

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ РЕВМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

А.П.Алексанкин, Е.Н.Александрова, А.С.Авдеева,
А.А.Меснянкина, Е.В.Супоницкая

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А.Насоновой»
(ФГБНУ НИИР им. В.А.Насоновой), г.Москва, Российская Федерация

Одной из важных задач лабораторной диагностики аутоиммунных ревматических заболеваний (РЗ) является оценка основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови. С помощью проточной цитометрии было изучено содержание $CD3^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD4^+CD8^+$, $CD19^+$ и $CD56^+$ у пациентов с РЗ. Выявлено, что у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) снижено содержание $CD3^+CD8^+$, $CD19^+$, $CD56^+$ и увеличено – $CD3^+$, $CD3^+CD8^+$. У пациентов с другими РЗ уровень лимфоцитов в периферической крови существенно не отличался от нормальных показателей.

Ключевые слова: проточная цитометрия, Т и В лимфоциты, естественные клетки киллеры (ЕКК), ревматоидный артрит (РА), ранний ревматоидный артрит (РРА), системная красная волчанка (СКВ), системная склеродермия (ССД).

Введение. В настоящее время понимание роли Т и В-лимфоцитов в аутоиммунном воспалении при РЗ существенно изменилось [1, с.4710]. Развитие РЗ характеризуется потерей В-клеточной толерантности, что приводит к выживанию аутореактивных клонов В-лимфоцитов и их дифференцировке в аутореактивные плазматические клетки, синтезирующие широкий спектр аутоантител, которые индуцируют воспаление и деструкцию тканей организма [2, с.8]. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови является одним из наиболее широко применяемых методов клинической лабораторной диагностики, который позволяет оценить базальный уровень лимфоцитов в норме и при РЗ. Это исследование представляется актуальной задачей как в плане уточнения патогенетических механизмов аутоиммунных РЗ, так и для разработки новых подходов к прогнозированию эффективного ответа на проводимую терапию.

Цель исследования – изучить содержание основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови с помощью проточной цитометрии у здоровых доноров и пациентов с различными РЗ.

Материалы и методы. Обследовано 20 здоровых доноров, средний возраст – 44 года (35–52); 39 пациентов с РРА, возраст 50 лет (32–58) с продолжительностью болезни 5 лет (4–6), отвечающих критериям ACR [3, с.315]; 18 пациентов, возраст 54 года (44–62) с продолжительностью

болезни 14 лет (5–16) с достоверным диагнозом РА по критериям ACR; 59 пациентов с СКВ, возраст 33 года (11–66) с продолжительностью болезни 5 лет (0–23), диагноз основывался на критериях SLICC/ACR [4, с.1725]; 23 пациента, возраст 55 лет (47–60) с достоверным по критериям ACR диагнозом ССД.

Использовалась цельная кровь из локтевой вены в количестве 2,7мл, которую собирали в вакуумную пробирку с добавлением солей ЭДТА в концентрации 1,6мг/мл (S-monovette, 2,7mlK3E; “Sarstedt”, Германия).

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови, включая определение процентного и абсолютного количества общей популяции Т-лимфоцитов ($CD3^+$), Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$), Т-цитотоксических клеток ($CD3^+CD8^+$), ЕКК ($CD56^+$) и В-клеток ($CD19^+$), проводили методом многоцветной проточной цитометрии на анализаторе NAVIOS (“BeckmanCoulter”, США). Использовались готовые коммерческие наборы мышинных моноклональных антител (МА): CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 (“BeckmanCoulter”, США) и CYTO-STAT tetraCHROMECD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (“BeckmanCoulter”, США). Для подсчета абсолютного количества Т, В-лимфоцитов и ЕКК использовался набор реагентов для прямого определения лимфоцитов Flow-Count™ Fluorospheres (“BeckmanCoulter”, США). Подго-

товку лейкоцитов цельной крови к проточному цитометрическому исследованию проводили на автоматической станции для лизирования и фиксации проб цельной крови TQ-Prep™ Workstation (“BeckmanCoulter”, США) с использованием набора реагентов IMMUNOPREP™ ReagentSystem (“BeckmanCoulter”, США).

