

ВЛИЯНИЕ ГЕМОКОМПОНЕНТНОЙ ТЕРАПИИ НА ИММУННЫЙ СТАТУС ПАЦИЕНТОВ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ СИСТЕМЫ КРОВИ

Т.В. Глазанова, О.Е. Розанова, И.Е. Павлова, Ж.В. Чубукина, Е.Р. Шилова, В.Е.

Солдатенков, Л.Н. Бубнова

ФГУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии» Федерального медико-биологического агентства

(191024 Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16.

Тел. 812-717-08-90, e-mail: tatyana-glazanova@yandex.ru)

Резюме: С помощью многоцветной проточной цитометрии исследованы особенности и закономерности изменения показателей клеточного иммунитета в процессе проведения трансфузий гемокомпонентов, содержащих эритроциты, у пациентов с апластической анемией (n=54), из которых 61,1 % не получали трансфузий, 18,5% получали только лейкофильтрованную эритроцитную взвесь и 20,4% – отмытые, размороженные эритроциты и эритроцитную массу, и у пациентов с гемофилией А (n=102), из которых 38,2% получали эритроцитные среды. При отсутствии различий между выделенными группами в относительном содержании общей популяции Т-лимфоцитов (CD3+), их основных иммунорегуляторных субпопуляций (CD3+/CD4+ - Т-хелперов и CD3+/CD8+ - Т-цитотоксических клеток) и В-клеток (CD19+), установлено опосредованное иммуносупрессирующее влияние гемокомпонентной терапии на показатели клеточного иммунитета, проявляющееся в изменении относительного содержания ряда минорных популяций: возрастании числа иммунокомпетентных клеток с фенотипом CD8+/CD3- и снижении числа активированных лимфоцитов с фенотипом CD3+/DR+ и НКТ-клеток (CD3+/CD16/56+). Полученные результаты свидетельствуют, что пациентов с многократными трансфузиями гемокомпонентов в анамнезе следует относить к группе повышенного риска развития вторичного иммунодефицита и инфекционных осложнений, что целесообразно учитывать при назначении иммуносупрессивных препаратов трансфузионнозависимым больным и в выборе тактики гемокомпонентной терапии.

Ключевые слова: клеточный иммунитет, трансфузии, гемокомпоненты, апластическая анемия, гемофилия.

THE EFFECT OF HAEMOCOMPONENT THERAPY ON IMMUNE STATUS OF PATIENTS WITH BLOOD DISORDERS

T.V. Glazanova, O.E. Rozanova, I.E. Pavlova, J.V. Chubukina, E.R. Shilova, V.E. Soldatenkov, L.N. Bubnova

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Russian Federal Medical-biological Agency,

(191024 St.-Petersburg, 2nd Sovestkaia str. 16,

Tel. 812-717-08-90, e-mail: tatyana-glazanova@yandex.ru)

Summary: Using multi-colour flow cytometry we have studied the changes of parameters of cell immunity during the course of red blood cell transfusions in patients with aplastic anaemia (n=54), of whom 61,1% have not received any red blood cell transfusions, 18,5% have received only leukodepleted red blood cells and 20,4% - washed, unfreezed red blood cells and erythrocyte mass. Also we have examined patients with haemophilia A (n=102), of whom 38,2% were red blood cell recipients. There have not been revealed any significant differences between examined groups in the amount of total T-cell population (CD3+) and its main immunoregulatory subsets (CD3+/CD4+ - T-helpers and CD3+/CD8+ - T-cytotoxic cells) and B-cells (CD19+). Nevertheless, we have revealed the mediate immunosuppressive effect of haemotransfusion therapy manifesting by changes of amount of minor lymphoid subsets: increase of percent of CD8+/CD3- cells and decrease of activated CD3+/DR+ and NKT (CD3+/CD16/56+ lymphocytes). The obtained data are the evidence that patients with history of multiple haemocomponent transfusions should be referred as a group with increased risk of secondary immune deficiency and infectious complications. This should be considered during prescribing of immunosuppressive therapy to transfusion-dependent patients and while choosing the tactics of haemocomponent transfusions.

Key words: cell immunity, red blood cells, transfusions, haemocomponents, aplastic anaemia, haemophilia.

