

Г. М. Боярська, О. І. Осадча, Г. П. Козинець

Дослідження імунологічної реактивності організму при опіковій травмі

В работе проведено анализ состояния иммунологической реактивности при ожоговой патологии у детей. Изучены факторы, оказывающие влияние на функциональное состояние лейкоцитов крови. Выявлено резкое снижение показателей клеточного и гуморального иммунитета пропорциональное тяжести травмы до развития вторичных иммунодефицитов по Т-независимому типу. Наибольшее супрессирующее влияние на активность Т-лимфоцитов оказывает белковая фракция аутологичной сыворотки. При этом выявлено снижение толерантности к аутологичным антигенам с гиперпродукцией аутоантител, фиксированных в большинстве случаев на эритроцитах. Потенцирующее действие на развитие аутоиммунных реакций оказывают вещества, находящиеся в безбелковой и глобулиновой фракции аутологичной сыворотки обожженных.

Вступ

Опікова патологія не обмежується місцевими порушеннями. Поширені значні опіки викликають різноманітні функціонально-морфологічні зміни внутрішніх органів і систем організму [4, 7]. У зв'язку з анатомо-фізіологічними особливостями дітей молодшого віку захисні реакції у них проявляються у першу чергу у формі неспецифічних реакцій, а імунологічна реактивність істотно знижена [3, 9].

Метою нашої роботи було встановлення стану імунологічної реактивності та характеристика факторів, що впливають на її рівень у дітей з опіками.

Методика

Обстежено 154 дитини віком від 1 до 5 років. До I контрольної групи ввійшло 35 дітей, які перенесли операцію планового грижевідалення в Українській спеціалізованій дитячій лікарні «Охматит». До II групи ввійшло 37 обстежених дітей з травмою середнього ступеня, до III групи — 42 обпечених з тяжкими опіками і до IV — 40 дітей з вкрайтяжкими опіками. Дослідження проводили в гострий період опікової хвороби на стадіях шоку та токсемії.

Популяції лейкоцитів виділяли з цитратної крові у подвійному градієнті густини фіколу-урографіну з наступним триразовим відмиванням середовищем №199 з 5 %-ю ембріональною сироваткою [6]. У дослідженнях використовували тест прямого та непрямого розеткоутворення з еритроцитами барана для ідентифікації популяцій еритроцит-розеткоутворюючих лімфоцитів (Е-РУЛ) і еритроцитів, які активовані комплементом (ЕАС-РУЛ). Активність розеткоутворення визначали після інкубації при 4 °С протягом 18 год. Джерелом комплементу була сироватка миші. Кількість

© А. М. Боярська та ін.

недиференційованих лімфоцитів (0-лімфоцитів) визначали за підрахунком різниці між абсолютною кількістю лімфоцитів і сумою Е-РУЛ та ЕАС-РУЛ. До Т-активних лімфоцитів (ЕА-РУЛ) відносили лімфоцити, які утворюють розетки впродовж 5 хв після контакту з еритроцитами барана [6]. Теофілінчутливі (Т-супресори) та теофілінрезистентні (Т-хелпери) лімфоцити визначали за методом Лебедевої [6]. Хелперно-супресорний коефіцієнт (ХСК) підраховували діленням кількості Т-хелперів на кількість Т-супресорів. Проліферативну активність лімфоцитів оцінювали у реакції бластної трансформації (РБТЛ) з фітогемаглютиніном (ФГА) та ліпополісахаридом (ЛПС) радіометричним методом за включенням ^3H -тимідинової мітки. Індекс стимуляції (ІС) визначали діленням показника спонтанної проліферативної активності лімфоцитів на показник їх стимульованої проліферативної активності. Для культивування лімфоцитів використовували середовище Ігла. Підрахунок проб проводили за допомогою рідинного сцинтиляційного спектрометра SL (Франція). Імуноглобуліни класів G, A, M у сироватці крові визначали методом радіальної імунодифузії в гелі за Mancini [6].

