УДК 616.155.194.115.17; 616.155.1-008.1

Г.А. Мироненко

ЕКСПРЕСІЯ ЕРИТРОЦИТАРНИХ ПРОТЕЇНІВ-РЕГУЛЯТОРІВ АКТИВАЦІЇ СИСТЕМИ КОМПЛЕМЕНТУ У ХВОРИХ НА АУТОІМУННУ ГЕМОЛІТИЧНУ АНЕМІЮ

ДУ "Інститут гематології та трансфузіології НАМН України", м. Київ

Аутоімунні гемолітичні анемії (АІГА) — група набутих анемій, при яких виробляються антитіла проти власного незміненого антигену еритроцитів, в результаті чого відбувається прискорене їхнє руйнування внаслідок аутосенсибілізації імуноглобулінами різних класів та/або компонентами комплементу [2]. У патогенезі аутоімунного гемолізу головну роль відіграє комплекс чинників: концентрація і тип антиеритроцитарних антитіл, температурний оптимум їх дії, антигенні особливості мембрани еритроцитів, специфічність і клас імуноглобулінів, залучення системи комплементу [1].

При антитілозалежному гемолізі еритроцитів активація комплементу ініціюється фіксацією антитіл на поверхні антигену C1q-субодиниці з наступним приєднанням до Fc-фрагменту однієї молекули IgM або двох молекул IgG. У результаті поступової активації компонентів комплементу (C1, 2, 4, 3) утворюється фрагмент C3b, що приєднується до поверхні мембрани, взаємодіючи з рецепторами до C3b-компоненту комплемента CR3 на нейтрофілах, макрофагах, моноцитах і лімфоцитах, що реалізують екстраваскулярний тип гемолізу [11].

Другий механізм деструкції еритроцитів здійснюється шляхом руйнування мембрани кінцевим продуктом каскаду комплемента — лізуючим мембрану комплексом (ЛМК) з наступною реалізацією внутрішньосудинного варіанту гемолізу [5, 11].

До сімейства мембранних еритроцитарних протеїнів-регуляторів активації комплементу (RCA — complement regulatory proteins), зокрема, відносять фактор деградації комплементу DAF (Decay Accelerating Factor) та білок CD59 — мембранний інгібітор реактивного лізису (MIRL) [4, 6].

Фактор DAF (CD55) представлений на всіх гемопоетичних клітинах (еритроцитах, природних кілерах, тромбоцитах), а також судинному ендотелії, епітелії шлунково-кишкового тракту, сечостатевої та центральної нервової систем, у плазмі крові; містить на своїй поверхні 16 поліморфних антигенів групи крові Cromer [4, 7, 10]. Генний локус системи Cromer-DAF картований на довгому плечі хромосоми 1 в позиції 1q32. CD55 заякорюється в мембрану еритроцита за допомогою глікозилфосфатидилінозитолу (GPI) [8, 10]. Молекулярна маса глікопротеїну DAF становить 55 кДа, щільність його розташування на поверхні еритроциту — 3300 молекул на клітину. Основна функція DAF — прискорення дисоціації C3-конвертази класичного та альтернативного шляхів активації комплементу і блокування зв'язування компонентів C4b2a та C3bBb (DAF зв'язується з ферментним комплексом, витісняючи його активний компонент C2a або Bb) [10]. Такий механізм попереджує аутоліз активованим комплементом власних клітин організму при надлишковій активації комплементу. Додаткові функцій DAF — участь у регуляції концентрації цитозольного кальцію, імунній відповіді, на клітинному рівні він бере участь у реакціях цитолізу, апоптозу, адгезії, в процесах новоутворень [11]. Експресія цього антигену знижується при лімфопроліферативних захворюваннях (неходжкінських лімфомах, гострій лімфобластній лейкемії, хворобі Ходжкіна), деяких інфекціях, системних захворюваннях сполучної тканини [3]. Підвищена експресія DAF на клітинах трофобласту є механізмом захисту плода від материнського комплементу [10]. Даних щодо специфічної направленості антиеритроцитарних аутоантитіл щодо антигенів у межах описаної системи в доступній літературі нами не виявлено.

Антитіла проти антигенів системи Кромер є виключно алоімунними і зустрічаються надзвичайно рідко, їх клінічне значення мінімальне, обумовлене здатністю викликати вкорочення життя введених при трансфузії еритроцитів. Випадків гемолітичної хвороби новонароджених,

зумовлених наявністю цих антитіл, не зафіксовано [3, 10].

