УДК 616-097.3: [617-001.17+616.71-018.46-002

СОДЕРЖАНИЕ ДУБЛЬ-ПОЗИТИВНЫХ CD4+CD8+ ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ТЯЖЕЛООБОЖЖЕННЫХ И БОЛЬНЫХ С ОСТЕОМИЕЛИТОМ

Лебедев М.Ю., Шолкина М.Н., Живцов О.П.

ФГБУ ННИИТО Минздрава России, Нижний Новгород, e-mail: nniito@rambler.ru

Обнаруживаемые в периферической крови дубль-позитивные $CD4^+CD8^+$ лимфоциты являются высокодифференцированными клетками памяти, которые имеют большое значение в развитии реакций адаптивного иммунитета в ответ на различные инфекционные агенты. Авторами было выдвинуто предположение, что патологии с ярко выраженными инфекционными процессами, такие как ожоговая болезнь и хронический остеомиелит на стадии обострения, могут сопровождаться изменениями содержания этих клеток в периферической крови, которые могут иметь корреляции с уровнем в крови Т-лимфоцитов и их основных субпопуляций. С помощью многоцветной проточной цитометрии было изучено содержание $CD4^+CD8^+$, $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов у 20 тяжелообожженных и 20 больных с хроническим остеомиелитом в стадии обострения. В качестве контроля обследовали 10 здоровых добровольцев. Выявлено, что у пациентов с термической травмой уровень $CD4^+CD8^+$ Т-лимфоцитов не отличался от нормальных показателей. У пациентов с обострением хронического остеомиелита имелась тенденция к увеличению $CD4^+CD8^+$ Т-лимфоцитов с фенотипом CD4 highCD8low. Не было выявлено зависимости числа $CD4^+CD8^+$ клеток от возраста и частоты обострений остеомиелита. В обеих группах исследования корреляционных взаимоотношений между числом дубль-позитивных клеток и содержания $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов обнаружено не было. Полученные результаты указывают на то, что содержание $CD4^+CD8^+$ Т-лимфоцитов в периферической крови тяжелообожженных и больных с хроническим остеомиелитом является стабильным показателем, участие которого в механизмах противоинфекционного иммунитета при данных патологиях еще предстоит выяснить.

Ключевые слова: CD4+CD8+ лимфоциты, ожоги, хронический остеомиелит

CONTENT OF DOUBLE-POSITIVE CD4+CD8+ LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH SEVERE BURNS AND PATIENTS WITH OSTEITIS

Lebedev M.Y., Sholkina M.N., Zhivshov O.P.

Nizhny Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Nizhny Novgorod, e-mail: info@nniito.ru

Double-positive $CD4^+CD8^+$ lymphocytes detected in peripheral blood are well-differentiated memory cells being of considerable importance in adaptive immunity reaction progression in response to various infectious agents. The authors made an assumption that pathologies with florid infections, such as burn disease and chronic osteitis in the exacerbation phase may be accompanied by alterations in content of these cells in peripheral blood; the cells can correlate with T-lymphocytes and their general subsets' level in blood. By means of multicolor flow cytometry content of $CD4^+CD8^+$, $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD8^+$ lymphocytes of 20 patients with severe burns and 20 patients with chronic osteitis in the exacerbation phase was analyzed. For control purposes 10 healthy subjects were examined. It was revealed that in case of patients having heat injuries $CD4^+CD8^+$ T-lymphocytes level did not diverge. In case of patients with chronic osteitis in the exacerbation phase the trend was towards expansion in the number of $CD4^+CD8^+$ T-lymphocytes with CD4 highCD8low phenotype. The dependence of $CD4^+CD8^+$ cells' number on the age and osteitis exacerbation incidence was not revealed. In both study groups correlation relationships between the number of double-positive cells and content of $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD8^+$ lymphocytes was not revealed. The obtained results show that content of $CD4^+CD8^+$ T-lymphocytes in peripheral blood of patients with severe burns and patients with chronic osteitis is stable; the role of the content in anti-infective immunity mechanisms in case of such pathologies is still to be clarified.

Keywords: CD4+CD8+ lymphocytes, burns, chronic osteitis

Ожоговая болезнь и обострение хронического остеомиелита протекают на фоне выраженных изменений в иммунной системе, признаком которых являются изменения в популяционном составе лимфоцитов периферической крови [1, 2, 5, 8]. Для оценки состояния клеточного звена иммунной системы в клинической практике имеет широкое распространение изучение пяти основных популяций лимфоцитов: Т-клеток, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и NK-клеток. Вместе с тем становится ясным, что заметную роль в развитии иммунных нарушений могут принимать «редкие» субпопуляции лимфоцитов [6].

