

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.155.294-092:612.017.11-078.33

Бутина Е.В., Зайцева Г.А., Исаева Н.В.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ IgG, СВЯЗАННОГО С ТРОМБОЦИТАМИ, У ПАЦИЕНТОВ С ТРОМБОЦИТОПЕНИЕЙ

ФГБУН "Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России",
610027, Киров, Россия

Представлен способ определения антитромбоцитарных аутоантител методом проточной цитометрии. Установлены значения IgG, связанного с тромбоцитами, у здоровых людей. Изучена частота встречаемости аутоантител к тромбоцитам у пациентов с впервые диагностированной иммунной тромбоцитопенией (ИТП), с рецидивом заболевания и после терапии ИТП. Проведенные исследования демонстрируют, что метод проточной цитометрии обладает высокой чувствительностью для определения тромбоцитсвязанных антител и может использоваться при обследовании пациентов с тромбоцитопенией.

Ключевые слова: иммунная тромбоцитопения; ИТП; антитромбоцитарные аутоантитела; тромбоцитсвязанный IgG; проточная цитометрия.

E.V. Butina, G.A. Zaitseva, N.V. Isaeva

THE DETECTION OF THROMBOCYTE-BOUND IGG IN PATIENTS WITH THROMBOCYTOPENIA

The Kirov research institute of hematology and blood transfusion of the Federal medical biological agency of Russia, 610027
Kirov, Russia

The article presents the mode of detection of anti-thrombocyte auto-antibodies using flow cytometry technique. The values of IgG conjugated with thrombocytes are established in healthy persons. The rate of frequency of auto-antibodies to thrombocytes is analyzed in patients with primarily diagnosed immune thrombocytopenia, with relapse of disease and after therapy of immune thrombocytopenia. The carried out studies demonstrate that flow cytometry technique has a high sensitivity to detect thrombocyte-related antibodies and can be applied under examination of patients with thrombocytopenia.

Key words: immune thrombocytopenia; anti-thrombocyte auto-antibodies; thrombocyte-bound IgG; flow cytometry.

Иммунная тромбоцитопения (ИТП) является самостоятельным заболеванием, характеризующимся изолированным снижением числа тромбоцитов в периферической крови [1]. В соответствии с рекомендациями Российского совета экспертов критерии диагностики ИТП разделены на три категории: основные, потенциально информативные и тесты с недоказанной или неопределенной информативностью [2]. Диагноз первичной ИТП устанавливается при числе тромбоцитов менее $100 \cdot 10^9/\text{л}$ у пациентов, не имеющих патологий, способных стать причиной тромбоцитопении. Диагностика базируется на данных анамнеза, физикального обследования, результатах общего анализа крови и исследования мазка периферической крови [3]. Определение IgG, связанного с тромбоцитами, отнесено в группу диагностических тестов, степень информативности которых при постановке диагноза ИТП не доказана [4]. Тем не менее тромбоцитассоциированные антитела исследуют при дифференцировании иммунных и неиммунных причин тромбоцитопении и при контроле эффективности иммуносупрессивной терапии ИТП [5, 6]. В настоящее время оценку уровня иммуноглобулинов на поверхности тромбоцитов можно провести, используя метод проточной цитометрии [7, 8].

Цель работы — определение частоты встречаемости антитромбоцитарных аутоантител у пациентов с тромбоцитопенией неясной этиологии, сравнение полученных данных с результатами обследования здоровых людей, изучение возможности использования проточной цитометрии при диагностике и контроле эффективности лечения ИТП.

Материалы и методы. IgG, ассоциированный с тромбоцитами, исследован у 224 пациентов: у 67 больных с диагнозом ИТП, находившихся на стационарном лечении в клинике

института, и у 157 пациентов (в том числе у 54 беременных), обратившихся в консультативную поликлинику по поводу тромбоцитопении неясного генеза. Число тромбоцитов в периферической крови у данных пациентов было менее $150 \cdot 10^9/\text{л}$. Возраст варьировал от 5 мес до 83 лет. Медиана возраста стационарных больных составила 23 года, поликлинических — 55 лет, беременных — 29 лет. Показатели уровня антитромбоцитарных антител (IgG) в норме были определены в результате анализа крови 136 здоровых (доноров крови и/или ее компонентов).

Для окрашивания клеток использовали моноклональные антитела, меченные флуорохромами (Beckman Coulter, США): Mouse Anti-Human IgG-FITC, CD41—FITC. Для пробоподготовки применяли фосфатно-солевой буфер (ФСБ), фосфатно-солевой буфер + бычий сывороточный альбумин (ФСБ + БСА), раствор фиколл-урографина. Анализ осуществляли на проточном цитофлуориметре EPICS XL (Beckman Coulter, США).

