

Abstract**Myronenko G.A.***SI "Institute of Haematology and Transfusiology of Ukraine"**12, M. Berlinskogo street, Kyiv, 04060, Ukraine***DEPENDENCE OF THE INTENSITY OF AUTOIMMUNE HEMOLYSIS FROM LEVEL OF EXPRESSION OF COMPLEMENT REGULATORY PROTEINS CD55 AND CD59 ON RED CELLS (ORIGINAL RESEARCHES)**

Introduction. All the erythrocytes (RBCs) immune destruction mechanisms involve in varying degrees components of the complement system, which perform cytotoxic and opsonizational function. Research studies of the system complement CD55 (dissociation decay factor – DAF), CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis – MIRL) proteins-regulators expression under autoimmune hemolytic anemia (AIHA) were only started to conduct in last few years. Under the same antibody parameters clinical course sharpness which depends on red blood cells destruction speed often differs, so the individual features of the complement system activation regulatory mechanisms may affect the process of RBCs destruction in cases of patients with AIHA. By the time the number of observations is still very small and does not allow making definite conclusions on the role of CD55 and CD59 in the cytolysis pathogenesis with these diseases, particularly, with AIHA.

Purpose. The purpose of current research study is to evaluate the role of RBCs CD55, CD59 expression in autoimmune hemolytic process progression.

Materials and methods. 29 patients with AIHA with different serological variants of the disease (with warm, cold agglutinins and a mixed variant) and 25 healthy people of control group were evaluated. The data of 11 patients with intense hemolysis (acute course, hemolytic crisis) and 14 people with moderate hemolysis (chronic out of crisis) were collected. We used the flow laser cytometric analysis (direct immunofluorescence test with MCA). Data collection was performed at the FACScan (Becton Dickinson, USA) flow laser cytofluorometer operated by Lysis II, and data analysis was performed using WinMDI 2.6. (Josef Trotter, Scripps Institute, La-Jolla, CA) program.

Discussion. The results of the research study shows abnormal decrease of the expression of complement regulatory proteins CD55/CD59 on erythrocyte membrane observed in 65 % of patients. This decrease didn't depend on serological variants of autoimmune antibodies. Patients with AIHA acute course and haemolytic crisis showed significantly lower CD55 expression on RBCs in comparison with patients with the chronic course out of crisis ($p < 0,05$). Positive correlation between the mean fluorescence intensities of the expression of CD55 and the level of haemoglobin ($rs=0,372$; $p < 0,05$) as well as erythrocytes quantity was established ($rs=0,399$, $p < 0,05$). This correlation generally indicates the importance of this indicator for the progression of anemia.

Thus the definition of the proportion of antigens carrier erythrocytes CD55, CD59, and the level of expression of these regulatory proteins allows us to distinguish a new pathogenetic factors of autoimmune hemolysis which may be promising diagnostic indicators of the severity and efficiency of AIHA treatment.

Keywords: CD55 (decay accelerating factor – DAF), CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis – MIRL), autoimmune haemolytic anemia, haemolytic crisis, erythrocytes, complement..

Corresponding author: *immunogematolog@gmail.com

Резюме

Мироненко Г. А.

ДУ «Інститут гематології та трансфізіології НАМН України»
М. Берлінського, 12, Київ, Україна, 04060

ЗАЛЕЖНІСТЬ ІНТЕНСИВНОСТІ АВТОІМУННОГО ГЕМОЛІЗУ ВІД РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ ЕРИТРОЦИТАРНИХ КОМПЛЕМЕНТРЕГУЛЯТОРНИХ БІЛКІВ CD55 ТА CD59 (ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ)

Метою дослідження було оцінити роль експресії еритроцитарних комплементрегуляторних білків CD55 та CD59 у прогресуванні автоімунного гемолітичного процесу. Методом проточної лазерної цитофлуориметрії (прямий імуофлуоресцентний тест із застосуванням моноклональних антитіл – МКА) обстежено 29 хворих на автоімунну гемолітичну анемію (АІГА) з різними серологічними варіантами захворювання (з неповними тепловими, холодowymi аглютинінами та змішаним варіантом захворювання), а також 25 практично здорових осіб контрольної групи. Збір даних проводився на проточному лазерному цитофлуориметрі FACScan (Becton Dickinson, USA) за допомогою програми Lysis II, аналіз даних проводили за допомогою програми WinMDI 2.6. (Josef Trotter, Scripps Institute, La-Jolla, CA).

Встановлено, що зниження експресії протеїнів-регуляторів системи комплементу CD55 та/або CD59 на еритроцитарній мембрані має місце у 65 % хворих, вона не залежить від серологічного варіанту автоімунних антитіл. При гострому перебігу АІГА та гемолітичній кризі вираженість експресії протеїну CD55 достовірно знижена ($p < 0,05$) у порівнянні з випадками хронічних форм поза кризою, встановлено позитивну кореляцію між рівнем гемоглобіну ($r^s=0,372$; $p < 0,05$) кількістю еритроцитів ($r^s=0,399$; $p < 0,05$) із рівнем експресії (середньою інтенсивністю флуоресценції – СІФ) антигену CD55, що загалом вказує на важливе значення цього показника для прогресування анемічного синдрому.

