

DOI: 10.33741/0435-1991.40.10

ДИНАМІКА ПОКАЗНИКІВ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ ТА БІЛКОВОГО ОБМІНУ ХВОРИХ НА ГЕМОФІЛІЮ ПІД ЧАС КОМПЛЕКСНОГО ЛІКУВАННЯ ГЕМОРАГІЧНИХ УСКЛАДНЕНЬ

Т. О. Калиниченко, М. Ю. Аношина, Є. В. Авер'янов,
В. І. Семеняка, Л. І. Парубець, М. В. Ягвдік

*Державна установа «Інститут гематології та трансфузіології
НАМН України», Київ, Україна*

Резюме

Актуальність. Комплексне лікування геморагічних ускладнень у хворих на гемофілію передбачає забезпечення гемостазу під час оперативного втручання та протягом реабілітаційного періоду. Чужорідна для реципієнта білкова природа препаратів факторів згортання крові може бути причиною ряду змін у його статусі.

Мета – проаналізувати зміни показників клітинної ланки імунітету та білкового обміну у периферичній крові хворих на гемофілію при проведенні оперативного втручання на фоні гемостатичної терапії препаратами факторів згортання крові.

Матеріали і методи. Досліджували кров хворих на гемофілію типів А і В середнього та важкого ступенів тяжкості у динаміці при хірургічному лікуванні геморагічних ускладнень кістково-м'язової локалізації. Використовували гематологічні, імунологічні, біохімічні та статистичні методи дослідження.

Результати та їх обговорення. Після операції у хворих спостерігалось зниження коефіцієнта співвідношення альбумінів і глобулінів, що обумовлено переходом альбумінів в тканини, збільшенням їхнього розпаду. На етапі раннього післяопераційного періоду у хворих відбувалось статистично значуще зниження імунорегуляторного індексу. Абсолютний вміст Т-лімфоцитів ($CD3^+$) мав тенденцію до поступового зростання, що вилилось у статистично значуще збільшення у пізньому післяопераційному періоді. У цей же період зростає кількість $CD8^+$, $CD16^+$ -клітин. Поступово, починаючи з 5–7 доби післяопераційного періоду, збільшувалась популяція В-лімфоцитів ($CD22^+$), кількість яких на 28 добу перевищила вихідні дані майже у 3,5 рази.

Висновки. Динаміка показників імунітету та білкового обміну на етапах післяопераційного та реабілітаційного періодів має особливості реагування, що можуть бути наслідком сенсibiliзації в результаті тривалого застосування специфічних засобів забезпечення гемостазу. Продовження досліджень у цьому напрямі є необхідною умовою уточнення висновків та надання дієвих рекомендацій.

Ключові слова: гемофілія; комплексне лікування геморагічних ускладнень; клітинний імунітет; лімфоцити; білки крові.

Конфлікт інтересів: автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.
Фінансування: дослідження не мало спонсорської підтримки.

DYNAMICS OF CELL IMMUNITY INDICATORS AND PROTEIN METABOLISM IN PATIENTS WITH HEMOPHILIA DURING COMPLEX TREATMENT OF HEMORRHAGIC COMPLICATIONS

T. O. Kalynychenko, M. Yu. Anoshyna, Ye. V. Averianov,
V. I. Semeniaka, L. I. Parubets, M. V. Yahovdik

*State Institution «Institute of Hematology and Transfusiology
of NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine*

Abstract

Background. Comprehensive treatment of hemorrhagic complications in patients with hemophilia provides hemostasis during surgery and in the rehabilitation period. The protein nature of the deficient coagulation factors, alien to the recipient, can cause several immunological changes in his status. The goal was to analyze changes in the parameters of the cellular component of immunity and protein metabolism of hemophilia patients during surgical interventions with effective hemostasis what obtained with using the deficient blood coagulation factors.