Для каждого донора (пациента) использовали две полипропиленовые пробирки Coulter (12x75мм, “BeckmanCoulter”, США). К 50мкл (1×10^6 клеток) образцов крови добавляли 5мкл меченых МА и помещали в станцию TQ-Prep™ Workstation, где спустя 10 минут происходил автоматически лизис эритроцитов. В полученную суспензию лимфоцитов вносили 50мкл Flow-Count™ Fluorospheres и проводили оценку результатов пятицветного окрашивания лимфоцитов на анализаторе NAVIOS. Для каждого анализа было подсчитано 50000 событий. Клеточные популяции идентифицировали с помощью программного обеспечения СХР (“BeckmanCoulter”, США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием компьютерной программы STATISTICA 8.0. Для парамет-

ров, распределение которых отличалось от нормального, при сравнении двух групп использовали U-критерий Манна-Уитни. Результаты представлены в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом 25–75 процентиль. Различия считались значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Результаты определения процентного и абсолютного содержания субпопуляций лимфоцитов в периферической крови у доноров и пациентов с РА, РРА, СКВ и ССД представлены в таблице.

У пациентов с РА и СКВ по сравнению с группой здоровых доноров отмечалась тенденция к увеличению относительного количества $CD3^+$ РА – 82,3% (76,7–83,8), СКВ – 82,3% (76,2–88,8) и доноров – 77% (68,4–79,7), $P < 0,05$. Абсолютное кол-во $CD3^+$ у пациентов с СКВ – $0,9 \times 10^9/л$ (0,7–1,3) по сравнению с донорами – $1,3 \times 10^9/л$ (1,2–1,8) – было ниже, $P < 0,05$. Относительное и абсолютное количество Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$) у пациентов с СКВ – 41,5% (31,6–45,0), $0,5 \times 10^9/л$ (0,3–0,7) по сравнению с группой доноров – 52,3% (48,4–56,2), $0,9 \times 10^9/л$ (0,7–1,2) – было ниже, $P < 0,05$. Обнаружено относительное увеличение

Таблица

Сравнительный анализ основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови у здоровых доноров и пациентов с различными РЗ

Показатель	Доноры	РА	РРА	СКВ	ССД
ПК $CD3^+$	77,0 (68,4-79,7)	82,3 (76,7-83,8)*	75,8 (68,1-1,0)	82,3 (76,2-88,8)*	77,4 (74,6-83,7)
Абс. кол. $CD3^+$	1,3(1,2-1,8)	1,6(1,3-1,9)	1,3 (0,9-1,6)	0,9(0,7-1,3)*	1,6(1,2-2,0)
ПК $CD3^+CD4^+$	52,3 (48,4-56,2)	49,0 (45,0-55,8)	51,8 (44,7-6,0)	41,5 (31,6-45,0)*	47,9 (45,7-54,7)
Абс. кол. $CD3^+CD4^+$	0,9 (0,7-1,2)	1,0(0,7-1,3)	0,8(0,5-1,2)	0,5(0,3-0,7)*	0,9 (0,8-1,2)
ПК $CD3^+CD8^+$	21,0 (18,6-23,7)	24,3 (20,8-30,3)	22 (17,9-26,6)	39,1 (33,3-47,8)*	24,4 (19,9-31,6)
Абс. кол. $CD3^+CD8^+$	0,4 (0,3-0,5)	0,5 (0,4-0,8)	0,3 (0,2-0,5)	0,5 (0,3-0,6)	0,5 (0,4-0,7)
Индекс Тх/Тц	2,5(1,9-3,1)	2,3 (1,7-2,5)	2,4 (1,8-2,9)	1,0 (0,7-1,3)*	2,1(1,5-3,1)
ПК $CD3^+CD56^+$	12,9(8,5-16,8)	8,3 (5,6-12,3)	8,8(7,3-17,1)	6,2(3,4-11,0)*	8,2 (7,2-11,7)
Абс. кол. $CD3^+CD56^+$	0,2(0,2-0,5)	0,2 (0,1-0,3)	0,2 (0,1-0,2)	0,1(0,04-0,1)*	0,2 (0,1-0,2)
ПК ($CD19^+CD3^+$)	9,7 (6,9-12,3)	7,5 (3,9-13,5)	10,9 (7,4-13,9)	7,7 (4,2-16,9)	10,4 (7,5-15,3)
Абс. кол. ($CD19^+CD3^+$)	0,2 (0,1-0,3)	0,2 (0,1-0,2)	0,2 (0,1-0,2)	0,1 (0,1-0,2)*	0,2 (0,1-0,3)

Примечания: РА – пациенты с ревматоидным артритом, РРА – пациенты с ранним ревматоидным артритом, СКВ – пациенты с системной красной волчанкой, ССД – пациенты с системной склеродермией, ПК – процентное (относительное) количество клеток, Абс. кол. – абсолютное количество клеток ($\times 10^9/л$), * – $P < 0,05$ между донорами и пациентами с РЗ.