Отже, визначення частки антигенів-носіїв еритроцитів CD55 та CD59, а також рівня експресії цих регуляторних протеїнів, дозволяє виділити нові патогенетичні чинники автоімунного гемолізу та є перспективним діагностичним показником гостроти перебігу й ефективності лікування АІГА.

Ключові слова: CD55 (фактор дисоціації розпаду – DAF), CD59 (мембранний інгібітор реактивного лізису – MIRL), автоімунна гемолітична анемія, гемолітична криза, еритроцити, комплемент.



Резюме**Мироненко Г.А.**

ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины» М. Берлинского, 12, Киев, 04060, Украина,

ЗАВИСИМОСТЬ ИНТЕНСИВНОСТИ АУТОИММУННОГО ГЕМОЛИЗА ОТ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ КОМПЛЕМЕНТРЕГУЛИРУЮЩИХ БЕЛКОВ CD55 И CD59 (ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ)

Целью исследования было оценить роль экспрессии эритроцитарных комплементрегуляторных белков CD55 та CD59 в прогрессировании аутоиммунного гемолитического процесса. Методом проточной лазерной цитофлуориметрии (прямой иммунофлуоресцентный тест с применением МКА) обследовано 29 больных аутоиммунной гемолитической анемией (АИГА) с разными серологическими вариантами заболевания (с неполными тепловыми, холодными агглютининами и смешанным вариантом заболевания), а также 25 практически здоровых лиц контрольной группы. Сбор данных производился на проточном лазерном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, USA) с помощью программы Lysis II, анализ данных проводили с помощью программы WinMDI 2.6. (Josef Trotter, Scripps Institute, La-Jolla, CA).

Установлено, что снижение экспрессии протеинов-регуляторов системы комплемента CD55 и/или CD59 на эритроцитарной мембране имеет место у 65 % больных, она не зависит от серологического варианта аутоиммунных антител. При остром течении АИГА и гемолитическом кризе выраженность экспрессии протеина CD55 достоверно снижена ($p < 0,05$) по сравнению со случаями хронических форм вне криза, выявлена положительная корреляция с уровнем гемоглобина ($r^s=0,372$; $p < 0,05$), количеством эритроцитов ($r^s=0,399$, $p < 0,05$) с уровнем экспрессии (средней интенсивностью флуоресценции – СИФ) антигена CD55, что в целом указывает на важное значение этого показателя в прогрессировании анемического синдрома.

Таким образом, определение доли антигенов-носителей эритроцитов CD55, CD59, а также уровня экспрессии этих регуляторных протеинов, позволяет выделить новые патогенетические факторы аутоиммунного гемолита, которые могут быть перспективным диагностическим показателем остроты течения и эффективности лечения АИГА.

Ключевые слова: CD55 (фактор диссоциации распада – DAF), CD59 (мембранный ингибитор реактивного лизиса – MIRL), аутоиммунная гемолитическая анемия, гемолитический криз, эритроциты, комплемент.

Автор, відповідальний за листування: *immunogematolog@gmail.com

Вступ

Уявлення про патогенез імунної деструкції еритроцитів не є остаточно сформованими. Першочергові механізми руйнування еритроцитів при антитілозалежному гемолізі – це позасудинний (макрофагально-опосередкований фагоцитоз і секвестрація в селезінці) та комплементзалежний внутрішньосудинний гемоліз. Додатковим способом деструкції опсонізованих антитілами еритроцитів є явище антитілозалежної клітинної цитотоксичності (АЗКОЦ) [1, 2]. Зна-

чну роль у реалізації цих механізмів відіграє система комплементу, що забезпечує цитотоксичну та опсонізуючу функції.

Цитотоксична функція реалізується внутрішньосудинно і забезпечується кінцевим продуктом активації системи комплементу – мембраноатакуючим комплексом (МАК), який проникає в еритроцитарну мембрану і спричиняє її руйнування. Каскад реакцій є можливим завдяки первинній активації C1q субодиниці C1-компоненту комплементу. Опсонізуюча функція



є етапом імунного гемолізу, характеризується виділенням опсонізуючих компонентів одразу після активації системи комплементу: продуктів його активації (C3b) та деградації (iC3b) [3, 4]. Опсонізовані фрагментами комплементу імунні комплекси мають високу афінність до еритроцитарного рецептора CR1a, який забезпечує їх доставку до ефекторних клітин. Фрагменти комплементу взаємодіють із специфічними рецепторами ретикулоендотеліальних клітин, у першу чергу, печінкових макрофагів (CR1b для компоненту C3b, CR3 – для iC3b). Адгезія та фагоцитоз еритроцитів, опсонізованих iC3b компонентом комплементу, є вирішальним моментом екстравакулярного гемолізу, а наявність продуктів розпаду C3 на еритроцитах підвищує ефективність АЗКОЦ за участю лімфоцитів [2].

Таким чином, усі механізми імунної деструкції еритроцитів у тій чи іншій мірі передбачають залучення компонентів системи комплементу.

При оцінці важкості автоімунного гемолітичного процесу зазвичай використовують такі його імунологічні характеристики, як серологічний варіант антитіл, їх клас, титр, щільність на поверхні еритроцитів, температурний оптимум дії, наявність продуктів розпаду комплементу [5]. Залежна від швидкості деструкції еритроцитів гострота клінічного перебігу часто різна за однакових імунологічних показників, тому є логічним припущення, що індивідуальні особливості регуляторних механізмів активації системи комплементу у хворих на АІГА можуть впливати на процес руйнування еритроцитів, а їх виявлення більш чітко оцінює стан пацієнта і дозволяє спрогнозувати перебіг захворювання.

