

УДК 616.831—009.11—053.2—089.844:611—013.7/8—018.8

Динамика показателей клеточного иммунитета и нейроаутоиммунных реакций у больных со спастическими формами ДЦП на этапах восстановительного лечения с использованием эмбриональной нервной ткани

Пичкур Л.Д., Руденко В.А.

Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова АМН Украины, Киев, Украина

Ключевые слова: иммунный статус, детский церебральный паралич, трансплантация эмбриональной нервной ткани, возраст.

Трансплантация нервной ткани представляет собой перспективный хирургический метод восстановительного лечения различных неврологических нарушений с достаточно высокой клинической эффективностью, что доказано в эксперименте и подтверждено в клинической практике при детском церебральном параличе, паркинсонизме, черепно-мозговой травме [2,6,8]. В ряде экспериментальных работ показано, что на трансплантат, помещенный в мозг, развивается клеточная и гуморальная иммунная реакция, в которой участвуют макрофаги, Т-лимфоциты и антитела к алло- и видоспецифическим антигенам. При этом основная роль в инициации иммунных реакций, как известно, принадлежит Т-лимфоцитам-хелперам [10,11].

Исходя из важной роли факторов клеточного иммунитета в запуске в мозге иммунных реакций на трансплантат, мы предприняли изучение различных популяций иммунокомпетентных клеток в периферической крови, их функциональной активности и развития нейроаутоиммунных реакций у больных со спастическими формами детского церебрального паралича (ДЦП) до и после трансплантации эмбриональной нервной ткани (ТЭНТ) в паренхиму мозга.

Материалы и методы. Исследование иммунного статуса проводили у больных со спастической формой ДЦП до первой и второй ТЭНТ и через 7 сут после повторной нейротрансплантации. Всего обследован 51 больной. Анализ материала проводили в двух возрастных группах: до 7 лет и 7—15 лет. Контрольные группы составили 17 практически здоровых детей аналогичного возраста (до 7 лет и 7—15 лет).

Иммунный статус больных оценивали на основании содержания лейкоцитов, лимфоцитов, субпопуляций лимфоцитов с фенотипами $СК^{3+}$ (маркер Т-клеток), $СК^{4+}$ (маркер клеток хелперов-индукторов), $СК^{8+}$ (маркер супрессорно-цитотоксических лимфоцитов), $СК^{72+}$ (маркер В-лимфоцитов), оценки соотношения регуляторных субпопуляций лимфоцитов ($СК4:СК8$) [12]. Функциональную активность Т- и В-лимфоцитов определяли в тесте бласттрансформации на ФГА (фитогемагглютинин), декстран-сульфат (Дек) [5], простагландинозависимых супрессоров — на ФГА и индометацин (результат выражали в виде индекса супрессии — Иичс) [13]. Развитие нейросенсибилизации оценивали в тесте бласттрансформации лимфоцитов на мозговой антиген (МА) и по уровню антител к маркерам нейронов и миелина — нейронспецифической енолазе (НСЕ) и основному белку миелина (ОБМ) [5,14].

Результаты исследований и их обсуждение. Спастическая форма ДЦП характеризуется определенными различиями иммунного статуса, обусловленными возрастом больных. Эти различия касаются и исходного состояния иммунного статуса и изменений его показателей после ТЭНТ. У больных в возрасте до 7 лет (табл.1) показатели изменения содержания лимфоцитов, $СК^{3+}$ лимфоцитов и субпопуляций Т-лимфоцитов ($СК^{4+}$, $СК^{8+}$), соотношения регуляторных субпопуляций лимфоцитов (хелперов-супрессоров) снижены по сравнению с контрольной группой детей. После первой ТЭНТ выявлено усугубление снижения содержания $СК^{3+}$ лимфоцитов и субпопуляций Т-лимфоцитов в ранние (7 дней) и более отдаленные (6—12

Таблица 1. Изменение субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови больных со спастической формой ДЦП на этапах наблюдения до и после ТЭНТ

| Группа наблюдаемых | n | Лейкоциты, $\times 10^9$ /л | Лимфоциты, $\times 10^9$ /л | Субпопуляции лимфоцитов ($\times 10^9$ /л) | | | | |
|-----------------------------------|----|-----------------------------|-----------------------------|---|------------------|------------------|-------------|-------------------|
| | | | | CD ³⁺ | CD ⁴⁺ | CD ⁸⁺ | CD4 : CD8 | CD ⁷²⁺ |
| Возрастная группа до 7 лет | | | | | | | | |
| до I ТЭНТ | 22 | 6,93±0,7 | 2,78±0,27 | 1,81±0,29* | 1,08±0,18* | 0,57±0,12 | 1,68±0,25 | 0,306±0,05 |
| через 7 сут после I ТЭНТ | 9 | 6,98±0,67 | 2,71±0,32* | 1,297±0,18* | 0,763±0,05* | 0,458±0,01* | 1,67±0,18 | 0,350±0,05 |
| через 6—12 мес после I ТЭНТ | 8 | 6,5±0,47 | 2,48±0,2* | 1,31±0,19* | 0,821±0,097* | 0,486±0,12 | 2,14±0,32 | 0,261±0,035 |
| через 7 сут после II ТЭНТ | 5 | 5,95±0,59 | 2,60±0,48* | 1,47±0,23* | 0,77±0,23* | 0,435±0,005* | 1,72±0,085* | 0,325±0,085 |
| Контрольная группа | 7 | 7,1±0,66 | 4,03±0,2 | 2,68±0,1 | 1,68±0,04 | 0,723±0,1 | 2,4±0,25 | 0,320±0,04 |
| Возрастная группа 7—15 лет | | | | | | | | |
| до I ТЭНТ | 8 | 5,89±0,62 | 2,195±0,3 | 1,698±0,36 | 0,985±0,36 | 0,698±0,19 | 1,75±0,37 | 0,315±0,05 |
| через 7 сут после I ТЭНТ | 8 | 7,33±0,78 | 3,2±0,65 | 1,965±0,24 | 1,34±0,17 | 0,848±0,1* | 1,55±0,15 | 0,49±0,04* |
| через 6-12 мес после I ТЭНТ | 12 | 6,4±0,40 | 2,52±0,15 | 1,59±0,21 | 1,066±0,15 | 0,711±0,22 | 1,5±0,17 | 0,287±0,055 |
| через 7 сут после II ТЭНТ | 5 | 4,93±1,08 | 1,91±0,11* | 1,39±0,26 | 0,61±0,19* | 0,491±0,1 | 1,2±0,1 | 0,160±0,02* |
| Контрольная группа | 10 | 7,3±0,48 | 2,74±0,3 | 1,76±0,22 | 1,065±0,11 | 0,590±0,08 | 1,91±0,14 | 0,253±0,03 |

Примечание. * — достоверность различий ($P < 0,05$) с показателями контрольной группы.

мес) сроки, которое сохраняется и после повторной ТЭНТ. Нормализация соотношения регуляторных лимфоцитов СК4:СК8 отмечается только через 6—12 мес после первой нейротрансплантации.

У больных в возрасте 7—15 лет до операции нейротрансплантации отклонений от контрольных значений изучаемых показателей содержания популяций лимфоцитов не выявлено (табл.1). После первой ТЭНТ отмечено увеличение количества лимфоцитов, популяций лимфоцитов с фенотипами СК³⁺, СК⁴⁺, СК⁸⁺, СК⁷²⁺ в ранние (7 сут) сроки послеоперационного периода с последующим восстановлением к исходному уровню в отдаленный период наблюдения (через 6—12 мес). Повторная ТЭНТ у пациентов данной возрастной группы ведет к снижению показателей количественного содержания лимфоцитов, СК³⁺ лимфоцитов и субпопуляций иммунокомпетентных клеток с преимущественным уменьшением содержания Т-хелперов, о чем свидетельствует нарушение соотношения регуляторных лимфоцитов (СК4:СК8 =1,2).

Таким образом, при спастической форме ДЦП прослеживаются различия в развитии адаптационной реакции иммунной системы на оперативное вмешательство и нейротрансплантацию.

Анализ функциональной активности Т- и В-лимфоцитов, простагландинозависимых супрессоров у больных в возрасте до 7 лет показал (табл.2), что, несмотря на выявленное уменьшение количества Т-клеток (СК³⁺), их функция достоверно не отличается от контрольных значений. Только после второй ТЭНТ усиливается активность супрессоров, синтезирующих простагландин. При этом функциональная активность В-клеток повышена во все сроки наблюдения. В данной группе больных повышенные показатели клеточной нейросенсибилизации (по данным РБТЛ с МА) не изменяются на этапах наблюдения. В то же время, уровень антител к ОБМ и, в меньшей степени, к НСЕ, будучи повышенным исходно, через 6—12 мес после первой ТЭНТ снижается к контрольным значениям. У детей со спастической формой ДЦП в группе 7—15 лет функциональная активность Т-лимфоцитов (СК³⁺) снижена именно в те сроки после ТЭНТ, когда их содержание в периферической крови увеличено или соответствует контрольным значениям. В эти же сроки активизируются простагландинозависимые супрессоры и увеличивается содержание супрессорных Т-лимфоцитов (СК³⁺). Функциональная активность В-лимфоцитов не отличается от контрольных значений. В отличие от предыдущей группы, клеточная нейросенсибилизация уси-

