

НАРУШЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ОБЩЕГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ВИДАМИ ЭНДОЦЕРВИКОЗА

П. Р. Сельський, М. Я. Фурдела, Б. П. Сельський

Государственное высшее учебное заведение “Тернопольский государственный
медицинский университет имени И.Я. Горбачевского МОЗ Украины”, Тернополь,
Украина

Резюме

Проведено иммунологическое исследование 51 больной с эндоцервикозом. В первую группу вошли все больные с эндоцервикозом, вторую – только с простым эндоцервикозом (31,4 %), в третью (37,2 %) – с заживающим эндоцервикозом, а четвертая группа (31,4 %) охватывала женщин с прогрессирующим эндоцервикозом.

Анализ клеточного звена иммунитета проводился с помощью моноклональных антител к антигенам лимфоцитов CD3, CD4, CD8 и CD19.

Содержание большинства фенотипов лимфоцитов крови обследованных женщин с эндоцервикозом отличалось от нормальных. У больных с эндоцервикозом наблюдалось значительное угнетение клеточного звена иммунитета. Средний уровень CD3-лимфоцитов составил – (46,0±0,7) % против (64,5±2,8) % в контрольной группе (p<0,05). Средний уровень CD4-лимфоцитов был также существенно снижен и составлял (30,2±0,3) % против (44,2±2,6) % в группе практически здоровых женщин (p<0,05), а среднее содержание CD8-лимфоцитов составляло (15,0±1,0) % против (22,9±2,0) % в группе контроля (p<0,05).

Имело место и снижение соотношения Th/Ts (иммунорегулирующий индекс CD4/CD8 составлял 1,9±0,1 против 2,3±0,1 у женщин контрольной группы) и уровня CD16-лимфоцитов (натуральных киллеров), среднее содержание которых составляло (10,0±0,3) % против (14,5±1,9) % в контрольной группе (p<0,05).

Изменения уровня относительного количества Т-лимфоцитов коррелировали со степенью развития эндоцервикоза (r = - 0,94 – сильная обратная связь).

Результаты исследований свидетельствуют о выраженных нарушениях иммунологического гомеостаза у больных эндоцервикозом, которые проявлялись Т-лимфопенией, снижением уровня натуральных киллеров, дисбалансом субпопуляционного состава Т-клеток, в основном за счет снижения циркулирующих Т-хелперов/индукторов, что приводило к снижению коэффициента CD4/CD8 и свидетельствовало о формировании вторичного иммунодефицита преимущественно по иммуносупрессорному варианту. В результате исследования клеточного иммунитета у больных с эндоцервикозом выявлено четкую связь между степенью иммунных нарушений и видом эндоцервикоза, причем существенные изменения были отмечены при прогрессирующем эндоцервикозе, в то же время при заживлении эндоцервикоза – большинство иммунных показателей находились в пределах нормы. Процент больных с иммуносупрессорным вариантом вторичного иммунодефицита у пациенток с прогрессирующим и стационарным эндоцервикозом имел тенденцию к повышению по сравнению с группой обследованных с заживающим эндоцервикозом, в то же время у последних значительно чаще встречался гипосупрессорный вариант вторичной иммунологической недостаточности, а при стационарном и прогрессирующем эндоцервикозе он не наблюдался.

Таким образом, на основе проведенных исследований можно сделать вывод о существенном влиянии нарушения клеточного иммунитета на прогрессирование данного заболевания.

Ключевые слова: шейка матки, предопухолевые заболевания, клеточный иммунитет, популяции лимфоцитов, иммунорегулирующий индекс, иммунологическая недостаточность, прогрессирование эндоцервикоза.

VIOLATION OF THE TOTAL CELLULAR IMMUNITY IN PATIENTS WITH DIFFERENT TYPES OF ENDOCERVICOSIS

P. R. Selskyy, M. Ya. Furdela, B. P. Selskyy

**State Institution of Higher Education “I. Horbachevsky Ternopil State Medical University of
the Ministry of Health of Ukraine”**

Summary

Immunomorphological investigation of 51 patients with endocervicosis was carried out. The first group included patients with endocervicosis, the second group contained women with simple endocervicosis (31,4 %), the third (37,2 %) – patients with healing endocervicosis, and the fourth group (31,4 %) women had progressive endocervicosis.

The analysis of cellular immunity was done with the help of monoclonal antibodies to antigens of CD3, CD4, CD8 and CD19 lymphocytes.

The content of most blood lymphocytes phenotypes in examined women with endocervicosis was different from the normal. Patients with endocervicosis showed a significant inhibition of cell immunity. The average level of CD3-lymphocytes was $46,0 \pm 0,7$ % compared to $64,5 \pm 2,8$ % in the control group ($p < 0,05$). The average level of CD4-lymphocyte count was also significantly reduced – $30,2 \pm 0,3$ % compared to $44,2 \pm 2,6$ % in the group of healthy women ($p < 0,05$), and the average content of CD8-lymphocytes was lower ($15,0 \pm 1,0$ %) against control group ($22,9 \pm 2,0$ %) with $p < 0,05$.

There has been a decline in the ratio of Th/Ts (immunoregulatory index CD4/CD8 was $1,9 \pm 0,1$ compared to $2,3 \pm 0,1$ in the women of the control group), as well as in the level of CD16-lymphocytes (natural killer cells) – $10,0 \pm 0,3$ % vs $14,5 \pm 1,9$ % in the control group ($p < 0,05$).

Changes in the relative number of T cells strongly correlated with the degree of endocervicosis development ($r = - 0,94$).

Our research showed profound disruption of immunological homeostasis in patients with endocervicosis, and this disruption was manifested by T lymphopenia, reduced levels of natural killer cells, imbalance of T-cells subpopulations, mainly due to the decrease in circulating T helper/inducer cells, which led to a decrease in CD4/CD8 ratio and evidence of the formation of secondary immune deficiency, following the immunosuppressive scenario.

The study of cellular immunity in patients with endocervicosis revealed a clear correlation between the degree of immune disorders and types of endocervicosis. The most significant changes were observed in case of progressive endocervicosis, while the majority of immune parameters were within normal limits in case of healing endocervicosis. The percentage of patients with immunosuppressive scenario of secondary immunodeficiency in patients with progressive and ongoing endocervicosis tended to increase compared with the group of examinees with healing endocervicosis. The patients with healing endocervicosis experienced hyposuppressive scenario of secondary immune deficiency, while in case of the ongoing and progressive endocervicosis this scenario was not observed.

To summarize current research, we can make the conclusion about the significant influence of the disruption of the cellular immunity on the endocervicosis progress.

Keywords: cervix, precancerous diseases, cellular immunity, lymphocyte populations, the immune regulatory index, immunologic failure, progression endocervicosis.

Вступление. Ранняя онкологическая патология шейки матки является крайне важной медицинской проблемой. Ее связывают с увеличением частоты бесплодия, самопроизвольных выкидышей и преждевременных родов [1]. Фоновые заболевания шейки

матки широко распространены, в частности эндоцервикоз диагностируется в течение жизни более чем у одной трети женщин, в основном в молодом возрасте [2, 3, 4]. Актуальность изучения этой патологии обусловлена необходимостью точной и своевременной диагностики в связи с возможностью развития диспластических процессов, которые являются предраковыми [5, 6].

В диагностике и лечении эндоцервикоза не всегда учитывают изменения иммунного статуса при разных видах эндоцервикоза. Исследования, проведенные в этом направлении, указывают на изменения клеточного звена иммунитета при данном заболевании [7, 8]. Однако остается до конца невыясненной роль нарушений клеточного звена общего иммунитета в развитии и прогрессировании эндоцервикоза.

Поэтому *целью* нашей работы было установить проявления изменений клеточного звена общего иммунитета при различных видах эндоцервикоза.