Еритроцитарний антиген-регулятор системи комплементу CD59 (MIRL) представлений одноланцюговим білком з молекулярною масою 19–25 кДа, який, подібно білку DAF, заякорюється в клітинну поверхню за допомогою GPI [3]. Широко експресований на мембрані гемопоетичних і негемопоетичних клітин, не несе на своїй поверхні групових антигенів [8, 11]. Протектин MIRL блокує збірку мембраноатакуючого комплексу на мембрані клітини-мішені: зв'язуючись із компонентом комплементу C8 у складі комплексу C5b-8, пригнічує занурення і розгортання C9 в мембрані і, тим самим, формування ЛМК, котрий або взагалі не формується, або не може здійснювати процес осмотичного пороутворення внаслідок структурної неповноцінності [3, 11]. CD59 виконує сигнальну роль в активації Т-клітин, відіграє роль у біологічних процесах апоптозу, згортанні крові. Мутації в гені, що кодує цей білок, спричиняють недостатню експресію MIRL та підвищення чутливості до комплемент-опосередкованого лізису, який зумовлює розвиток гемолітичної анемії, тромбозів, ревматоїдного артриту [6, 9]. Глікозилювання MIRL при цукровому діабеті призводить до хронічного гемолізу. CD59 також виконує і інші важливі біологічні функції: стимулює проліферацію фібробластів, мезангіальних клітин, асоціює з транспортером креатиніну, запобігає проникненню в еритроцити малярійного плазмодію, забезпечуючи несприйнятливість до малярії [8, 11].

Дефіцит комплементрегулюючих білків в організмі людини призводить до хронічного внутрішньосудинного гемолізу. На поверхні клітин циркулюючої крові відмічається варіабельна експресія анкерних білків GPI: на деяких вона нормальна, на інших — частково або повністю відсутня. Виявлення фенотипу CD55–CD59 — є основним діагностичним критерієм для пароксизмальної нічної гемоглобінурії (ПНГ) [9]. ПНГ-подібні еритроцити (фенотипи $CD55^+$ $CD59^-$; $CD55^-$ $CD59^+$; $CD55^-$ $CD59^-$) в нормі складають близько 4% від загальної популяції еритроцитів. На сьогодні роль цих молекул при захворюваннях аутоімунної природи та їх діагностична цінність вивчена недостатньо [6].

Мета роботи — встановити відсоток $CD55^+$ і $CD59^+$ еритроцитів та вираження їхньої експресії у хворих на АІГА в порівнянні із здоровими особами, визначити їхню роль у патогенезі аутоімунного гемолізу та діагностичну значимість.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В дослідження включено 18 хворих на набуту гемолітичну анемію (з встановленим діагнозом АІГА, а також направлених для уточнення діагнозу), яким серологічно підтверджено аутоімунний характер захворювання. Ідіопатичні форми склали 12 випадків, із них із синдромом Фішера–Еванса — 2. Симптоматичні форми, як ускладнення основного захворювання спостерігалися у 6 осіб, фоновими захворюваннями для них були: В-клітинний хронічний лімфолейкоз, вірусний гепатит С, системний червоний вовчак, макроглобулінемія Вальденстрема. Віковий діапазон обстежених становив 2,5–80 років, серед них: 8 осіб жіночої статі та 10 — чоловічої. Хронічний перебіг хвороби мав місце у 13 осіб, 4 із них обстежено на висоті гемолітичної кризи; вперше виявлене захворювання (з гострим перебігом) — у 5. На момент обстеження 10 хворих отримували глюкокортикоїдну терапію, двом — здійснювалася монотерапія препаратом Мабтера, в одному випадку — азатіоприном, п'ятьом хворим специфічної терапії ще не проводилося. При симптоматичних формах захворювання обстеження здійснювали на фоні лікування основної нозології. Контрольну групу склали 18 практично здорових осіб, які за віком і статтю відповідали дослідній групі.

Всім пацієнтам проведена оцінка показників периферичної крові за даними гемограм (кількість гемоглобіну, еритроцитів, ретикулоцитів). Серологічні дослідження виконували за допомогою гелевої технології BioRad (Швейцарія). Неповні теплові аутоімунні антитіла до еритроцитів визначали на ID-картках LISS/Coombs (IgG+C3d), для визначення холодових антитіл використовувались ID-картки "NaCl, enzyme test and cold agglutinins". Специфічність антитіл визначали за допомогою панелі типованих еритроцитів ID–DiaPanel cells 1-11.

