

КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

УДК 618:14-005.1:612.661:612.017

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ПРИ МАТОЧНЫХ КРОВОТЕЧЕНИЯХ ПУБЕРТАТНОГО ПЕРИОДА

Л. С. Сотникова

*Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск,
НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, г. Томск*

Маточные кровотечения пубертатного периода (МК ПП) в структуре гинекологической патологии подростков занимают I место (10–37 %) [1, 2, 3]. Затяжное и рецидивирующее течение заболевания, наличие осложнений при маточных кровотечениях обуславливает тяжелое состояние ребенка и требует длительного лечения. Основным осложнением МК ПП является развитие хронической постгеморрагической железодефицитной анемии (ЖДА) [4, 5, 11, 13]. Цитокиновый профиль при МК ПП, сопровождающийся изменением субпопуляционного состава лимфоцитов, в настоящее время не изучен [1, 3, 6, 7, 11, 13]. В связи с этим большой интерес вызывает проведение комплексной и сравнительной оценки иммунного ответа у пациенток с МК ПП как без, так и с развитием анемии для получения новых данных фундаментального характера о степени вовлечения иммунной системы в патологический процесс [9, 10, 12].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить продукцию цитокинов при МК ПП.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования явились 120 девушек-подростков. Основную группу составили 80 пациенток с МК ПП. Контрольную группу составили 40 практически здоровых девушек без нарушения менструального цикла, сопоставимых с основной группой по возрасту. Критериями отбора в основную группу были: наличие на момент обследования маточного кровотечения; возраст от 13 до 18 лет; наличие в анамнезе 3 и более эпизодов маточного кровотечения; инфекционный индекс $\leq 2-2,5$; отсутствие острых и хронических воспалительных заболеваний; в момент исследования пациентки не принимали половые стероиды.

В зависимости от наличия анемического синдрома пациентки с МК ПП были распределены на две группы: I группа ($n = 42$) – девушки с МК ПП без развития анемии (гемоглобин ≥ 120 г/л); II группа ($n = 38$) – девушки с МК ПП с развитием железодефицитной анемии средней степени [гемоглобин – $(92 \pm 1,6)$ г/л].

Оценка состояния иммунного статуса проводилась в период кровотечения. Определение общего количества лейкоцитов и подсчет их отдельных морфологических форм проводили стандартными гематологическими методами (Меньшиков В.В., 1987). Определение CD3+, CD4+, CD8+ и CD72+ лимфоцитов проводили иммуноцитохимическим методом с использованием набора реагентов фирмы "Dako" (Дания). Определение уровня IFN γ , IL-2, IL-4 и IL-10 в супернатантах проводили с использованием твердофазного иммуноферментного "сэндвичевого" метода. Процедуру выполнения иммуноферментного анализа проводили по инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем ("Procon", Россия; "Cytimmune", США). Учет результатов иммуноферментного анализа проводили с помощью фотометра для микропланшетов "Multiscan EX" ("ThermoLabSystems", Финляндия) при длине волны 450 нм (для IFN γ , IL-2 и IL-4) и 490 нм (для IL-10). Концентрацию цитокинов вычисляли по калибровочной кривой. Данные выражали в пг/мл.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием пакета программ "Statistica 5.0" для "Windows". Определялись среднее арифметическое X и ошибка среднего арифметического m . Уровень статистической значимости различий сравниваемых показателей устанавливали с использованием критерия Стьюдента в случаях, когда распределение подчинялось нормальному закону, и непарамет-

рического U -критерия Манна-Уитни в случаях отклонения распределений от нормального [8].