Материалы и методы. С целью установления особенностей состояния клеточного иммунитета у больных с фоновыми заболеваниями шейки матки нами были изучены показатели общего иммунитета 51 пациентки с эндоцервикозом (псевдоэрозией шейки матки) в возрасте $(33,31 \pm 0,97)$ лет. Контрольную группу составили 15 фертильных женщин без заболеваний гениталий, которые были признаны при обследовании здоровыми. В первую группу вошли все больные с эндоцервикозом, вторую – только с простым эндоцервикозом (31,4 %), в третью (37,2 %) – с заживающим эндоцервикозом, а четвертая группа (31,4 %) охватывала женщин с прогрессирующим эндоцервикозом.

Относительное содержание лимфоцитов периферической крови оценивали с помощью моноклональных антител, разработанных в Институте иммунологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, к антигенам основных популяций: CD3, CD4, CD8, CD16 и CD19.

Лимфоциты выделяли из гепаринизированной крови путем центрифугирования на градиенте фиколл-верографина (плотность 1,077 г/мл) и вносили в объеме 50 мкл в центрифужные пробирки. К клеткам добавляли 5 мкл моноклонального антитела, которое тестировалось, и инкубировали 30-45 минут при +4 °С. После инкубации добавляли 150 мкл раствора Хэнкса и центрифугировали 5 минут при 200 g. Удаляли супернатант и вносили 50 мкл раствора Хэнкса (клетки образуют суспензию), а потом добавляли 150 мкл того же раствора и центрифугировали 5 минут при 200 g. После удаления супернатанта к осадку отмытых клеток добавляли 50 мкл F(ab')₂ фрагментов овечьих антител к Ig мыши, меченых FITS и разведенных 1:100. Для разведения использовали физраствор с фосфатным буфером (PBS), который содержал 0,5% желатина и 0,1% азида натрия. После образования суспензии, ее инкубировали 30 минут при + 4 °С. Клетки отмывали 2 раза с помощью раствора Хэнкса, как было показано выше.

Окрашенные клетки просматривали с помощью микроскопа Микмед-2. Для этого суспензия клеток переносилась на предметное стекло, покрывалась покровным стеклом и анализ препарата проводился под иммерсией с использованием нефлуоресцирующего иммерсионного масла в затемненном помещении. Количество антиген положительных клеток определяли как процент флуоресцирующих клеток от 100 лимфоцитов за вычетом процента флуоресцирующих клеток, которые наблюдались в препарате отрицательного контроля. В качестве такого контроля использовали препараты, подготовлены аналогичным образом, за исключением того, что вместо моноклональных антител клетки обрабатывались раствором Хэнкса.

Статистическая обработка материала проведена с использованием пакета программ "Microsoft Excel" (Microsoft Office 2003).

Результаты исследования. Содержание большинства фенотипов лимфоцитов крови обследованных женщин с эндоцервикозом отличалось от нормальных. Как следует из приведенных в табл. 1 данных, у больных с эндоцервикозом (первая группа) наблюдалось значительное угнетение клеточного звена иммунитета. Средний уровень CD3-лимфоцитов составил – $(46,0 \pm 0,7)$ % против $(64,5 \pm 2,8)$ % в контрольной группе ($p < 0,05$). Средний уровень CD4-лимфоцитов был также существенно снижен и составлял $(30,2 \pm 0,3)$ % против $(44,2 \pm 2,6)$ % в группе практически здоровых женщин ($p < 0,05$), а среднее содержание CD8-лимфоцитов составляло $(15,0 \pm 1,0)$ % против $(22,9 \pm 2,0)$ % в группе контроля ($p < 0,05$).

Имело место и снижение соотношения Th/Ts (иммунорегулирующий индекс CD4/CD8 составлял $1,9 \pm 0,1$ против $2,3 \pm 0,1$ у женщин контрольной группы) и уровня CD16-лимфоцитов (натуральных киллеров), среднее содержание которых составляло $(10,0 \pm 0,3)$ % против $(14,5 \pm 1,9)$ % в контрольной группе ($p < 0,05$). При этом уровень CD19-лимфоцитов (В-клеток) у больных данной группы находился в пределах нормы ($(8,3 \pm 0,3)$ % против $(10,0 \pm 2,3)$ % в контрольной группе ($p > 0,05$)).