Циркуючі імунні комплекси (ЦІК) у сироватці периферичної крові хворих дітей вивчали за методом, що ґрунтується на преципітації імунних комплексів поліетиленгліколем (фірма «Loba chemil», Австрія) з молекулярною масою 6000 Да при низьких концентраціях (3,5 %) з наступними вимірами оптичної густини розчину на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 280 нм [1]. Визначали концентрацію антипротейних та антисиньогнійних антитіл (АТ) у реакції пасивної гемаглютинації (мікромодифікації) з використанням відповідних діагностикумів [8]. Для вивчення впливу *in vitro* білокасоційованих комплексів сироватки крові обпечених дітей визначали кількість лімфоцитів, що утворюють розетки з еритроцитами барана після інкубації з суцільною сироваткою обпечених та її безбілковою фракцією. Вилучення білкової компоненти з сироватки крові проводили методом висолювання з використанням сульфату амонію різної концентрації [1]. Кількість лімфоцитів, що утворюють розетки з аутологічними еритроцитами визначали за методом розеткоутворювання [6].

Результати обробляли з використанням методів математичної статистики, визначали вірогідність результатів за критерієм t Стьюдента.

Результати та їх обговорення

При вивченні функціональної активності лімфоцитів встановлено, що на стадії шоку відносний і абсолютний вміст Е-РУЛ, ЕА-РУЛ знижений пропорційно до ступеня тяжкості травми у дітей усіх трьох груп. Відмічено також різке підвищення у крові кількості 0-лімфоцитів, що може свідчити про вплив опікового шоку на функцію тимуса [2]. Порушення диференціації лімфоцитів посилюється зі зменшенням числа ЕА-РУЛ. На фоні низької кількості Т-хелперів і Т-супресорів у хворих II і III груп ХСК у всіх обстежених дітей був зниженим відносно контрольних значень. Це свідчить про порушення балансу імунорегуляторних субпопуляцій Т-лімфоцитів і пригніченні Т-залежної імунної відповіді, що потребує участі Т-хелперів (табл. 1). Можливо, що пригнічення рецепторів Т-лімфоцитів пов'язано з дією комплексів токсин — антитоксин [1, 10].

Таблиця 1. Зміна вмісту ($\times 10^9$ /л) лімфоцитів та їх субпопуляцій у гострому періоді опікової хвороби ($M \pm m, n = 76$)

Показник	Контроль (I група)	Ступінь тяжкості травми		
		Середній (II група)	Тяжкий (III група)	Вкрайтяжкий (IV група)
Лейкоцити	5,56±0,70			
шок		10,0±0,54*	13,30±1,60*	1,10±0,46*
токсемія		11,10±0,25*	11,00±0,34*	15,30±0,74*
Лімфоцити	3,02±0,25			
шок		3,38±0,41	2,10±0,18*	2,68± 0,30
токсемія		3,63±0,47	3,60±0,21	3,26±0,29
Олімфоцити	0,62±0,02			
шок		1,51±0,24*	1,22±0,35*	1,90±0,27*
токсемія		2,32±0,54*	2,54±0,79*	2,54±0,31*
T-лімфоцити	1,43±0,23			
шок		1,14±0,32	0,58±0,07*	0,64±0,09*
токсемія		0,87±0,09*	0,73±0,03*	0,62±0,07*
T-активні лімфоцити	1,00±0,14			
шок		0,30±0,09*	0,15±0,02*	0,14±0,01*
токсемія		0,16±0,06*	0,14±0,04*	0,10±0,03*
T-супресори	0,58±0,09			
шок		0,59±0,03	0,34±0,01*	0,38±0,03*
токсемія		0,31±0,04*	0,34±0,06*	0,32±0,03*
T-хелпери	0,84±0,13			
шок		0,54±0,11*	0,24±0,02*	0,28±0,09*
токсемія		0,56±0,04*	0,39±0,06*	0,30±0,09*
Хелперно-супресор- ний коефіцієнт	1,45			
шок		0,91	0,71	0,75
токсемія		1,78	1,14	1,0