Мембранные молекулы CD4 и CD8 являются ко-рецепторами комплекса TCR-CD3 и рассматриваются как основные маркеры определения Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов. До недавнего времени считалось, что одновременно CD4 и CD8 появляются на мембране лимфоцитов только на стадии β-селекции при их развитии в тимусе. Обнаружение $CD4^+CD8^+$ клеток в периферической крови считалось неким артефактом, связанным с преждевременным выходом незрелых лимфоци-

тов из тимуса [4, 10] или признаком активации цитотоксических Т-лимфоцитов [9]. К настоящему времени установлено, что представители данной субпопуляции лимфоцитов являются высокодифференцированными клетками памяти [3]. Исследователи выделяют несколько вариантов фенотипа $CD4^{+}CD8^{+}$ клеток, таких как $CD4^{dim}CD8^{bright}$ (или $CD4^{low}CD8^{high}$) и $CD4^{bright}$ $CD8^{dim}$ ($CD4^{high}CD8^{low}$). Помимо человека фенотип $CD4^{bright}CD8^{dim}$ часто встречается в крови экспериментальных животных: свиней, цыплят, крыс и мышей, приматов [9]**.** Имеются сведения об увеличении $CD4^{+}CD8^{+}$ лимфоцитов в периферической крови при различных патологических состояниях, например, мононуклеозе, вызванном вирусом Эбштейна-Барра, ВИЧ-инфекции, хроническом лимфолейкозе, миастении, рассеянном склерозе, идиопатической тромбоцитопенической пурпуре и др. [9]. Значение увеличения количества этих клеток остается во многом необъяснимым, хотя считается, что дубль-позитивные Т-лимфоциты могут иметь большое значение в реакциях адаптивного иммунитета в ответ на различные инфекционные агенты [3]. Сведений о количестве $CD4^{+}CD8^{+}$ лимфоцитов в периферической крови пациентов с ожоговой травмой и хроническими остеомиелитами, патологиями с ярко выраженными инфекционными процессами в доступной литературе найти не удалось.

Целью данной работы явилось проведение анализа количественного содержания дубль-позитивных Т-клеток и их фенотипа, а также числа $CD3^{+}$, $CD4^{+}$и $CD8^{+}$ лимфоцитов в периферической крови тяжелообожженных больных и пациентов с хроническими остеомиелитами в период обострения заболевания.

Материалы и методы исследования

Исследованы образцы крови 20 пациентов с термической травмой (все пациенты с благоприятным исходом ожоговой болезни) и 20 пациентов с обострением хронического остеомиелита. Возраст больных варьировался от 37 до 75 лет. Все пациенты получали стандартное лечение, включающее оперативные вмешательства и медикаментозную терапию. Специфических иммуномодуляторов не использовали. Образцы для исследований забирали в утренние часы одновременно с плановыми анализами. В качестве образцов использовали цельную кровь из периферической вены с добавлением антикоагулянта ЭДТА-К3. Исследования проводили при поступлении пациентов в стационар (для пострадавших от ожога в период ожогового шока) и перед выпиской больных из стационара после полного курса терапевтических и хирургических мероприятий. В качестве контроля исследовали 10 образцов периферической крови здоровых волонтеров. Анализ выполняли в день поступления образца в лабораторию. Использовался метод многоцветного анализа на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter). В качестве реагентов использовали четырехцветную панель моноклональных антител против CD45 (меченых – FITC), CD4 (меченых –PE), CD8 (меченых –ECD) и CD3 (меченных–PC5). Все реагенты производства «Beckman Coulter». Двойная экспрессия CD4 и CD8 выявлялась гейтированием по $CD45^{+}$ лимфоцитам. Результаты выражали в процентном содержании клеток.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ SPSS-14. При анализе взаимосвязей использовали коэффициент корреляции Пирсона. Уровень статистической значимости принимали равным 0,05. Результаты описаны средним и стандартным отклонением ($M \pm \sigma$).