Введение. Иммунологическая и инфекционная безопасность является основным принципом гемотрансфузионной терапии. Известно, что содержащиеся в донорской крови лейкоциты, их фрагменты и вырабатываемые ими цитокины могут являться причиной нежелательных иммунологических эффектов, таких как HLA-аллоиммунизация, фебрильные негемолитические реакции, острое трансфузионное поражение легких и другие иммуноопосредованные осложнения. Индуцированная аллогенными гемотрансфузиями модуляция иммунного ответа, в основном проявляющаяся в виде иммуносупрессии, является одним из важнейших нежелательных эффектов у трансфузионнозависимых пациентов [1,2]. Считается, что она связана с наличием в гемокомпонентах (ГК) лимфоцитов, с которыми в организм реципиента поступает множество чужеродных антигенов, включая донорские антиген-презентирующие клетки, несущие антигены HLA II класса. Кроме того, трансфузии аллогенных гемокомпонентов, хранимых в течение длительного периода времени, могут индуцировать анергию Т-клеток реципиента [3], приводящую к иммуносупрессии. Показано, что у реципиентов аллогенных гемотрансфузий наблюдаются различные нарушения функции клеток иммунной системы, включая снижение соотношения хелперы/супрессоры, ингибирование активности натуральных киллеров (НК-клеток), процессов антигенной презентации, супрессию бластной трансформации лимфоцитов, а также развитие гиперчувствительности замедленного типа [4]. Умеренные нарушения в составе лимфоидных субпопуляций и функции естественных киллеров обнаруживались даже спустя 6 месяцев после аллогенных трансфузий [5]. Кроме того, существуют данные [6] о том, что развитие ответа CD8⁺ Т-клеток на ассоциированные с эритроцитами минорные антигены главного комплекса гистосовместимости может происходить даже в отсутствие донорских лейкоцитов.

Тем не менее, на настоящий момент не существует исчерпывающей картины, дающей представление о закономерностях и механизмах иммуномодуляции, вызываемой переливанием компонентов крови, поэтому данный феномен требует дальнейшего исследования и уточнения. Актуальность данной проблемы подтверждается и тем, что в США на базе Вашингтонского университета в настоящий момент продолжается начатое в 2008 году рандомизированное клиническое исследование, целью которого является исследование уровня HLA-сенситизации и иммунного ответа у пациентов, получающих различные виды гемотрансфузий.

Целью данной работы явилось изучение влияния трансфузий эритроцитсодержащих сред на состояние иммунной системы пациентов с гематологическими заболеваниями

Материалы и методы

Исследованы показатели клеточного иммунитета у 54 пациентов с апластической анемией и 102 пациентов с гемофилией А на фоне трансфузионной терапии эритроцитсодержащими гемокомпонентами, включая размороженные, отмытые и лейкофилтрованные эритроциты. Иммунологические показатели исследовали до начала гемотрансфузионной терапии и в процессе ее.

Фенотипирование мононуклеарных клеток осуществляли с применением трехцветной проточной цитометрии на лазерном проточном цитофлюориметре Beckman Coulter FC500 (США). Для исследования использовали моноклональные антитела производства Beckman Coulter (США), конъюгированные с флюорохромами FITC (зеленое окрашивание) и PE (красное окрашивание), имеющие специфичность к следующим поверхностным маркерам: CD3/CD19, CD3/CD4, CD3/CD8, CD3/CD16/56, CD3/HLA-DR. Гейтирование осуществляли с помощью антител к общелейкоцитарному маркеру CD45. По 100 мкл образцов цельной крови с антикоагулянтом помещали в пластиковые пробирки для проточного цитометра, добавляли 20 мкл моноклональных антител и инкубировали согласно прилагаемым к каждому реагенту инструкциям. Далее образцы подвергали лизису с помощью реагентов ImmunoPrep Reagent system, Beckman Coulter, США, используя автоматическую станцию пробоподготовки Beckman Coulter, США. Учет антиген-положительных клеток осуществляли на проточном цитофлюориметре, собирая не менее 5000 событий в области мононуклеарных клеток (CD45+/CD14-). Число клеток в этой области составляло не менее 95%.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью персонального компьютера, используя пакет прикладных программ «Microsoft Office Excel 2003», версия 7.0, применяя методы общей статистики. Сравнение двух выборок осуществляли с помощью методов непараметрической статистики по критерию Уилкоксона-Манна-Уитни для независимых переменных из пакета программы Statistica 6.0. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Обследованные пациенты с апластической анемией (АА) были поделены на следующие основные группы: 1-я (33 человека, 61,1 %) – не получавшие трансфузий ГК,

2-я (10 человек, 18,5%) – получавшие только лейкофильтрованную эритроцитную взвесь, 3-я (11 человек, 20,4%) – получавшие другие эритроцитные среды (отмытые, размороженные эритроциты, эритроцитную массу).