Експресію антигенів CD55 та CD59 на поверхні досліджуваних еритроцитів визначали методом проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл, мічених флуоресцеїном ізотіаціанатом (FITC Mous Anti-Human CD55 та CD59 (Becton Dickinson, США)). Збір даних проводився на лазерному цитофлюориметрі FACScan за допомогою програми Lysis-II Ver. I.I. (BD, USA). Для аналізу записували події з регіону

еритроцитів, виділеного за параметрами переднього та бічного світлорозсіювання. Підсилення по каналу флуоресценції залишалося сталим для всіх зразків і встановлювалося за показниками відносно здорових осіб. Експресію антигенів визначали за гістограмою розподілу параметру флуоресценції, результат виражали у відсотках позитивних подій та середньому значенні інтенсивності флуоресценції (СІФ) в умовних одиницях. Аналіз даних проточної цитометрії проводили за допомогою програм freeFCS-reader та Win MDI 2.6. (Josef Trotter, Scripps Institute, La-Jolla, Канада).

Статистична обробка результатів проводилася за допомогою пакета статистичних програм Statistica 6.1. Для опису розподілень, котрі не є нормальними, використано міру центральної тенденції Me (медіана) та міру дисперсії — інтерквартильний розмах у вигляді 25 і 75% процентилей; при нормальному розподілі даних — у вигляді середньої арифметичної та її помилки (M±m), середньої арифметичної та середньоквадратичного відхилення (M±s). Для оцінки достовірності розбіжностей кількісних ознак використовували: непараметричний метод статистичного аналізу U-критерій Мана–Уітні (при ненормальному розподілі і параметричний (t-критерій Ст'юдента) — при нормальному розподілі даних.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У сироватці крові 14 пацієнтів у прямій та непрямій пробах Кумбса виявлено неповні теплові аглютиніни (IgG+C3d), у двох хворих — холодові аглютиніни (IgM+C3d), ще в двох випадках — комбінація теплових та холодових антитіл (IgG+IgM+C3d). Реакція Кумбса та реакція сольової аглютинації, що використовувалися для визначення антитіл, були різко позитивними — "++++" за умовною шкалою. Всі виявлені неповні теплові антитіла були поліспецифічними, тобто давали позитивну реакцію з усіма 11 зразками панелі типованих еритроцитів. Повні холодові аглютиніни мали специфічну спрямованість анти-I. У всіх обстежених пацієнтів спостерігалися клінічні ознаки активного гемолітичного процесу, що відповідали встановленим серологічним варіантам АІГА. Глибока анемія із різко зниженим рівнем гемоглобіну до 30–50 г/л була виявлена у 3 хворих, у більшості випадків це зниження було в межах 55–95 г/л і тільки у 4 хворих вказаний показник був більше 100 г/л. Для всіх пацієнтів були властиві різного ступеню вираженості еритроцитопенія та ретикулоцитоз. Середній рівень (M±s) еритроцитів склав 2,45±0,85 Т/л, ретикулоцитів — 81±64,3 ‰. В табл. 1 представлені результати імунофенотипічного дослідження еритроцитів пацієнтів із проявами АІГА та здорових осіб контрольної групи.

Виходячи з даних табл. 1 видно, що в групі пацієнтів з АІГА частки еритроцитів, носіїв антигену CD55 та CD59, достовірно знижені, вираженість експресії (щільність) антигену CD59 з високою статистичною значимістю ($p<0,01$) нижча, ніж у осіб контрольної групи.

При аутоімунному гемолізі має місце значне зменшення вмісту еритроцитів із повним фенотипом $CD55^+$ та $CD59^+$ порівняно з нормою (рис. 1 та 2). Абсолютна кількість еритроцитів, що експресують антигени $CD55^+$ та $CD59^+$, достовірно нижча ($p<0,01$), ніж у контрольній групі здорових осіб (табл. 2).

Випадок із практики. Пацієнтка Л., 19 років. Діагноз: набута аутоімунна гемолітична анемія, ідіопатична форма. Хвороба має хронічний перебіг (хворіє з 10 років), гемолітичні кризи спостерігаються 2–3 рази на рік. Пряма та непряма

Таблиця 1

Частка та середня інтенсивність флюоресценції антигенів-регуляторів системи комплементу на еритроцитах, Me (25%; 75%)

	CD55 (DAF)		CD59 (MIRL)	
	%	СІФ	%	СІФ
Пацієнти з АІГА (n=18)	91,74 (83,2; 97,5)	408,25 (378; 417)	98,13 (84,14; 99,82)	436,35 (421,9; 475,58)
Контрольна група (n=18)	98,4 (94,15; 99,36)	423,12 (382; 468)	99,59 (98,42; 99,8)	471,13 (464,96; 496,27)
U-критерій Уітні–Мана	76,5 ($p<0,01$)	145 ($p>0,05$)	106 ($p<0,05$)	75 ($p<0,01$)