Materials and Methods. The blood of hemophilia patients (types A and B, moderate and severe severity) has been investigated in dynamics during the surgical treatment of the hemorrhagic musculoskeletal complications. A number of research methods such as hematological, immunological, biochemical and statistical have been used. **Results.** The decreasing in the ratio of albumins and globulins occurred after surgery, which was due to the albumins transition into tissues and their decay increasing. A statistically significant decrease in the immunoregulatory index was recorded at the stage of the early postoperative period. The absolute content of T-lymphocytes (CD3⁺) showed a tendency to gradual growth, which resulted in a statistically significant increase during the late postoperative period. The number of CD8⁺, CD16⁺-cells increased during the same period. The population of B-lymphocytes (CD22⁺) was increasing gradually, starting since 5–7 days after surgery. On the 28th day, their number exceeded the initial data by almost 3.5 times.

Conclusions. Peculiar properties of dynamics of immunity indicators and protein metabolism at the stages of the postoperative and rehabilitation periods may be the result of sensitization after prolonged using of specific agents for ensuring the hemostasis. The continuation of the research in this direction is a prerequisite for clarifying the findings and making effective recommendations.

Keywords: hemophilia; complex treatment of hemorrhagic complications; cellular immunity; lymphocytes; blood proteins.

Вступ

Терапевтичною метою здійснення постійної гематологічної профілактики при веденні пацієнтів з гемофілією є попередження рецидивуючих кістково-м'язових крововиливів. На жаль, все ще існують об'єктивні обставини, через які внутрішньовенне гемостатичне лікування таких хворих є доступним тільки за вимогою [1, 2, 3]. Замісна гемостатична терапія факторами згортання крові (F) VIII і IX може бути причиною ряду змін у статусі хворих на гемофілію, що пов'язане з чужорідною для реципієнта білковою природою препаратів [4, 5]. У роботі представлено аналіз стану білкового обміну, а також клітинного імунітету (переважно Т-ланки) хворих на гемофілію типів А і В середнього та важкого ступенів тяжкості з геморагічними ускладненнями на етапах комплексного лікування (до операції, у ранньому та пізньому післяопераційних періодах та у період реабілітації).

Мета. Проаналізувати зміни показників клітинної ланки імунітету та білкового обміну хворих на гемофілію при проведенні оперативних утручань на фоні гемостатичної терапії препаратами факторів згортання крові.

Матеріали і методи

Досліджували кров 12 дорослих хворих на гемофілію типів А і В середнього та важкого ступеня тяжкості, що мали геморагічні ускладнення у кістково-м'язовій системі та/або артропатії. Лікування пацієнтів проводилось у рамках комплексної програми з проведенням оперативних утручань (синовектомії, видалення псевдопухлини, ендопротезування) під прикриттям гемостатичної терапії препаратами дефіцитних факторів згортання крові (FVIII, FIX). Результати оцінювали до початку операції перед введенням передопераційної дози препарату фактора згортання крові (1 етап), через 30–60 хв. після введення (2 етап), а також – у післяопераційному та реабілітаційному періодах: зразу після закінчення операції (3 етап), 1 доба (4 етап), на 5–7 добу (5 етап), через 14, 21, 28 днів (відповідно – 6, 7, 8 етапи). Визначали вміст лейкоцитів периферичної крові хворих та лейкограму в мазках, зафарбованих за Папенгеймом. Оцінку стану клітинного імунітету здійснювали шляхом фенотипування лімфоцитів в тестах розеткування з частинками, вкритими моноклональними антитілами до CD3 (загальні Т-лімфоцити), CD4 (Т-хелпери (Тх)), CD8 (Т-супресори/цитотоксичні (Тс/ц)), CD16 (натуральні кілери (НК)), CD22 (В-лімфоцити) [6]. Імунорегуляторний індекс (ІІ) визначали як співвідношення Тх/ Тс/ц (CD4/CD8). Показники білкового обміну досліджували уніфікованим біуре-

товим методом з використанням набору реактивів ЧНПП «Філіт діагностика» (м. Дніпро, Україна).