Дослідження експресії протеїнів-регуляторів системи комплементу CD55 (фактор дисоціації розпаду – DAF) і CD59 (мембранний інгібітор реактивного лізису – MIRL) при автоімунних цитопеніях почали проводитися тільки в останні роки [6, 7]. Ці молекули здійснюють протективну функцію по відношенню до власних клітин (у тому числі – еритроцитів) при активації гомологічного комплементу, а їх недостатня експресія може бути важливим фактором прогресування цитолізу. Функції цих білків різняться: CD55 інгібує формування C3-, C5-конвертаз класичного та альтернативного шляхів активації комплементу, а також прискорює дисоціацію вже попередньо утворених; CD59 – інгібує формування мембраноатакуючого комплексу (C5b-

9), вклинюючись у процес комплектації молекул C5b, C6, C7, C8 та C9.

Відсутність або зниження експресії цих протеїнів специфічно для пароксизмальної нічної гемоглобінурії (ПНГ), а також може асоціюватися і з іншими захворюваннями: автоімунною тромбоцитопенією, апластичною анемією, системним червоним вовчаком, АІГА, синдромом Фішера-Еванса. На теперішній час кількість спостережень ще дуже незначна і не дозволяє зробити однозначні висновки про роль CD55 і CD59 у патогенезі цитолізу при цих захворюваннях, зокрема, при АІГА [8].

Мега роботи. Оцінити роль експресії еритроцитарних комплементрегуляторних білків CD55 та CD59 у прогресуванні автоімунного гемолітичного процесу.

Матеріали і методи. У дослідження включено 29 хворих на АІГА. Ідіопатичні форми склали 22 випадки, серед них із синдромом Фішера-Еванса – 2. Симптоматичні форми, як ускладнення основного захворювання, спостерігалися у 7 осіб, фоновими захворюваннями для них були: В-клітинна хронічна лімфоїдна лейкемія (В-ХЛЛ), вірусний гепатит С, системний червоний вовчак, макроглобулінемія Вальденстрема, інфекційний мононуклеоз. Середній вік ($M \pm s$) обстежених становив ($37,6 \pm 23,5$) р., серед них 15 осіб жіночої статі та 14 – чоловічої. Хронічний перебіг захворювання мав місце у 24 осіб, із них шість обстежено на висоті гемолітичної кризи, гострий перебіг захворювання спостерігали у 5 пацієнтів. На момент обстеження 17 хворих отримували загальноприйнятую терапію преднізолоном, двом здійснювалася монотерапія препаратом ритуксімаб, по одному випадку – азатіоприном та Сандімуном, восьми хворим на момент обстеження специфічної терапії не проводилося. При симптоматичних формах захворювання обстеження здійснювали на фоні лікування основної нозології. Контрольну групу склали 25 практично здорових осіб.

Усім пацієнтам проведена оцінка показників периферичної крові за даними гемограм (кількість гемоглобіну, еритроцитів, ретикулоцитів). Серологічні дослідження виконували за допомогою гелевої технології BioRad (Швейцарія). Неповні теплові автоімунні антитіла до еритроцитів визначали на ID-картках LISS/Coombs (IgG+C3d), для визначення холодних антитіл використовувались ID-картки "NaCl, enzyme test and cold agglutinins".



Для оцінки експресії протеїнів-регуляторів системи комплементу CD55 та CD59 на еритроцитарній мембрані використано метод проточної лазерної цитофлуориметрії (прямий імуофлуоресцентний тест із застосуванням МКА, мічених флуоресцеїноізотіаціанатом (FITC Mous Anti-Human CD55 та CD59, Becton Dickinson, USA) [9]. Збір даних проводили на проточному лазерному цитофлюориметрі FACScan (Becton Dickinson, USA) за допомогою програми Lysis II, аналіз – програмою WinMDI 2.6. (Josef Trotter, Scripps Institute, La-Jolla, CA). Досліджували наступні характеристики еритроцитів: частка CD55+, CD59+ клітин (%), експресія – середня інтенсивність флуоресценції (СІФ) відпові-

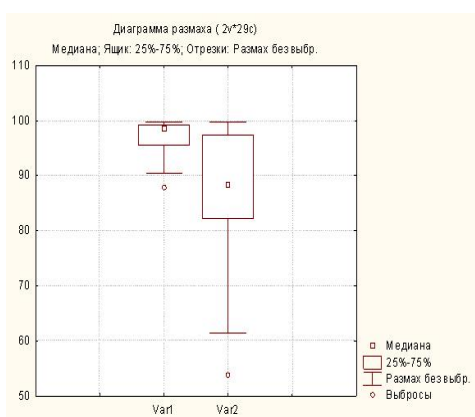


Рис.1. Графік: частки CD55+ еритроцитів у осіб контрольної групи (Var 1) та у хворих на АІГА (Var 2).