Результаты исследования и их обсуждение

В группе здоровых добровольцев содержание $CD4^{+}CD8^{+}$ клеток в периферической крови было стабильным показателем и составило $0,7 \pm 0,2$ % от общего количества лимфоцитов, что в целом соответствует литературным данным [3]. Во всех случаях выявлялись клетки как с фенотипом $CD4^{high}CD8^{low}$, так и $CD4^{low}CD8^{high}$ в соотношении примерно 1:1.

У пациентов с термической травмой количество дубль-позитивных $CD4^{+}CD8^{+}$ лимфоцитов практически не отличалось от нормальных значений (табл. 1). Соотношение фенотипов $CD4^{high}CD8^{low}$ и $CD4^{low}CD8^{high}$ повторяло картину у здоровых добровольцев. Содержание этих клеток и соотношение фенотипов при поступлении и на момент выписки пациента из стационара находилось на одном уровне. Из всей группы ожоговых больных только у одного пациента уровень дубль-позитивных лимфоцитов на момент поступления превысил нормальные значения в четыре раза и оставался таковым к моменту выписки из стационара. Из сопутствующих заболеваний у пострадавшего выявлен хронический бронхит, который, вероятно, и мог послужить причиной повышения содержания клеток памяти в крови. Одновременно у других пострадавших, имевших подобное сопутствующее заболевание, бронхит не сопровождался повышением количества изучаемых клеток. Можно предположить, что ожоговая травма и проводимое по этому поводу лечение не приводили к количественному изменению $CD4^{+}CD8^{+}$ клеток в периферической крови обожженных.

Содержание Т-лимфоцитов, их основных субпопуляций и показатель иммунорегуляторного индекса также не имели достоверных различий от нормальных показателей в указанные сроки исследования.

Проведенный корреляционный анализ не выявил достоверных взаимоотношений между количеством $CD4^{+}CD8^{+}$ клеток и уровнем других изучаемых показателей.

Таблица 1

Содержание субпопуляций лимфоцитов в крови тяжелообожженных пациентов (%)

Показатель	Норма	При поступлении	Перед выпиской
$CD3^+$ клетки	70 ± 5,3	70,0 ± 7,1	69,9 ± 9,4
$CD4^+$ клетки	41,5 ± 5,7	43,9 ± 7,4	45,0 ± 9,8
$CD8^+$ клетки	27,4 ± 3,4	24,7 ± 7,2	25,4 ± 7,0
CD4/CD8	1,5-2,6	1,9 ± 0,7	1,9 ± 1,0
$CD4^+CD8^+$ клетки	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,9	0,9 ± 1,0

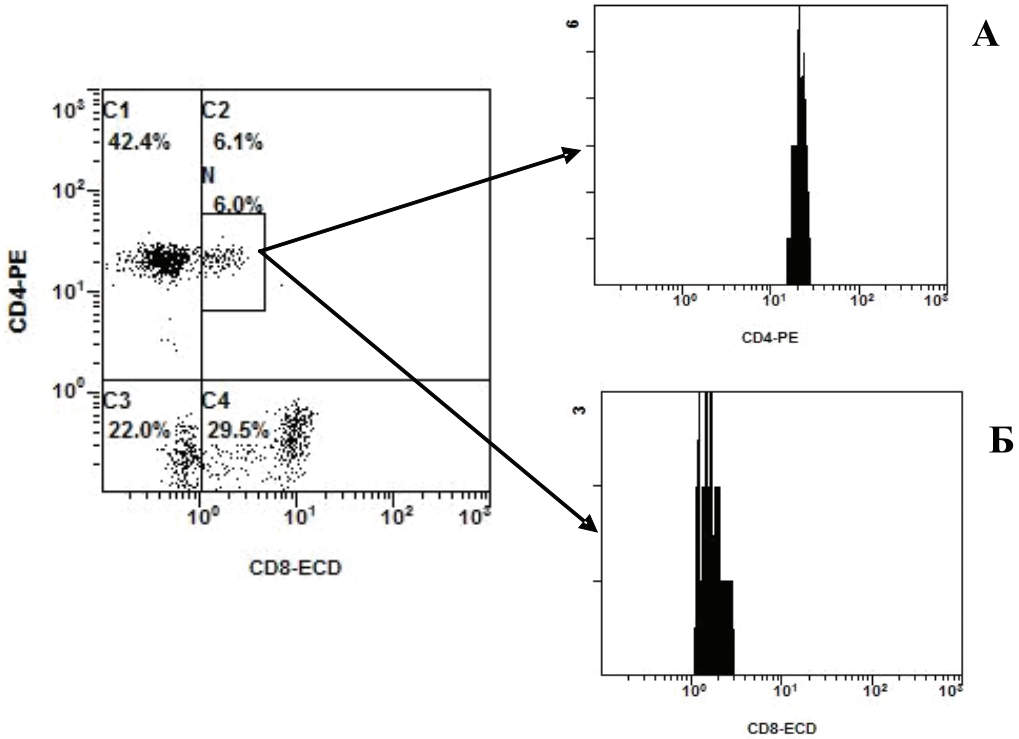
У пациентов с обострением хронического остеомиелита содержание $CD4^+CD8^+$ лимфоцитов в периферической крови имело тенденцию к увеличению как по сравнению с нормальными значениями, так и по сравнению с ожоговыми (табл. 2).