Исследование тромбоцитассоциированных IgG включало следующие этапы: выделение тромбоцитов из периферической крови (1), инкубацию тромбоцитов с аутосывороткой пациента (2), окрашивание моноклональными антителами (3), лазерную проточную цитометрию (4), анализ и интерпретацию полученных данных (5).

1. Образцы крови брали из периферической вены пациентов в две пробирки — содержащую и не содержащую антикоагулянт EDTA. 3 мл исследуемой крови, взятой с антикоагулянтом, смешивали с 3 мл раствора Хенкса и наслаивали ее на эквивалентный объем раствора фиколл-урографина в пластиковой пробирке с коническим дном. Пробирку центрифугировали в течение 15 мин при 1200g. Клетки из интерфазного кольца собирали, переносили в пластиковую пробирку и добавляли 4 мл раствора Хенкса. Центрифугировали в течение 5 мин при 700g. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в растворе Хенкса, доводя концентрацию тромбоцитов до $4\text{--}6 \cdot 10^5/\text{мл}$.

Для корреспонденции:

Бутина Елена Владимировна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр.

Адрес: 610027, Киров, ул. Красноармейская, 72

E-mail: butinalena@rambler.ru

Таблица 1

Частота обнаружения антитромбоцитарных аутоантител у стационарных больных с диагнозом ИТП

Причина госпитализации	Категория больных	Число больных	Частота обнаружения аутоантител		p
			при поступлении	после лечения	
Впервые выявленная ИТП	Взрослые	13	12 (92,3)	2 (15,4)	< 0,01
	Дети	19	13 (68,4)	2 (10,6)	< 0,01
Рецидив ИТП	Взрослые	12	12 (100)	2 (16,7)	< 0,05
	Дети	23	22 (95,7)	3 (13,0)	< 0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2 в скобках — %.

2. Пробирки для проточной цитофлуориметрии маркировали в расчете на 3 пробы (А, В, С) для каждого пациента. Полученную суспензию тромбоцитов вносили по 100 мкл в каждую пробирку. В пробу С добавляли 100 мкл аутосыворотки пациента (из вакуумной пробирки без EDTA). Затем инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Далее во все пробы добавляли по 2 мл буфера ФСБ+БСА. Центрифугировали 5 мин при 3000g. Надосадочную жидкость удаляли. Данную процедуру отмывания тромбоцитов повторяли 2 раза. Осадок клеток ресуспендировали в 100 мкл ФСБ.

3. В пробирку пробы А вносили 10 мкл моноклональных антител CD41—FITC. В пробирки проб В и С вносили по 100 мкл моноклональных антител Mouse Anti-Human IgG-FITC, предварительно разведенных в ФСБ в соотношении 1:10. Пробу инкубировали в темноте 20 мин. Затем в каждую пробу добавляли по 2 мл буфера ФСБ + БСА, центрифугировали 5 мин при 3000g и удаляли супернатант. Последнюю процедуру повторяли.

4. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре, оснащенном двумя флуоресцентными каналами и лазером (длина волны 488 нм). Анализ клеток в образце проводили по трем параметрам: интенсивности прямого и бокового (бидиректного) светорассеяния (линейная шкала), флуоресценции FITC. При анализе пробы А на графике выбирали регион неповрежденных тромбоцитов и определяли количество клеток, окрашенных моноклональными антителами к CD41. Далее анализировали тот же регион, но в пробах В и С, оценивая количество клеток, окрашенных моноклональными антителами Anti-Human IgG. В каждом образце анализировали не менее $2 \cdot 10^5$ тромбоцитов.

5. Процентное отношение числа клеток, окрашенных Anti-Human IgG, к числу CD41-положительных клеток являлось показателем адсорбции иммуноглобулинов класса G на поверхности тромбоцитов (тромбоцитассоциированный IgG). При этом анализ пробы, проведенной без инкубации с аутосывороткой, характеризовал фиксированные на тромбоцитах антитела. Исследование пробы после инкубации с аутосывороткой позволяло сделать заключение о наличии в сыровотке крови пациента циркулирующих иммуноглобулинов, способных адсорбироваться на тромбоцитах.

Ложноположительные и ложноотрицательные результаты реакции исключали посредством включения в исследование положительных и отрицательных контролей. В качестве отрицательного контроля использовали тромбоциты здоровых людей (доноров компонентов крови), инкубированные с аутосывороткой. В качестве положительного контроля применяли тромбоциты доноров, инкубированные с сыровоткой крови аллоиммунизированных пациентов, содержащей анти-HLA-аллоантитела, направленные к 100% образцов тромбоцитов.

Продолжительность анализа составила 2—2,5 ч.