Частка CD55+ еритроцитів у хворих на АІГА Me (25 %; 75 %) склала 88,3 (82,2; 97,3) % у порівнянні із здоровими особами 98,6 (95,5; 99,2) %, тобто медіана та межі інтерквартильного розмаху показника зміщені в сторону зменшення (рис. 1). Мінімальна величина частки CD55+ еритроцитів (з урахуванням викидів) у хворих осіб склала 53,8 % проти 87,9 % у контрольній групі. Максимальні показники досліджуваного показника були практично однакові: 99,7 % – проти 99,8 % контрольної. Таким чином, можна констатувати зменшення частки CD55+ еритроцитів у частини хворих на АІГА.

При дослідженні вмісту CD59+ еритроцитів графіки розподілень кількісних даних мають подібний вигляд (рис. 2). Представлені на рис. 2 дані демонструють, що центральні тенденції (Me) у контрольній та в групі хворих на АІГА осіб практично не відрізняються (99,6 % проти 98,3 %). Проте, характеризуючи дисперсію спостережень, видно суттєві відмінності. Так, інте-

дного маркера (ум. од). Для статистичної оцінки розбіжностей вивчених показників застосовано непараметричний U-критерій Уїтні-Мана, для оцінки кореляційних зв'язків – коефіцієнт рангової кореляції Спірмена; статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета статистичних програм Statistica 6.1.

Результати дослідження. У ході дослідження встановлено, що частка CD55+ та CD59+ еритроцитів у контрольній групі осіб склала близько 100,0 %, тоді як у хворих на АІГА характеризувалася варіабельністю: у частини хворих показники не відрізнялися від таких у здорових осіб, проте у більшості спостерігали зниження одного або одразу двох показників (рис. 1-2).

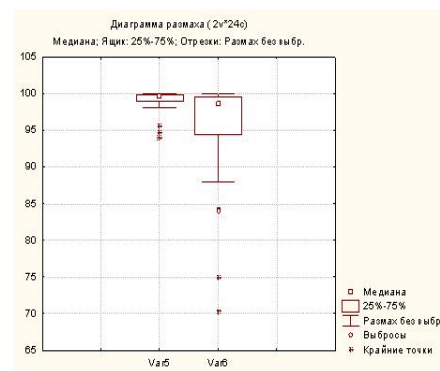


Рис. 2. Графік: частки CD59+ еритроцитів у осіб контрольної рупи ((Var 5) та у хворих на АІГА (Var 6).

квартильний розмах (25 %; 75 %) у контрольній групі є незначним (98,9; 99,8) %, мінімум склав 94,0 %, максимум – 100,0 %. У досліджуваній групі аналогічний інтерквартильний розмах зміщений у сторону зменшення (87,9; 99,4) %, мінімальний показник становив 70,4 %, максимальний – 99,9 %. Отже, виходячи з отриманих даних, можна зробити висновок про зменшення частки CD59+ клітин у популяційному складі еритроцитів у частини хворих на АІГА.

Середня інтенсивність флуоресценції відповідного маркера є відображенням щільності його присутності на мембрані і характеризує ступінь експресії молекул. Показники СІФ антигенів-регуляторів системи комплементу CD55+ та CD59+ у частини хворих на АІГА також були нижчими, ніж у осіб контрольної групи з подібною амплітудою діапазону коливань.

При вивченні рівня експресії антигену DAF (рис. 3), спостерігали деяке зниження центральної тенденції (Me) у хворих на АІГА у порів-

нянні з контрольною групою: 390,4 ум. од. проти 414,7 ум. од. Оцінюючи інтерквартильний розмах (25 %; 75 %) видно, що у контрольній групі осіб він зміщений в сторону збільшення (382,3; 453,5) ум. од., максимальний показник – 551,7 ум. од. У той же час у хворих на АІГА інтерквартильний розмах був звужений – (364,6; 411,9) ум. од., максимум склав 482,7 ум. од.

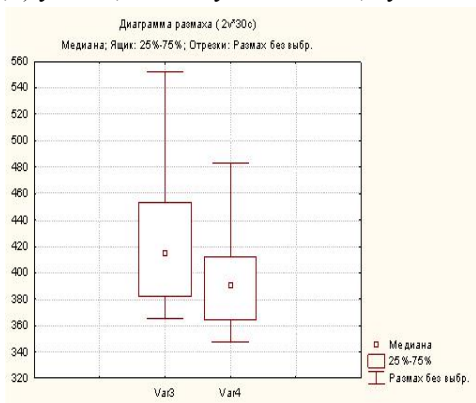


Рис.3. Графік: інтенсивність флуоресценції антигену CD55 (ум. од.) на еритроцитах у осіб контрольної групи (Var 3) та у хворих на АІГА (Var 4).

На рис. 4 графічно представлені дані, отримані при вивченні СІФ антигену MIRL. У групі хворих на АІГА відмічено більш різке зменшення медіани СІФ антигену CD59 у бік зменшення: 445,2 ум. од. проти 480,3 ум. од. контрольної групи. При аналізі дисперсії спостережень відмічали зменшення інтерквартильного розмаху (25 %; 75 %) у бік зменшення у дослідній групі пацієнтів (426,6; 490,9) ум. од. порівняно з контрольною – (465,0; 513,3) ум. од.

