитивных клеток в данном регионе составляло уже 44,3%, что свидетельствовало о преодолении критического порога.

Заключение

Процедура оценки состояния пациента при сепсисе очень проста и доступна для использования практически в любой клинической лаборатории, оборудованной проточным цитометром. Таким образом, из всего приведенного выше видно, что использование проточной цитометрии для оценки экспрессии HLA-DR антигенов на моноцитах в клинической практике значительно ускоряет диагностику тяжести септического состояния пациентов и позволяет проводить мониторинг в процессе терапии. Исходя из этого, данный метод уже сегодня может найти самое широкое применение для оценки клеток при различных патологиях.

Список литературы

1. Маянский А.Н., Вискман М.К. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитро-синего тетразолия: Метод. рекомендации. — Казань, 1979. — 11 с.
2. Фрейдлин И.С. Система мононуклеарных фагоцитов. — М., 1984. — 271 с.
3. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Избранные вопросы современной проточной цитометрии. — Челябинск: «Челябинская государственная медицинская академия», 2007. — 84 с.
4. Asadullah K., Woiciechowsky C., Docke W.D., Egerer K., Kox W., Volgel S., Sterry W., Volk H.D. Very low monocytic HLA-DR expression indicates high risk of infection — immunomonitoring for patients after neurosurgery and patients during high dose steroid therapy // Eur. J. Emerg. Med. — 1995. — Vol. 2. — P. 184-190.
5. Boelens P.G., Houdijk A.P., Fonk J.C., Nijveldt R.J., Ferwerda C.C., Von Blomberg-Van Der Flier B.M., Thijs L.G., Haarman H.J., Puyana J.C., Van Leeuwen P.A. Glutamine-enriched enteral nutrition increases HLA-DR expression on monocytes of trauma patients // J. Nutr. — 2002. — Vol. 132, N 9. — P. 2580-2586.
6. Ditschkowski M., Kreuzfelder E., Rebmann V., Ferencik S., Majetschak M., Schmid E.N., Obertacke U., Hirche H., Schade U.F., Grosse-Wilde H.

HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic patients after trauma // *Ann. Surg.* — 1999. — Vol. 229, N 2. — P. 246-254.

7. Docke W.D., Hoflich C., Davis K.A., Rottgers K., Meisel C., Kiefer P., Weber S.U., Hedwig-Geissing M., Kreuzfelder E., Tschentscher P., Nebe T., Engel A., Monneret G., Spittler A., Schmolke K., Reinke P., Volk H.D., Kunz D. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study // *Clin. Chem.* — 2005. — Vol. 51, N 12. — P. 2341-2347.

8. Fumeaux T., Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* — 2002. — Vol. 166, N 11. — P. 1475-1482.

9. Guillou P.J. Biological variation in the development of sepsis after surgery or trauma // *Lancet.* — 1993. — Vol. 342. — P. 217-220.

10. Haveman J.W., van den Berg A.P., van den Berk J.M., Mesander G., Slooff M.J., de Leij L.H., The T.H. Low HLA-DR expression on peripheral blood monocytes predicts bacterial sepsis after liver transplantation: relation with prednisolone intake // *Transpl. Infect. Dis.* — 1999. — Vol. 1, N 3. — P. 146-152.

11. Hershman M.J., Cheadle W.G., Wellhausen S.R., Davidson P.F., Polk S.C. Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient // *Br. J. Surg.* — 1990. — Vol. 77. — P. 204-207.

12. Hoffman J.A., Weinberg K.I., Azen C.G., Horn M.V., Dukes L., Starnes V.A., Woo M.S. Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral blood monocytes and the risk of pneumonia in pediatric lung transplant recipients // *Transpl. Infect. Dis.* — 2004. — Vol. 6. — P. 147-155.

13. Kawasaki T., Ogata M., Kawasaki C., Tomihisa T., Okamoto K., Shigematsu A. Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery // *Anesth. Analg.* — 2001. — Vol. 92, N 5. — P. 1322-1326.

