

DOI: 10.18499/2225-7357-2020-9-3-54-63

УДК 611.41+616.155.294-097.3

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

14.03.02 – патологическая анатомия

© Коллектив авторов, 2020



Характеристика иммуноморфологических процессов в селезенке пациентов с иммунной тромбоцитопенией

Н. С. Федоровская*, Л. М. Железнов, С. В. Петров, В. Б. Зайцев

ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава России, Киров, Россия

Цель исследования – дать характеристику иммуноморфологических процессов в селезенке пациентов с иммунной тромбоцитопенией (ИТП) в зависимости от формы заболевания и ответа на спленэктомию.

Материал и методы. В исследование вошли селезенки 50 больных ИТП, среди которых было 32 женщины (64%) и 18 мужчин (35%). Медиана возраста составила 38.0 (22.8; 52.0) лет. В зависимости от формы заболевания все больные ИТП были разделены на три группы: впервые диагностированная (n=12); персистирующая форма (n=20); хроническая форма (n=18). Все случаи ИТП были разделены на две подгруппы: 1-ю (n=32) – пациенты, у которых после спленэктомии устанавливалась ремиссия; 2-ю – лица с рефрактерным течением заболевания после спленэктомии (n=18). Группа сравнения представлена аутопсийным материалом селезенки 20 человек, не имевших в анамнезе заболеваний системы крови, печени и другой патологии. Медиана возраста – 39 (27; 65) лет. С помощью гистологических, иммуногистохимических и морфометрических методик изучали размеры красной и белой пульпы селезенки, а также ее клеточный состав.

Результаты. У больных ИТП, ответивших на спленэктомию, морфология селезенки характеризовалась как соответствующая I–II этапам иммунного ответа. В подгруппе с рефрактерным течением заболевания и у пациентов с персистирующей формой состояние селезенки соответствовало II–III этапам иммунного ответа, что свидетельствовало о более продолжительном или агрессивном течении болезни. Уменьшение размеров периаартериальных лимфоидных муфт вне зависимости от ответа на спленэктомию по отношению к группе сравнения ($p < 0.05$), является отражением патогенеза заболевания, а также результатом воздействия иммуносупрессивной терапии на Т-клеточную зону белой пульпы. Изменения клеточного состава селезенки у больных ИТП характеризовались увеличением относительного и абсолютного количества В- и Т-лимфоцитов в белой и красной пульпе, макрофагов (CD68⁺) и дендритных клеток (CD35⁺, S100⁺). Повышение содержания в белой и красной пульпе лимфоидных элементов, экспрессирующих CD4⁺, а также CD8⁺ Т-лимфоцитов в красной пульпе свидетельствует о многофакторности развития аутоиммунных расстройств при данном заболевании. Значимое увеличение количества цитотоксических CD8⁺ Т-клеток и CD68⁺ макрофагов в красной пульпе у больных с рефрактерным течением ИТП по сравнению с лицами, ответившими на спленэктомию ($p < 0.05$), свидетельствует, о том, что в разрушении тромбоцитов у пациентов с резистентным к хирургическому лечению течением заболевания наряду с макрофагами активно участвуют и цитотоксические Т-лимфоциты. Определены морфометрические критерии неблагоприятного прогноза течения ИТП после спленэктомии.

Ключевые слова: селезенка, иммунная тромбоцитопения, иммуногистохимия, морфометрия.

Characteristics of Immunomorphological Processes in the Spleen of Patients with Immune Thrombocytopenia

© N. S. Fedorovskaya*, L. M. Zheleznov, S. V. Petrov, V. B. Zaitsev, 2020

Kirov State Medical University, Kirov, Russia

The aim of the study was to characterize the immunomorphological processes in the spleen of patients with immune thrombocytopenia depending on the form of the disease and the response to splenectomy.

Material and methods. The study included the spleens of 50 patients with immune thrombocytopenia, including 32 women (64%) and 18 men (35%). The median age was 38.0 (22.8; 52.0) years. Depending on the form of the disease, all patients with immune thrombocytopenia were divided into three groups: first diagnosed disease (n=12); persistent form (n=20); and chronic form (n=18). All cases of immune thrombocytopenia were divided into two subgroups: 1 (n=32) – patients who were in remission after splenectomy; 2 (n=18) – people with refractory disease after splenectomy. The comparison group was represented by spleens autopsy material of 20 people who had no history of blood system and liver diseases, or other pathology. The median age was 39 (27; 65) years. Histological, immunohistochemical, and morphometric methods were used to study the size of the red and white spleen pulps, as well as their cellular composition.

Results. In patients with immune thrombocytopenia who responded to splenectomy, the spleen morphology was characterized as corresponding to stages I–II of the immune response. In the subgroup with a refractory course of the disease and in patients with a persistent form, the condition of the spleen corresponded to stages II–III of the immune response, which indicated a longer or aggressive course of the disease. Reducing the size of

the periarterial lymphoid muffs, regardless of the response to splenectomy in relation to the comparison group ($p < 0.05$), reflects the pathogenesis of the disease and presents the effect of immunosuppressive therapy on T-cell area of white pulp. Changes in the cell composition of the spleen in patients with immune thrombocytopenia were characterized by an increase in the relative and absolute number of B and T lymphocytes in the white and red pulps, macrophages (CD68⁺) and dendritic cells (CD35⁺, S100⁺). An increase in the content of lymphoid elements expressing CD4⁺ in white and red pulps, as well as CD8⁺ T-lymphocytes in the red pulp indicates a multifactorial development of autoimmune disorders in this disease. A significant increase in the number of cytotoxic CD8⁺ T cells and CD68⁺ macrophages in the red pulp in patients with refractory course of immune thrombocytopenia compared to those who responded to splenectomy ($p < 0.05$) indicates that cytotoxic T-lymphocytes along with macrophages are actively involved in the destruction of platelets in patients resistant to the surgical treatment of the disease. Morphometric criteria for unfavorable prognosis of immune thrombocytopenia after splenectomy were determined.

Key words: spleen, immune thrombocytopenia, immunohistochemistry, morphometry.

*Автор для переписки:

Федоровская Надежда Станиславовна
Кировский государственный медицинский университет,
ул. К. Маркса, 112, Киров, 610998, Российская Федерация

*Corresponding author:

Nadezhda Fedorovskaya
Kirov State Medical University, ul. K. Marksa, 112, Kirov,
610998, Russian Federation

E-mail: fednadst@mail.ru

зависимости от формы заболевания и ответа на спленэктомию.