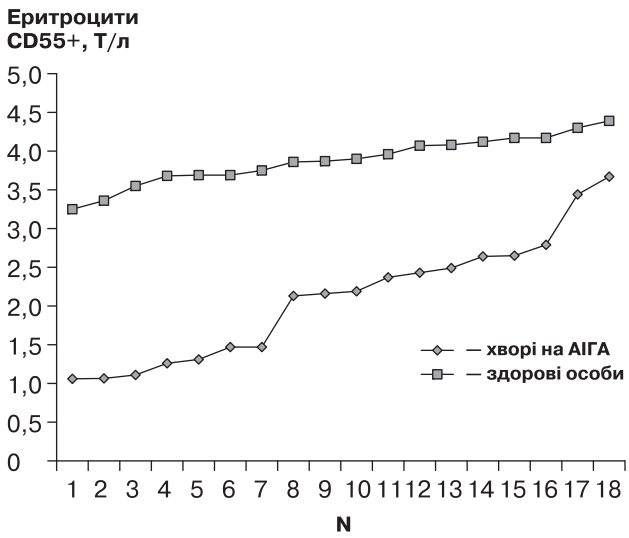

Рис. 1. Вміст CD55$^+$ еритроцитів у пацієнтів з АІГА та в контрольній групі

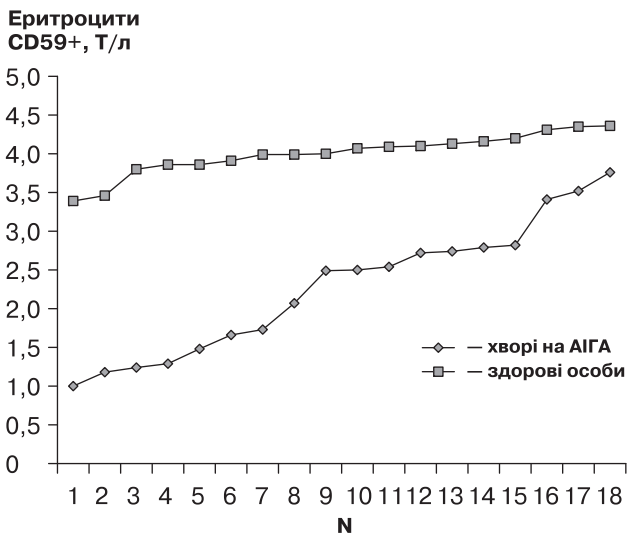

Рис. 2. Вміст CD59$^+$ еритроцитів у пацієнтів з АІГА та в контрольній групі

Таблиця 2

Кількість еритроцитів, що експресують антигени-регулятори системи комплементу, M±m

Досліджувана група	Кількість еритроцитів, Т/л	
	CD55$^+$	CD59$^+$
Хворі на АІГА	2,095±0,188	2,274±0,201
Контрольна група	3,88±0,073	4,00±0,06
t-критерій Ст'юдента	8,9 (p<0,01)	8,2 (p<0,01)

проби Кумбса різко позитивні (++++) як у період ремісії, так і під час гемолітичної кризи. Неповні теплові антиеритроцитарні антитіла поліспецифічні: реакція позитивна зі всіма 11 зразками панелі типованих еритроцитів. Рівень експресії CD59 (СІФ) визначали в період гемолітичної кризи (Hb — 73 г/л, еритроцити — 2,01 Т/л, ретикулоцити — 52 ‰) та в період ремісії (Hb — 117 г/л, еритроцити — 3,48 Т/л, ретикулоцити — 10 ‰), котрий склав відповідно 258,86 ум. од. та 439,35 ум. од. Частка еритроцитів-носіїв антигену MIRL практично не змінилася (98,1% — у період кризи, 99,9% — під час ремісії). Вірогідно, що низький рівень експресії CD59 в період активного гемолізу (в 1,7 рази нижчий, ніж в період ремісії) сприяє швидкій активації комплементу на поверхні еритроцитів, реалізуючи інтраваскулярний механізм гемолізу.

Отримані результати та їх співставлення доводять участь CD59 в патогенезі гемолізу при АІГА і можуть бути прогностичним критерієм при моніторингу перебігу хвороби. Фіксація проміжного продукту розпаду комплементу C3b в комплексі з IgG значно підсилює фагоцитоз клітинами системи мононуклеарних фагоцитів, забезпечуючи активацію механізму позасудинного гемолізу. Таким чином, можна припустити, що популяція еритроцитів зі зниженим рівнем експресії CD59 швидше елімінується із кров'яного русла, а продукування еритроцитів з нормальним рівнем експресії забезпечує ефективну протективну функцію щодо системи комплементу в період ремісії. Більш значущий вклад глікопротеїну MIRL в аутологічний захист клітин від власного комплементу, ніж CD55, є доведеним [3], а наведений приклад демонструє його патогенетичну роль також і при аутоімунному гемолізі.