Статистичну обробку здійснювали з використанням пакету прикладних статистичних програм STATISTICA 6. 0 (StatSoft, USA), а також Excel XP (Microsoft, USA). Нормальність розподілу кількісних ознак визначали за критерієм Шапіро-Уїлка. Критерії для оцінки значущості відмінностей вибрані в залежності від нормальності розподілу величин. Для перевірки статистичних гіпотез про відсутність відмінностей груп при множинному порівнянні пов'язаних між собою груп показників використовували непараметричний ранговий дисперсійний аналіз за Фрідменом. При послідовному парному порівнянні груп використовували критерій Вілкоксона з поправкою Бонфероні для корекції похибки 1 типу. Для виявлення й оцінки сили зв'язків між кількісними показниками був застосований метод рангової кореляції Спірмена.

Результати та їх обговорення

Статистично суттєве зростання кількості лейкоцитів периферичної крові хворих відбувалось на момент закінчення операції з поступовим зниженням на 7–14 добу (рис. 2). При визначенні відносного і абсолютного вмісту клітин загальної запальної реакції (моноцитів, нейтрофілів, еозинофілів) було встановлено, що на 5 етапі (5–7 доба) дослідження з'явилась тенденція до зростання вмісту еозинофільних гранулоцитів у порівнянні з вихідними даними.

Пізніше – на 21–28 добу (7–8 етапи дослідження) це зростання ставало вже статистично достовірним ($p < 0,001$).

У ранньому післяопераційному періоді у хворих мав місце лівий нейтрофільний здвиг як показник гострої запальної реакції. При цьому значуще зростав вміст лейкоцитів за рахунок паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів. У подальший період зазначені показники поступово відновлювались до вихідних значень.

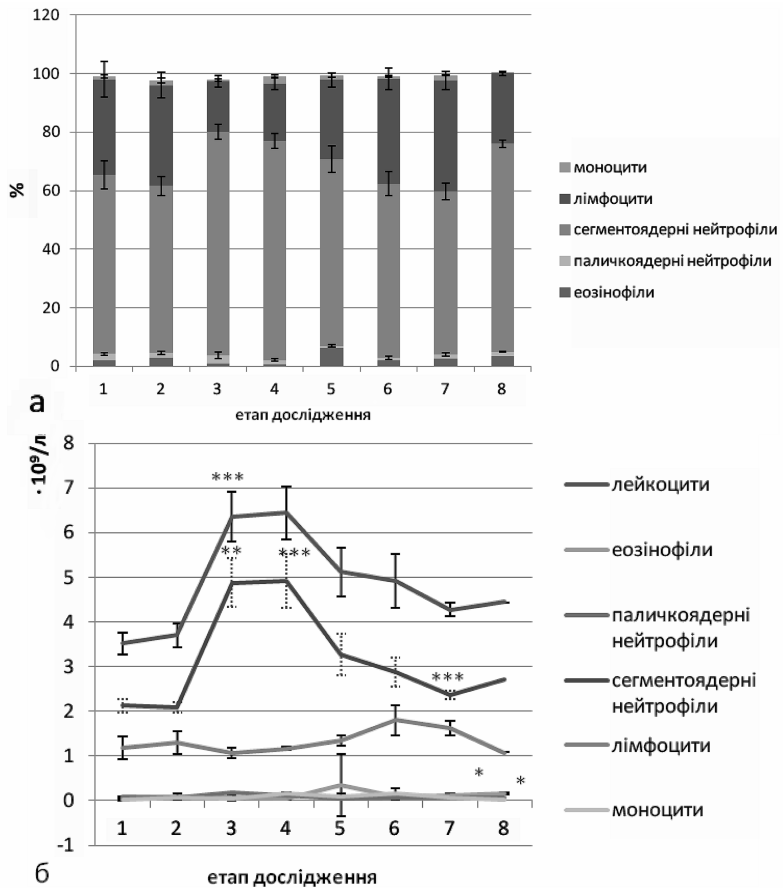


Рисунок 1. Зміни лейкоцитарної формули (а) та абсолютного вмісту субпопуляцій лейкоцитів (б) у периферичній крові хворих на гемофілію на етапах дослідження.