Материал и методы исследования

В исследование вошли селезенки 50 пациентов с ИТП. Возраст пациентов варьировал от 18 до 66 лет на момент постановки диагноза. Медиана возраста составила 38.0 (22.8; 52.0) лет. Преобладали лица женского пола – 32 (64%), мужчин было 18 (36%). Все пациенты с ИТП были разделены на три группы в зависимости от формы заболевания: впервые диагностированная ($n=12$); персистирующая форма ($n=20$); хроническая форма ($n=18$). Кроме того, все случаи ИТП были разделены на подгруппы в зависимости от эффективности спленэктомии. В 1-ю подгруппу вошли пациенты, у которых после спленэктомии установилась ремиссия ($n=32$); 2-ю подгруппу составили лица ($n=18$) с рефрактерным течением заболевания после удаления селезенки. Группу сравнения составили препараты селезенки (аутопсийный материал), взятые от 20 лиц, скончавшихся скоропостижно и не имевших в анамнезе, заболеваний печени, системы крови, инфекционной и другой патологии, оказывающей влияние на структуру селезенки. Медиана возраста – 39 (36.3; 50.5) лет. Мужчин – 12 (60.0%), женщин – 8 (40.0%).

В настоящем исследовании для решения поставленных задач был использован комплекс морфологических методов. Препараты селезенки, приготовленные по общепринятым методикам для гистологического исследования, окрашивали гематоксилином и эозином. ИГХ окрашивание проводилось с помощью иммунопероксидазного метода. После депарафинирования и обезвоживания, срезы, с целью демаскировки антигенных детерминант подвергали температурной обработке в цитратном буфере, поместив образцы тканей в Деклокинг. После отмывания в Трис-буферном растворе срезы обрабатывали 0.3% H_2O_2 в течение 30 мин с целью блокировки эндогенной пероксидазы. Затем промывали в Трис-буферном растворе и наносили первичные антитела. Перечень антител, используемых в работе при ИГХ окрашивании

Введение

В литературе практически отсутствуют работы, посвященные характеристике иммунноморфологических процессов в селезенке в зависимости от этапов иммунного ответа. Имеющиеся данные о размерах и структурных компонентах пульпы и количественном составе иммунокомпетентных клеток в компартментах органа малочисленны и носят, как правило, разрозненный характер [2, 4].

Спленэктомия как хирургический метод лечения иммунной тромбоцитопении (ИТП) применяется в комплексе с иммуносупрессивной терапией [3, 9, 13, 19, 22]. При ИТП спленэктомия дает самую высокую степень долгосрочного ответа (50–70% случаев) по сравнению с другими методами лечения [9, 11, 13, 14, 17]. Однако в 23% случаев наступают рецидивы, причем, в течение 48 месяцев после операции у 80% пациентов [27]. До сих пор нет четкого представления о том, какие иммунноморфологические процессы приводят к резистентности к проводимой терапии. Изучение структуры селезенки при ИТП является очевидным для уточнения механизмов возникновения рефрактерных форм данной патологии. Применение методов иммуногистохимии (ИГХ) и компьютерной морфометрии может оказать существенную помощь в решении этих вопросов. Выявление особенностей гистоархитектоники селезенки обосновывают способы определения прогноза течения ИТП после спленэктомии, что является актуальным и имеет важное фундаментальное и практическое значение.

Цель исследования – дать характеристику иммунноморфологических процессов в селезенке при иммунной тромбоцитопении в

Таблица 1

Характеристика используемых в работе антител

Антитела	Клон	Производитель	Маркируемые клетки
CD20	L26	Dako, Дания	В-лимфоциты
CD3	PS1	Dako, Дания	Общая популяция Т-лимфоцитов
CD4	4B12	BioGenex, США	Т-хелперы
CD8	C8/144B	Dako, Дания	Цитотоксические Т-лимфоциты
CD68	PG-M1	Dako, Дания	Тканевые макрофаги
CD11c	5D11	Monosan, Нидерланды	Дендритные клетки, гистиоциты
MAC387	MAC387	Dako, Дания	Гранулоциты, клетки моноцитарно-гистиоцитарного ряда
MPO	polyclone	Dako, Дания	Гранулоциты
S100	polyclone	Dako, Дания	Интердигитальные дендритные клетки
CD35	RLB25	BioGenex, США	Фолликулярные дендритные клетки
Factor VIII	polyclone	Dako, Дания	Эндотелиоциты, мегакариоциты

представлен в табл. 1. Инкубацию с первичными антителами выполняли во влажной камере в среднем от 30 до 45 мин при комнатной температуре. После промывания препаратов в Трис-буферном растворе наносили систему визуализации EnVision+ (Dako), инкубация 30 мин. Выявление пероксидазной активности осуществляли с помощью DAB+(Dako). Докрашивали срезы гематоксилином. При просмотре препаратов антигенпозитивные клетки распознавали по окрашиванию их структур в желто-коричневый цвет.

Морфометрические методы осуществлялись с помощью светового микроскопа "Leica" (Германия) с программным обеспечением анализа изображений ImageScope Color, версии M (в 20 полях зрения, об. $\times 10$, $\times 20$, $\times 100$, ок. $\times 10$).

В исследуемом гистологическом материале селезенки при ИГХ окрашивании и морфометрии получены численные значения площадей компартментов функциональных зон, а также популяций иммунокомпетентных клеток в относительных (%) и абсолютных значениях. Такой пересчет морфометрических показателей с учетом массы органа явился принципиально новым методическим подходом к пониманию особенностей гистоархитектоники селезенки [4].

Оценку реактивных изменений, происходящих в селезенке при ИТП, проводили с учетом миграционных свойств иммунокомпетентных клеток в компартментах органа в комплексном сопоставлении с их функциями. Характерные морфологические особенности селезенки у пациентов с различными формами ИТП, а также в зависимости от ответа на хирургическое лечение сопоставляли с этапами иммунного ответа [4].