ВИСНОВКИ

1. Частка еритроцитарних антигенів CD55 та CD59 у хворих з аутоімунним гемолізом достовірно знижена в порівнянні з контрольною групою.

2. Середня інтенсивність флуоресценції MIRL (CD59), на відміну від білка DAF (CD55), достовірно знижена в порівнянні з контрольною групою, що дає змогу стверджувати про більш значиму патогенетичну роль цього фактору при АІГА.

3. Визначення частки антигенів-носіїв еритроцитів CD55, CD59 та рівня експресії CD59 дозволяє уточнити патогенез аутоімунного гемолізу

та є перспективним діагностичним критерієм для прогнозу перебігу хвороби.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Анемії / С.М. Гайдукова, С.В. Видиборець, Л.А. Сивак, Н.М. Пясецька. — К.: Три крапки, 2005. — 312 с.*
2. *Гематология : пособие / А.Ф. Романова, Я.И. Выговская, В.Е. Логинский, И.С. Дягиль, И.В. Абраменко, Е.Е. Караманешт, Е.В. Кущевой. — К.: Медицина, 2006. — 456 с.*
3. *Дифференцировочные молекулы клеток человека (система CD) / Д.Ф. Глузман, Л.М. Скляренко, В.А. Надгорная, С.В. Коваль // Укр. журн. гематол. та трансфузіології. — 2006. — № 3. — С. 29–45.*
4. *Донсков С.И., Мороков В.А. Группы крови человека : руководство по иммунносерологии. — М.: ИП Скороходов, 2011. — 1015 с.*
5. *Иммунология / Д. Мейл, Дж. Бростофф, Д.Б. Рот, А. Ройт. — М.: Логосфера, 2007. — 568 с.*
6. *Expression levels of CD47, CD35, CD55, and CD59 on red blood cells and signal-regulatore protein-a,b on monocytes from patients with warm autoimmune hemolytic anemia / M.M. Barros, M. Yamamoto, M.S. Figueiredo, R. Cançado, E.Y.S. Kimura, D.M. Langhi Jr, C.S. Chiattone, J.O. Bordin // Transfusion. — 2009. — Vol. 49, № 1. — P. 154–160.*
7. *International Sociaty of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Berlin report / J.R. Storry, L. Castilho, G. Daniels, W.A. Flegel, G. Garratty, C.L. Francis, J.M. Moulds, J.J. Moulds, M.L. Olsson, J. Poole, M.E. Reid, P. Rouger, E. Schoot, M. Scott, E. Smart, Y. Tani, L.-C. Yu, S. Wendel, C. Westhoff, V. Yahalom, T. Zelinski // Vox Sang. — 2011. — Vol. 101, № 1. — P. 77–82.*
8. *Pourazar A. Red cell antigens: structure and function // Asian J. Transf. Science. — 2007. — Vol. 1, № 1. — P. 24-32.*
9. *Ruiz-Arguelles A., Llorente L. The role of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias // Autoimmun. Rev. — 2007. — Vol. 6, №3. — P. 155–161.*
10. *Storry J.R., Red M.E. The Cromer blood group system : a review // Immunohematology. — 2003. — Vol.18, № 4. — P. 95–102.*
11. *Wintrobe's clinical hematology: 11th ed. / J.P. Greer, J. Foerester, J.N. Lukens, G.M. Rodgers, F. Paraskevas, B. Glader. — Philadelfia: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2004. — 1508 p.*

ЭКСПРЕССИЯ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ ПРОТЕИНОВ-РЕГУЛЯТОРОВ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА У БОЛЬНЫХ АУТОИММУННОЙ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ

Г.А. Мироненко

Методом проточной цитометрии определены особенности иммунофенотипа эритроцитов у пациентов с аутоиммунной гемолитической анемией. Установлено достоверное снижение доли, интенсивности флюоресценции CD59 и доли CD55 — эритроцитарных протеинов-регуляторов активации системы комплемента.

EXPRESSION OF COMPLEMENT REGULATORY PROTEINS (CD55 AND CD59) ON RED BLOOD CELLS IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNE HAEMOLYTIC ANAEMIA

G.A. Myronenko

Immunophenotypic features of red blood cells for these antigens in patients with autoimmune haemolytic anaemia was defined with the use of flow cytometric analyses. It was established significant decrease in the proportion and fluorescence intensity of CD59, as well as in the proportion of CD59 (complement regulatory proteins).