* $P < 0,05$ (тут та далі у табл. 2, 3, 4)

У цей період виявлено також різке зниження індексу стимуляції у РБТЛ на фітогемаглютинін та ліпополісахарид у 2,5–4,4 рази ($P < 0,05$), що пов'язано з підвищенням спонтанної проліферативної активності T-лімфоцитів. Оскільки, як відомо [5], підвищена спонтанна активність лімфоцитів пов'язана з активацією клітин *in vivo*, вона може бути показником тяжкості шоку при гострому стані (табл. 2).

Досліджено прогресивне зниження відносної та абсолютної кількості ЕАС-РУЛ, яке пропорційне ступеню тяжкості травми. Як з'ясувалося, зниження у плазмі крові концентрації Ig G, що являють собою основну кількість специфічних антитоксичних антитіл, на 24,8–45,2% ($P < 0,05$) порівняно

Таблиця 2. Показники проліферативної активності (ум. од.) лімфоцитів у дітей при опіковій травмі ($M \pm m, n = 70$)

Індекс стимуляції	I група	II група	III група	IV група
У відповідь на ліпополісахарид	2,25±0,41			
шок		0,90±0,07*	0,60±0,12*	0,51±0,09*
токсемія		0,57±0,09*	0,33±0,07*	0,25±0,02*
фітогемаглютинін	1,26±0,23			
шок		0,71±0,15*	0,62±0,08*	0,50±0,07*
токсемія		0,92±0,17	0,85±0,05*	0,50±0,04*

з контрольними значеннями відображає пригнічення синтезної Ефункції ЕАС-РУЛ у цей період (табл. 3). Концентрація Ig A при опіках тяжкого та вкрайтяжкого ступеню був зниженою, що спричинило погіршення захисту слизових оболонок, особливо оболонки в кишечнику дитини. Гіперпродукція Ig M у дітей II групи на фоні субкомпенсованих значень IgG на стадії шоку свідчить про посилення гуморального імунітету та компенсацію гуморального гомеостазу внаслідок синтезу низькоафінних антитіл. При визначенні вмісту ЦІК відмічено незначне його підвищення лише у хворих з вкрайтяжкими опіками.

На стадії токсемії на 8–10-ту добу після опікової травми у дітей зберігалось прогресивне зниження показників клітинної ланки імунітету (див. табл. 1). При цьому підвищення ХСК корелює ($r = 0,62$; $P < 0,05$) з накопиченням у периферичній крові вмісту ЦІК. У цей період встановлено тенденцію до нормалізації ІС у відповідь на фітогемаглютинін у РБТЛ у хворих III групи. Проліферативна активність лімфоцитів у відповідь на ліпополісахарид залишалася суттєво зниженою (див. табл. 2).

Стадія токсемії характеризувалася подальшим прогресивним зниженням відносної та абсолютної кількості ЕАС-РУЛ у 2,82–9,7 раза ($P < 0,05$) (див. табл. 3). Речовинами, що можуть так впливати, були токсини тканинного та мікробного походження, продукти неповного протеолізу білків, що накопичуються у периферичній крові у цей період [4]. Встановлено зменшення концентрації Ig G та Ig A відносно таких на стадії шоку, що є одним з факторів пошкодження ентерогематичного бар'єра внаслідок погіршення захисту слизових оболонок в кишечнику дітей усіх трьох груп. Тільки у

Таблиця 3. Вміст В-лімфоцитів, імуноглобулінів основних класів і специфічних антитіл при опіковій травмі ($M \pm m$, $n = 76$)