Т-цитотоксических клеток ($CD3^+CD8^+$) у пациентов с СКВ – 39,1% (33,3–47,8) по сравнению с донорами – 21,0% (18,6–23,7), $P < 0,05$. Абсолютное количество $CD3^+CD8^+$ у пациентов с СКВ и доноров достоверно не отличалось. Иммунорегуляторный индекс – соотношение $CD4^+$ и $CD8^+$ (индекс Тх/Тц) – у пациентов с СКВ – 1,0 (0,7–1,3) – был ниже, чем у доноров – 2,5 (1,9–3,1), $P < 0,05$. Относительное и абсолютное количество ЕКК ($CD56^+$) у пациентов с СКВ – 6,2% (3,4–11,0) и $0,1 \times 10^9/\text{л}$ (0,04–0,1) – было ниже, чем у доноров – 12,9% (8,5–16,8) и $0,2 \times 10^9/\text{л}$ (0,2–0,5), $P < 0,05$. Снижение абсолютного количества В-клеток ($CD19^+$) наблюдалось у пациентов с СКВ – $0,1 \times 10^9/\text{л}$ (0,1–0,2) – по сравнению с донорами – $0,2 \times 10^9/\text{л}$ (0,1–0,3), $P < 0,05$. При сравнении относительного количества $CD19^+$ достоверных различий между донорами и пациентами с СКВ не найдено. При сравнении с донорами процентного и абсолютного содержания субпопуляций лимфоцитов в периферической крови у пациентов с РРА и ССД достоверных различий не найдено.

Заключение. Таким образом, полученные результаты указывают на то, что РА, РРА и ССД не оказывают существенного влияния на уровень субпопуляций лимфоцитов в периферической крови. Среди пациентов с СКВ по сравнению со здоровыми донорами достоверно снижено относительное и абсолютное количество $CD3^+CD4^+$, $CD56^+$, абсолютное количество $CD3^+$, $CD19^+$ и индекс $CD3/CD4$. Увеличено относительное количество $CD3^+$ и $CD3^+CD8^+$. В дальнейшем это позволит сопоставить уровни субпопуляций лимфоцитов в периферической крови пациентов с СКВ до и после проведенной терапии и оценить в динамике количественные изменения значимых субпопуляций лимфоцитов на фоне проводимой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Takemura S., Klimiuk P.A., Braun A., Goronzy J.J., Weyand C.M. T cell activation in rheumatoid

synovium is B cell dependent. *J Immunol.* 2001;167:4710–18.

2. Анти-В-клеточная терапия в ревматологии: фокус на ритуксимаб. Монография / Под ред. акад. Е.Л.Насонова. – М.: ИМА-ПРЕСС, 2012:8-16.
3. Arnett F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A., McShane D.J., Fries J.F., Cooper N.S. [et al.] The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988 Mar;31(3):315-24.
4. Hochberg M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997 Sep;40(9):1725-1734.

COMPARATIVE ANALYSIS OF MAIN LYMPHOCYTES SUBPOPULATIONS IN THE PERIPHERAL BLOOD OF HEALTHY DONORS AND PATIENTS WITH VARIOUS RHEUMATOID DISEASES

Aleksankin A.P., Aleksandrova E.N., Avdeeva A.S., Mesnyankina A.A., Suponickaya E.V.

V.A.Nasonova Scientific and Research Institute of Rheumatology (FSBSI “V.A.Nasonova SRIR”), Moscow, Russian Federation

One of the important tasks of laboratory diagnosis of autoimmune rheumatic diseases (RD) is assessment of main lymphocytes subpopulations in the peripheral blood. Content of $CD3^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD4^+CD8^+$, $CD19^+$ and $CD56^+$ in patients with RD using flow cytometry was studied. It was revealed that patients with systemic lupus erythematosus (SLE) had reduced content of $CD3^+CD8^+$, $CD19^+$, $CD56^+$, and increased $CD3^+$, $CD3^+CD8^+$. In patients with other RD, the level of lymphocytes in the peripheral blood did not differ significantly from the normal values.

Keywords: flow cytometry, T and B lymphocytes, natural killer cells, rheumatoid arthritis, early rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis.