

ФЕНОТИП ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ АНГИНЕ

И.Г. Мустафин, В.Х. Фазылов, А.Ю. Барышников

Кафедра инфекционных болезней (зав. — проф. В.Х. Фазылов) Казанского государственного медицинского университета, Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИДом (главврач — О.М. Романенко) МЗ РТ, НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей (директор — заслуж. деят. науки и техники России, проф. А.Ю. Барышников), г. Москва

Проблемы инфекционной иммунологии на сегодняшний день не менее актуальны, чем в предшествующие периоды научных исследований. Новые данные о механизмах межклеточного взаимодействия, процессах активации и пролиферации иммунокомпетентных клеток, роли рецептор-лигандных взаимодействий лимфоцитов требуют нового подхода к оценке иммунных реакций при инфекционных заболеваниях. Развитие гибридной технологии позволило получить широкую панель моноклональных антител к дифференцировочным антигенам лейкоцитов и изучить роль поверхностных структур иммунокомпетентных клеток в иммунном ответе [2, 9, 11, 12].

Вопросам активации лимфоцитов придается особое внимание в связи с тем, что активация иммунокомпетентных клеток (ИКК) является одним из начальных и важных этапов иммунного ответа, и ее блокада ведет к нарушению функционирования иммунной системы в целом [4, 6, 14]. Разработаны подходы к оценке активационных маркеров лимфоцитов с помощью моноклональных антител (мкАТ) в реакции иммунофлуоресценции, и изучены изменения их экспрессии при ряде заболеваний [3, 4, 7]. Совокупность поверхностных маркеров составляет фенотип лимфоцита, и его исследование позволяет в определенной мере оценить функциональное состояние ИКК [8, 12, 14].

При ангине возникают различные изменения иммунной системы, которые многие авторы характеризуют как вторичную иммунологическую недостаточность [1, 5, 7]. Вместе с тем авторами определялись лишь количественные показатели основных популяций и субпопуляций лимфоцитов, не позволяющие судить о функциональном состоянии ИКК. В последние годы благодаря успехам биотехнологии появилась возмож-

ность изучения активационных процессов в лимфоцитах при помощи моноклональных антител, однако для оценки иммунного ответа при ангине эти возможности не использовались.

Целью нашего исследования было изучение фенотипа лимфоцитов с применением моноклональных антител к дифференцировочным антигенам лейкоцитов при ангине в остром периоде и в динамике заболевания.

Под наблюдением находились 87 больных с различными формами ангины в возрасте от 15 до 56 лет. В качестве контроля обследован 51 здоровый доброволец. Нами были выделены группы больных по выраженности местного патологического процесса (лакунарная форма — у 68, язвенно-пленчатая — у 19), леченных традиционными методами.

Для исследования фенотипа лимфоцитов у больных ангиной брали венозную кровь из локтевой вены утром (в одни и те же часы) натощак в первые сутки поступления до начала лечения. Повторное взятие крови осуществляли в периоды ранней (на 7—10-й день болезни) и поздней реконвалесценции (20—25-й день).

В работе использовали гепаринизированную кровь (12 — 15 ЕД гепарина на 1 мл крови). Мононуклеарные клетки выделяли из гепаринизированной крови по методу A. Boum (1968) на одноступенчатом градиенте фиколл-верографина, а затем отмывали их раствором Хенкса и доводили концентрацию до 2×10^6 /мл.

Имунофенотипирование лимфоцитов производили в непрямой реакции иммунофлуоресценции с моноклональными антителами серии ИКО НПЦ “Медбиоспектр” (Москва) [2]. Были использованы моноклональные антитела ИКО-90 (CD3), ИКО-86 (CD4), ИКО-31 (CD8), ИКО-116 (CD16), ИКО-105 (CD25), ИКО-1 (HLA-DR), 3F3 (CD72), ИКО-166 (CD45RA), ИКО-20 (CD38),

ИКО-GM1 (CD11b), ИКО-92 (CD71), ИКО-147 (CD26), IPO-4 (CD95). В качестве вторых антител применяли F(ab)2-фрагменты кроличьей антисыворотки против иммуноглобулинов мыши, меченных флуоресцеинизотиоцианатом (FITC).

Двухцветное маркирование лимфоцитов проводили в цельной крови в прямой реакции иммунофлуоресценции с мКАТ ИКО-86 (CD4), ИКО-31 (CD8), меченными FITC и ИКО-160 (CD95), меченными фикоэритрином (PE). Лизирование эритроцитов осуществляли раствором "FACS Lysing Solution" (Becton Dickinson, USA) после окрашивания клеток мКАТ.

Экспрессию CD38 антигена на CD4+ лимфоцитах определяли методом трехэтапного маркирования клеток, включающего на первом и втором этапах окраску в непрямой реакции иммунофлуоресценции с мКАТ к CD38 и F(ab)2-фрагментами FITC с последующим маркированием клеток прямо меченными мКАТ анти-CD4(ИКО-86)-PE.

Учет реакции иммунофлуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре "FACScan" (Becton Dickinson, USA) в программе LYSYS II. В каждой пробе анализировали 10.000 клеток. При анализе лизированной цельной крови по боковому и малоугловому светорассеиванию выделяли гейты "лимфоцитов", "гранулоцитов" и "моноцитов". В гейте "лимфоцитов" регистрировали сигналы по FL1 и FL2, соответствующие флуоресценции FITC и PE. Для получения раздельного сигнала по флуоресценции FITC и PE устанавливали режим компенсации по FL1 и FL2 с помощью частиц "CalyBRITE" "Becton Dickinson, USA" в программе AutoCOMP.

Статистическую обработку полученных результатов производили с использованием программы Microsoft Excell 97 на персональном IBM-совместимом компьютере.

Анализ полученных данных (см. табл.) показал, что в остром периоде заболевания на фоне умеренного лейкоцитоза и лимфопении имела место достоверная разница между отдельными популяциями лимфоцитов по их функциональным маркерам в зависимости от выраженности и глубины местного воспалительного процесса. Так, при язвенно-пленчатой ангине наблюдалось дос-

товерное повышение абсолютного и относительного числа CD16+лимфоцитов соответственно на 33,3% и 32,1%, HLA-DR+клеток — на 73,9% и 60,4%, относительного содержания CD38+лимфоцитов (включающих в себя NK-клетки, часть В-лимфоцитов, активированные Т-лимфоциты) — на 11%, CD11b+лимфоцитов (α -цепь молекулы адгезии) — на 37,2% по сравнению с показателями здоровых лиц. При этом отмечалось снижение абсолютного и относительного количества CD26+лимфоцитов на 14,1% и 21,2% соответственно.

Содержание CD3+, CD4+лимфоцитов у больных данной группы имело тенденцию к уменьшению, а CD8+лимфоцитов — к повышению, что отразилось в виде достоверного снижения иммунорегуляторного индекса — ИРИ ($P<0,05$).

В периоде ранней реконвалесценции на фоне нормализации содержания основных популяций и субпопуляций лимфоцитов сохранялись повышенные уровни относительного числа CD16+клеток, абсолютного и относительного числа HLA-DR+лимфоцитов; относительное содержание CD45RA+ и CD95+лимфоцитов снизилось соответственно на 14,4% и 22,9%.

В периоде поздней реконвалесценции у больных язвенно-пленчатой ангиной на фоне уменьшения общего количества лимфоцитов на 18,2% ($P<0,01$) наблюдались существенные изменения фенотипа лимфоцитов: достоверное снижение уровня CD3+лимфоцитов на 12% и CD4+клеток на 13,4%, а также увеличение числа CD8+лимфоцитов на 16,2%, что отразилось на снижении ИРИ на 31%. Абсолютное и относительное содержание активированных лимфоцитов с маркерами HLA-DR+ увеличивалось в 2 и 2,4 раза, CD11b+ — соответственно на 60,1% и 33%. Абсолютное и относительное число CD72+лимфоцитов уменьшилось на 44,8% и 40%, CD71+лимфоцитов — соответственно на 40,2% и 33,3%, относительное число CD45RA+лимфоцитов — на 16,6%, CD95+лимфоцитов — на 26,8%.

Острый период лакунарной ангины характеризовался достоверным уменьшением абсолютного и относительного числа CD3+лимфоцитов соответственно на 19,1% и 5,7%, абсолютного числа CD4+лимфоцитов на 14,1%, разно-

Фенотип лимфоцитов при ангине в динамике заболевания (M±m)

Показатели	Здоровые (n=51)	Динамика заболевания										P ₂₋₃	P ₄₋₅	P ₆₋₇		
		острый период		ранняя реконвалесценция		поздняя реконвалесценция										
		язвенно-пленчатая (n=19)	2	лакунарная (n=68)	3	язвенно-пленчатая (n=9)	4	лакунарная (n=30)	5	язвенно-пленчатая (n=8)	6				лакунарная (n=16)	7
Лейкоциты, · 10 ⁹ /л	4,88±0,18	8,88±0,77***		7,63±0,24***		5,79±0,64		5,38±0,25		5,52±0,83		5,37±0,31		> 0,05	> 0,05	> 0,05
Лимфоциты, · 10 ⁹ /л	1,84±0,09	1,91±0,17		1,59±0,07*		2,08±0,25		2,14±0,12		1,79±0,26		2,08±0,15		> 0,05	> 0,05	> 0,05
%	38,70±1,38	23,20±2,30***		23,70±0,80***		36,43±2,37		40,40±1,70		31,67±2,17**		39,81±2,97		< 0,05	< 0,05	< 0,05
CD3, · 10 ⁹ /л	1,36±0,05	1,33±0,12		1,10±0,06*		1,44±0,15		1,65±0,12		1,21±0,22		1,53±0,11		> 0,05	> 0,05	> 0,05
%	73,07±1,23	69,30±1,76		68,94±1,01*		70,71±4,59		76,57±1,74		64,33±2,45**		73,44±1,91		> 0,05	> 0,05	> 0,05
CD4, · 10 ⁹ /л	0,78±0,04	0,78±0,08		0,67±0,05		0,81±0,12		0,99±0,08**		0,67±0,10		0,80±0,04		> 0,05	> 0,05	> 0,05
%	43,09±0,99	40,95±2,00		42,09±0,87		39,86±4,15		46,00±1,87		37,33±2,29*		39,06±2,05		> 0,05	> 0,05	> 0,05
CD8, · 10 ⁹ /л	0,56±0,02	0,62±0,07		0,51±0,03		0,52±0,08		0,64±0,05		0,61±0,08		0,67±0,09		> 0,05	> 0,05	> 0,05
%	29,84±1,06	32,75±1,39		31,71±0,74		24,86±3,71		30,40±1,74		34,67±2,31*		31,06±2,41		> 0,05	> 0,05	> 0,05
Tx/Ts	1,54±0,08	1,30±0,10*		1,47±0,06		1,86±0,58		1,64±0,09		1,07±0,01***		1,39±0,12		> 0,05	> 0,05	> 0,05
CD16, · 10 ⁹ /л	0,27±0,02	0,36±0,04*		0,27±0,01		0,21±0,04		0,25±0,03		0,30±0,07		0,30±0,04		< 0,05	< 0,05	< 0,05
%	14,42±1,04	19,05±2,12*		16,99±0,84**		10,29±1,78*		12,10±1,56		17,33±4,62		14,13±1,98		> 0,05	> 0,05	> 0,05
HLA-DR, · 10 ⁹ /л	0,23±0,02	0,40±0,04***		0,24±0,02		0,48±0,11*		0,55±0,08***		0,64±0,15**		0,60±0,12**		> 0,05	> 0,05	> 0,05
%	12,74±0,81	20,44±1,24***		17,12±0,92**		23,57±5,34*		30,74±3,01***		32,67±4,04***		30,07±4,24***		> 0,05	> 0,05	< 0,05
CD25, · 10 ⁹ /л	0,19±0,02	0,22±0,03		0,24±0,01*		0,31±0,06		0,33±0,04**		0,23±0,05		0,25±0,03*		> 0,05	> 0,05	> 0,05
%	10,62±0,94	11,75±1,09		15,49±0,70***		13,86±2,37		15,33±1,38**		11,67±1,01		13,13±1,49		> 0,05	> 0,05	> 0,05
CD72, · 10 ⁹ /л	0,16±0,01	0,18±0,02		0,15±0,01		0,22±0,05		0,17±0,02		0,09±0,01**		0,12±0,02		> 0,05	> 0,05	> 0,05
%	8,79±0,96	9,15±0,79		9,48±0,44		10,71±1,93		8,53±1,03		5,33±0,14**		6,31±0,99*		> 0,05	> 0,05	> 0,05
CD71, · 10 ⁹ /л	0,15±0,02	0,16±0,02		0,15±0,01		0,19±0,05		0,21±0,02*		0,09±0,02*		0,11±0,01*		> 0,05	> 0,05	> 0,05
%	7,96±0,74	8,65±1,03		9,68±0,41*		8,71±1,63		10,37±2,10		5,33±0,87*		5,88±0,85*		> 0,05	> 0,05	> 0,05
CD38, · 10 ⁹ /л	0,99±0,08	1,06±0,09		0,78±0,03*		1,06±0,22		1,00±0,06		1,00±0,20		0,92±0,08		> 0,05	> 0,05	> 0,05
%	52,48±1,66	58,20±2,45*		49,90±1,43		50,50±4,32		48,33±2,65		48,50±2,30		44,64±3,33*		> 0,05	> 0,05	> 0,05
CD11b, · 10 ⁹ /л	0,45±0,04	0,59±0,08		0,53±0,02		0,59±0,12		0,62±0,07		0,72±0,14*		0,77±0,04***		> 0,05	> 0,05	> 0,05
%	24,20±1,35	33,20±2,31***		35,53±0,76***		26,40±4,03		30,83±1,90**		32,50±0,83***		39,38±3,21**		> 0,05	> 0,05	> 0,05
CD45RA, · 10 ⁹ /л	1,79±0,18	1,42±0,24		1,18±0,05***		1,70±0,25		1,65±0,10		1,34±0,12*		1,51±0,11		> 0,05	> 0,05	> 0,05
%	90,00±1,25	85,60±2,18		77,00±1,59***		77,00±1,36***		79,21±2,64**		75,04±1,46***		74,67±3,43***		> 0,05	> 0,05	> 0,05
CD26, · 10 ⁹ /л	0,90±0,08	0,77±0,08*		0,73±0,05**		1,02±0,14		1,05±0,07		0,87±0,16		0,90±0,07		> 0,05	> 0,05	> 0,05
%	52,00±2,62	41,00±3,73**		46,32±1,21***		48,14±1,93		49,03±2,01		46,33±3,75		44,81±2,83*		> 0,05	> 0,05	> 0,05
CD95, · 10 ⁹ /л	1,27±0,13	1,30±0,14		0,80±0,03***		1,06±0,19		1,26±0,06		1,01±0,23		1,07±0,06*		> 0,05	> 0,05	> 0,05
%	64,25±4,79	65,30±2,57		56,88±1,61*		47,33±2,26**		60,28±1,67		47,00±3,89**		51,91±3,33*		> 0,05	> 0,05	< 0,001

Примечание. *P<0,05, ** P<0,001, P<0,0001 — по сравнению с данными здоровых. В остальных случаях P>0,05.

направленным изменением уровня лимфоцитов с активационными маркерами — повышением числа HLA-DR+ лимфоцитов на 37,3%, CD71+лимфоцитов — на 21,6%, абсолютного и относительного числа CD25+лимфоцитов — соответственно на 26,3% и 45,8%, CD11b+клеток — на 17,8% и 46,8%, снижением абсолютного числа CD38+ лимфоцитов на 21,2%, абсолютного и относительного числа CD45RA+ лимфоцитов — на 34,1% и 14,4%, CD26+ клеток — на 19% и 11%, CD95+клеток — на 37,2% и 12,1%.

В периоде ранней реконвалесценции у больных данной группы отмечались дальнейшее повышение относительно содержания HLA-DR+ лимфоцитов на 30,4% и значительное увеличение их абсолютного количества в 2,3 раза при сохраняющихся высоких абсолютных и относительных показателях CD25+ и CD11b+лимфоцитов, сниженных относительных значениях CD45RA+клеток. По сравнению с показателями острого периода заболевания увеличилось абсолютное и относительное содержание CD38+лимфоцитов на 40,1% и 30,3%, CD95+клеток — на 57,5% и 6% соответственно.

В периоде поздней реконвалесценции на фоне нормализации общего числа лейкоцитов, лимфоцитов и их основных популяций и субпопуляций (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+) у больных лакунарной ангиной сохранялось отличие по сравнению со здоровыми лицами в содержании лимфоцитов с экспрессией активационных и ряда дифференцировочных антигенов лейкоцитов: достоверно высокое абсолютное и относительное содержание HLA-DR+ и CD11b+лимфоцитов, высокое абсолютное количество CD25+лимфоцитов, сниженное относительное содержание CD72+, CD71+, CD45RA+, CD26+, CD38+лимфоцитов при уменьшении абсолютного и относительного содержания CD95+лимфоцитов.

Результаты фенотипирования лимфоцитов у больных лакунарной и язвенно-пленчатой ангиной в динамике заболевания позволяют выделить среди исследованных популяций ИКК по дифференцировочным антигенам наиболее значимые изменения экспрессии на лимфоцитах активационных маркеров

HLA-DR, CD25, CD71, CD26, CD38, CD95, CD11b, CD45RA. Однако экспрессия этих маркеров на лимфоцитах больных ангиной неоднозначна в зависимости от характера местного воспаления и фазы инфекционного процесса.

В острой фазе заболевания с развитием общеинфекционного токсического синдрома независимо от характера местного воспалительного процесса наблюдалась лейкоцитарная реакция с повышением числа лейкоцитов и снижением числа лимфоцитов. На этом фоне у больных язвенно-пленчатой ангиной активация ИКК на антигенное воздействие сопровождалась увеличением экспрессии только HLA-DR антигена в отличие от аналогичного показателя при лакунарной ангине, при которой на фоне активационных процессов лимфоцитов имело место увеличение экспрессии HLA-DR, CD25, CD71 антигенов, что является характерной чертой полноценной активации ИКК лимфоидного ряда [4]. Отсутствие экспрессии рецепторов к IL-2 и трансферрину ведет к блокаде последующей пролиферации клеток и, следовательно, к нарушению иммунного ответа на конкретный антиген.

Известно, что в передаче активационного сигнала помимо Т-клеточного рецепторного комплекса участвуют антигены CD45RA [10]. Активация Т-лимфоцитов сопровождается изменением фенотипа клеток CD45RA+ (“наивные, непримированные”) на CD45RA+ (“клетки памяти”). При лакунарной ангине в остром периоде снижается содержание “наивных” лимфоцитов в отличие от показателей при язвенно-пленчатой форме, что свидетельствует об активации Т-лимфоцитов в первой группе больных. На отсутствие активации Т-лимфоцитов и их субпопуляций у больных язвенно-пленчатой ангиной указывает отсутствие экспрессии CD95 антигена на CD4+ и CD8+лимфоцитах при двухцветном окрашивании клеток. Активация лимфоцитов, по данным Miyawaki T. и соавт. [13], сопровождается экспрессией Fas/APO-1 (CD95) антигена, что наблюдалось у больных лакунарной ангиной в виде повышения числа CD4+/CD95+ и CD8+/CD95+ лимфоцитов.

В периоды ранней и поздней реконвалесценции у больных лакунарной ангиной сохранялась активация лимфоцитов (высокое абсолютное и относительное содержание HLA-DR⁺, CD25⁺ лимфоцитов), что свидетельствовало об активном процессе со стороны иммунной системы. У больных язвенно-пленчатой ангиной в динамике заболевания экспрессия лишь HLA-DR антигена на лимфоцитах оставалась на повышенном уровне, что, по-видимому, является особенностью данной формы заболевания. Однако на поздних сроках содержание лимфоцитов с рецепторами к трансферрину (CD71⁺) у больных ангиной достоверно уменьшилось независимо от выраженности местного воспалительного процесса, а экспрессия CD72 антигена (пан-В-клеточный маркер, лиганд CD5 антигена на Т-лимфоцитах, участвует в активации продукции IL-2 и экспрессии рецептора к IL-2) значительно снизилась в обеих группах больных. Снижение экспрессии CD71 и CD72 антигенов на лимфоцитах у больных ангиной на 20—25-й день от начала заболевания может служить в определенной мере показателем иммуносупрессии при данной патологии и требует включения иммуномодулирующих препаратов в комплексную терапию больных ангиной.