Статистическая обработка результатов исследования включала описание и анализ полученных данных. Для оценки статистической значимости различий между количественными показателями в сравниваемых группах использовали непараметрические двусторонние критерии: Краскела–Уоллиса (множе-

ственные сравнения), Манна–Уитни с поправкой Бонферони (апостериорные сравнения между отдельными выборками после применения критерия Краскела–Уоллиса). Количественные данные представлены медианой, а также нижним (25%) и верхним (75%) квартилями для каждой группы. Для оценки статистической значимости различий выборочных качественных признаков использовался метод χ^2 с поправкой на непрерывность Йетса. В качестве критического уровня статистической значимости (p) различий выборочных данных взято значение $p < 0.05$. Статистическая обработка выполнена с помощью программы «STATISTICA Advanced 10 for Windows Ru», лицензионный номер 136-394-673.

Исследования проводились при строгом соблюдении международных регламентов биоэтики. Протокол проведения исследований был одобрен комиссией локального этического комитета ФГБОУ ВО Кировский ГМУ Минздрава России (протокол № 02/2018).

Результаты и их обсуждение

Морфологические изменения селезенки при ИТП характеризовались увеличением размеров белой пульпы (БП) при персистирующей и хронической формах по отношению к группе сравнения ($p < 0.05$), вне зависимости от ответа на спленэктомию, преимущественно за счет расширения маргинальной зоны (МЗ) (табл. 2, 3). У пациентов с впервые диагностированной формой болезни статистически значимых различий данных показателей установлено не было ($p > 0.05$).

Полученные результаты свидетельствуют об активности иммунных процессов в компартменте, в котором происходят взаимодействия макрофагов и лимфоцитов с антигенами, продукция антител и иммунных медиаторов, а также депонирование тромбоцитов. Изменения БП и МЗ при ИТП были отмечены многими авторами [12, 28], вместе с тем, наши наблюдения, связанные с формами болезни и

Таблица 2

Относительные и абсолютные значения размеров отделов белой пульпы селезенки больных иммунной тромбоцитопенией в зависимости от формы заболевания (Ме (Q₁; Q₃))

Показатели		Группа сравнения, n=20	Характеристика групп			
			Все пациенты, n=50	Впервые диагностированная, n=12	Персистирующая форма, n=20	Хроническая форма, n=18
БП	%	10.6 (9.5; 12.5)	15.1 (10.3; 18.0)*	10.4 (8.0; 14.2)	16.1 (10.2; 21.9) *	17.3 (12.1; 18.0) *
	г	13.1 (11.9; 1.9)	20.9 (13.9; 34.8)*	17.3 (12.6; 38.2)	21.8 (13.8; 39.8) *	23.9 (14.0; 28.5) *
МЗ	%	1.2 (0.9; 2.1)	5.5 (3.1; 7.2) *	2.0 (2.0; 5.6)	6.6 (3.1; 8.1) *	5.6 (3.9; 6.4) *
	г	1.5 (0.9; 2.3)	7.8 (5.3; 12.7) *	5.6 (2.2; 12.2) *	11.8 (6.5; 13.2) *	6.6 (5.3; 9.3) *
ПАЛМ	%	3.3 (2.6; 4.6)	1.7 (1.4; 2.0) *	1.6 (1.2; 1.83) *	1.6 (1.2; 2.0) *	2.0 (1.7; 2.3) *
	г	4.6 (3.0; 5.2)	2.6 (2.0; 3.5) *	2.1 (1.7; 3.4) *	2.5 (2.0; 3.2) *	2.6 (2.2; 3.6) *
ЛУ	%	5.8 (4.8; 6.8)	7.6 (5.5; 9.5) *	5.9 (5.2; 7.1) Δ	8.1 (7.1; 9.7) *Δ	7.6 (6.2; 10.5) *
	г	7.5 (5.5; 8.9)	11.0 (6.9; 15.7) *	11.0 (6.43; 19.47) *	14.6 (9.9; 16.8) *	11.7 (6.5; 15.5) *

Примечание: * – статистическая значимость различий по отношению к данным группы сравнения, $p < 0.05$; Δ – статистическая значимость различий между показателями иммунной тромбоцитопении при разных формах заболевания, $p < 0.05$.

Таблица 3

Относительные и абсолютные значения размеров отделов белой пульпы селезенки больных иммунной тромбоцитопенией в зависимости от ответа на спленэктомию (Ме (Q₁; Q₃))

Отделы БП	Ед	Группа сравнения, n=20	Характеристика групп		
			Вся группа, n=50	Ремиссия после спленэктомии (1-я подгруппа), n=32	Рефрактерное течение (2-я подгруппа), n=18
БП	%	10.6 (9.5; 12.5)	15.1 (10.3; 18.0)*	17.1(11.5; 19.6)*Δ	11.6 (9.4; 15.3)Δ
	г	13.1(11.9; 14.9)	20.9 (13.9; 34.8)*	23.2(12.8; 38.2)*	18.3 (13.6; 24.6)*
МЗ	%	1.2 (0.9; 2.1)	5.5 (3.1; 7.2)*	5.7(3.5; 7.5)*	5.6 (3.1; 7.6)*
	г	1.5 (0.9; 2.3)	7.8 (5.3; 12.7)*	7.2(5.3; 12.6)*	8.2(5.9; 12.9)*
ПАЛМ	%	3.3 (2.6; 4.6)	1.7(1.4; 2.0)*	1.8(1.5; 1.9)*	1.5(1.23; 2.0)*
	г	4.6 (3.0; 5.2)	2.6(2.0; 3.5)*	2.3(1.9; 3.5)*	2.6(1.8; 3.6)*
ЛУ	%	5.8 (4.8; 6.8)	7.6 (5.5; 9.5)*	7.8(5.6; 10.3)*	7.4(5.4; 8.1)
	г	7.5 (5.5; 8.9)	11.0(6.9; 15.7)*	14.9(7.6; 16.9)*	12.6(8.6; 14.6)*

Примечание: * – статистическая значимость различий по отношению к показателю группы сравнения, $p < 0.05$; Δ – статистическая значимость различий между показателями при иммунной тромбоцитопении в ремиссии и при рефрактерном течении, $p < 0.05$.

ответом на спленэктомию, уточняют и дополняют сведения, которые в доступной литературе практически отсутствуют.