Примітки: 1 – $p < 0,001$, 2 – $p < 0,01$, 3 – $p < 0,05$ – значуща різниця у порівнянні з 1 етапом дослідження (вихідні дані).

Оцінка якісних та кількісних співвідношень основних білкових фракцій у загальній групі хворих дозволила констатувати, що середні показники білкового обміну не виходили за межі фізіологічної норми на будь-якій зі стадій дослідження (рис. 2, 3).

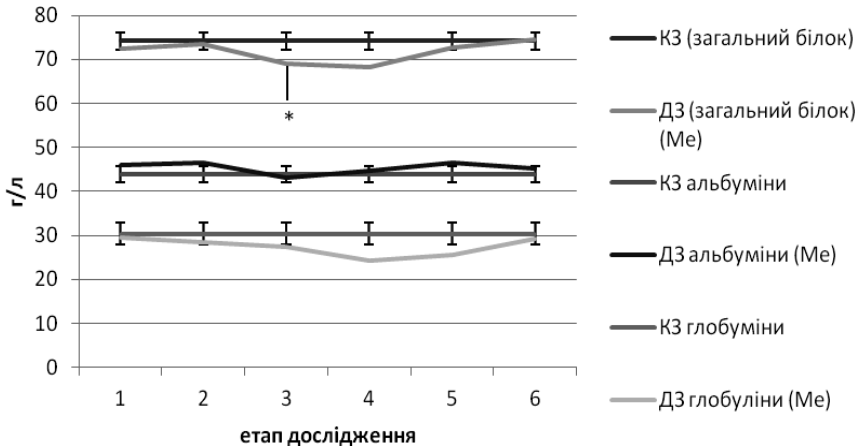


Рисунок 2. Динаміка показників обміну білка у сироватці крові хворих на гемопілію на етапах дослідження.

Примітки: КЗ – контрольні значення; ДЗ – дослідні значення; Me – медіана; * – статистично значуща відмінність показників у порівнянні з II етапом дослідження ($p=0,002874$).

Разом з тим, динаміка вмісту фракцій глобулінів (рис. 3) проявляла характерні для гострої запальної реакції риси. Так, вміст α_1 -глобулінів відразу після закінчення оперативного втручання зростав відносно норми ($(2,93 \pm 0,17)$ г/л) на 25,6% ($p < 0,001$), через добу тримався на рівні 20,0% вище контрольних значень ($p < 0,05$). Ще через тиждень (5 група) відбулось повернення до норми. Концентрація β -глобулінів на 7 добу після операції була знижена ($p < 0,01$) у порівнянні з контролем ($(8,46 \pm 0,38)$ г/л) майже на 22% (до $6,61 \pm 0,51$) г/л, що може бути пов'язаним з транзиторним дефіцитом трансферину. Вихідний вміст γ -глобулінів у хворих був знижений ($p < 0,001$) на 39,5% (норма $(11,87 \pm 0,43)$ г/л) внаслідок надмірної втрати білка при геморагічних ускладненнях. Подальша динаміка змін зазначеного показника демонструє поступове підвищення до меж контрольних значень. Зростання вмісту глобулінів відбувалось головним чином за рахунок фракції γ -глобулінів (рис. 3). Це підтвердилось наявністю сильного позитивного кореляційного зв'язку між показниками загального вмісту глобулінів та фракції γ -глобулінів (коефіцієнт рангової кореляції Спірмена $r = 0,86014$, $p = 0,00033$).

