

Федоровская Н.С., Петров С.В., Железнов Л.М.

Содержание В- и Т-клеток в селезенке пациентов с иммунной тромбоцитопенией

ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Киров.
ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Казань

Fedorovskaya N.S., Petrov S.V., Zheleznov L.M.

Content of B- and T-cells in the spleen of patients with immune thrombocytopenia

Резюме

Цель исследования: Определить содержание В- и Т-клеток в селезенке при различных формах иммунной тромбоцитопении (ИТП). Материал и методы. С помощью гистологических, иммуногистохимических и морфометрических методов изучали В- и Т-клетки в селезенке 50 больных ИТП. Медиана возраста - 38,0 (22,7; 52,0) лет. Результаты. В гистологическом материале селезенки, при ИГХ окрашивании и морфометрии, получены относительные численные значения (%) популяций В- и Т-клеток в функциональных зонах органа у больных ИТП с различным ответом на спленэктомию. Пересчет морфометрических показателей в абсолютные значения (г) с учетом массы селезенки проводился по специальным авторским формулам. Оценка содержания В- и Т-клеток в селезенке позволила определить факторы прогноза течения ИТП после спленэктомии. Определяющими неблагоприятный прогноз признаками содержания клеточных субпопуляций в селезенке явились: снижение массы CD4+ лимфоцитов ниже 20,5 г; увеличение массы CD8+ лимфоидных клеток более 9,75 г. Полученные результаты уточняют механизмы возникновения рефрактерных к спленэктомии форм ИТП.

Ключевые слова: селезенка человека, В-клетки, Т-клетки, иммунная тромбоцитопения

Summary

To determine the content of B-and T-cells in the spleen of patients with various forms of immune thrombocytopenia (ITP). Materials and methods. Using histological, immunohistochemical and morphometric methods, B and T cells were studied in the spleens of 50 ITP patients. The median age was 38.0 (22.7; 52.0) years. Results. In the histological materials of the spleens, with IHC staining and morphometry the relative numerical values (%) of the population of B and T cells were obtained in functional areas of the organ in patients with ITP who had different responses to splenectomy. Recalculation of morphometric parameters in absolute values (g) taking into account the mass of the spleen, was carried out according to special author's formulas. Evaluation of the content of B- and T-cells in the spleens allowed to determine the predictive factors for the course of development of ITP after splenectomy. The negative signs of the content of cellular subpopulations in the spleen were the following: a decrease in the mass of CD4+ lymphocytes below 20.5 g; the increase in the mass of CD8+ lymphoid cells were more than 9.75 g. The obtained results clarify the mechanisms for the emergence of ITP forms that are refractory to splenectomy.

Key words: human spleen, B cells, T cells, immune thrombocytopenia

Введение

Первичная иммунная тромбоцитопения (ИТП) относится к группе аутоиммунных гематологических заболеваний и характеризуется снижением содержания кровяных пластинок в периферической крови (ниже $100 \times 10^9/\text{л}$), возникающим и/или сохраняющимся без каких-либо явных причин [1, 2].

Спленэктомия при ИТП дает самый высокий уровень долгосрочного ответа (50-70% случаев) по сравнению с другими методами лечения. Однако рецидивы на-

ступают в 23% случаев, причем, у 80% пациентов из них в течение 48 месяцев после операции [3, 4, 5, 6]. До сих пор нет четкого представления о причинах, приводящих к рефрактерному течению болезни. Необходимость характеристики иммуноморфологической структуры селезенки при ИТП очевидна для уточнения механизмов возникновения резистентных к терапии форм данной патологии.

Цель исследования: Определить содержание В- и Т-лимфоидных популяций в селезенке при различных формах иммунной тромбоцитопении.

Материалы и методы

Исследование выполнено на гистологических образцах селезенки больных ИТП ($n = 50$). Медиана возраста пациентов на момент постановки диагноза - 38,0 (22,7; 52,0) лет. Большую часть больных составили лица женского пола - 32 (64%), мужчин было 18 (36%). Для определения эффективности спленэктомии больные ИТП подразделены на группы: в группу 1 вошли пациенты, у которых после спленэктомии установилась ремиссия ($n=32$); в группу 2 были включены лица с рефрактерным течением заболевания после удаления селезенки ($n=18$).