Анализ клинического материала показал, что средний возраст пациенток с МК ПП в исследовании составил $(14,8 \pm 0,2)$ года. Средний возраст появления менархе был $(13,4 \pm 0,3)$ года. У 63 % (51) девушек цикл к моменту кровотоечения не установился. Менструации были нерегулярными, через 2–3 месяца по (6 ± 1) день. У 37 % (29) девушек менструальный цикл до момента кровотоечения был регулярным в течение 1–2 лет, через (28 ± 2) дня по (4 ± 1) дня. На момент обследования 60 % (48) имели гиперполименорею, 22 % (17) – гиперменорею и 18 % (15) пациенток – полименорею. Длительность кровотоечения варьировала от 14 до 46 дней – в среднем (18 ± 2) дня. Циклические кровотоечения наблюдались у 35 % (28) больных, ациклические – у 65 % (52). В контрольной группе средний возраст девушек был $(14,2 \pm 0,2)$ года, возраст менархе – $(13,5 \pm 0,3)$ года. На момент исследования менструальный цикл был через $(28 \pm 1,2)$ дня по (4 ± 1) дней, кровянистые выделения были умеренными по количеству и безболезненными.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение количества лимфоцитов, несущих поверхностные маркеры клеточной дифференцировки, установило, что относительное и абсолютное содержание Т-лимфоцитов у здоровых девушек составляло $(64,26 \pm 3,12)$ % и $(1,38 \pm 0,15) \cdot 10^9$ /л соответственно. При этом относительное и абсолютное количество CD4 положительных лимфоцитов в контрольной группе соответствовало значениям $(40,12 \pm 3,22)$ % и $(0,70 \pm 0,08) \cdot 10^9$ /л. Процентное содержание CD8+ лимфоцитарных клеток регистрировалось на уровне $(25,06 \pm 1,24)$ %, что в абсолютных величинах составляло $(0,44 \pm 0,02) \cdot 10^9$ /л. Иммунорегуляторный индекс (CD4+/CD8+) определялся на уровне $1,52 \pm 0,14$. Популяция В-лимфоцитов (CD72+) в периферической крови здоровых девушек составляла $(14,21 \pm 1,06)$ % клеток, что в абсолютных числах соответствовало $(0,36 \pm 0,08) \cdot 10^9$ /л.

Результаты иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови у пациенток с маточными кровотечениями пубертатного периода продемонстрировали значительное снижение процентного содержания CD4+ клеток, проявляющих хелперную активность, как у пациенток с МК ПП без развития анемии, так и у больных с наличием ЖДА по сравнению со значениями аналогичных параметров у здоровых доноров – $(26,12 \pm 3,46)$ % ($p < 0,05$) и $(20,70 \pm 1,34)$ % ($p < 0,05$) соответственно. Напротив, относительное количество цитотоксических Т-лимфоцитов достоверно возрастало ($p < 0,05$) у пациенток I группы до $(32,24 \pm 3,02)$ % и во II клинической группе до $(38,28 \pm 2,12)$ %, в контроле – $(25,06 \pm 1,24)$ %. Соответственно контрольному показателю ($p < 0,05$)

снижалось значение иммунорегуляторного индекса. Интерпретируя данные результаты, нельзя не отметить, что более выраженные изменения субпопуляционного состава Т-лимфоцитов регистрировались у пациенток с МК ПП, осложнившимися развитием анемии. При исследовании уровня В-лимфоцитов отмечалось статистически значимое повышение ($p < 0,01$) по сравнению с таковым в группе контроля абсолютного числа CD72-позитивных лимфоцитарных клеток у обследованных пациенток с МК ПП как без, так и с развитием анемии.

Таким образом, результаты исследования субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови при МК ПП демонстрируют факт нарушения функционирования клеточного звена иммунитета. Согласно современным представлениям активация Th1-лимфоцитов, сопряженная с продукцией ключевых цитокинов IFN- γ и IL-2, усиливает клеточный иммунитет, детерминация иммунного ответа по гуморальному типу осуществляется при доминирующем влиянии Th2-цитокинов, дискриминантными из которых являются IL-4 и IL-10 [9, 10, 12].