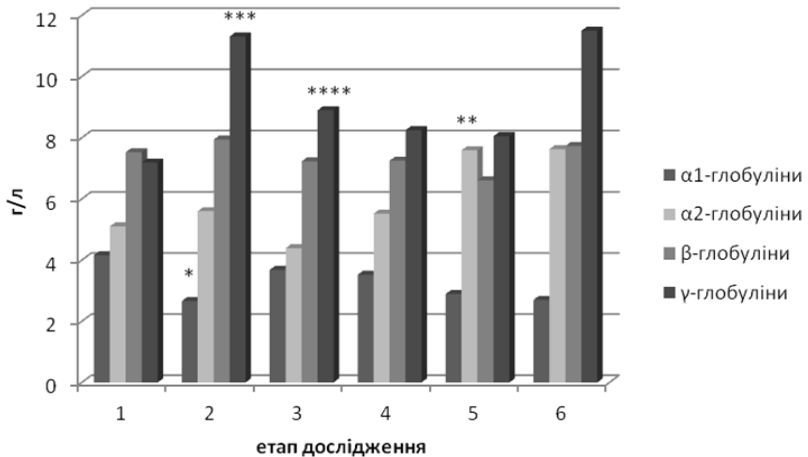


Рисунок 3. Фракції глобулінів у сироватці крові хворих на гемофілію на етапах дослідження.

Примітки: * – статистично значуща відмінність показників α_1 -глобулінів у порівнянні з I етапом дослідження ($p=0,00222$); ** – α_2 -глобулінів у порівнянні з III етапом дослідження ($p=0,00287$); *** – γ -глобулінів у порівнянні з I етапом дослідження ($p=0,00287$); **** – γ -глобулінів у порівнянні з II етапом дослідження ($p=0,00287$).

Після проведення операції у хворих спостерігалось зниження співвідношення альбумінів і глобулінів внаслідок зниження концентрації альбумінів (рис. 2), що обумовлено їхнім переходом в тканини при підвищенні проникності судин, а також збільшенням розпаду [7]. Вміст глобулінів у цей період мав тенденцію до зростання.

При зіставленні даних на різних етапах дослідження з використанням рангового непараметричного дисперсійного аналізу за Фрідменом з обчисленням коефіцієнта конкордації Кендала W при врахуванні рівня $p < 0,05$ було встановлено наявність відмінностей для таких показників як загальний білок ($W=0,40794$, $p < 0,00018$), альбуміни ($W=0,22778$, $p < 0,01787$), α_1 -глобуліни ($W=0,19312$, $p < 0,04091$), α_2 -глобуліни ($W=0,39320$, $p < 0,00026$), γ -глобуліни ($W=0,37698$, $p < 0,00040$). При подальшому парному порівнянні груп з використанням непараметричного тесту Вілкоксона та поправки Бонфероні (у нашому випадку для 6 груп розрахунковий рівень $p=0,00333$) ці розбіжності були підтверджені лише вибірково (рис. 2, 3).

На першому етапі дослідження субпопуляційний склад лімфоцитарної фракції периферичної крові досліджених хворих (рис. 4) не мав суттєвих розбіжностей із нормальними показниками здорових осіб.

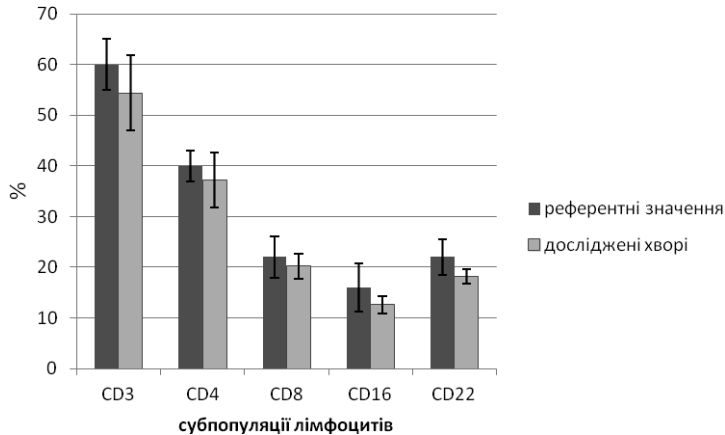


Рисунок 4. Вміст субпопуляцій лімфоцитів у хворих на гемофілію (1 етап дослідження).