При анализе структуры МЗ у больных ИТП выявлены признаки нарушения микроциркуляции, маргинальные синусы в селезенках у пациентов с ИТП были деформированы вне зависимости от ответа на хирургическое лечение и формы болезни (рис. 1). Выявленные нами изменения подтверждают данные о патогенетическом усилении васкуляризации МЗ и расширении маргинальных синусов, что ведет к замедлению скорости кровотока и способствует увеличению распознавания антигенов крови макрофагами. Полученные нами результаты дополняют исследования авторов [25], обнаруживших в МЗ большое количество тромбоцитов на разных стадиях разрушения

при которых кровяные пластинки выявлялись как внеклеточно, так и в цитоплазме макрофагов.

В настоящей работе установлено, что размер лимфоидных узелков (ЛУ) был увеличен у всех больных ИТП по отношению к группе сравнения ($p < 0.05$). Вместе с тем, герминативные центры (ГЦ) в ЛУ селезенки у большинства пациентов с ИТП отсутствовали. При сравнении количества ГЦ у лиц с ответом на спленэктомию (1-я подгруппа): 7.9%, по отношению к группам сравнения: 2.8% ($\chi^2 = 15.87$; $p = 0.001$) и рефрактерных больных (2-я подгруппа): 2.2% ($\chi^2 = 4.87$; $p = 0.027$) выявлено достоверное увеличение данного показателя в первой подгруппе пациентов. Вместе с тем, ГЦ были небольших размеров, деления на темную и светлую зону (признаков

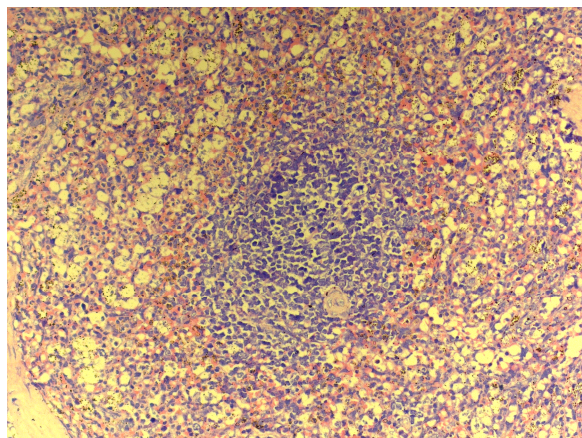


Рис. 1. Персистирующая форма иммунной тромбоцитопении (1-я подгруппа). Признаки нарушения микроциркуляции в маргинальной зоне. «Пенистые» макрофаги, определяются перифолликулярно в красной пульпе. Окраска гематоксилином и эозином. Ок. 10, об. 20.

активных В-клеточных пролиферативных процессов) не было выявлено.

В результате морфометрического исследования периартериальных лимфоидных муфт (ПАЛМ) наблюдалось статистически значимое уменьшение размеров данного компартмента БП у всех обследованных с ИТП вне зависимости от фазы болезни и ответа на спленэктомию по отношению к группе сравнения ($p < 0.05$). Можно предположить, что данные изменения являются следствием перераспределения Т-клеток в красную пульпу (КП), а также результатом предшествующей иммуносупрессивной терапии. Вместе с тем, уменьшение содержания Т-клеток в БП (как в ПАЛМ, так и в ЛУ) свидетельствует о снижении Т-лимфоцитарного контроля, что является морфологическим проявлением патогенеза заболевания.

Обнаружение в селезенке пациентов с ремиссией после спленэктомии (1-я подгруппа) увеличения размеров БП за счет МЗ и ЛУ дает возможность морфологически охарактеризовать состояние органа, как соответствующее I–II этапам иммунного ответа. Это дополняет и уточняет данные литературы о том, что гиперплазия БП коррелирует с лучшим послеоперационным исходом и может служить критерием благоприятного прогноза [12, 28].

Считаем, что достоверное увеличение размеров БП за счет МЗ и ЛУ, а также расширение КП в группе рефрактерных больных, дает возможность расценить состояние селезенки, как соответствующее II–III этапам иммунного ответа, свидетельствующее о более продолжительном или агрессивном течении заболевания. Кроме того, нами отмечено активное воздействие на структуру органа проводимой до операции иммуносупрессивной терапии, которое в большей степени выявляется на ранней стадии заболевания, и у боль-

ных, ответивших на спленэктомию. В ИГХ исследованиях [10] показано, что на структуру селезенки пациентов с ИТП иммуносупрессивная терапия не оказывает влияния. Представленная двойственность ситуации в нашей работе подтверждается тем, что морфологические изменения селезенки зависят от тяжести заболевания.

Расширение КП выявлялось в абсолютных показателях при персистирующей форме ИТП – 115.1 (96.3; 152.4) г по отношению к группе сравнения – 93.1 (86.5; 109.3) г ($p < 0.05$) за счет увеличения клеточности в данной функциональной зоне, что на наш взгляд, предопределяет II–III этап иммунного ответа у этой категории пациентов.

Отек стромы, утолщение и огрубение стенки синусоидов КП (Factor VIII) при впервые выявленной форме, а также более выраженные деформации синусоидов (извитость структуры, расширение просвета), определяющиеся при хронической ИТП, отражают динамику процесса, происходящего в данной функциональной зоне. В нашем исследовании грубые нарушения сосудов КП были обнаружены также у пациентов на ранней стадии течения ИТП, что свидетельствует о наличии «скрытой» фазы аутоиммунного процесса. Полученные результаты уточняют и дополняют изученные ранее характеристики нарастающей дезорганизации соединительной ткани в КП селезенки при ИТП [1].

Исследование содержания клеточного состава в селезенке при ИТП было проведено в 2 подгруппах: у пациентов, ответивших на спленэктомию, и лиц с рефрактерной формой заболевания. Увеличение относительного 23.7 (16.0; 27.6)% и абсолютного 32.8 (19.9; 49.9) г количества В-лимфоидных (CD20+) элементов в гистологических срезах селезенки у больных ИТП по отношению к группе сравнения 8.8 (7.0; 10.9)% и 11.2 (7.5; 16.2) г, соответственно ($p < 0.05$), подтверждает участие В-лимфоцитов в патогенезе данного заболевания, вне зависимости от ответа на спленэктомию. Изменения были обнаружены в БП и КП органа. Наши данные согласуются с исследованиями A.Solanilla et al. (2005), в которых показано, что при ИТП ассоциированный с тромбоцитами CD154 способствует активации аутореактивных В-лимфоцитов [23]. В селезенке происходит взаимодействие между активированными тромбоцитами и В-лимфоцитами, и, соответственно, образование антитромбоцитарных антител при данной патологии (рис. 2).