Изменения относительного содержания лимфоцитов периферической крови у больных при различных видах эндоцервикоза

Фенотип лимфоцитов	1-а группа (M±m)	2-а группа (M±m)	3-а группа (M±m)	4-а группа (M±m)	Контроль (M±m)
CD3, %	46,0±0,7*	46,0±1,2***	49,1±0,7	42,6±0,7***	64,5±2,8
CD4, %	30,2±0,3*	30,0±0,6***	31,5±0,5*	29,0±0,4***	44,2±2,6
CD8, %	15,0±1,0*	14,4±0,8*	16,4±0,9*	14,4±0,5*	22,9±2,0
CD4/CD8,%	1,9±0,1*	1,7±0,2*	2,0±0,1	2,0±0,2	2,3±0,1
CD19,%	8,3±0,3	8,6±0,5	8,1±0,5	8,2±0,6	10,0±2,3
CD16, %	10,0±0,3*	10,4±0,6	10,5±0,5	9,1±0,4***	14,5±1,9
Примечания. 1.* – достоверное различие по сравнению с группой контроля. 2.** – достоверное различие по сравнению с 3-ей группой.					

Исследование показателей общего иммунитета при различных видах эндоцервикоза показали, что нарушения клеточного звена зависели от формы болезни. Изменения уровня относительного количества Т-лимфоцитов коррелировали со степенью развития эндоцервикоза ($r = -0,94$ – сильная обратная связь).

Наиболее выраженные изменения наблюдались у пациенток с прогрессирующим эндоцервикозом (четвёртая группа). Средний уровень относительного количества CD3-лимфоцитов в данной группе составил $(42,55 \pm 0,65)$ %, в то время как у женщин с заживающим эндоцервикозом (3-я группа) этот показатель составил – $(49,15 \pm 0,67)$ %, а с простым (2-я группа) – $(46,00 \pm 1,20)$ % ($p < 0,05$).

Относительное содержание CD4-лимфоцитов в 4-й группе женщин составлял $(29,09 \pm 0,38)$ %, а в 3-й – $(31,46 \pm 0,47)$ % ($p < 0,05$).

Уровень относительного количества CD16-лимфоцитов в 4-й группе больных был также значительно ниже $(9,09 \pm 0,38)$ в сравнении с 3-ей группой $(10,46 \pm 0,5)$ ($p < 0,05$).

Статистически достоверного различия средних показателей относительного количества CD8-лимфоцитов, CD19-лимфоцитов и соотношения Т-хелперов/Т-супрессоров (CD4/CD8) при различных видах эндоцервикоза не обнаружено.

Проведенный нами индивидуальный анализ иммунограмм больных эндоцервикозом показал, что у большинства (65,7%) обследованных женщин выявлено преимущественное

снижение уровня CD4-лимфоцитов, вследствие чего коэффициент CD4/CD8 имел тенденцию к снижению, что можно трактовать как развитие иммуносупрессорного варианта вторичной иммунологической недостаточности.

У 20 % пациенток обнаружено пропорциональное уменьшение относительного количества, как CD4- так и CD8-лимфоцитов, а иммунорегулирующий индекс CD4/CD8 колебался в пределах нормы. Вторичный иммунодефицит по относительному гипосупрессорному варианту отмечен у 14,3 % обследованных женщин с эндоцервикозом.

Был проведен также индивидуальный анализ иммунограмм при каждом из видов эндоцервикоза. У 53,8 % пациенток с заживающим эндоцервикозом встречался иммуносупрессорный вариант вторичной иммунологической недостаточности, у 38,5% – гипосупрессорный вариант. У остальных (7,7 %) пациенток выявлено пропорциональное уменьшение относительного количества, как CD4- так и CD8-лимфоцитов, а иммунорегулирующий индекс CD4/CD8 колебался в пределах нормы.