Сравнительный анализ проводили с препаратами селезенки (архивный материал), взятых от 20 лиц, скончавшихся скоропостижно и не имевших в анамнезе заболеваний системы крови. Медиана возраста составила 39 (36,3; 50,5) лет. Мужчин было 12 (60,0%), женщин - 8 (40,0%).

Гистологические исследования послеоперационных селезенок выполнялись на срезах с парафиновых блоков (окраска гематоксилином и эозином); иммуногистохимические окрашивания - с антителами (CD20; CD3; CD4; CD8) и системой визуализации En VISION, PEROXIDASE (DAB) "Dako" в рабочих разведениях. Морфометрические методы - оценка результатов осуществлялась с помощью светового микроскопа "Leica" (Германия) со встроенной фото-видеокамерой и программного обеспечения анализа изображений ImageScore Color, версии M (в 20 полях зрения, об. х 100, ок. х 10).

В исследуемом гистологическом материале селезенок, при ИГХ окрашивании и морфометрии, получали относительные численные значения (%) площадей функциональных зон, а также популяций В- и Т-клеток. Далее по специальным авторским формулам вычислялись величины в абсолютных значениях (г) с учетом массы селезенки (согласно патентам на изобретение: № 2599021 от 08 сентября 2016 и №2563284 от 21.08.2015).

Статистический анализ выполнялся при помощи компьютерной программы «STATISTICA Advanced 10 for Windows Ru». Для выявления достоверности различий между показателями в сравниваемых группах использовали непараметрические двусторонние критерии Краскела-Уоллеса, Манна-Уитни с учетом поправки Бонферони при множественных сравнениях. Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$. Результаты исследований представлены с указанием медианы, а также нижнего (25%) и верхнего (75%) квартиля.

Результаты и обсуждение

Исследования клеточного состава селезенки больных ИТП, были выполнены с целью оценки процессов, происходящих в данном органе при разных формах заболевания. При изучении В-лимфоидной популяции в селезенке у больных ИТП было установлено, что CD20-экспрессирующие клетки располагались преимущественно в В-клеточных зонах белой пульпы (БП) - маргинальной зоне (МЗ) и лимфоидных узелках (ЛУ). В красной пульпе (КП) данные клеточные элементы локализовались дискретно и в небольших периваскулярных скопле-

ниях (рисунок 1 — этот и другие рисунки к статье см. на специальной цветной вставке журнала — прим. ред.).

В результате морфометрического подсчета В-лимфоцитов (CD20+) на гистологических срезах селезенки у больных ИТП было установлено, что для всех пациентов характерно увеличение относительного и абсолютного количества В-лимфоидных элементов по отношению к группе сравнения (таблица 1). При этом изменения были выявлены как в БП, так и в КП органа ($p < 0,05$).

При морфометрическом исследовании различий содержания в селезенке CD20+-экспрессирующих В-клеток у лиц с рефрактерным течением ИТП после спленэктомии и больных, положительно ответивших на удаление данного органа, выявлено не было ($p > 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют об участии В-лимфоцитов в патогенезе заболевания при всех формах ИТП, вне зависимости от ответа на спленэктомиию.

При морфологическом изучении особенностей распределения Т-лимфоидных элементов в селезенке было установлено, что общая популяция CD3+-Т-клеток определялась как в периартериальных лимфоидных муфтах (ПАЛМ), так и в МЗ, в меньшем количестве в ЛУ. В КП органа CD3-экспрессирующие клетки располагались диффузно в умеренном количестве (рисунок 2). По содержанию CD3+-Т-элементов (в относительных и абсолютных значениях) выявлено увеличение их количества у всех больных ИТП по отношению к группе сравнения вне зависимости от ответа на спленэктомиию, $p < 0,05$ (Таблица 2). При этом статистически значимое повышение уровня данной клеточной популяции было установлено как в БП, так и в КП селезенки.

Дальнейшее исследование было направлено на анализ Т-клеточных субпопуляций. Так, при морфометрическом изучении относительного и абсолютного содержания CD4+-лимфоидных элементов установлено увеличение их количества у всех больных ИТП по отношению к группе сравнения вне зависимости от ответа на спленэктомиию, $p < 0,05$ (Таблица 3). При этом, статистически значимое повышение уровня данной клеточной субпопуляции было выявлено как в БП, так и в КП селезенки (рисунок 3). Вместе с тем, существенное увеличение содержания в абсолютных значениях CD4+-Т-клеток определялось в БП у больных, ответивших на хирургическое лечение, по сравнению с пациентами с рефрактерным течением заболевания, $p < 0,05$.