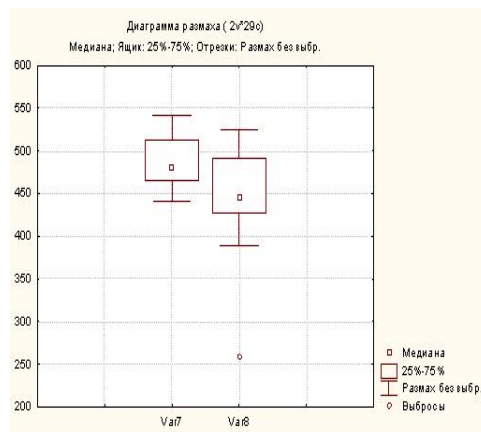


Рис.4. Графік: інтенсивність флуоресценції антигену CD59 (ум. од.) на еритроцитах у осіб контрольної групи (Var 7) та у хворих на АІГА (Var 8).

При проведенні статистичного аналізу отриманих даних з використанням U-критерію Уїтні-Мана встановлено, що у хворих на АІГА виявляється достовірне зниження часток CD55+ та CD59+ еритроцитів і рівня експресії відповідних молекул антигенів-регуляторів системи комплементу в порівнянні з контрольною групою ($p < 0,01$). Аналіз достовірності відмінностей свідчить про різний рівень статистичної значимості досліджуваних показників: $p < 0,05$ при оцінці рівня експресії CD55; $p < 0,01$ при оцінці часток CD55+ і CD59+ еритроцитів та рівня експресії CD59 (табл. 1).

Таблиця 1

Особливості експресії протеїнів-регуляторів системи комплементу CD55 та CD59 на еритроцитах хворих АІГА, Me (25 %;75 %)

Досліджувана група	CD55 (DAF)		CD59 (MIRL)	
	%	СІФ, ум.од.	%	СІФ, ум.од.
Пацієнти з АІГА, n=29	88,3 (82,2; 97,3)	390,4 (364,6; 411,9)	98,3 (87,9; 99,4)	445,2 (426,6; 490,9)
Контрольна група, n=25	98,6 (95,5; 99,2)	414,7 (382,3; 453,5)	99,6 (98,9; 99,8)	480,3 (465,0; 513,3)
U-критерій	131,5	239	185,5	175
Уїтні-Мана	$p < 0,01$	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,01$

У всіх зразках крові 29 обстежених пацієнтів з АІГА виявлено автоімунні антиеритроцитарні антитіла, які визначали серологічний варіант захворювання. За серологічним принципом було сформовано три дослідні групи пацієнтів з АІГА: з неповними тепловими аглютинінами (n=23), з повними холодowymi аглютинінами

(n=3) та змішаний варіант (n=3). Неповні теплові аглютиніни були ідентифіковані в прямій та непрямій пробах Кумбса (IgG+C3d) у 23 осіб, у трьох хворих виявили повні холодowymi аглютиніни (IgM+C3/C3c), ще у трьох випадках – їх комбінацію (IgG+IgM+C3d). Теплові автоімунні антитіла відносилися до субкласів IgG1 та IgG3,



холодові аглютиніни були представлені IgM і мали властивості патологічних: титр більше 1:64 при температурі 4 °С (максимальний – 1:3072), аглютинаційна активність проявлялась у діапазоні температур від 4 до 22 °С (у титрі від 1:4 до 1:512). Статистична обробка отриманих даних не встановила достовірних відмінностей часток CD55+ і CD59+ еритроцитів та рівнів експресії вказаних антигенів між групами хворих на АІГА із різними серологічними варіантами антитіл ($p > 0,05$).

За клінічним перебігом захворювання хворих поділено на дві групи: I-а (висока інтенсивність гемолізу) – 11 осіб із гострим перебігом захворювання або гемолітичною кризою; II-а (низька інтенсивність гемолізу) – 18 осіб із хронічною формою АІГА поза кризою.

В анамнезі осіб I-ої групи часто відмічали перенесену респіраторну інфекцію, контакт із токсичними речовинами (переважно фарбниками), неконтрольований прийом медикаментів. Швидке падіння гемоглобіну, підвищення вмісту ретикулоцитів та непрямого білірубину, наростання слабкості, запаморочення, блідості, тахікардії, адинамії, задухи без фізичної загрузки розвивалися протягом 1-2 тижнів. У деяких випадках з'являлась гематурія, ознаки ниркової недостатності. Мала місце глибока анемія із різко зниженими середніми показниками ($M \pm s$) гемоглобіну ($66,6 \pm 20,5$) г/л, еритроцитів – ($1,84 \pm 0,66$) $\times 10^{12}$ /л. Середня кількість ретикулоцитів ($103,8 \pm 30,6$) ‰, непрямого білірубину – (56 ± 41) мкмоль/л.