Показник	I група	II група	III група	IV група
В-лімфоцити, 10^9 /л	$0,97 \pm 0,08$			
шок		$0,73 \pm 0,14$	$0,30 \pm 0,11^*$	$0,14 \pm 0,04^*$
токсемія		$0,44 \pm 0,02^*$	$0,33 \pm 0,06^*$	$0,10 \pm 0,02^*$
Імуноглобулін G, г/л	$9,45 \pm 0,27$			
шок		$7,11 \pm 0,56^*$	$6,59 \pm 0,41^*$	$5,18 \pm 0,22^*$
токсемія		$5,34 \pm 0,91^*$	$5,02 \pm 1,01^*$	$4,32 \pm 0,47^*$
Імуноглобулін A, г/л	$0,81 \pm 0,05$			
шок		$0,84 \pm 0,09$	$0,75 \pm 0,10$	$0,69 \pm 0,07^*$
токсемія		$0,72 \pm 0,04$	$0,67 \pm 0,09^*$	$0,49 \pm 0,05^*$
Імуноглобулін M, г/л	$0,86 \pm 0,05$			
шок		$1,02 \pm 0,15$	$0,64 \pm 0,07$	$0,57 \pm 0,04^*$
токсемія	$1,25 \pm 0,18^*$	$0,61 \pm 0,08^*$	$0,52 \pm 0,03^*$	
Циркуючі імунні комплекси, ум. од	$73,90 \pm 3,20$			
шок		$73,55 \pm 2,01$	$84,69 \pm 8,55$	$105,00 \pm 15,89^*$
токсемія		$89,95 \pm 8,92$	$104,30 \pm 12,71^*$	$125,50 \pm 9,55^*$
Антисиньогнійні антитіла, ум. од.	$13,33 \pm 7,74$			
токсемія		$20,20 \pm 4,18$	$11,31 \pm 3,15$	$10,05 \pm 4,37$
Антипротейні антитіла, ум. од.	$10,00 \pm 7,24$			
токсемія		$19,15 \pm 2,58$	$15,33 \pm 1,54$	$9,55 \pm 2,03$

хворих II групи спостерігався підвищений на 45,3 % ($P < 0,05$) синтез IgM (низькоафінних антитіл).

Вивчене зменшення концентрації Ig G, а також Ig M у дітей з опіками тяжкого та вкрайтяжкого ступеня створює передумови до різкого ослаблення гуморального імунітету на відміну від дорослих хворих, у яких вміст низькоафінних антитіл, як засвідчать дані інших дослідників [4], спостерігався підвищеним протягом усього гострого періоду опікової хвороби, що забезпечує мінімальний рівень гуморального захисту. У дітей з опіковою хворобою зниження концентрації імуноглобулінів у крові здійснюється внаслідок плазмореї, що виникає ще на стадії шоку [9], і пригнічення їх синтезу імунокомпетентними клітинами [3]. Вміст ЦІК на стадії токсемії мав тенденцію до підвищення відносно стадії шоку у дітей усіх трьох груп, що є однією з характеристик підвищення рівня інтоксикації. Вміст антисигнійних АТ та антипротейних АТ залишався у межах контрольних значень (див. табл. 3). При цьому, за даними Скачкової [8], у цей період у 30 % випадків спостерігалася контамінація опікових ран грамнегативною мікрофлорою у дітей з опіками середнього ступеня, з тяжкими опіками — в 50 % випадків і в 80 % випадків у хворих з вкрайтяжкими опіками.

На стадії шоку експериментально *in vitro* встановлено супресуючий вплив суцільної сироватки (зниження у 2,0–4,8 раза; $P < 0,05$) на розеткоутворюючу активність лімфоцитів у дітей усіх груп. Безбілкова фракція сироватки крові у дітей II і III груп не знижує значення досліджуваного показника, що свідчить про супресуючу дію переважно білокосоційованих токсинів. У хворих IV групи визначено супресуючий вплив як білокосоційованих комплексів, так і безбілкової фракції сироватки крові, що представлена гідрофобними структурами (табл. 4).