В результате полученных морфометрических характеристик абсолютного содержания CD4+-Т-лимфоцитов нами обоснован способ прогнозирования течения ИТП после спленэктомии, характеризующийся тем, что при значении массы данной субпопуляции клеток в селезенке $\leq 20,5$ г определялась чаще всего рефрактерная форма заболевания («Способ прогнозирования течения иммунной тромбоцитопении после спленэктомии по массе CD4+-Т-лимфоцитов селезенки», патент на изобретение № 2599021 от 08 сентября 2016). Причем более низкие показатели CD4+-Т-клеток наблюдались в БП, в то время как в КП увеличенные значения таковых были у всех

Таблица 1. Содержание CD20+ - В-лимфоцитов в селезенке больных ИТП
в зависимости от ответа на спленэктомию

	Ед.	Селезенка	БП	КП
Группа сравнения, n=20	%	8,8(7,0;10,9)	47,1 (34,3; 55,9)	5,0 (2,9; 8,4)
	г	11,2(7,5;16,2)	6,0 (4,7; 7,2)	4,5 (2,8; 7,8)
Все пациенты, n=50	%	23,7(16,0;27,6) *	73,4(63,0;79,0) *	13,5(9,8;17,6) *
	г	32,8(19,9;49,9) *	17,0(10,4;27,1) *	16,7(10,0;21,4) *
Ремиссия после спленэктомии (1 группа), n=32	%	26,2(15,8;28,0) *	75,7(63,0;79,8) *	15,9(9,0;18,3) *
	г	31,8(19,5;52,1) *	16,1(9,7;22,6) *	16,7(10,2;29,5) *
Рефрактерное течение (2 группа), n=18	%	17,5(14,9;22,18) *	75,3(71,7;78,8) *	11,4(9,4;14,4) *
	г	31,3(18,8;49,5) *	14,1(10,8;29,7) *	16,9(6,7;21,3) *

Примечание: достоверность различий:

* - по отношению к группе сравнения в относительных значениях, $p < 0,05$;

– по отношению к группе сравнения в абсолютных значениях, $p < 0,05$.

Таблица 2. Содержание CD3+-Т-лимфоцитов в селезенке больных ИТП
в зависимости от ответа на спленэктомию

	Ед.	Селезенка	БП	КП
Группа сравнения, n=20	%	4,8(1,1;5,8)	13,2(9,3; 20,4)	5,2(4,4; 7,4)
	г	8,3(5,4;11,0)	2,0(1,5;4,3)	5,2(3,5; 7,3)
Все пациенты, n=50	%	17,6(14,4;21,7) *	29,5(18,9;37,7) *	18,1(15,0;23,9) *
	г	27,4(22,7;32,9) *	4,9(3,7;7,7) *	19,1(16,0;26,8) *
Ремиссия после спленэктомии (1 группа), n=32	%	18,2(11,6;25,1) *	28,1(13,1;38,9) *	16,8(11,8;23,2) *
	г	26,2(17,6;31,7) *	5,1(3,0;9,2) *	16,9(12,8;21,7) *
Рефрактерное течение (2 группа), n=18	%	20,0(15,4;21,6) *	31,4(23,9;35,4) *	19,1(17,0;24,0) *
	г	29,4(24,3;39,0) *	4,9(4,4;5,9) *	24,0(18,4;33,8) *

Примечание: достоверность различий

* – по отношению к группе сравнения в относительных значениях, $p < 0,05$;

– по отношению к группе сравнения в абсолютных значениях, $p < 0,05$.

пациентов с ИТП, независимо от ответа на спленэктомию (таблица 3).

При исследовании субпопуляции CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов в селезенке больных ИТП было отмечено, что они располагались как в БП, так и в КП (Рисунок 4). В результате морфометрического анализа данной субпопуляции установлено достоверное увеличение их количества в относительных и абсолютных величинах у всех больных ИТП по отношению к группе сравнения ($p < 0,05$), преимущественно за счет повышенного их содержания в КП (таблица 4).

Как в первой, так и во второй группе установлено статистически значимое увеличение уровня CD8+-Т-лимфоцитов в относительных и абсолютных значениях

в селезенке у больных ИТП в зависимости от ответа на спленэктомию по отношению к группе сравнения, $p < 0,05$. При этом большее количество данной клеточной субпопуляции по абсолютному содержанию было выявлено в КП органа. Кроме того, существенные различия в содержании CD8+-Т-клеток в КП наблюдались у пациентов с рефрактерным течением заболевания по отношению к обследованным, ответившим на спленэктомию, $p < 0,05$.