Абсолютний вміст загальних Т-лімфоцитів ($CD3^+$) мав тенденцію до поступового зростання, що перейшло у статистично значуще ($p < 0,01$) дворазове збільшення у пізньому післяопераційному періоді (7 і 8 етапи дослідження, рис. 5). Також статистично достовірно у 2,8 рази зросла кількість клітин, які належать до субпопуляцій Тс/ц ($CD8^+$). При цьому показники вмісту Тс/ц мали сильний прямий кореляційний зв'язок, а Тх – зв'язок середньої сили з вмістом глобулінів (коефіцієнт рангової кореляції Спірмена $r = 0,749159$, $p = 0,00504$; $r = 0,65021$, $p = 0,02207$, відповідно). Також були виявлені такі взаємозв'язки як сильний від'ємний між вмістом Тс/ц та співвідношенням альбумінів до глобулінів ($r = -0,70799$, $p = 0,00998$), а також прямий середньої сили між Тх та вмістом фракції γ -глобулінів ($r = 0,60781$, $p = 0,03603$).

У цей же період (21-28 доба після операції) зростав як відносний, так і абсолютний вміст НК-клітин з фенотипом $CD16^+$, останній показник – більш ніж у 2 рази. Окрім того, поступово збільшувалась популяція В-лімфоцитів ($CD22^+$) із статистично значущими змінами, починаючи з 5–7 доби післяопераційного періоду, що разом з підвищенням вмісту еозинофілів

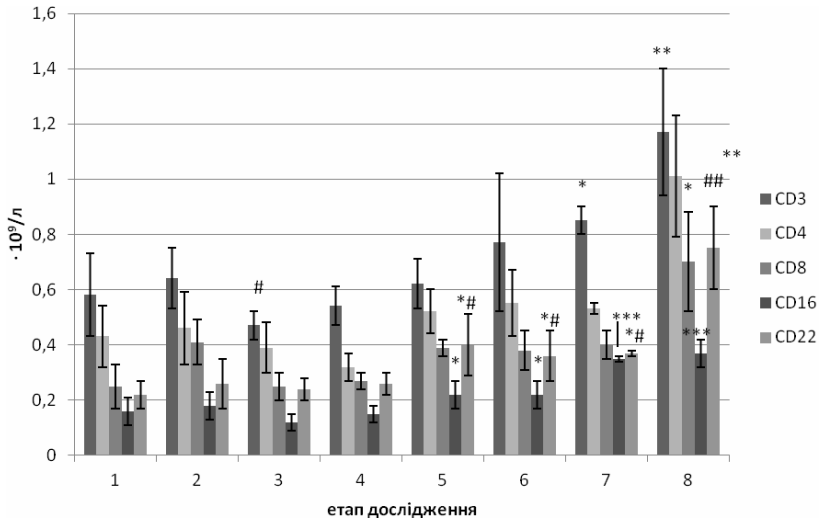


Рисунок 5. Показники клітинного імунітету у загальній групі досліджених хворих на етапах лікування.

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ – статистично значуща різниця у порівнянні з 1 етапом дослідження; # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$ – статистично значуща різниця у порівнянні з 2 етапом дослідження.

стало особливістю перебігу запальної реакції у досліджуваній категорії хворих. При цьому на 8 етапі абсолютне зростання вмісту В-лімфоцитів склало майже 3,5 раза. Зростання кількості CD22⁺-клітин, а також переважне збільшення фракції γ -глобулінів у периферичній крові хворих може свідчити про включення гуморальної ланки імунної відповіді у пізньому післяопераційному та реабілітаційному періодах.

Значущими показниками стану імунітету, окрім кількісних, є також і співвідношення основних субпопуляцій Т-клітин. У табл. представлений індекс співвідношення Тх (CD4⁺) і Тс/ц клітин (CD8⁺) на етапах дослідження.