При исследовании содержания общей популяции Т-лимфоцитов выявлено увеличение количества CD3+-клеточных элементов (в относительных и абсолютных значениях) у всех больных ИТП: 17.6 (14.4; 21.7)%; 27.4 (22.7; 32.9) г, по отношению к группе сравнения: 4.8 (1.1; 5.8)%; 8.3 (5.4; 11.0) г

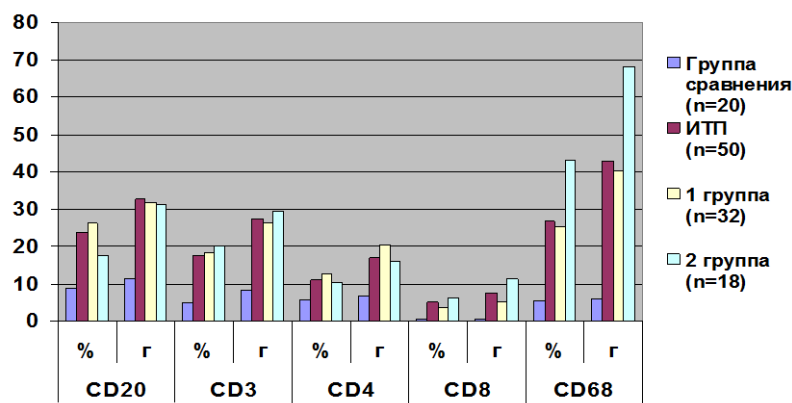


Рис. 2. Сравнительная характеристика содержания основных клеточных популяций в селезенке больных иммунной тромбоцитопенией.

соответственно, вне зависимости от ответа на спленэктомию, $p < 0.05$. О наличии данных изменений у больных ИТП свидетельствуют работы многих авторов [18, 19, 21, 26].

Увеличение содержания $CD4^+$ Т-лимфоцитов у пациентов с ИТП определялось в селезенке в относительных – 11.1 (8.8; 14.6)%, а также в абсолютных – 16.9 (12.3; 21.9) г значениях, по отношению к группе сравнения 5.5 (4.2; 7.4)% и 6.7 (4.8; 9.4) г, соответственно ($p < 0.05$). Вместе с тем, рефрактерная форма заболевания наблюдалась чаще всего при показателях массы $CD4^+$ Т-лимфоцитов в селезенке менее и равной 20.5 г [5]. Более низкие значения $CD4^+$ Т-клеток выявлялись в БП органа у рефрактерных больных 4.1 (3.8; 5.0) г по отношению к пациентам с ответом на спленэктомию 9.9 (5.8; 13.6) г, ($p < 0.05$); при 1.6 (1.2; 2.8) г в группе сравнения ($p < 0.05$). В КП увеличенные показатели таковых отмечались у всех пациентов с ИТП, независимо от ответа на спленэктомию, как в относительных 10.1 (7.1; 11.5)%, так и в абсолютных значениях 11.93 (7.0; 14.2) г по отношению к группе сравнения 4.6 (4.0; 6.8)%; 4.9 (3.2; 6.2) г, соответственно ($p < 0.05$).

В исследованиях S. Audia (2014) показано, что фолликулярные Т-хелперы, наблюдаемые в большем количестве в центрах размножения лимфоидных узелков селезенки у больных ИТП, являются основными $CD4^+$ клетками, активирующими выработку антител антигенспецифическими В-лимфоцитами [8]. Обнаруженные нами более низкие значения $CD4^+$ Т-клеток в БП, соответствующие рефрактерному течению заболевания, обосновывают участие в патогенезе ИТП других субпопуляций Т-клеток, влияющих на ответ на спленэктомию. Снижение субпопуляций фолликулярных Т-хелперов и Т-регуляторных клеток в ЛУ при ИТП было отмечено С. Daridon и соавт. (2012), чем авторы объясняют дефект Т-клеточного контроля. Причем в ЛУ с отсутствующими ГЦ при ИТП, в IgM с иммунными комплексами, плотно связанными с фолликулярными дендритными клетками (ДК), приближенными к пролиферирующим В-лимфоцитам, были обнаружены

аутоантигены гликопротеина тромбоцитов (GP) IIb/IIIa, а также GPIV [10].

Увеличение количества $CD8^+$ Т-лимфоцитов селезенки выявлялось у всех пациентов с ИТП в относительных 5.1 (2.8; 6.1)% и в абсолютных 7.7 (4.2; 12.0) г значениях по отношению к группе сравнения 0.5 (0.3; 0.9)%; 0.6 (0.4; 1.1) г соответственно ($p < 0.05$). Масса данных клеток в селезенке, превышающая 9.75 г, указывала на неблагоприятный прогноз заболевания после спленэктомии [6]. Различия в содержании $CD8^+$ Т-клеток в абсолютных цифрах были выявлены преимущественно в КП у пациентов с рефрактерным течением заболевания 10.1 (8.6; 15.9) г по отношению к обследованным, ответившим на спленэктомию 5.0 (2.3; 7.0) г, $p < 0.05$. Существенное увеличение количества $CD8^+$ Т-клеток в КП позволило сделать вывод о том, что в разрушении тромбоцитов у рефрактерных больных активно участвуют цитотоксические лимфоциты наряду с макрофагами.

Вычисление индекса соотношения масс $CD4^+/CD8^+$, полученных при морфометрическом исследовании селезенки больных с разным течением ИТП после спленэктомии, показало, что при значениях индекса < 2.3 прогнозируется рефрактерная форма заболевания. Величина данного индекса ≥ 2.3 свидетельствует о более благоприятном течении болезни [7]. Обнаружение экспрессии CD8 на клетках ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) в КП, возможно, свидетельствует об ее участии в деструкции тромбоцитов, покрытых антителами (рис. 3). Известно, что при блокаде РЭС происходит сохранение в циркуляции IgG-сенсibilизированных тромбоцитов, с чем связывают эффект воздействия ГКС, применяемых в качестве терапии первой линии [16].