Результаты и обсуждение. Для определения значения тромбоцитассоциированного IgG в норме были исследованы образцы крови 136 здоровых — доноров крови и(или) ее

Таблица 2

Частота выявления антитромбоцитарных аутоантител у пациентов с тромбоцитопенией, наблюдавшихся в поликлинике

Категория обследованных	Частота выявления антитромбоцитарных аутоантител				p
	при количестве тромбоцитов 100—150 · 10 ⁹ /л		при количестве тромбоцитов < 100 · 10 ⁹ /л		
	всего	с антителами	всего	с антителами	
Общая группа	43	16 (37,2)	60	44 (73,3)	< 0,01
Беременные женщины	41	14 (34,4)	13	3 (23,1)	< 0,05

компонентов. Содержание тромбоцитов с фиксированным IgG не превышало 1% у 95,6% (n = 130) доноров. У 94,1% (n = 128) обследованных доноров содержание тромбоцитов, адсорбирующихся на себе IgG антитела после инкубации с аутосывороткой, находилось в пределах 3%. Показатели выше данных значений расценивались как наличие у пациента аутоенсибилизации к тромбоцитам.

При обследовании 32 стационарных больных с тяжелым течением впервые диагностированной ИТП установлено наличие аутоантител (IgG) на тромбоцитах 92,3% взрослых пациентов и 68,4% детей (табл. 1). После проведения первого курса лечения тромбоцитсвязанный IgG обнаруживался у 15,4% взрослых и 10,6% детей. Различия в выявлении аутоантител у больных до и после терапии достоверны; p < 0,01.

Во время госпитализации по поводу рецидива заболевания обследованы 35 пациентов с персистирующей и хронической формой ИТП (см. табл. 1). Тромбоцитсвязанные IgG антитела выявлены у 100% взрослых и 93,8% детей. При выписке из стационара аутоантитела были определены у 16,7 и 13,0% пациентов соответственно (p < 0,05).

Проанализированы результаты исследования тромбоцитсвязанных IgG антител у 103 пациентов, обратившихся в консультативную поликлинику по поводу тромбоцитопении неясного генеза (табл. 2, общая группа). Аутоантитела выявлены у 56,3% обследованных. При количестве тромбоцитов в периферической крови менее 100 · 10⁹/л аутоенсибилизация диагностирована у 73,3% пациентов. При содержании тромбоцитов более 100 · 10⁹/л антитела к тромбоцитам найдены у 37,2% больных. Различия в частоте выявления тромбоцитсвязанных IgG-антител в зависимости от количества тромбоцитов достоверны, p < 0,01.

Изучены результаты определения антитромбоцитарных аутоантител у 54 беременных в возрасте от 18 до 39 лет, состоявших на поликлиническом учете по поводу тромбоцитопении (см. табл. 2). Тромбоцитсвязанные антитела выявлены у 31,5% пациенток. При количестве тромбоцитов в периферической крови менее 100 · 10⁹/л антитела определялись у 23,1% обследованных, при числе тромбоцитов более 100 · 10⁹/л — у 34,5% беременных (p > 0,05).

Таким образом, проведенные исследования показали высокую чувствительность метода проточной цитометрии при выявлении антитромбоцитарных аутоантител. Результаты определения тромбоцитсвязанного IgG могут быть использованы в комплексной диагностике этиологических факторов тромбоцитопении и контроле эффективности терапии ИТП наряду с другими диагностическими тестами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rodeghiero F., Stasi R., Gernsheimer T., Michel M., Provan D., Arnold D.M. et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood*. 2009; 113 (11): 2386—93.

2. Масчан А.А., Румянцев А.Г., Ковалева Л.Г., Афанасьев Б.В., Поспелова Т.И., Зарицкий А.Ю. и др. Рекомендации Российского Совета экспертов по диагностике и лечению больных первичной иммунной тромбоцитопенией. *Онкогематология*. 2010; 3: 36—45.
3. Neunert C., Lim W., Crowther M., Cohen A., Solberg L., Crowther M.A., Jr. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood*. 2011; 117: 4190—207.
4. Масчан А.А., Румянцев А.Г. Стимуляция продукции тромбоцитов: новый подход к лечению хронической иммунной тромбоцитопенической пурпуры. *Онкогематология*. 2009; 1: 51—6.
5. Huh H.J., Park C.J., Kim S.W., Han S.H., Jang S., Chi H.S. Flow cytometric detection of platelet-associated immunoglobulin in patients with immune thrombocytopenic purpura and nonimmune thrombocytopenia. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2009; 39 (3): 283—8.
6. Nguyen X.D., Dugrillon A., Beck C., Kerowgan M., Klüter H. A novel method for simultaneous analysis of specific platelet antibodies: SASPA. *Br. J. Haematol.* 2004; 127 (5): 552—60.
7. Бутина Е.В., Зайцева Г.А., Исаева Н.В., Васкина Е.А., Докшина И.А. Способ определения аутоантител к тромбоцитам. Пат. № 2488114, РФ. Опубл. 20.07.2013; Бюл. № 20.
8. Hezard N., Simon G., Mace C., Jallu V., Kaplan C., Nguyen P. Is flow cytometry accurate enough to screen platelet autoantibodies? *Transfusion*. 2008; 48: 513—8.