За даними табл. на етапі раннього післяопераційного періоду у хворих відбувалось статистично достовірне зниження ІРІ у порівнянні з нормою, що свідчить про переміщення частини найбільш активних реактогенних Т-клітин у місце запалення. Пізніше індекс нормалізувався.

Слід зазначити, що спонтанна кровотеча у кістково-м'язовій системі є найбільш розповсюдженим клінічним проявом гемофілії [8]. Навіть первинна

Таблиця. Імунорегуляторний індекс (IPI, CD4/CD8)
на етапах дослідження у хворих на гемофілію (M±m)

№ з/п	Етап дослідження	CD4/CD8
1	До введення препарату фактора	1,79±0,30
2	Через 30–60 хв. після введення	1,43±0,31
3	Відразу після закінчення операції	1,30±0,14*
4	1 доба після операції	1,19±0,15*
5	5–7 доба після операції	1,39±0,27
6	14 доба після операції	1,42±0,16
7	21 доба після операції	1,38±0,13
8	28 доба після операції	1,84±0,30

Примітки: нормальне значення IPI = 1,80±0,08, * – p<0,01 – статистично значуща різниця у порівнянні з нормою.

профілактика за допомогою введення дефіцитних факторів згортання крові, на жаль, не повністю захищає пацієнта від суглобових крововиливів та субклінічних кровотеч [9]. До того ж, обмежена забезпеченість зазначеними препаратами все ще лишається найбільшою проблемою світового рівня, незважаючи на значний прогрес у лікуванні гемофілії [10].

Окрім первинної профілактики, будь-яке хірургічне втручання при гемофілії виконується під прикриттям замісної терапії дефіцитними факторами згортання крові, рівень яких підтримують у відповідності до розроблених стандартів протягом 8–10 тижнів реабілітаційного періоду [1]. Оскільки останні є препаратами білкової природи, їхнє часте введення може спричинювати зміни імунологічних і гематологічних показників у реципієнтів.

При дослідженні реакції організму хворих в екстремальних умовах операційного втручання та протягом періоду реабілітації було встановлено, що імунна відповідь та білковий обмін цієї категорії хворих мали свої особливості перебігу запальної реакції в умовах нормального імунного реагування. Для остаточних висновків та подальшого напрацювання конкретних рекомендацій необхідне продовження досліджень у цьому напрямі.

Висновок

Динаміка показників імунітету та білкового обміну хворих на гемофілію під час комплексного хірургічного лікування геморагічних ускладнень та на етапах післяопераційного та реабілітаційного періодів свідчить про особливості імунної відповіді, що можуть бути наслідком

сенсифілізації в результаті тривалого застосування специфічних засобів забезпечення гемостазу у вигляді препаратів факторів згортання крові.

Література

1. Rodriguez-Merchan EC. Musculo-skeletal complications of hemophilia. HSS J. 2010 Feb; 6(1):37-42. doi: 10.1007/s11420-009-9140-9.
2. Rodriguez-Merchan EC. Prevention of the musculoskeletal complications of hemophilia. Adv Prev Med. 2012; 2012:201271. doi: 10.1155/2012/201271.
3. De la Corte-Rodriguez H, Rodriguez-Merchan EC, Jimenez-Yuste V. Point-of-care Ultrasonography in Orthopedic Management of Hemophilia: Multiple Uses of an Effective Tool. HSS J. 2018 Oct;14(3): 307-313. doi: 10.1007/s11420-018-9604-x.
4. Игнатъев СВ, Кокорева МА, Ивашкина ЕП, Ворожцова СИ, Градобоева ТГ. Состояние иммунитета у больных гемофилией, получающих длительную профилактическую заместительную терапию. Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины. 2015; 1:194-7.
4. Полянская ТЮ, Зоренко ВЮ. Профилактическая гемостатическая терапия препаратом Фейба у больных ингибиторной формой гемофилии. Гематол. и трансфузиол. 2014;59(2):40-3.
6. Новиков ПД, Новиков ДК. Сравнительная характеристика современных методов иммунофенотипирования лимфоцитов. Иммунология, аллергология, інсектологія. 2000;1:62-6.