Как показало проведенное исследование, спонтанная и стимулированная фитогемагглютинином продукция IFN- γ мононуклеарными лейкоцитами периферической крови у здоровых девушек составила $(104,02 \pm 12,76)$ и $(272,33 \pm 22,04)$ пг/мл соответственно. Индекс стимуляции выработки данного цитокина оказался равным $(2,52 \pm 0,24)$ усл. ед. Изучение продукции мононуклеарами IL-2 в контрольной группе показало, что базальная секреция этого цитокина оказалась равной $(40,62 \pm 6,34)$ пг/мл, а ФГА-индуцированная – $(192,20 \pm 16,42)$ пг/мл. Средняя величина индекса стимуляции секреции IL-2 составила $(5,24 \pm 1,02)$ усл. ед. Спонтанная и стимулированная продукция IL-4 у здоровых девушек соответствовала $(58,64 \pm 8,24)$ и $(142,04 \pm 16,14)$ пг/мл, индекс стимуляции этого цитокина оказался равным $(2,82 \pm 0,18)$ усл. ед. Конституциональная и ФГА-индуцированная секреция мононуклеарными клетками IL-10 у лиц контрольной группы оказалась равной $(62,18 \pm 4,62)$ и $(156,62 \pm 16,42)$ пг/мл соответственно, индекс стимуляции продукции данного интерлейкина – $(2,62 \pm 0,26)$ усл. ед.

Детальное изучение цитокин-продуцирующей функции мононуклеаров периферической крови у пациенток с МК ПП позволило констатировать факт изменения изучаемых показателей. Так, в ходе исследования уровня продукции мононуклеарами IFN γ было выявлено значительное снижение его спонтанной и ФГА-стимулированной секреции по сравнению с таковыми у здоровых девушек в 1,2 раза у пациенток без анемии и в 1,4 раза – с развитием ЖДА. Причем индекс стимуляции продукции IFN γ у обследованных нами пациенток соответствовал контрольным значениям.

Продукция цитокинов у пациенток с МК ПП, $X \pm m$

Продукция цитокина		Группы обследованных		
		Контрольная группа	I группа МКПП без ЖДА	II группа МК ПП с ЖДА
IL-2	Спонтанная, пг/мл	40,62±6,34	48,66±6,42 $p_1 > 0,05$	52,24±12,14 $p_{1,2} > 0,05$
	ФГА-стимулированная, пг/мл	192,20±16,42	102,46±14,42 $p_1 < 0,01$	96,24±8,82 $p_1 < 0,01, p_2 > 0,05$
	Индекс стимуляции, усл. ед.	5,24±1,02	2,12±0,68 $p_1 < 0,01$	2,36±0,21 $p_1 < 0,01, p_2 > 0,05$
INF- γ	Спонтанная, пг/мл	104,02±12,76	86,62±14,12 $p_1 < 0,01$	75,16±6,56 $p_1 < 0,05, p_2 > 0,05$
	ФГА-стимулированная, пг/мл	272,33±22,04	152,04±22,46 $p_1 < 0,05$	127,03±24,38 $p_1 < 0,05, p_2 > 0,05$
	Индекс стимуляции, усл. ед.	2,52±0,24	2,48±0,22 $p_1 > 0,05$	2,56±0,25 $p_{1,2} > 0,05$
IL-4	Спонтанная, пг/мл	58,64±8,24	92,62±12,14 $p_1 < 0,05$	118,24±9,67 $p_1 < 0,001, p_2 < 0,01$
	ФГА-стимулированная, пг/мл	142,04±16,14	204,26±16,25 $p_1 < 0,05$	238,42±12,14 $p_1 < 0,01, p_2 > 0,05$
	Индекс стимуляции, усл. ед.	2,82±0,18	2,32±0,24 $p_1 > 0,05$	2,06±0,14 $p_{1,2} < 0,05$
IL-10	Спонтанная, пг/мл	62,18±6,62	52,12±11,14 $p_1 > 0,05$	56,46±8,04 $p_{1,2} > 0,05$
	ФГА-стимулированная, пг/мл	156,62±16,42	126,23±6,42 $p_1 > 0,05$	134,26 ±12,02 $p_{1,2} > 0,05$
	Индекс стимуляции, усл. ед.	2,62±0,26	2,82±0,44 $p_1 > 0,05$	2,78±0,12 $p_{1,2} > 0,05$

Примечание. p_1 – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы; p_2 – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями у пациенток с МК ПП без ЖДА.