Прямую зависимость активности аутоиммунного процесса от состояния макрофагального звена селезенки при ИТП подтверждает достоверное увеличение содержания $CD68^+$ клеточных элементов у всех пациентов с ИТП в сопоставлении с группой сравнения (табл. 4). Подтверждением являются также установленные различия показателей

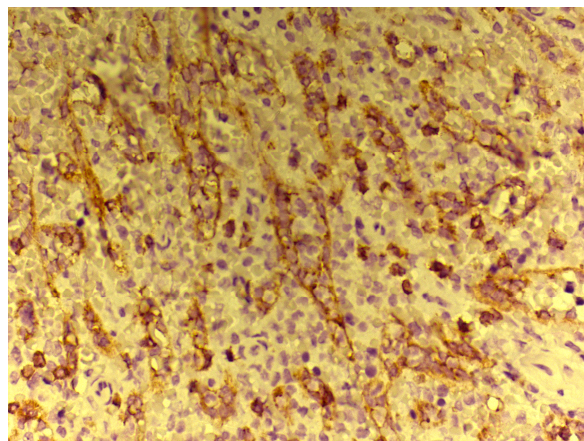


Рис. 3. Хроническая форма иммунной тромбоцитопении (2-я подгруппа). Цитотоксические Т-лимфоциты, окраска CD. Эндотелий синусоидов экспрессирует CD8. «Dako», ИПМ. Ок. 10, об. 40.

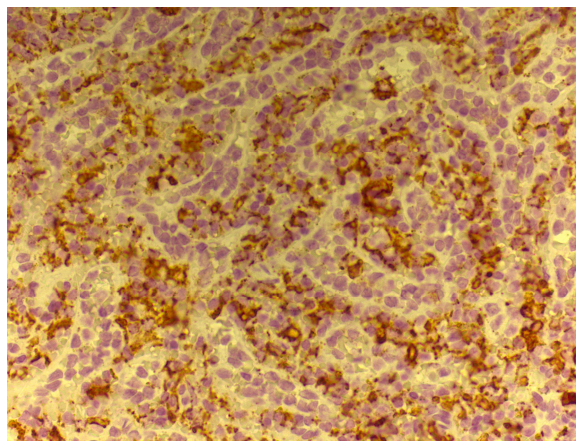


Рис. 4. Хроническая фаза иммунной тромбоцитопении (2-я подгруппа). Макрофаги, окраска CD68, определяются в красной пульпе вдоль синусоидов. «Dako», ИПМ. Ок. 10, об. 40.

Таблица 4

Содержание в селезенке популяций клеток системы мононуклеарных фагоцитов и дендритных клеток у больных иммунной тромбоцитопенией в зависимости от ответа на спленэктомию (Me (Q₁; Q₃))

Группы исследования	CD68	CD11c	S100	CD35
Группа сравнения (n=20), г	5.9 (4.8;8.9)	13.3 (11.7;17.8)	0.1 (0.07; 0.13)	0.1 (0.08; 0.2)
Ремиссия после спленэктомии (1-я подгруппа), n=32, г	40.3 (34.3;47.6) *Δ	15.5 (9.9;15.7)	0.3 (0.1; 0.3)*	0.4 (0.3; 0.5)*
Рефрактерное течение (2-я подгруппа), n=18, г	68.3 (61.4;73.5) *Δ	10.3 (7.1;14.5)	0.3 (0.1; 0.3)*	0.4 (0.3; 0.5)*

Примечание: достоверность различий * – по отношению к группе сравнения в абсолютных значениях, $p < 0.05$; Δ – между 1-й и 2-й подгруппами в абсолютных значениях, $p < 0.05$

содержания макрофагов в зависимости от ответа после спленэктомии ($p < 0.05$). Кроме того, выявлено большое количество CD68⁺ клеток, расположенных вдоль синусоидов КП (рис. 4), а у части пациентов с ИТП – перифолликулярные скопления пенных макрофагов (липофагов) (рис. 1).

Полученные в настоящей работе факты свидетельствуют о том, что данная клеточная популяция (CD68⁺) выполняет основную антиген-презентирующую роль, поддерживающую продукцию анти-тромбоцитарных антител, а также занимает ключевую позицию в разрушении сенсibilизированных кровяных пластинок вследствие опосредованного Fc-рецепторами фагоцитоза [15]. Наши данные не противоречат доказательствам того, что в цитоплазме пенных макрофагов при этом заболевании были обнаружены включения, содержащие фосфолипиды, источником которых может быть фагоцитоз тромбоцитов [24]. Вместе с тем, новой важной дополнительной информацией являются полученные различные количественные результаты макрофагальных элементов в КП у пациентов с ИТП в зависимости от ответа на спленэктомию.

Установленное в настоящей работе увеличение содержания всех популяций иммунокомпетентных клеток (В- и Т-лимфоцитов, макрофагов) в селезенке больных ИТП по отношению к группе сравнения свидетельствует об активных иммунных процессах в этом органе у обследованных пациентов. Известны проведенные В. Olsson (2012) исследования морфологии селезенки, в которых выявлено увеличение количества В-лимфоцитов в КП, вместе с тем, изменений содержания В-клеток в БП и Т-клеток в БП и КП не было найдено [20]. Авторами отмечалось, что в КП число В-клеток увеличивается вместе с Т-хелперами, Т-цитотоксическими лимфоцитами и макрофагами, расположенными вдоль синусоидов, что способствует иммунологической атаке на тромбоциты при ИТП. Полученные при выполнении данного исследования результаты о количественных характеристиках клеточного состава функциональных зон селезенки с использованием массы органа в относительных и в абсолютных величинах, а также изучение распределения иммунокомпетентных клеток в пульпе органа у пациентов с различными ответами на спленэктомию вносят существен-

ные дополнения в имеющиеся в литературе сведения.

Содержание в селезенке незрелых ДК, транспортирующих антигены в данный лимфоидный орган и экспрессирующих CD11c⁺ (маркер рецептора CR4, предназначенного для распознавания опсонизированных клеток и регуляции иммунных процессов), не отличалось от нормальных значений в обеих группах больных ИТП, $p > 0.05$ (табл. 4). При морфометрическом изучении селезенки больных ИТП обнаружено увеличение содержания фолликулярных ДК (CD35) у пациентов с ремиссией после спленэктомии и у рефрактерных больных, а также интердигитальных ДК (S100) в первой и во второй подгруппах, соответственно по отношению к группе сравнения (г), $p < 0.05$. Исследование ДК другими авторами также выявляло повышенное содержание антигенпрезентирующих клеток у больных ИТП [29]. В связи с тем, что данные клеточные элементы отвечают за гистоархитектонику компартментов БП, обнаруженные в настоящей работе изменения содержания ДК свидетельствуют о нарушениях структурирования составляющих БП (отсутствие ГЦ в большинстве ЛУ) при наличии активных иммунных процессов.