Таблица 2. Показатели функциональной активности лимфоцитов и уровня нейросенсибилизации у больных со спастической формой ДЦП на этапах наблюдения до и после ТЭНТ

| Группа наблюдаемых: | n | Р Б Т Л | | | | Антитела к НСБ, усл. ед. | |
|-----------------------------------|----|-------------|------------|-------------|------------|--------------------------|-------------|
| | | ФГА | Иичс | Дек | МА | ОБМ | НСЕ |
| Возрастная группа до 7 лет | | | | | | | |
| до I ТЭНТ | 22 | 51,09±4,43 | 1,25±0,05 | 43,3±3,74* | 9,67±2,88* | 28,51±2,26* | 16,23±1,03* |
| через 7 сут после I ТЭНТ | 9 | 41,89±5,48 | 1,23±0,08 | 46,67± 8,1* | 8,0±2,0* | 28,82±3,7* | 17,50±0,75* |
| через 6—12 мес после I ТЭНТ | 8 | 54,75±4,96 | 1,16±0,09 | 48,86±5,05* | 8,67±2,72* | 20,96±2,44 | 15,78±0,6* |
| через 7 сут после II ТЭНТ | 5 | 39,2±5,58 | 1,65±0,14* | 44,5±7,5* | — | 21,09±2,45 | 14,41±1,47 |
| Контрольная группа | 7 | 51,7±6,86 | 1,19±0,19 | 26,6±4,3 | 3,6±0,6 | 18,31±1,11 | 10,96±2,24 |
| Возрастная группа 7—15 лет | | | | | | | |
| до I ТЭНТ | 5 | 51,60±7,97 | 1,23±0,20 | 29,33±10,3 | 3,0±0,3 | 23,93±0,88 | 15,99±1,41 |
| через 7 сут после I ТЭНТ | 5 | 47,6±10,28 | 1,55±0,23* | 39,33±8,52 | 5,0±1,0 | 21,88±0,25* | 14,23±0,27* |
| через 6—12 мес после I ТЭНТ | 10 | 43,57±8,11* | 1,42±0,29 | 40,30±11,1 | 9,0±1,3 | 24,06±1,28* | 17,39±0,79* |
| через 7 сут после II ТЭНТ | 5 | 56,5±7,98 | 1,04±0,08 | 36,5±13,5 | 4,0±2,0 | 26,07±3,00* | 20,2±0,015* |
| Контрольная группа | 10 | 67,0±3,23 | 1,003±0,05 | 31,9±2,68 | 5,55±1,7 | 19,96±0,80 | 10,51±0,05 |

Примечание. * — достоверность различий ($P < 0,05$) с показателями контрольной группы

ливается только через 6—12 мес после первой ТЭНТ. Та же закономерность прослеживается и в нарастании количества антител к ОБМ и НСЕ, с той разницей, что исходно оно уже было повышенным. Повторная ТЭНТ в этой возрастной группе способствует усилению антителообразования к ОБМ и НСЕ.

Таким образом, у больных со спастической формой ДЦП в возрастных группах до 7 лет и 7—15 лет различия, выявленные в функциональной активности Т- и В- лимфоцитов, простагландиносинтезирующих супрессоров, очевидно, и определяют особенности развития клеточной нейросенсибилизации и уровня антителообразования к нейрональным и глиальным антигенам. Особенно чётко различия в группах прослеживаются в изменении уровня антител к НСЕ. Если у больных до 7 лет уровень антител к НСЕ, будучи исходно достоверно повышенным, мало изменяется в динамике наблюдения после нейротрансплантации, то в возрастной группе 7—15 лет он достоверно снижается через 7 дней после первой ТЭНТ, а затем возрастает в более отдалённый период и после повторной ТЭНТ. Сниженный уровень антител к НСЕ отмечается наряду с активацией простагландиносинтезирующих супрессоров и повышением содержания супрессорно-цитотоксических лимфоцитов ($СК^{8+}$), чего не наблюдается у больных в возрасте до 7 лет.