На стадії токсемії супресуючий вплив на розеткоутворюючу активність лімфоцитів проявляють білокзв'язані токсини та безбілкова фракція сироватки крові у дітей всіх трьох груп (табл. 4).

Також визначено тенденцію до підвищення значень показників розеткоутворюючої активності лімфоцитів відносно аутологічних еритроцитів на стадії шоку у дітей з опіками. Інкубація лімфоцитів з аутологічною сироваткою призводить до подальшого підвищення значень цих показників.

Таблиця 4. Вплив факторів сироватки на розеткоутворюючу активність (%) лімфоцитів, ($M \pm m$, $n = 76$)

Показник	I група	II група	III група	IV група
Т-лімфоцити шок	47,20±0,95	33,60±8,00	27,50±4,10*	24,00±3,10*
токсемія		23,90±2,00*	20,30±1,50*	19,00±2,50*
Т-лімфоцити, інкубовані з сироваткою шок	48,00±0,50	18,00±1,90*	13,50±1,15*	10,00±1,90*
токсемія		12,50±2,10*	7,80±1,81*	7,50±0,55*
Т-лімфоцити, інкубовані з безбілковою фракцією сироватки шок	47,50±0,75	35,70±3,50*	24,30±3,20*	9,50±2,70*
токсемія		9,50±2,20*	12,20±1,30*	15,20±3,20*

Найбільш виражений ефект у II і III групах спостерігався при введенні у середовище безбілкової фракції, а в IV групі — безбілкової та глобулінової фракції аутологічної сироватки (табл. 5).

Стадія токсемії характеризувалася подальшим прогресивним підвищенням показників розеткоутворюючої активності лімфоцитів відносно як нативних, так і відмитих еритроцитів пропорційно до ступеня тяжкості травми. Ці зміни дають можливість характеризувати міру сенсебілізації лімфоцитів відносно аутологічних еритроцитів, а також рівень фіксації на поверхні еритроцитів антиеритроцитарних антитіл (див. табл. 5).

Таким чином, отримані результати і аналіз літературних даних свідчать, що опікова хвороба у дітей, починаючи вже зі стадії шоку, супроводжується зниженням імунологічної реактивності, пропорційно тяжкості травми, що призводить до розвитку вторинних імунодефіцитів за Т-незалежним типом. Протягом гострого періоду опікової хвороби у дітей всіх груп основний супресуючий вплив на Т-ланку імунітету здійснює білкова фракція аутологічної сироватки. З 8–10-ї доби після травми пригнічуючі властивості починає проявляти безбілкова фракція сироватки.

Ці зміни поєднуються з розвитком аутоімунних реакцій відносно аутологічних еритроцитів. Спостерігається втрата толерантності до аутоантигенів з гіперпродукцією аутоантитіл, що підтверджується високою концен-

Таблиця 5. Показники активності лімфоцитів (%) у реакції розеткоутворювання з аутологічними еритроцитами при опіковій травмі (M ± m, n = 50)

Показник	I група	II група	III група	IV група
Спонтанна реакція аутологічного розеткоутворювання	17,43±0,89			
шок		15,60±2,00	18,71±0,22	17,20±0,79
токсемія		25,15±3,22*	20,40±1,21*	29,4±0,42*,**
Відмиті еритроцити	2,73±0,45			
шок		5,56±0,87***	3,21±0,79***	3,71±0,59***
токсемія		15,32±1,56*,**	12,70±0,59*,**,***	15,20±0,73*,**
Вплив аутологічної сироватки,	19,71±1,27			
шок		5,65±3,11*,**	20,90±0,53	29,50±0,73*,***
токсемія		51,31±4,00*,**,***	49,71±1,22*,**,***	64,32±1,22*,**,***
Вплив глобулінової фракції сироватки	17,2±0,54			
шок		15,97±1,51	16,20±0,69	20,31±0,73*,***
токсемія		39,81±1,13*,**,***	37,40±0,73*,**,***	57,20±1,09*,**,***
Вплив альбумінової фракції сироватки	12,5±0,22			
шок		19,33±0,95*	14,30±0,43*	17,30±0,51*,***
токсемія		19,85±1,12*	21,71±0,69*,***	22,34±1,02*,**,***
Вплив безбілкової фракції сироватки	7,20±0,95			
шок		20,23±1,12*	19,70±0,49*	25,40±0,67*,***
токсемія		25,22±1,95*,**	21,53±1,02*,***	23,10±0,47*,**