Выявленные изменения позволили обосновать способ прогнозирования рефрактерного течения заболевания по содержанию CD8 – положительных цитотоксических лимфоцитов в селезенке больных ИТП. Масса данных клеток, превышающая 9,75 г, свидетель-

Таблица 3. Содержание CD4+ - Т-лимфоцитов в селезенке больных ИТП в зависимости от ответа на спленэктомию

	Ед.	Селезенка	БП	КП
Группа сравнения, n=20	%	5,5(4,2;7,4)	12,5 (9,1; 16,6)	4,6 (4,0; 6,8)
	г	6,7(4,8;9,4)	1,6 (1,2; 2,8)	4,9 (3,2; 6,2)
Все пациенты, n=50	%	11,1(8,8;14,6)*	25,4(19,7;34,0)*	10,1(7,1;11,5)*
	г	16,9(12,3;21,9) [†]	4,8(3,7;9,4)*	11,93(7,0;14,2) [†]
Ремиссия после спленэктомии (1 группа), n=32	%	12,6(9,8;16,4)*	26,0(13,7;35,1)*	10,4(7,2;13,3)*
	г	20,4(14,3;26,0) [†]	9,9(5,8;13,6) [†]	11,5(7,0;14,3) [†]
Рефрактерное течение (2 группа), n=18	%	10,4(7,9;12,7)*	23,5(20,0;30,9)*	9,6(7,1;10,6)*
	г	16,0(11,2;18,2) [†]	4,1(3,8;5,0) [†]	11,5(9,0;12,7) [†]

Примечание: достоверность различий

* – по отношению к группе сравнения в относительных значениях, $p < 0,05$;

– по отношению к группе сравнения в абсолютных значениях, $p < 0,05$;

^ – между 1 и 2 группами в абсолютных значениях, $p < 0,05$.

Таблица 4. Содержание CD8+-Т-лимфоцитов в селезенке больных ИТП в зависимости от ответа на спленэктомию

	Ед.	Селезенка	БП	КП
Группа сравнения, n=20	%	0,5(0,3;0,9)	0 (0; 0,6)	0,4 (0,3; 0,7)
	г	0,6(0,4;1,1)	0 (0; 0,7)	0,4 (0,3; 0,6)
Все пациенты, n=50	%	5,1(2,8;6,1)*	3,6(2,4;5,9)*	6,1(3,7;7,1)*
	г	7,7(4,2;12,0)*	0,8(0,5;1,1)	5,6(3,8;10,2) [†]
Ремиссия после спленэктомии (1 подгруппа), n=32	%	3,7(2,0;5,3)*	2,7(2,0;4,5)*	4,7(2,2;6,4)*
	г	5,1(2,5;10,3) [†]	0,7(0,4;0,9)	5,0(2,3;7,0) [†]
Рефрактерное течение (2 подгруппа), n=18	%	6,2(5,2;7,9)*	5,6(3,4;7,4)*	7,1(6,1;9,5)*
	г	11,3(6,9;15,6) [†]	1,1(0,7;1,5)	10,1(8,6;15,9) [†]

Примечание: достоверность различий:

* – по отношению к группе сравнения в относительных значениях, $p < 0,05$;

– по отношению к группе сравнения в абсолютных значениях, $p < 0,05$;

^ – между 1 и 2 подгруппами в абсолютных значениях, $p < 0,05$.

ствовала о неблагоприятном прогнозе болезни после спленэктомии («Способ прогнозирования течения иммунной тромбоцитопении после спленэктомии по массе CD8+-Т-лимфоцитов селезенки», патент на изобретение №2563284 от 21.08.2015 г).

Заключение

Изложенные выше сведения позволяют заключить, что изменения содержания клеточного состава в селезенке больных ИТП характеризуются увеличением относительного и

абсолютного количества В- и Т- лимфоцитов в БП и КП, что подтверждает участие данных клеточных популяций в патогенезе заболевания. Полученные нами данные согласуются и дополняют исследования A.Solanilla et al. (2005), в которых установлено, что CD154 (ассоциированный с тромбоцитами) способствует активации аутореактивных В-лимфоцитов при ИТП. Взаимодействие между активированными тромбоцитами и В-лимфоцитами происходит в селезенке, которая считается основным местом для продукции антитромбоцитарных антител при данной патологии [7].