Таким образом, определение активационных маркеров и ряда дифференцировочных антигенов лейкоцитов позволило выявить у больных ангиной изменение фенотипа лимфоцитов как в острой фазе заболевания, так и в периоды ранней и поздней реконвалесценции.

ВЫВОДЫ

1. У больных ангиной независимо от формы заболевания наблюдается увеличение количества лимфоцитов, экспрессирующих активационный маркер HLA-DR. При лакунарной ангине имеет место активация лимфоцитов, проявляющаяся увеличением экспрессии HLA-DR, CD25, CD71 антигенов.

2. При язвенно-пленчатой ангине активация лимфоцитов сопровождается увеличением экспрессии только HLA-DR антигена.

3. На поздних сроках наблюдения (20 — 25-й день болезни) у больных ангиной

независимо от характера местного патологического процесса сохраняется высокое содержание HLA-DR⁺ лимфоцитов на фоне снижения CD72⁺ лимфоцитов и нарушения экспрессии рецептора к трансферрину (CD71⁺), что свидетельствует о наличии супрессии иммунной системы в периоде поздней реконвалесценции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабич Н. Ф. Актуальные вопросы клинической оториноларингологии. (Материалы междунауч.-практ. конф. оториноларингологов). — М., 1992.
2. Барышников А. Ю. // Гемат. трансфуз. — 1990. — № 8. — С. 4 — 7.
3. Ковальчук Л. В., Беда М. В., Веселова А. В. и др. // Бюлл. экспер. биол. — 1994. — № 11. — С. 483 — 485.
4. Ковальчук Л. В., Чередеев А. Н. // Иммунология. — 1990. — № 5. — С. 4 — 7.
5. Мельников О. Ф. // Журн. ушн. нос. и горл. бол. — 1991. — № 4. — С. 6 — 10.
6. Павлюк А. С., Беда М. В., Веселова А. В. и др. // Иммунология. — 1993. — № 2. — С. 21 — 24.
7. Фролов В. М., Деменков В. Р. и др. // Журн. ушн., нос. горл. хвор. — 1997. — № 1. — С. 33 — 37.
8. Barclay A. N., Birkeland M. L., Brown M. H. et al. // The LeuKocyte Antigen Facts Book. — London — N.-Y., 1993.
9. Fleischer B. // Immunol. Today. — 1994. — Vol. 4. — P. 180 — 184.
10. June C. H. // Curr. Opin. Immunol. — 1991. — Vol. 3. — P. 287 — 293.
11. Lee M. // Med. Sci. Res. — 1992. — Vol. 20. — P. 539 — 542.
12. Malavasi F., Funaro A., Roggero S. et al. // Immunol. Today. — 1994. — Vol. 15. — P. 95 — 97.
13. Miyawaki T., Uehara T., Nibu R. et al. // J. Immunol. — 1992. — Vol. 149. — P. 3753 — 3758.
14. Van Seventer G. A., Shimizu Y., Shaw S. // Curr. Opin. Immunol. — 1991. — Vol. 3. — P. 294 — 303.

Поступила 19.07.99.

PHENOTYPE OF PERIPHERIC BLOOD LYMPHOCYTES IN ANGINA

I. G. Mustafin, V. Kh. Fazylov, A. Yu. Baryshnikov

S u m m a r y

The phenotype of peripheral blood lymphocytes is studied in 87 patients with angina by cytofluorimetry. It is shown that the course of the disease is accompanied by significant changes of the phenotype of lymphocytes: the increase of expression of activation markers, the increase of the content of CD16⁺ cells. However, the changes of the phenotype of lymphocytes in groups of patients with lacunar and ulceromembranous anginas are ambiguous in the acute period of the disease as well as late in the observation.