Хронічні форми (друга група спостереження) склали 2/3 всіх випадків АІГА і спостерігались у 18 осіб. У окремих випадках процес починався з гострого внутрішньосудинного гемо-

лізу, згодом, після первинного покращення, захворювання набувало затяжного характеру із ознаками екстраваскулярного руйнування еритроцитів. У більшості випадків відмічався поступовий розвиток симптомів із виникненням клінічних ознак анемії, наростаючої жовтяниці, збільшення печінки та селезінки. Хворі відмічали наявність субфебрильної температури, зміну забарвлення шкірних покривів (від блідості до іктеричності), появу артралгій. Загальний стан змінювався помірно, часто, не дивлячись на виражену анемізацію, пацієнти почували себе задовільно. При хронічному перебігу ознаки гемолізу виявлялися протягом тривалого часу (місяці, роки), мали місце чергування періодів загострень та ремісій. Часто хронічна АІГА ускладнювала перебіг В-ХЛЛІ, системних захворювань, вірусних та автоімунних гепатитів. Середні показники гемограм ($M \pm s$) були наступними: рівень гемоглобіну – ($96,1 \pm 21,6$) г/л, кількість еритроцитів – ($2,93 \pm 0,77$) $\times 10^{12}$ /л, ретикулоцитів – ($62,3 \pm 58,0$) ‰. Середній рівень непрямого білірубину складав ($35,9 \pm 27,5$) мкмоль/л.

Результати порівняння частки еритроцитів-носіїв антигенів DAF та MIRL за U-критерієм Уїтні-Мана у виділених групах представлені в табл. 2. Нами встановлено достовірні відмінності між показниками СІФ антигену CD55 на еритроцитарній мембрані в залежності від перебігу захворювання ($p < 0,05$). Встановлено, що для хворих на АІГА є характерним достовірне зниження частки CD59+ еритроцитів та експресії на них антигену MIRL порівняно із контрольною групою, проте означені показники не є залежними від гостроти процесу, залишаючись на практично однаковому рівні (табл. 1- 2).

Таблиця 2

Особливості експресії протеїнів-регуляторів системи комплементу CD55 та CD59 на еритроцитах в залежності від перебігу АІГА, Me (25 %;75 %)

Варіанти перебігу	CD55 (DAF)		CD59 (MIRL)	
	% позит. к-н	СІФ, ум.од.	% позит. к-н	СІФ, ум.од.
Гострий / гем. криза (n=11)	88,3 (77,3; 93,8)	381,4 (358,2; 409,7)	98,2 (93,9; 99,6)	452,4 (421,9; 473,6)
Хронічний, (n=18)	95,6 (85,7; 97,7)	407,2 (375,9; 435,5)	98,4 (84,1; 99,9)	439,4 (426,6; 490,9)
U-критерій	65	57,5	94	104
Уїтні-Мана	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

В окремих випадках при інтенсивному автоімунному гемолізі кількість CD55+ еритроцитів зменшувалася дуже істотно. Так, на рис. 5 представлено гістограму, що відображає розподіл

параметрів флуоресценції еритроцитарного антигену DAF хворого В. (80 років), який знаходився у критичному стані у відділенні інтенсивної терапії з діагнозом: набута гемолітична ане-



мія з холодними аглютинінами, гемолітична криза. Оцінюючи дані гістограми видно, що близько половини еритроцитів від загальної популяції хворого не експресували антиген CD55, що свідчить про вагомий вплив цього явища на прогресування гемолізу.

Було досліджено наявність корелятивних зв'язків показників експресії комплементрегуляторних протеїнів із деякими показниками периферичної крові, що найбільш чітко відображають прогресування анемічного синдрому внаслідок деструкції еритроцитів. У табл. 3 показано, що у хворих на АІГА має місце позитивна кореляція рівня гемоглобіну та кількості еритроцитів із середнім рівнем імунофлуоресценції антигену CD55.

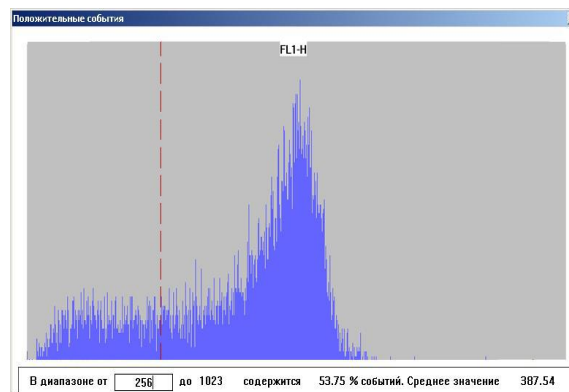


Рис. 5. Гістограма розподілу параметру флуоресценції (експресія антигену CD55) хворого В. (80 р.). Набута гемолітична анемія з холодними аглютинінами. Гемолітична криза.

Таблиця 3

Корелятивні зв'язки фактора деградації комплементу DAF та мембранного інгібітора реактивного лізису MIRL з деякими показниками периферичної крові хворих на АІГА

Парні показники, що оцінюються	Показники кореляції	
	r^s характер кореляції	p рівень достовірності
Нв, г/л : CD55+ RBCs, % (n=29)	-0,051	p>0,05
Нв, г/л : СІФ CD55, ум. од. (n=29)	0,372	p<0,05
Нв, г/л : CD59+ RBCs, % (n=29)	-0,085	p>0,05
Нв, г/л : СІФ CD59, ум. од. (n=29)	-0,211	p>0,05
К-ть RBCs : CD55+ RBCs, % (n=29)	0,058	p>0,05
К-ть RBCs : СІФ CD55, ум. од. (n=29)	0,399	p<0,05
К-ть RBCs : CD59+ RBCs, % (n=29)	0,049	p>0,05
К-ть RBCs : СІФ CD59, ум. од. (n=29)	-0,112	p>0,05
Непр. білір., мкмоль/л : CD55+ RBCs, % (n=29)	-0,051	p>0,05
Непр. білір., мкмоль/л : СІФ CD55, ум. од. (n=29)	-0,169	p>0,05
Непр. білір., кмоль/л : CD59+ RBCs, % (n=29)	-0,013	p>0,05
Непр. білір., кмоль/л : СІФ CD59, ум. од. (n=29)	0,072	p>0,05