REFERENCES

1. Rodeghiero F., Stasi R., Gernsheimer T., Michel M., Provan D., Arnold D.M. et al. Standardization of terminology, definitions and

outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood*. 2009; 113 (11): 2386—93.

2. Maschan A.A., Rumyantsev A.G., Kovaleva L.G., Afanas'ev B.V., Pospelova T.I., Zaritskiy A.Yu. et al. Guidelines of Russian expert council on diagnostic and therapy of patients with primary immune thrombocytopenia. *Онкогематология*. 2010; 3: 36—45. (in Russian)
3. Neunert C., Lim W., Crowther M., Cohen A., Solberg L., Crowther M.A., Jr. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood*. 2011; 117: 4190—207.
4. Maschan A.A., Rumyantsev A.G. Stimulation of platelet production: the new treatment approach to chronic immune thrombocytopenic purpura. *Онкогематология*. 2009; 1: 51—6. (in Russian)
5. Huh H.J., Park C.J., Kim S.W., Han S.H., Jang S., Chi H.S. Flow cytometric detection of platelet-associated immunoglobulin in patients with immune thrombocytopenic purpura and nonimmune thrombocytopenia. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2009; 39 (3): 283—8.
6. Nguyen X.D., Dugrillon A., Beck C., Kerowgan M., Klüter H. A novel method for simultaneous analysis of specific platelet antibodies: SASPA. *Br. J. Haematol.* 2004; 127 (5): 552—60.
7. Butina E.V., Zaytseva G.A., Isaeva N.V., Vaskina E.A., Dokshina I.A. Method for detection of platelet autoantibodies. Patent N 2488114, Rossiyskaya Federatsiya. 2013. (in Russian)
8. Hezard N., Simon G., Mace C., Jallu V., Kaplan C., Nguyen P. Is flow cytometry accurate enough to screen platelet autoantibodies? *Transfusion*. 2008; 48: 513—8.

Поступила 26.03.14

Received 26.03.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.22/23-092:612.017.1]-053.6-02:614.72]-078.33

Маснавиева Л.Б., Несмеянова Н.Н., Кудяева И.В., Тихонова И.В.

ПОКАЗАТЕЛИ МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА ЗЕВА У ПОДРОСТКОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

ФГБУ "Восточно-Сибирский научный центр экологии человека" СО РАМН, 665827, Ангарск, Россия

Изучены показатели местного иммунитета зева у подростков с хронической патологией верхних дыхательных путей, проживающих в условиях высокого уровня загрязнения атмосферного воздуха. Выявлено, что при развитии патологии на фоне воздействия факторов окружающей среды происходит повышение уровней секреторного иммуноглобулина А и лактоферрина. Также установлено, что при хронической патологии верхних дыхательных путей в стадии ремиссии у подростков, проживающих в районах с высоким уровнем загрязнения атмосферного воздуха, нарушены взаимосвязи между факторами местной защиты (секреторным иммуноглобулином А и лизоцимом) и общей микробной обсемененностью.

Ключевые слова: подростки; местный иммунитет; загрязнение атмосферного воздуха.

I.V. Masnavieva, N.N. Nesmeianova, I.V. Kudaeva, I.V. Tikhonova

THE INDICATORS OF LOCAL IMMUNITY OF PHARYNX IN ADOLESCENTS WITH CHRONIC PATHOLOGY OF UPPER RESPIRATORY WAYS RESIDING IN CONDITIONS OF ANTHROPOGENIC LOAD

East-Siberian Scientific Center of Human Ecology of Siberian Branch of RAMS, 665827, Angarsk, Russia

The indicators of local immunity of pharynx in adolescents with chronic pathology of upper respiratory ways residing in conditions of higher level pollution of atmosphere air. It is established that under development of pathology against the background of impact of environmental factors increasing of levels of secretory immune globulin A and lactoferrin occur. It is established too that under chronic pathology of upper respiratory ways at the stage of remission in adolescents residing in conditions of higher level pollution of atmosphere air inter-dependencies between factors of local defense (secretory immune globulin A and lysozyme) and aggregate microbial germination are damaged.

Key words: adolescent; local immunity; pollution of atmosphere air

Для корреспонденции:

Маснавиева Людмила Борисовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

Адрес: 665827, Ангарск-27, а/я 1170

E-mail: masnavieva_luda@mail.ru

Наибольший вклад в рост заболеваемости органов дыхания вносит загрязнение атмосферного воздуха, так как слизистые оболочки верхних дыхательных путей являются первым барьером при действии поллютантов. В связи с этим проживание в экологически неблагоприятных районах