Примітка. * вірогідно порівняно з показниками контрольної групи, (P < 0,05); ** вірогідно порівняно з вихідними показниками, (P < 0,05); *** вірогідно порівняно з показниками спонтанної реакції (P < 0,05).

трацією низькоафіних антитіл. Потенціюючу дію на розвиток аутоімунних реакцій здійснює безбілкова та глобулінова фракція аутологічної сироватки.

Як зниження активності клітинного імунітету, так і концентрації імуноглобулінів G та M у дітей з опіками тяжкого та вкрайтяжкого ступеня створює передумови для розвитку інфекційних ускладнень.

A. M. Boyarskaya, O. I. Osadchaya, G. P. Kozinets

IMMUNOLOGICAL REACTIVITY CONDITIONS OF BURNED CHILDREN

Analysis of the immunological reactivity conditions of burned children was conducted. The factors which have influence on the functional activity of blood leucocytes were studied. The decrease of immunological reactivity proportionale to the grave of the trauma was discovered. The secondary immunodeficiency in T-indepent type developed. The protein fraction of the blood serum influenced on the T-lymphocytes to the highest degree. Simultaneously decrease of the toleranse to the autologus erythrocytes with the hyperproduction of antibodies was discovered.

Institute of Haematology and Transfusiology, Kiev;

P. L. Shupik Medical Academy of Postgraduate Education, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Аполлонин А.В., Яковлев М.Ю., Рудик А.Л.* Эндотоксины свертывающей системы крови // *Микробиология, эпидемиология и иммунология.* — 1990. — №11. — С.100-116.
2. *Иммунология* инфекционного процесса / Под ред. В.И.Покровского. — М.: РАМН, 1994. — 215 с.
3. *Карваял К.Ф., Паркс Д.Х.* Ожоги у детей / Пер. с англ. — М.: Медицина, 1990. — 512 с.
4. *Козинец Г.П.* Патогенетическое обоснование различных методов детоксикации при ожоговой болезни и влияние их на течение раневого процесса: Автореф. дис...д-ра мед.наук. — К., 1992. — 37 с.
5. *Колкер И.И.* Инфекция и иммунитет при термических поражениях // *Хирургия.* — 1990. — № 5. — С. 17-22.
6. *Лабораторные* методы исследования в клинике. Справочник / Под. ред. В.В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.
7. *Повстяной Н.Е., Козинец Г.П., Сосюра Т.В. и др.* Патогенез и лечении пострадавших в остром периоде ожоговой болезни: Метод.рекомендации МЗ УССР. — Киев. — 1989. — 23 с.
8. *Скачкова Н.К.* Микробиологические аспекты применения новых антимикробных средств для местного лечения ожоговых ран: Автореф.дис. ...канд.мед.наук. — М., 1990. — 19 с.
9. *Сосюра Т.В., Цыганков В.П., Кирилюк А.Н., Боярская А.М.* Изменение иммунологической реактивности у детей при ожоговой болезни // *Клин. хирургия.* — 1989. — №3. — С.33-35.
10. *Taal L.A.* Psychological aspects of burn enjuries. — In.: *Burns association 8th Congress.* (Sept. 15 -18 1999). Marathon — Attica, Hellas, 1999. — P.131.

Київ. НДІ гематології та трансфузіології

АМН України;

*Київ. мед. академія післядиплом. освіти
ім.П.Л.Шутика*

*Матеріал надійшов до
редакції 8.02.2000*