Заключение

Полученные нами морфометрические результаты содержания В- и Т-лимфоидных и других популяций в функциональных зонах селезенки в группах с различным ответом на спленэктомию обосновывают необходимость исследования количественных показателей клеточных элементов в абсолютных значениях, которые способствуют получению информативных критериев прогноза в зависимости от динамики процесса.

Результаты изменения морфометрических показателей функциональных зон селезенки при ИТП в относительных и абсолютных величинах в зависимости от формы заболевания и ответа на спленэктомию позволили сформулировать характеристики иммуноморфологических процессов в селезенке пациентов с ИТП.

Выявленное у больных, ответивших на спленэктомию, увеличение размеров белой пульпы за счет маргинальной зоны и лимфоидных узелков, дает возможность морфологически охарактеризовать состояние селезенки, как соответствующее I–II этапам иммунного ответа. Достоверное увеличение размеров белой пульпы за счет маргинальной зоны и лимфоидных узелков, а также расширение красной пульпы в группе с рефрактерным течением заболевания и у пациентов с персистирующей формой позволяет расценивать состояние селезенки как II–III этапы иммунного ответа, что свидетельствует о более про-

должительном или агрессивном течении болезни. Установленное статистически значимое уменьшение размеров периартериальных лимфоидных муфт у всех обследованных с иммунной тромбоцитопенией вне зависимости от ответа на спленэктомию является отражением патогенеза заболевания, а также результатом воздействия иммуносупрессивной терапии на Т-клеточную зону белой пульпы. Изменения содержания клеточного состава в селезенке больных иммунной тромбоцитопенией характеризуются увеличением относительного и абсолютного количества иммунокомпетентных клеток: В- и Т- лимфоцитов в белой и красной пульпе, макрофагов, дендритных клеток, что подтверждает участие данных клеточных популяций в патогенезе заболевания. Увеличение содержания в белой и красной пульпе лимфоидных элементов, экспрессирующих CD4⁺, а также CD8⁺ Т-лимфоцитов в красной пульпе свидетельствует о многофакторности возникновения аутоиммунных расстройств при иммунной тромбоцитопении. Выявленные в белой пульпе у рефрактерных больных более низкие показатели CD4⁺ Т-клеток по сравнению с пациентами, у которых была получена ремиссия после спленэктомии, объясняют патогенетический дефект Т-клеточного контроля, обусловленного субпопуляциями, как фолликулярных Т-хелперов, так и Т-регуляторных клеток. Значимое увеличение количества цитотоксических CD8⁺ Т-клеток и макрофагов в красной пульпе у больных с рефрактерным течением заболевания по сравнению с лицами, ответившими на спленэктомию, свидетельствует о том, что в разрушении тромбоцитов у рефрактерных больных наряду с макрофагами активно участвуют и лимфоциты. Определяющими неблагоприятный прогноз признаками содержания клеточных субпопуляций в селезенке явились: уменьшение массы CD4⁺ лимфоцитов ниже 20.5 г; увеличение массы CD8⁺ лимфоидных клеток более 9.75 г, а также значение индекса соотношения масс CD4⁺/CD8⁺ ниже 2.3.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы/References

1. Анохина Ю.В., Цепя Л.С. Изменения в селезенке при острой форме болезни Верльгофа. Проблемы гематологии. 1969;10:28–31 [Anokhina YuV, Tsepa LS. Izmeneniya v seleezenke pri ostroi forme bolezni Ver'l'gofa. Problemy gematologii. 1969;10:28–31] (in Russian).
2. Волков В.П. Новый алгоритм морфометрической оценки функциональной иммуноморфологии селезенки. Universum: Медицина и фармакология: электрон. научн. журн. 2015;5-6(18) [Volkov VP. Novyi algoritim morfometricheskoi