Выявленное, независимо от ответа на спленэктомию, увеличение количества Т-клеток в селезенке, существенно уточняет известные данные, полученные у различных категорий больных ИТП [2; 8; 9; 10]. Повышенные содержания в БП и КП лимфоидных элементов, экспрессирующих CD4+, а также CD8+-Т-лимфоцитов в КП свидетельствует о многофакторности возникновения аутоиммунных расстройств при ИТП. Установленные нами результаты дополняют исследования S. Audia (2014), в которых было показано, что фолликулярные Т-хелперы, расположенные в повышенном количестве в ГЦ лимфоидных узелков селезенки больных ИТП, являются основными CD4+-клетками, которые стимулируют выработку антител антигенспецифическими В-лимфоцитами [11].

Выявленные нами более низкие значения CD4+-Т-клеток в БП, соответствующие рефрактерному течению заболевания, могут свидетельствовать об участии в патогенезе данных форм заболевания других субпопуляций Т-клеток, влияющих на ответ после спленэктомии. Снижение субпопуляций Т-клеток в ЛУ при ИТП было отмечено С. Daridon и соавт. (2012), причем как фолликулярных Т-хелперов, так и Т-регуляторных клеток, чем авторы объясняют дефект Т-клеточного контроля. Кроме того, в ЛУ с отсутствующими ГЦ при ИТП, в IgM (содержащим иммунные комплексы, плотно связанные с фолликулярными дендритными клетками и приближенные к

пролиферирующим В-лимфоцитам) авторами были обнаружены аутоантигены гликопротеина тромбоцитов (GP) IIb / IIIa, а также GPIV [12].

Полученные данные указывают на перераспределение Т-лимфоцитов в КП, что свидетельствует о наличии прямого цитотоксического эффекта Т-клеток (CD3+, CD8+) у пациентов с резистентной к спленэктомии формой ИТП. Значительное увеличение содержания цитотоксических CD8+-Т-лимфоцитов в КП позволяет сделать вывод о том, что у рефрактерных больных в разрушении тромбоцитов в данной зоне наряду с макрофагами участвуют и лимфоциты. ■

Федоровская Надежда Станиславовна, к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии, ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Киров. **Петров Семен Венедиктович**, д.м.н., профессор кафедры общей патологии, ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Казань. **Лев Михайлович Железнов**, д.м.н., профессор, кафедра нормальной анатомии, ректор ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Киров. Автор, ответственный за переписку — Федоровская Надежда Станиславовна, e-mail: fednadst@mail.ru.

Литература:

1. Меликян А.Л., Пустовая Е.И., Цветаева Н.В. и соавт. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (первичной иммунной тромбоцитопении) у взрослых (редакция 2016). *Гематология и трансфузиология* 2017; 62(1): 3–24 (Приложение 1).
2. Lambert M.P., Gernsheimer T.B. *Clinical updates in adult immune thrombocytopenia*. *Blood* 2017; 129(21): 2829-35.
3. Chaturvedi S., Arnold D.M., McCrae K.R. *Splenectomy for immune thrombocytopenia: down but not out*. *Blood* 2018; 131(11): 1172-82.
4. Ghanima W., Godeau B., Cines D.B., Bussel J.B. *How I treat immune thrombocytopenia: the choice between splenectomy or a medical therapy as a second-line treatment*. *Blood* 2012; 120(5): 960-9.
5. Guan Y., Wang S., Xue F. et al. *Long-term results of splenectomy in adult chronic immune thrombocytopenia*. *European Journal of Haematology* 2017; 98(3): 235-41.
6. Kojouri K., Vesely S.K., Terrell D.R., George J.N. *Splenectomy for adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review to assess long-term platelet count responses, prediction of response, and surgical complications*. *Blood* 2004; 104(9): 2623-34.
7. Solanilla A., Pasquet J.M., Viillard J.F. et al. *Platelet-associated CD154 in immune thrombocytopenic purpura*. *Blood* 2005; 105(1): 215 - 8.
8. Leo C.A., Pravisani R., Bidinost S. et al. *Postsplenectomy recurrence of idiopathic thrombocytopenic purpura: role of laparoscopic splenectomy in the treatment of accessory spleen*. *Giornale di Chirurgia* 2015; 36(4): 153-7.
9. Olsson B., Ridell B., Carlsson L., Jacobsson S., Wadenvic H. *Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1*. *Blood* 2008; 112(11): 1078-84.
10. Toltl L.J., Nazi I., Jafari R., Arnold D.M. *Piecing together the humoral and cellular mechanisms immune thrombocytopenia*. *Seminars In Thrombosis And Hemostasis* 2011; 37(6): 631-9.
11. Audia S., Rossato M., Santegoets K. et al. *Splenic TFH expansion participates in B-cell differentiation and antiplatelet-antibody production during immune thrombocytopenia*. *Blood* 2014; 124(18): 2858-66.
12. Daridon C., Loddenkemper C., Spieckermann S. et al. *Splenic proliferative lymphoid nodules distinct from germinal centers are sites of autoantigen stimulation in immune thrombocytopenia*. *Blood* 2012; 120(25): 5021-31.