Результаты сравнения изученных иммунологических показателей в 1-й, 2-й и 3-й группах не выявили значимых различий в относительном содержании общей популяции Т-лимфоцитов (CD3+) и их основных иммунорегуляторных субпопуляций, CD3+/CD4+ (Т-хелперы) и CD3+/CD8+ (Т-цитотоксические клетки). Однако наблюдались достоверные изменения ряда других показателей (таблица 1).

Таблица 1

Иммунологические показатели у пациентов с апластической анемией на фоне трансфузий гемокомпонентов

Группа больных АА	CD8+/CD3- (%)	DR+/CD3+ (%)	CD16/56+/CD3+ (%)	CD16/56+/CD3- (%)
1- без ГТ (n=33)	2,4 ± 0,21	2,2 ± 0,42	6,1 ± 0,51	7,9 ± 1,23
2- с ГТ лейкофилтр. (n=10)	4,5 ± 0,42	5,0 ± 0,51	5,7 ± 0,44	9,5 ± 2,01
3- с ГТ проч. (n=11)	4,6 ± 0,91	1,3 ± 0,31	5,4 ± 0,22	11,7 ± 2,03
P ₁₋₂	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05
P ₁₋₃	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05

Так, отмечалось возрастание относительного содержания CD8+ лимфоцитов, не экспрессирующих маркер общей популяции Т-клеток CD3 (CD8+/CD3⁻), как в группе пациентов, получавших фильтрованные ГК (2-я гр.), так и среди пациентов, получавших другие, нефильтрованные эритроцитные среды (3-я гр.), при сравнении с пациентами, не получавшими ГК (1-я группа) – 2,4%, 4,5% и 4,6%, соответственно в 1-й, 2-й и 3-й группе. Кроме того, в группах пациентов с АА, получавших трансфузии ГК (2-я и 3-я гр.), наблюдалось повышение относительного содержания клеток с фенотипом естественных киллеров (НК-клеток) – CD16/56+/CD3⁻ по сравнению с группой, не получавшей трансфузий ГК – 7,9%, 9,5% и 11,7%, соответственно в 1-й, 2-й и 3-й группе. Отмечалась также тенденция к снижению относительного содержания CD16/56+/CD3⁺-лимфоцитов, т.н. НКТ-клеток, в группах больных, получавших трансфузии ГК, по сравнению с больными 1-й группы – 6,1%, 5,7% и 5,4 % в 1-й, 2-й и 3-й группе соответственно. Относительное содержание активированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих одновременно маркеры CD3⁺ и DR⁺, было выше во второй группе и имело тенденцию к снижению в 3-й группе, по сравнению с таковым в 1-й группе – 2,2%, 5,0% и 1,3% в 1-й, 2-й и 3-й группе соответственно. Так как больные 3-й группы получали нефильтрованные гемокомпоненты, вероятно, снижение численности активированных Т-клеток подтверждает иммуносупрессирующее воздействие данного вида трансфузий.

Среди обследованных пациентов с гемофилией А (n=102) были выделены следующие группы: 1-я (45 человек, 44,1%) – неоперированные пациенты в возрасте от 6 до 30 лет, которые не получали трансфузий эритроцитов, а получали лишь немногочисленные переливания нефильтрованного криопреципитата - не чаще 1-2 раз в год, однократно переливалось до 10 доз; 2-я (14 человек, 13,7%) - оперированные по поводу гемофилической артропатии пациенты в возрасте от 6 до 30 лет, которые получали

переливания от 1 до 6 доз фильтрованной эритроцитной массы и больших объемов криопреципитата (ежесуточно); 3-я (18 человек, 17,7%) - неоперированные пациенты старше 30 лет, не получавшие трансфузий эритроцитов, а лишь нефильтрованный криопреципитат 1-2 раза в месяц, до 10 доз одномоментно; 4-я (25 человек, 24,5%) - оперированные пациенты старше 30 лет, получавшие неоднократно от 1 до 6 доз донорской нефильтрованной эритроцитной массы и большие объемы криопреципитата (до 30 доз в сутки).

Результаты обследования больных гемофилией не выявили достоверных различий в содержании общей популяции Т-клеток (CD3+) и их иммунорегуляторных фракций (CD3+/CD4+ и CD3+/CD8+) как между 1-й и 2-й, так и между 3-й и 4-й группами. В то же время, у пациентов в возрасте менее 30 лет в группе оперированных лиц, т.е., получавших трансфузии фильтрованной эритроцитной массы, наблюдалось возрастание относительного содержания клеток с фенотипом CD8+/CD3- по сравнению с неоперированными пациентами – 4,5% и 8,2%, соответственно в 1-й и 2-й группе (таблица 2). Уровень же лимфоцитов периферической крови с фенотипом CD3+/DR+, CD16/56+/CD3+ (НКТ) и CD16/56+/CD3- (НК-клеток) у оперированных пациентов, получавших множественные трансфузии эритроцитов, был ниже, по сравнению с таковым у пациентов, их не получавших. Так, показатели CD3+/DR+ составили в 1-й и 2-й группе соответственно 4,3% и 2,4%, CD16/56+/CD3+ - 3,7% и 2,0%, а НК-клеток – 13,4% и 10,4%.