Refereces

1. Rodriguez-Merchan EC. Musculo-skeletal complications of hemophilia. HSS J. 2010 Feb; 6(1):37-42. doi: 10.1007/s11420-009-9140-9.
2. Rodriguez-Merchan EC. Prevention of the musculoskeletal complications of hemophilia. Adv Prev Med. 2012;2012:201271. doi: 10.1155/2012/201271.
3. De la Corte-Rodriguez H, Rodriguez-Merchan EC, Jimenez-Yuste V. Point-of-care Ultrasonography in Orthopedic Management of Hemophilia: Multiple Uses of an Effective Tool. HSS J. 2018 Oct;14(3): 307-313. doi: 10.1007/s11420-018-9604-x.
4. Ignatyev SV, Kokoreva MA, Ivashkina EP, Vorozhtsova SI, Grado-boyeva TG. Sostoyaniye immuniteta u bolnykh gemofiliyey. Poluchayushchikh dlitelnyu profilakticheskuyu zamestitelnuyu terapiyu. Aktualnyye voprosy transfuziologii i klinicheskoy meditsiny. 2015;1:194-7 (in Russian).
5. Polynskaya TYu, Zorenko VYu. FAIBA preventive hemostatic therapy in patients with inhibitory hemophilia. Russian Journal of Hematology and Transfusiology. 2014; 59(2):40-3 (in Russian).
6. Novikov PD, Novikov DK. Comparative evaluation of contemporary methods of lymphocytes immunophenotyping. Immunopathology, Allergology, Infectology. 2000;1:58-62 (in Russian).

7. Thompson J. Plasma protein tests: how to interpret abnormal results [internet]. Guidelines in Practice. Supporting implementation of the best practice (for UK healthcare professionals); 2018 Aug 23; cited 2019 Oct 20. Available from: <https://www.guidelinesinpractice.co.uk/liver-disease/plasma-protein-tests-how-to-interpret-abnormal-results/454286>. article
8. Huang ZY, Huang Q, Zeng HJ, Ma J, Shen B, Zhou ZK, Pei FX. Tranexamic acid may benefit patients undergoing total hip/knee arthroplasty because of haemophilia. BMC Musculoskelet Disord. 2019 Sep 4; 20(1):402. doi: 10.1186/s12891-019-2767-x.
9. Peters R, Harris T. Advances and innovations in haemophilia treatment. Nat Rev Drug Discov. 2018;17(7): 493–508. doi: 10.1038/nrd. 2018.70.
10. Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments, and its complications. The Lancet. 2016 Jul; 388(10040):187-197. doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01123-X
7. Thompson J. Plasma protein tests: how to interpret abnormal results [internet]. Guidelines in Practice. Supporting implementation of the best practice (for UK healthcare professionals); 2018 Aug 23; cited 2019 Oct 20. Available from: <https://www.guidelinesinpractice.co.uk/liver-disease/plasma-protein-tests-how-to-interpret-abnormal-results/454286>. article
8. Huang ZY, Huang Q, Zeng HJ, Ma J, Shen B, Zhou ZK, Pei FX. Tranexamic acid may benefit patients undergoing total hip/knee arthroplasty because of haemophilia. BMC Musculoskelet Disord. 2019 Sep 4; 20(1):402. doi: 10.1186/s12891-019-2767-x.
9. Peters R, Harris T. Advances and innovations in haemophilia treatment. Nat Rev Drug Discov. 2018;17(7): 493–508. doi: 10.1038/nrd. 2018.70.
10. Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments, and its complications. The Lancet. 2016 Jul; 388(10040):187-197. doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01123-X

Надійшла: 01. 11. 2019

Контакти: kalynuchenko_tetiana@ukr.net