Содержание В- и Т-клеток в селезенке пациентов с иммунной тромбоцитопенией

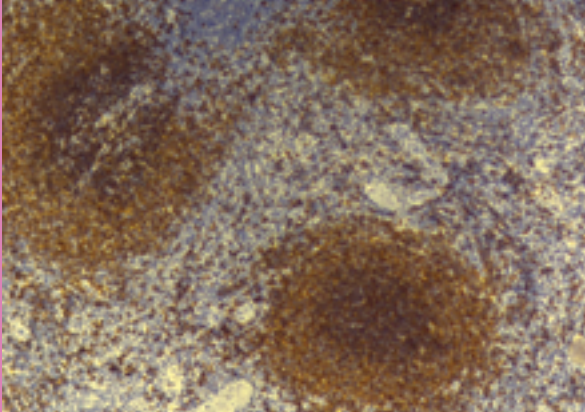


Рисунок 1. В-клеточные зоны. Белая пульпа увеличена за счет маргинальной зоны. Красная пульпа – клеточная, отмечаются периваскулярные скопления В-клеток в виде «муфт». Окраска CD20, clone L26, «Dako», ИПМ. Ок. x 10, об. x 10

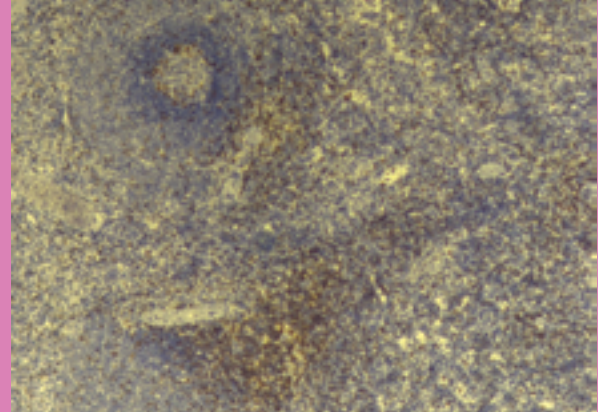


Рисунок 2. Т-лимфоциты, окраска CD3, определяются в периартериальных лимфоидных муфтах, в герминативных центрах и красной пульпе. Окраска CD3, clone PS1, «Dako», ИПМ. Ок. x 10, об. x 10



Рисунок 3. CD4+Т-хелперы определяются в периартериальных лимфоидных муфтах и красной пульпе. Окраска CD4+, clone 4B12 «BioGenex» (США), ИПМ. Ок. x 10, об. x 10

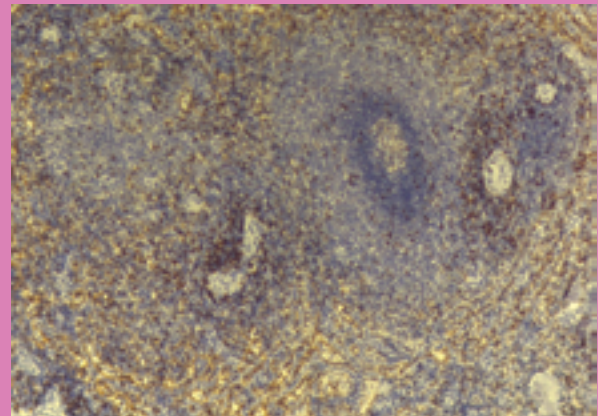


Рисунок 4. Цитотоксические Т-лимфоциты, окраска CD8, определяются в периартериальных лимфоидных муфтах и красной пульпе. Окраска CD8, clone C8/144В, «Dako», ИПМ. Ок. x 10, об. x 10