Обговорення результатів. На основі отриманих даних можна стверджувати про наявність у значної частини хворих на АІГА патологічних клонів еритроцитів з частковою або повною відсутністю антигенів DAF та MIRL, зниження щільності вказаних антигенів на еритроцитарній мембрані. Ці явища можуть зустрічатися як в комбінації, так і ізольовано. Так, зменшення частки CD55+ еритроцитів відносно контрольної групи мало місце у 51 % хворих, у 34 % спостерігали зниження частки CD59+ еритроцитів. У той же час зниження показників СІФ означених антигенів було притаманне 45 % хворим щодо антигену DAF та 59 % – відносно MIRL. Еритроцити з фенотипом CD55⁻CD59⁺, CD55⁺CD59⁻, CD55⁻CD59⁻ – так звані ПНГ-подібні еритроцити, що характерні для пароксизмальної нічної гемоглобінурії, – також можуть виявлятися у здорових осіб, проте їх частка в

нормі складає не більше 4 % від загальної популяції [5]. Оскільки у частини хворих досліджувані показники залишаються в межах норми, це дозволяє трактувати виявлені особливості як важливі додаткові чинники гемолізу при АІГА, які мають значення для реалізації певного варіанту клінічного перебігу.

Відсутність антигенів CD55, CD59 або низький рівень їх експресії в період активного гемолізу сприяє швидкій активації комплементу з реалізацією інтраваскулярного механізму гемолізу, а 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 популяції CD55⁻CD59⁻ еритроцитів та еритроцитів зі зниженим рівнем їх експресії швидше елімінуються із кро-



в'яного русла, а продукування еритроцитів з нормальним її рівнем забезпечує ефективну протективну функцію щодо системи комплементу в період ремісії. Це вказує на підвищення вразливості еритроцитарної мембрани пацієнта щодо комплемент-опосередкованого лізису і сприяє прогресуванню гемолізу, поглиблюючи явище анемії.

Представлені у світовій літературі дані щодо визначення зазначених показників у хворих на АІГА свідчать лише про зміни експресії антигену CD59 [6, 8].

Беручи до уваги, що частота зустрічаємості холодкових та комбінованих антитіл при АІГА в нашому дослідженні була порівняно низькою, вважаємо оцінку їх значимості орієнтовною – на етапі маніфестації гемолізу не було виявлено взаємозалежності серологічних характеристик імунних антитіл та експресії молекул протеїнів-регуляторів комплементу.

Уперше було встановлено достовірні відмінності між показником середньої інтенсивності флуоресценції (СІФ) антигену DAF на еритроцитарній мембрані залежно від перебігу захворювання – аналогічні дослідження в сучасних джерелах інформації не описані.

При гострому перебігу та гемолітичній кризі АІГА вираженість експресії (щільність) протеїну DAF достовірно знижена у співставленні з випадками хронічного перебігу поза кризою. В той же час зниження частки CD59+ еритроцитів та рівня експресії антигену M1RL, порівняно з контрольною групою, було властиве для всіх пацієнтів з АІГА незалежно від активності гемолітичного процесу – статистично значимого зв'язку цих показників з гостротою перебігу нами не виявлено ($p > 0,05$). Можливо, більш виражене зниження експресії CD55 у поєднанні із фоновим зниженням CD59 створює передумови для більш інтенсивної деструкції еритроцитів, зумовлюючи гостроту процесу. Відомо, що при гострому початку АІГА та гемолітичній кризі гемоліз початково носить внутрішньосудинний характер [5], тому виявлені нами особливості експресії комплементрегуляторних протеїнів можуть сприяти реалізації цього виду деструкції еритроцитів.

Очевидно, що при зниженні щільності протеїну DAF, який перериває асоціацію C4b та C3b компонентів комплементу, прискорюючи їх розпад, створюються оптимальні умови для швидкої активації комплементу, що призводить до негайного цитолізу еритроцитів і в певній мірі

визначає інтенсивність гемолітичного процесу. У досліджених нами хворих інтенсивний автоімунний гемоліз часто виникав на фоні інфекцій, частіше респіраторного або шлунково-кишкового трактів. Враховуючи дані літератури про те, що антиген DAF може функціонувати як мультирецептор для ряду вірусів та мікроорганізмів, останні можуть частково блокувати його основну функцію та створювати додаткові умови для масивного інтраваскулярного гемолізу [2, 3, 10]. Оскільки у частини хворих показники експресії CD55 та CD59 знаходяться в межах норми, виявлену особливість можна трактувати як додатковий чинник активації цитолізу при гострих формах АІГА, а анамнестичний зв'язок дебюту захворювання з інфекційним фактором підтверджує патогенетичне значення протеїнів-регуляторів комплементу в активності автоімунного гемолітичного процесу.