Оценивая полученные результаты и их зна-

чение для клиницистов, необходимо, во-первых, акцентировать внимание на возрастных особенностях формирования и становления взаимоотношений между иммунной, нервной и нейроэндокринной системами в условиях патологии нервной системы [3, 4, 7].

Во-вторых, комплексная оценка иммунного статуса больных ДЦП позволяет выявить некоторые механизмы формирования “иммунодефицитного” состояния, характерного для спастической формы ДЦП каждого возрастного периода развития. Так, в возрасте до 7 лет повышенная клеточная нейросенсибилизация и усиление антителообразования к ОБМ и НСЕ формируются на фоне повышенной функциональной активности В-лимфоцитов и уменьшения в периферической крови общего количества лимфоцитов, Т-лимфоцитов ($СК^{3+}$) и их субпопуляций ($СК^{4+}$, $СК^{8+}$). В то же время, не исключено, что в старшей возрастной группе (7—15 лет), несмотря на близкие к норме количественные и функциональные показатели иммунитета, когда нарушения в иммунной системе сохраняются только в виде усиления антителообразования к маркерам нейронов и миелиновых структур (НСЕ и ОБМ), имеют место нарушения в более тонких механизмах созревания и дифференцировки Т-лимфоцитов [1, 9].

В-третьих, исходя из изменений иммунологических показателей на этапах лечения с использованием ТЭНТ, можно заключить, что у

больных в возрасте до 7 лет через 6—12 мес после первой ТЭНТ не происходит резких изменений в иммунном статусе, только отмечаются нормализация соотношения регуляторных субпопуляций лимфоцитов и снижение антителообразования к ОБМ. Уровень субпопуляции СК⁴⁺ лимфоцитов-хелперов, которым отводится преимущественная роль в инициации отторжения внутримозгового трансплантата, снижен в большей степени, чем супрессорных лимфоцитов СК⁸⁺. Повторная ТЭНТ на этом фоне активизирует супрессорное звено, что сопровождается угнетением антителообразования к антигенам мозга. В то же время, в возрасте 7—15 лет ТЭНТ сопровождается увеличением количества СК³⁺ и регуляторных лимфоцитов с одновременным сохранением нарушенного их соотношения и активизацией простагландин-зависимых супрессоров. После повторной ТЭНТ, несмотря на уменьшение количества регуляторных субпопуляций лимфоцитов, с преимущественным уменьшением в крови содержания лимфоцитов-хелперов, уже не активируются супрессоры, синтезирующие простагландин-Е₂, и возрастает образование антител к нейроантигенам. Можно думать, что с увеличением возраста больных со спастической формой ДЦП нарушаются те компенсаторные сдерживающие механизмы развития аутоиммунных реакций, которые играют определенную роль в более раннем возрасте. Не исключено, что отмеченный выше характер изменений иммунного статуса при ДЦП взаимосвязан с “задержкой” формирования цитокиновой и гормональной сети взаимодействий, лежащей в основе взаимовлияний нервной, иммунной и нейроэндокринной систем.

Полученные данные необходимо учитывать при нейротрансплантации, а также при решении вопроса об использовании иммуносупрессоров при ТЭНТ в зависимости от возраста больных и характера иммунных нарушений.