Таблица 2

Содержание субпопуляций лимфоцитов в крови пациентов с остеомиелитом (%)

Показатель	Норма	При поступлении	Перед выпиской
$CD3^+$ клетки	70 ± 5,3	76,7 ± 6,6	78,4 ± 4,6
$CD4^+$ клетки	41,5 ± 5,7	45,4 ± 7,7	48,6 ± 8,4
$CD8^+$ клетки	27,4 ± 3,4	28,6 ± 9,9	32,4 ± 8,7
CD4/CD8	1,5-2,6	1,7 ± 0,7	1,6 ± 0,6
$CD4^+CD8^+$ клетки	0,7 ± 0,2	1,7 ± 1,9	1,9 ± 2,0

Также как и у ожоговых пациентов, количество дубль-позитивных клеток в периферической крови оставалось одинаковым как при поступлении, так и на момент выписки пациента. При этом в данной группе больных преобладал фенотип $CD4^{high}CD8^{low}$ в соотношении 3:1. Особенно ярко преобладание данного фенотипа выявлялось при высоком содержании $CD4^+CD8^+$ лимфоцитов (рисунок).



Пример высокого содержания дубль-позитивных лимфоцитов с фенотипом $CD4^{high}CD8^{low}$ в периферической крови пациента с хроническим остеомиелитом. На гистограммах А и Б показана интенсивность флоурисценции для молекул CD4 и CD8 соответственно

В группе пациентов с обострением хронического остеомиелита у девяти пациентов обнаружено повышенное содержание дубль-позитивных лимфоцитов. У одного пациента высокие показатели $CD4^{high}CD8^{low}$ клеток выявлены при повторной госпитализации спустя четыре месяца после выписки из стационара, т.е. содержание этих клеток остается стабильным как в период обострения, так и период ремиссии основного заболевания. Не было выявлено зависимости количества $CD4^{+}CD8^{+}$ клеток от возраста, времени нахождения в стационаре и частоты обострений основного заболевания, что частично подтверждает данные Lambert C at al. [7].

Содержание Т-лимфоцитов и их основных субпопуляций имело тенденцию к увеличению перед выпиской пациентов по сравнению с первыми днями после госпитализации. Вероятно, это является реакцией на проведение курса антибиотикотерапии и санации гнойного очага, что приводит к снижению аутоинтоксикации.

Корреляционный анализ не выявил взаимосвязей содержания в периферической крови $CD4^{+}CD8^{+}$ клеток и $CD3^{+}$, $CD4^{+}$ и $CD8^{+}$ лимфоцитов, а также иммунорегуляторного индекса.

Заключение

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что ожоговая болезнь и обострение хронического остеомиелита не оказывают существенного влияния на уровень в крови $CD4^{+}CD8^{+}$ клеток, соответственно количество этих лимфоцитов в периферийном кровотоке больных определяется преморбидным фоном. Среди пациентов с хроническими остеомиелитами повышено число лиц с увеличением содержания в крови дубль-позитивных лимфоцитов по сравнению с ожоговыми больными и здоровыми добровольцами, а также преобладает фенотип $CD4^{high}CD8^{low}$. При изучаемых патологиях содержание $CD4^{+}CD8^{+}$ клеток не имеет корреляционных взаимоотношений с количеством $CD3^{+}$, $CD4^{+}$ и $CD8^{+}$ лимфоцитов. Не удалось выявить зависимости количества $CD4^{+}CD8^{+}$ клеток и их фенотипа от возраста больных, тяжести течения основного заболевания и частоты обострений хронического остеомиелита (для данной категории пациентов). Вероятно, роль, которую могут играть эти клетки в механизмах противоинфекционного иммунитета при развитии ожоговой болезни и хронического остеомиелита еще предстоит выяснить.