Было установлено статистически значимое ($p < 0,01$) угнетение ФГА-стимулированной продукции дискриминантного в реализации Th1-пути иммунного ответа IL-2 у всех обследованных пациенток. Уровень конституционального синтеза этого интерлейкина практически не отличался от нормы. Индекс стимуляции секреции цитокина также существенно ($p < 0,01$) снижался. Выявлено статистически значимое возрастание базальной и ФГА-стимулированной продукции мононуклеарами IL-4, стимулирующее поляризацию Т-хелперов в направлении Th2, в анализируемых клинических группах по сравнению с контрольными значениями. Расчет индекса стимуляции продукции данного цитокина показал снижение значения этого показателя на 25 % у пациенток с анемией вследствие МК ПП. Конституциональная и индуцированная продукция иммунокомпетентными клетками IL-10, а также индекс стимуляции секреции данного цитокина у пациенток с МК ПП независимо от наличия анемического синдрома значимых изменений по сравнению с таковыми в контрольной группе не преобладали (см. табл.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное нами исследование позволило выявить нарушение иммунного статуса при МК ПП, что характеризовалось дефицитом Т-клеточного звена иммунитета, следствием которого, вероятно, явился выявленный дисбаланс продукции цитокинов с про- (IL-2, INF- γ) и противовоспалительными (IL-4) свойствами. Настоящее исследование позволило зарегистрировать у пациенток с анемией при МК ПП значительное угнетение продукции мононуклеарами IL-2, а также провоспалительного цитокина – INF- γ . При этом продукция цитокина Th-2 пути иммунного ответа – IL-4, напротив, значительно увеличивалась.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богданова Е. А. Гинекология детей и подростков. – М.: Медицинское информационное агенство, 2000. – 332 с.
2. Гарден А. С. Детская и подростковая гинекология / Под ред. А. С. Гарден, Т. М. Глыбинной; пер. с англ. – М.: Медицина, 2001. – С. 149–155.
3. Гуркин Ю. А. Гинекология подростков. – СПб.: Фолиант, 2002. – С. 193–226.
4. Диагностика и лечение ювенильных маточных кровотечений: методические рекомендации / Сост. В. Ф. Коколина. – М., 1999. – 32 с.

5. Железодефицитные состояния в различные периоды жизни женщины / В. Н. Серов, В. Н. Прилепская, Е. В. Жаров и др. – М., 2002. – 15 с.

6. Зудикова С. И. // Сб. науч. тр. IV Всерос. конф. по детской и подростковой гинекологии, г. Москва, 2000. – М., 2000. – С. 59–60.

7. Кучумова О. Ю. // Репродуктивное здоровье детей и подростков: сб. науч. тез. конфер. – Барнаул, 2004. – С.188–190.

8. Пеккер Я. С., Фокин В. А. Анализ и обработка медико-биологической информации. – Томск: Изд-во ТПУ, 2002. – 160 с.

9. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология: пер. с англ. – М.: Мир, 2000. – 582 с.

10. Симбирцев А. С. // Циток. и воспал. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 16–21.

11. Уварова Е. В., Веселова Н. М. // Репродуктивное здоровье детей и подростков. – 2005. – № 3. – С. 30–37.

12. Хайтов Р. М., Игнатъева Г. А., Сидорович И. Г. Иммунология. – М.: Медицина, 2000. – 432 с.

13. Chen B. H., Giudice L. C. // West. J. Med. – 2004. – Vol. 169. – P. 280–284.