14. Khaidukov S.V., Komaleva R.L., Nesmeyanov V.A. N-acetylglucosamine-containing muramyl peptides directly affect macrophages // *Int. J. Immunopharmacol.* — 1995. — Vol. 17, N 11. — P. 903-911.

15. Kox W.J., Volk T., Kox S.N., Volk H.D. Immunomodulatory therapies in sepsis // *Int. Care. Med.* — 2000. — Vol. 26. — P. 124-128.

16. Kunz D., Pross M., Lippert H., Konig W., Manger T. Diagnostic relevance of procalcitonin, IL-6 and cellular immune status in the early phase after liver transplantation // *Transplant. Proc.* — 1998. — Vol. 30. — P. 23-24.

17. Le Tulzo Y., Pangault C., Amiot L., Guilloux V., Tribut O., Arvieux C., Camus C., Fauchet R., Thomas R., Drénou B. Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* — 2004. — Vol. 169, N 10. — P. 1144-1151.

18. Lin R.Y., Astiz M.E., Saxon J.C., Rackow E.C. Altered leukocyte immunophenotypes in septic shock. Studies of HLA-DR, CD11b, CD14, and IL-2R expression // *Chest.* — 1993. — Vol. 104, N 3. — P. 847-853.

19. Monneret G., Elmenkouri N., Bohe J., Debard A.L., Gutowski M.C., Bienvenu J., Lepape A. Analytical requirements for measuring monocytic human lymphocyte antigen DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock // *Clin. Chem.* — 2002. — Vol. 48, N 9. — P. 1589-1592.

20. Monneret G., Venet F., Pachot A., Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony // *Mol. Med.* — 2008. — Vol. 14, N 1-2. — P. 64-78.

21. Pitton C., Fitting C., van Deuren M., van der Meer J.W., Cavaillon J.M. Different regulation of TNF α and IL-1ra synthesis in LPS-tolerant human monocytes // *Prog. Clin. Biol. Res.* — 1995. — Vol. 392. — P. 523-528.

22. Richter A., Nebe T., Wendl K., Schuster K., Klaebisch G., Quintel M., Lorenz D., Post S., Trede M. HLA-DR Expression in acute pancreatitis // *Eur. J. Surg.* — 1999. — Vol. 165. — P. 947-951.

23. Sachse C., Prigge M., Cramer G., Pallua N., Henkel E. Association between reduced human leukocyte antigen (HLA-DR) expression on blood monocytes and increased plasma level of interleukin-10 in patients with severe burns // *Clin. Chem. Lab. Med.* — 1999. — Vol. 37. — P. 193-198.

24. Spittler A., Winkler S., Gotzinger P., Oehler R., Willheim M., Tempfer C., Weigel G., Fugger R., Boltz-Nitulescu G., Roth E. Influence of glutamine on the phenotype and function of human monocytes // *Blood.* — 1995. — Vol. 86, N 4. — P. 1564-1569.

25. Strohmeyer J.C., Blume C., Meisel C., Doecke W.D., Hummel M., Hoeflich C., Thiele K., Unbehauen A., Hetzer R., Volk H.D. Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients // *Cytometry.* — 2003. — Vol. 53. — P. 54-62.

26. Tschaikowsky K., Hedwig-Geissing M., Schiele A., Bremer F., Schywalsky M., Schuttler J. Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients // *Crit. Care. Med.* — 2002. — Vol. 30 — P. 1015-1023.

27. Wolk K., Docke W.D., von Baehr R., Volk H.D., Sabat R. Comparison of monocyte functions after LPS- or IL-10-induced reorientation: importance in clinical immunoparalysis // Pathobiology. — 1999. — Vol. 67. — P. 253-256.
28. Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein // Science. — 1990. — Vol. 249, N 4975. — P. 1431-1433.

поступила в редакцию 16.01.2008

принята к печати 27.05.2008