Установлена в ході досліджень позитивна кореляція рівня гемоглобіну та кількості еритроцитів із середнім рівнем імуофлуоресценції антигену CD55 свідчить, що оптимальна кількість молекул DAF, попереджуючи автоліз еритроцитів активованим комплементом та опсонізацію його компонентами, сприяє збереженню цілісності їх мембрани, і, відповідно, підтримувannya кількості еритроцитів й рівня гемоглобіну на більш високому рівні. Аналогічної кореляції рівня гемоглобіну, кількості еритроцитів із СІФ антигену CD59 не встановлено – однакове зниження рівнів його експресії при всіх варіантах перебігу АІГА (незалежно від рівня активності гемолізу та показників периферичної крові) вказує, що цей фактор гемолізу не є першочерговим при АІГА. Проводячи у деяких хворих динамічне визначення цих показників, було виявлено, що покращення показників гемограм при ефективній терапії гострої форми АІГА супроводжується збільшенням частки CD55+ еритроцитів та показників СІФ для цього антигену. Таким чином, можна припустити, що продукування еритроцитів з нормальною експресією DAF забезпечує ефективну протективну функцію щодо активованої системи комплементу і сприяє процесу одужання.

Таким чином, отримані нами результати не тільки підтверджують літературні дані про наявність у частини хворих на АІГА патологічних клонів еритроцитів з відсутністю одного або двох досліджуваних антигенів, але і доповнюють інформацією про рівень їх експресії при

різних варіантах та клінічних перебігах захворювання.

Отже, визначення частки еритроцитів-носіїв CD55, CD59 та рівня експресії означених молекул дозволяє уточнити зв'язок автоімунного гемолізу з протеїнами-регуляторами системи

Висновки

1. Частка еритроцитів-носіїв антигенів CD55 та CD59, а також середня інтенсивність флуоресценції DAF та MIFL у хворих з автоімунним гемолізом достовірно знижена в порівнянні з контрольною групою.

2. Зниження експресії протеїнів-регуляторів системи комплементу CD55 та/або CD59 на еритроцитарній мембрані має місце у 65 % хворих.

3. Експресія мембранних протеїнів-регуляторів системи комплементу на еритроцитах не залежить від серологічного варіанту автоімунних антитіл.

4. При гострому перебігу АІГА та гемолітичній кризі вираженість експресії протеїну DAF достовірно знижена у порівнянні з випадками хронічних форм поза кризою, це

комплементу як патогенетичними чинниками імунного гемолізу. Ці показники можуть бути перспективним лабораторним критерієм для діагностики і моніторингу перебігу гемолітичних анемії.

створює оптимальні умови для швидкої активації комплементу й інтенсивної деструкції еритроцитів.

5. Наявність позитивної кореляції між рівнем гемоглобіну, кількістю еритроцитів із СІФ антигену CD55 вказує на важливе значення цього показника для прогресування анемічного синдрому при автоімунному гемолізі.

Визначення частки CD55+ та CD59+ еритроцитів і рівня експресії на них комплемент-регуляторних протеїнів дозволяє виділити нові патогенетичні чинники автоімунного гемолізу та є перспективним діагностичним показником гостроти перебігу й ефективності лікування АІГА.

References (список літератури)

- Guseva SA, Goncharov YaP. [Autoimmune hemolytic anemia: diagnosis and treatment (lecture)]. *Ukrainian Journal of Hematology and Transfusiology*. 2012; 1:34-50.
- Greer JP, Foerester J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F. *Wintrobe's clinical hematology*. Philadelphia: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2004. pp. 1142-1182.
- Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I. *Immunology (7th Ed.)*. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2006. pp. 203-213.
- Drannik GN, Drannik AG. *Klinicheskaya immunologia i allergologia* [Clinical Immunology and Allergology]. Kiev: Poligraf plus Publ., 2011. 562 p.
- Alekseev NA. *Anemii* [Anemia]. Sankt-Peterburg: Hippokrat Publ., 2004. 510 p.
- Barros MMO, Yamamoto M, Figueiredo MS, Cançado R, Kimura EYS, Langhi DMJR, Chiatton CS, Bordin JO. Expression levels of CD47, CD35, CD55, and CD59 on red blood cells and signal-regulatory protein-a,b on monocytes from patients with warm autoimmune he-

molytic anemia. *Transfusion*. 2009; 49(1):154-160.

- Ruiz-Arguelles A, Llorente L. The role of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias. *Autoimmun. Rev*. 2007; 6(3):155-161.
- Ruiz-Delgado GJ, Vázquez-Garza E, Méndez-Ramírez N, Gómez-Almaguer D. Abnormalities in the expression of CD55 and CD59 surface molecules on peripheral blood cells are not specific to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology*. 2009;14(1):33-37.
- Blanchard D, Navenot JM, Petit-Le Roux Y, Willem C, Loirat MJ. Flow cytometry and immunoblotting analysis of monoclonal antibodies directed to complement regulatory proteins. *Transfus. Clin. Biol*. 1997;4(1):131-134.
- Donskov SI, Morokov VA. *Gruppy krovi cheloveka* [Human blood group]. Moskva: IP Skorokhodov Publ., 2011. 1015 p.

(received 16.11.2014, published online 30.06.2015)

(отримано 16.11.2014, опубліковано 30.06.2015)