Список литературы

1. *Ившина А.В., Кузнецов В.А., Кузнецова А.В. и др.* Фенотип лимфоцитов крови в определении объёма опухоли и степени её васкуляризации при остеогенной саркоме. Подход, основанный на распознавании нечётких систем // Иммунология.—1995.— №6.— С.56—64.
2. *Лосева Е.В., Цымбалюк В.И., Пичкур Л.Д., Брагин А.Г.* Влияние нейротрансплантации эмбриональной мозговой ткани на структурные изменения в мозгу крыс после черепно—мозговой травмы // Нейрофизиология.—1995.— №5/6.— С.350 — 361.
3. *Рубцова М.Ю., Лобанов Д.С., Клосс Т.Ю. и др.* Сывороточные антитела к белковым антигенам мозга при детском церебральном параличе // Бюл. эксперим. биол. и мед.—1992.— Т.113, №4.— С. 395 — 397.
4. *Руденко В.А., Лисянский Н.И., Цымбалюк В.И. и др.* Развитие нейроаутоиммунных реакций и изменения в иммунном статусе больных детским церебральным параличом в зависимости от формы заболевания и этиологических факторов // Журн. АМН України.—1995.— Т.1, № 2. — С. 264 — 274.
5. *Хоробрых В.В., Пронин А.В., Куркин А.Ф., Санин А.В.* Методы постановки реакции бласттрансформации в микромодификации // Иммунология.—1983.— №3. — С. 76 — 79.
6. *Цымбалюк В.И.* Відновна нейрохірургія // Журн. АМН України —1997.— Т.3, № 3.— С. 393—400.
7. *Blalock J.E.* The syntax of immune-neuroendocrine communication // Immunology today.—1994.— V.15, N.11.— P. 504 — 511.
8. *Brundin P., Widner H., Nilson K.G., Strecker R.E. and Bjorklund A.* Intracerebral xenograft of dopamine neurons: the role of immunosuppression and the blood-brain barrier //Exp.Brain.Res.—1989.—V.75.— P. 195 — 207.
9. *Kardenne M. and Savino W.* Control of thymus physiology by peptidic hormones and neuropeptides // Immunology Today .—1994.— V.15, N.11.— P. 518 — 523.
10. *Honey C.R., Charlton H.M., Wood K.J.* Functioning rat neural xenografts in hpg mice immunosuppressed with anti-L3T4 monoclonal antibodies// Restor. neurol. and Neurosci.—1990.— V.1, N. 2.— P.106.
11. *Nicholas M.K., Sagher K., Hartley J.P., et al.* A phenotypic analysis of T lymphocytes isolated from the brains of mice with allogeneic neural transplants // Transplant. into Mammal.CNS.— Amsterdam etc.—1988.— P. 249 — 259.
12. *Parks K.R., Lanier L.L., Herzenberg L.A.* Flow cytometry and fluorescence activated cell sorting (FACS). In Handbook of Experimental Immunology. Chapter 29 //Eds.K.M.Weir, L.A.Herzenberg and c. Blackwell /Blackwell scientific Publications, Oxford —1986.
13. *Skoldstam L., Lochake K., Mesamer R.* Contrasting effects of prostaglandin E₂-and

indomethcin in modulsting ConA-induced human lymphocyte proliferation and suppresser cell development // Clin.immunol. and immunopatol. —1982.— V.25, N.1.— P. 32 — 42.

- 14.Voller A., Bidwell K.E., Bartlett A. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): A guide with abstracts of microplate application // Bull.World Health krgan. —1976.— N.53.— P. 55 — 65.

Динаміка показників клітинного імунітету і нейроаутоімунних реакцій у хворих з спастичними формами ДЦП на етапах відновного лікування з використанням ембріональної нервової тканини

Пічкур Л.Д., Руденко В.А.

На основі комплексного дослідження імунного статусу хворих із спастичними формами ДЦП до і після трансплантації ембріональної нервової тканини показано взаємозв'язок стану регуляторної та ефекторної ланок імунітету, в тому числі і розвитку нейроаутоімунних реакцій, в до та різні терміни після нейротрансплантації з віком хворих (в групах дітей до 7 та 7—15 років). Зроб-

лено висновок, що характер змін імунологічних показників у кожній віковій групі пов'язаний з особливостями формування та становлення взаємовідношень між імунною, нервовою та нейроендокринною системами, які відбуваються в умовах патології ЦНС, що необхідно враховувати при нейротрансплантації і вирішенні питання про доцільність використання імуносупресорів.

Dynamics of cell immunity and of neuroautoimmune response indices in cerebral palsy patients during restorative treatment using embrionic nervous tissue

L.K.Pichkour, V.A. Rudenko

On the basis of complex research immunological condition of the patients with spastic cerebral palsy before and after embryonic nervouse tissue transplantation show interrelation of parts immunity, including development neuroimmunological reactions depending on age (in groups of children up to seven and from seven till fifteen years). Is established, that the certain character of changes immunological parameters in each age group depends on features of formation both immunological and neuroendocrine systems, which are carried out in conditions of pathological changes of the central nervous system. Such immunological feature are necessary for taking into account at application transplantation of embryonic brain tissue and decision of a question on application immunosuppressed therapy.

Авторы выражают благодарность член-кор. АМН Украины, проф. Цымбалюку В.И. и сотрудникам лаборатории иммунологии Института нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова АМН Украины во главе с проф. Н.И.Лисяным за помощь в выполнении данной работы и написании статьи.