Таблица 2

Иммунологические показатели у пациентов с гемофилией в возрасте 6-30 лет на фоне трансфузий гемокомпонентов

Группа больных гемофилией	CD8+/CD3- (%)	DR+/CD3+ (%)	CD16/56+/CD3+ (%)	CD16/56+/CD3- (%)
1 - <30 лет без ГТ (n=45)	4,5 ± 0,32	4,3 ± 0,71	3,7 ± 0,43	13,4 ± 0,94
2 - <30 лет с ГТ (n=22)	8,2 ± 0,61	2,4 ± 0,42	2,0 ± 0,91	10,4 ± 0,92
P ₁₋₂	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05

Аналогичные закономерности получены и при сравнении оперированных и неоперированных пациентов в возрасте старше 30 лет (таблица 3): возрастание содержания клеток с фенотипом CD8+/CD3- (4,5% и 5,7% в 3-й и 4-й группе, соответственно), и снижение уровня CD3+/DR+ (5,9% и 3,7%, соответственно) и CD16/56+/CD3+ (5,8% и 3,9%, соответственно) у оперированных пациентов по сравнению

с неоперированными. Относительное содержание НК-клеток в 3-й и 4-й группах не различалось.

Таблица 3

Иммунологические показатели у пациентов с гемофилией старше 30 лет на фоне трансфузий гемокомпонентов

Группа больных гемофилией	CD8+/CD3- (%)	DR+/CD3+ (%)	CD16/56+/CD3+ (%)	CD16/56+/CD3- (%)
3 - ≥ 30 лет без ГТ (n=24)	$4,5 \pm 0,43$	$5,9 \pm 1,11$	$5,8 \pm 0,62$	$13,8 \pm 1,23$
4 - ≥ 30 лет с ГТ (n=25)	$5,7 \pm 0,42$	$3,7 \pm 0,72$	$3,9 \pm 0,63$	$13,2 \pm 1,11$
P ₃₋₄	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05

Представлялось актуальным сравнение иммунологических показателей двух возрастных групп пациентов с гемофилией – от 6 до 30 лет и старше 30 лет (1-я и 3-я группы), обе из которых включали только лиц, не подвергшихся оперативному вмешательству по поводу гемофилической артропатии, и, вследствие этого, не получавших переливаний эритроцитных сред. Оказалось, что эти группы не различаются по относительному содержанию лимфоцитов с фенотипом CD8+/CD3- и НК-клеток, тогда как у пациентов старше 30 лет, получавших суммарно большие объемы криопреципитата, нежели более молодые пациенты, наблюдалось несколько более высокое содержание лимфоцитов, экспрессирующих CD3+/DR+ (4,3% и 6% в 1-й и 3-й группе, соответственно, $p < 0,05$) и НКТ клеток - CD16+/CD3+ (4,0% и 6,4% в 1-й и 3-й группе, соответственно, $p < 0,05$). Это позволяет предположить, что трансфузии криопреципитата, не содержащего форменных элементов и не вызывающего HLA-сенсibilизацию, оказывают умеренное стимулирующее воздействие на клеточное звено иммунитета, о чем свидетельствует возрастание относительного содержания активированных Т-клеток - CD3+/DR+ и НКТ-клеток - CD16+/CD3+.

Таким образом, нами были исследованы показатели клеточного иммунитета у пациентов с апластической анемией и гемофилией А – заболеваниями, имеющими различную этиологию, при которых существует потребность в трансфузиях эритроцитных гемокомпонентов. В результате проведенных исследований выявлены общие закономерности изменения содержания некоторых субпопуляций иммунокомпетентных клеток на фоне гемотрансфузий. Так, при отсутствии значимых изменений в содержании основных лимфоидных популяций (Т-клеток – CD3+ , их иммунорегуляторных