- otsenki funktsional'noi immunomorfologii селезенки. Universum: Meditsina i farmakologiya: elektron. nauchn. zhurn. 2015;5-6(18)] (in Russian).
3. Донуш Е.К. Современное состояние вопроса об идиопатической тромбоцитопенической пурпуре у детей. Педиатрия. 1999;2:56–77 [Donyush EK. Sovremennoe sostoyanie voprosa ob idiopaticheskoi trombositopenicheskoi purpure u detei. Pediatriya. 1999;2:56–77] (in Russian).
4. Федоровская Н.С., Железнов Л.М., Зайцев В.Б., Дьяковно Д.А., Коледаева Е.В. Морфометрическая характеристика гистоархитектоники селезенки человека. Морфология. 2020;157(1):41–7 [Fedorovskaya NS, Zheleznov LM, Zaitsev VB, Diakonov DA, Koledaeva YeV. Morphometric characteristic of histoarchitectonics of the human spleen. Morfologiya. 2020;157(1):41–7] (in Russian).
5. Федоровская Н.С., Дьяконов Д.А., Федоровская Н.А., Паньков В.Н., Ванеева Е.В. Патент РФ № 2599021; 2016 [Fedorovskaya NS, D'yakonov DA, Fedorovskaya NA, Pan'kov VN, Vaneeva EV. The patent of the Russian Federation № 2599021; 2016] (in Russian).
6. Федоровская Н.С., Дьяконов Д.А., Федоровская Н.А., Паньков В.Н. Патент РФ №2563284; 2015 [Fedorovskaya NS, D'yakonov DA, Fedorovskaya NA, Pan'kov VN. The patent of the Russian Federation №2563284; 2015] (in Russian).
7. Федоровская Н.С., Дьяконов Д.А., Федоровская Н.А., Ванеева Е.В. Патент РФ № 2621627; 2017 [Fedorovskaya NS, D'yakonov DA, Fedorovskaya NA, Vaneeva EV. The patent of the Russian Federation № 2621627; 2017] (in Russian).
8. Audia S, Rossato M, Santegoets K, Spijkers S, Wichers C, Bekker C, et al. Splenic TFH expansion participates in B-cell differentiation and antiplatelet-antibody production during immune thrombocytopenia. Blood. 2014 Oct 30;124(18):2858–66. doi: 10.1182/blood-2014-03-563445
9. Chaturvedi S, Arnold DM, McCrae KR. Splenectomy for immune thrombocytopenia: down but not out. Blood. 2018 Jan 2;131(11):1172–82. doi: 10.1182/blood-2017-09-742353
10. Daridon C, Loddenkemper C, Spiekermann S, Kühl AA, Salama A, Burmester GR, et al. Splenic proliferative lymphoid nodules distinct from germinal centers are sites of autoantigen stimulation in immune thrombocytopenia. Blood. 2012 Dec 13;120(25):5021–31. doi: 10.1182/blood-2012-04-424648
11. Deeg HJ, O'Donnell M, Tolar J, et al. Optimization of conditioning for marrow transplantation from unrelated donors for patients with aplastic anemia after failure of immunosuppressive therapy. Blood. 2006 May 9;108(5):1485–91. doi: 10.1182/blood-2006-03-005041
12. Furudoï A, Rivière É, Lazaro E, Furudoï E, Viallard J-F, Parrens M. Adult Primary Immune Thrombocytopenia. The American Journal of Surgical Pathology. 2018 Mar;42(3):401–12. doi: 10.1097/pas.0000000000000994
13. Ghanima W, Godeau B, Cines DB, Bussel JB. How I treat immune thrombocytopenia: the choice between splenectomy or a medical therapy as a second-line treatment. Blood. 2012 Aug 2;120(5):960–9. doi: 10.1182/blood-2011-12-309153
14. Guan Y, Wang S, Xue F, Liu X, Zhang L, Li H, et al. Long-term results of splenectomy in adult chronic immune thrombocytopenia. European Journal of Haematology. 2016 Nov 7;98(3):235–41. doi: 10.1111/ejh.12821
15. Johnsen J. Pathogenesis in immune thrombocytopenia: new insights. Hematology. 2012 Dec 8;2012(1):306–12. doi: 10.1182/asheducation.v2012.1.306.3798320
16. Kelton J, Carter C, Rodger C, Bebenek G, Gauldie J, Sheridan D, et al. The relationship among platelet-associated IgG, platelet lifespan, and reticuloendothelial cell function. Blood. 1984 Jun 1;63(6):1434–8. doi: 10.1182/blood.v63.6.1434.1434
17. Kojouri K, Vesely SK, Terrell DR, George JN. 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 Nov 1;104(9):2623–34. doi: 10.1182/blood-2004-03-1168
18. Lambert MP, Gernsheimer TB. Clinical updates in adult immune thrombocytopenia. Blood. 2017 May 25;129(21):2829–2835. doi: 10.1182/blood-2017-03-754119
19. Leo C, Pravisani R, Bidinost S. Postsplenectomy recurrence of idiopathic thrombocytopenic purpura: role of laparoscopic splenectomy in the treatment of accessory spleen. Giornale di Chirurgia - Journal of Surgery. 2015;4(36):153–157. doi: 10.11138/gchir/2015.36.4.153
20. Olsson B, Ridell B, Jernås M, Wadenvik H. Increased number of B-cells in the red pulp of the spleen in ITP. Annals of Hematology. 2011 Jul 23;91(2):271–7. doi: 10.1007/s00277-011-1292-2
21. Olsson B, Ridell B, Carlsson L, Jacobsson S, Wadenvik H. Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1. Blood. 2008 Aug 15;112(4):1078–84. doi: 10.1182/blood-2008-02-139402
22. Palandri F, Polverelli N, Sollazzo D, Romano M, Catani L, Cavo M, et al. Have splenectomy rate and main outcomes of ITP changed after the introduction of new treatments? A monocentric study in the outpatient setting during 35 years. American Journal of Hematology. 2016 Mar 18;91(4):E267–72. doi: 10.1002/ajh.24310
23. Solanilla A, Pasquet J-M, Viallard J-F, Contin C, Grosset C, Déchanet-Merville J, et al. Platelet-associated CD154 in immune thrombocytopenic purpura. Blood. 2005 Jan 1;105(1):215–8. doi: 10.1182/blood-2003-07-2367
24. Saltzstein SL. Phospholipid Accumulation in Histiocytes of Splenic Pulp Associated with Thrombocytopenic Purpura. Blood. 1961 Jul 1;18(1):73–88. doi: 10.1182/blood.v18.1.73.73
25. Schmidt E, MacDonald I, Groom A. Changes in splenic microcirculatory pathways in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood. 1991 Sep 15;78(6):1485–9. doi: 10.1182/blood.v78.6.1485.1485
26. Toltl L, Nazi I, Jafari R, Arnold D. Piecing Together the Humoral and Cellular Mechanisms of Immune Thrombocytopenia. Seminars in Thrombosis and Hemostasis. 2011 Sep;37(06):631–9. doi: 10.1055/s-0031-1291373

27. Vianelli N, Galli M, de Vivo A, et al. Efficacy and safety of splenectomy in immune thrombocytopenic purpura: long-term results of 402 cases. *Haematologica*. 2005 Jan;90(1):72-7.
28. Winde G, Schmid KW, Lugering N, et al. Results and prognostic factors of splenectomy in idiopathic thrombocytopenic purpura. *The American College of Surgeons*. 1996 Dec;183(6):565-74.
29. Zhou ZH, Li XY, Pan QY, et al. Distribution and activation of dendritic cells in immune thrombocytopenia patients. *Journal of experimental hematology*. 2013;6(21):1513-6.

Поступила в редакцию 13.06.2020

Received 13.06.2020

Принята в печать 2.09.2020

Accepted 2.09.2020

Для цитирования: Федоровская Н.С., Железнов Л.М., Петров С.В., Зайцев В.Б. Характеристика иммуноморфологических процессов в селезенке пациентов с иммунной тромбоцитопенией. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2020; 9(3): 54–63. doi: 10.18499/2225-7357-2020-9-3-54-63

For citation: Fedorovskaya N.S., Zheleznov L.M., Petrov S.V., Zaitsev V.B. Characteristics of immunomorphological processes in the spleen of patients with immune thrombocytopenia. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2020; 9(3): 54–63. doi: 10.18499/2225-7357-2020-9-3-54-63