При стационарном эндоцервикозе в большинстве случаев (72,7 %) имело место преимущественное снижение уровня CD4-лимфоцитов, вследствие чего коэффициент CD4/CD8 имел тенденцию к снижению. В 27,3 % больных выявлено пропорциональное уменьшение относительного количества, как CD4- так и CD8-лимфоцитов, а иммунорегулирующий индекс CD4/CD8 колебался в пределах нормы.

При индивидуальном анализе иммунограмм у пациенток с прогрессирующим эндоцервикозом имели место такие же изменения, как и при простом эндоцервикозе. В большинстве (72,7 %) случаев наблюдалось преимущественное снижение уровня CD4-лимфоцитов, вследствие чего коэффициент CD4/CD8 имел тенденцию к снижению. В 27,3 % больных иммунорегулирующий индекс CD4/CD8 находился в пределах нормы.

Гипосупрессорный вариант вторичной иммунологической недостаточности при прогрессирующем и стационарном эндоцервикозе не встречался.

Выводы. 1. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о важной роли нарушений общего звена клеточного иммунитета в развитии и прогрессии эндоцервикоза.

2. У больных эндоцервикозом обнаружены выраженные нарушения иммунологического гомеостаза, которые проявлялись Т-лимфопенией, снижением уровня натуральных киллеров, дисбалансом субпопуляционного состава Т-клеток, в основном за счет снижения циркулирующих Т-хелперов/индукторов, что приводило к снижению коэффициента CD4/CD8 и свидетельствовало о формировании вторичного иммунодефицита преимущественно по иммуносупрессорному варианту.

3. В результате исследования клеточного иммунитета у больных с эндоцервикозом выявлено четкую связь между степенью иммунных нарушений и видом эндоцервикоза, причем существенные изменения были отмечены при прогрессирующем эндоцервикозе, в то

же время при заживлении эндоцервикоза – большинство иммунных показателей находились в пределах нормы.

4. Процент больных с иммуносупрессорным вариантом вторичного иммунодефицита у пациенток с прогрессирующим и стационарным эндоцервикозом имел тенденцию к повышению по сравнению с группой обследованных с заживающим эндоцервикозом, в то же время у последних значительно чаще встречался гипосупрессорный вариант вторичной иммунологической недостаточности, а при стационарном и прогрессирующем эндоцервикозе он не наблюдался.

References

1. Hoyme Udo B. Sexually transmitted disease in adult, non-pregnant women // *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. – 2000. – № 5. – P. 521-526.

2. Grishchenko O.V. The drugs stimulate the repair process after removal of background processes of ectocervix / O.V. Grishchenko, A.V. Storch, V.I. Ostanina // *Women's Health*. – 2006. – № 4. – P. 103-109.

3. Korolenkova L.I. Zone cervical transformation as an object of carcinogenic human papillomavirus in case of cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer / L.I. Korolenkova, V.D. Ermilova // *Archives of Pathology* – 2011. – № 6. – P. 33-37.

4. Wasilewska L.N. Colposcopy / L.N. Wasilewska. – M., 1986. – 156 p.

5. Danilova N.V. Differential diagnosis of precancerous and regenerative changes in cervical epithelium using immunohistochemistry / N.V. Daniel, J.J. Andreev, P.G. Malkov // *Archives of Pathology* – 2011. – № 2. – P. 10-14.

6. Clonality analysis and human papillomavirus infection in squamous metaplasia and atypical immature metaplasia a precursor to cervical intraepithelial neoplasia? / T. Hiyatake, Y. Veda, K. Yoshino // *Int. J. Gynecol. Pathol.* – 2007. – Vol. 26, № 2 – P. 180-187.

7. Khmelnsky D.C. Cytological and histological diagnosis of cervix and uterine body diseases / D.C. Khmelnsky. – St. Petersburg, 2000. – 336 p.

8. Bodnar Ya. Ya. Immunomorfological changes in cervical tissue in patients with leukoplakia and endocervicosis / Ya. Ya. Bodnar, P.R. Selskyu, O.I. Grimalyuk // *Zaporozhye Medical Journal*. – 2005. – № 3. – P. 80-81.