Список литературы

1. Allgower M., Schoenenberger G.A., Sparkes B.G. Burning the largest immune organ // Burns. – 1995. – Vol. 21, Suppl. 1. – P. 19–20.

2. A cellular quantitative immune deficiency in chronic post-traumatic osteomyelitis. R Sistermann [et al.] // Unfallchirurg – 1992. – Vol. 95, № 5. – P. 254–258.

3. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions / M. Nascimbeni [et al.] // Blood. – 2004. – Vol. 104, № 2. – P. 478–486.

4. Rat peripheral CD4+CD8+ T lymphocytes are partially immunocompetent thymus-derived cells that undergo postthymic maturation to become functionally mature CD4+ T lymphocytes/ E. Jimenez, [et al.] // J. Immunol. – 2012. – Vol. 168. – P. 5005–5013.

5. Risk Assessment in the Therapy for Osteomyelitis using Immunological Parameters /A.H. Tiemann, [et al.] // Z. Orthop. Unfall. – 2011. – Vol. 149, № 3. – P. 330–335.

6. The role of increased frequency of treg cells in patients with chronic osteomyelitis / Y. Wu [et al.] // Orthopedics. – 2011. – Vol. 34, № 2. – P. 98.

7. Significance of unconventional peripheral CD4+CD8dim T cell subsets/. C. Lambert [et al.] // J. Clin. Immunol. – 2005. – Vol. 25, № 5. – P. 418–427.

8. T lymphocytes in implant-associated posttraumatic osteomyelitis: Identification of cytotoxic T effector cells at the site of infection / C. Wagner [et al.] //Shock. – 2006. – Vol. 25, № 3. – P. 241–246.

9. Upregulation of CD4 on CD8+ T cells: CD4dimCD8bright T cells an activated phenotype of CD8+ T cells / Y.B. Sullivan [et al.] // Immunology. – 2001. – Vol. 103, № 3. – P. 270–280.

10. Zuckermann FA. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. //Vet. Immunol. Immunopathol. – 1999. – Vol. 72, № 1–2. – P. 55–66.

References

1. Allgöwer M., Schoenenberger G.A., Sparkes B.G., *Burns*, 1995, Vol. 21, Suppl. 1, pp. 19–20.

2. Sistermann R., Möllenhoff G., Walz M., Josten C., Muhr G., *Unfallchirurg*, 1992, Vol 95, no. 5, pp. 254–258.

3. Nascimbeni M, Shin EC, Chiriboga L, Kleiner DE, Rehermann B., *Blood*, 2004, Vol. 104, no. 2, pp. 478–486.

4. Jiménez E., Sacedón R., Vicente A., Hernández-López C., Zapata A.G., Varas A., *J. Immunol*., 2012, Vol. 168, pp. 5005–5013.

5. Tiemann A.H., Müller W.L., Wuthe F., Hofmann G.O., Sack U., *Z. Orthop. Unfall*., 2011, Vol. 149, no. 3, pp. 330–335.

6. Wu Y., Tang Y., Liang X., Lin Y., Yang W., Ma Y., Huang L., Yang R., Ye J., Chen K., Shen H., *Orthopedics,* 2011, Vol. 34, no. 2, pp. 98.

7. Lambert C., Ibrahim M., Iobagiu C., Genin C., *J. Clin. Immunol.,* 2005, Vol. 25, no. 5, pp. 418–427.

8. Wagner C., Heck D., Lautenschläger K., Iking-Konert C., Heppert V., Wentzensen A., Hänsch G.M. *Shock*. 2006. Vol. 25, no. 3. pp. 241–246.

9. Sullivan Y.B., Landay A.L., Zack J.A., Kitchen S.G., Al-Harthi L., *Immunology*, 2001, Vol. 103, no. 3. pp. 270–280.

10. Zuckermann F.A., *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999. Vol. 72, no. 1–2. pp. 55–66.

Рецензенты:

Новиков В.В., д.б.н., профессор, директор НИИ молекулярной биологии и региональной экологии, ФГОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород;

Контрощикова К.Н., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой клинической лабораторной диагностики, ФПВК «Нижегородская государственная медицинская академия», г. Нижний Новгород.

Работа поступила в редакцию 30.11.2013.