субпопуляций – CD4+/CD3+ и CD8/CD3+, а также В-клеток – CD19+) при изученных патологических состояниях после трансфузий эритроцитсодержащих гемокомпонентов наблюдается достоверное возрастание относительного содержания лимфоцитов с фенотипом CD8+/CD3-, снижение содержания НКТ-клеток – CD16/56+/CD3+, в большинстве случаев отмечено снижение уровня активированных Т-лимфоцитов (CD3+/DR+). Возрастание числа НК-клеток (CD16/56+/CD3-) на фоне гемотрансфузионной терапии выявлено в группах пациентов с апластической анемией, а у пациентов с гемофилией более молодого возраста наблюдалось снижение данного показателя, в то время как у больных старше 30 лет его изменения на фоне трансфузий ГК отсутствовали. Клетки с фенотипом CD8+/CD3- рассматривают как субпопуляцию НК-клеток с регуляторными функциями [7,8]. Их возрастание на фоне трансфузий ГК, а также снижение уровня активированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих одновременно молекулы CD3 и DR свидетельствует о наличии иммуносупрессии. Можно предположить, что повышение содержания НК-клеток в некоторых группах пациентов, получающих гемотрансфузионную терапию, происходит вследствие активации KIR-рецепторов (Killer Immunoglobulin-like Receptors) этих клеток чужеродными (донорскими) HLA-антигенами; кроме того известно, что в ряде ситуаций при сохранном или повышенном количестве НК-клеток наблюдается их функциональный дефект – нарушение секреции цитокинов или цитотоксической функции [9]. НКТ-клетки с фенотипом CD16/56+/CD3+ рассматриваются как иммунорегуляторная субпопуляция, обладающая способностью модулировать функции Т-регуляторных клеток (CD4+/CD25+) посредством ИЛ-2-независимых механизмов [10,11].

Выявленные нами изменения в составе минорных субпопуляций иммунокомпетентных клеток (CD8+/CD3-, CD3+/DR+ и CD16/56+/CD3+), обусловленные гемотрансфузионной терапией, свидетельствуют о нарушении Т-клеточного звена иммунитета, т.е., об опосредованной иммуносупрессии, вызываемой трансфузиями гемокомпонентов.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют, что трансфузии гемокомпонентов являются иммунокомпрометирующим фактором, поэтому пациентов с многократными трансфузиями гемокомпонентов в анамнезе следует относить к группе повышенного риска развития вторичного иммунодефицита и инфекционных осложнений, что целесообразно учитывать при назначении иммуносупрессивных препаратов трансфузионнозависимым больным и в выборе тактики гемокомпонентной терапии.

Список литературы

1. J. Gorham. Transfusion tickles T cells through cross-priming // Blood. – 2006. – Vol. 107, N 1. – P. 6-7.
2. J. Waters. Trauma surgery and transfusion options // International Trauma Care. – 2008. – Vol. 18, N 1 – P. 66-69.
3. M. Raghavan, P. Marik, Anemia, Allogenic Blood Transfusion, Immunomodulation in the Critically Ill. // Chest. – 2005. - Vol.127. – P. 295-307.
4. Y. Min, Chen Gang, Fang Ling-ling, et al. Immunologic changes to autologous transfusion after operational trauma in malignant tumor patients. Neopterin and Interleukin-2 // Journal of Zhejiang University Science. – 2005. – Vol. 6B, N 1. – P.49-52.
5. O. Mathiesen, L. Lund, U. Brodthagen, P. Gandrup Leukocyte filtration does not affect lymphocyte subpopulations and NK cell function in recipients of blood transfusion // Vox Sang. – 1998. – Vol.74, N 1. – P.15-20.
6. J. Zimring, Gregory A. Hair, Seema S. Deshpande, and John T. Horan Immunization to minor histocompatibility antigens on transfused RBCs through crosspriming into recipient MHC class I pathways // Blood. – 2005. – Vol. 105, N 10. – P. 4106-4114.
7. R. Brutkiewicz, S. Venkataraman. Natural killer (NKT) cells and their role in antitumor immunity // Clin. Rev. in Oncol./Hematol. – 2002. – Vol. 41. – P.287-298.
8. S. Yang, J. Lee. Role of NKT cells in allogenic islet graft survival // Clin. immunol. – 2007. – Vol. 124. – P. 258-266.
9. Jakóbsiak M, Lasek W, Gołab J. Natural mechanisms protecting against cancer // Immunol. Lett. – 2003. – Vol. 15, N 9. – P. 103-122.
10. M. Nikolova, J.-D. Lelievre, M. Carriere, A. Bensussan, Y. Lévy. Treg modulate CD8 subsets through pd-1/pdl1 pathway // Blood. – 2009. – Vol. 113, N 19. – P. 4556-4565.
11. M. Terabe, J. Berzofsky. NKT cells in immunomodulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis. // Trends in Immunol. – 2007. – Vol. 28, N 11. – P. 491-496.