

ОЦЕНКА НА ЛИМФОЦИТНИТЕ ПОПУЛАЦИИ НА ЗДРАВИ ЖЕНИ В РЕПРОДУКТИВНА ВЪЗРАСТ ОТ РЕГИОНА НА СТАРА ЗАГОРА

Емил Славов, Севдалина Алекова, Красимира Халачева

*Катедра по Молекулярна биология, Имунология и Медицинска генетика, Медицински Факултет, Тракийски Университет, 6000, Стара Загора
e-mail: e_slav67@mf.uni-sz.bg*

ASSESSMENT OF LYMPHOCYTE SUBSETS IN HEALTHY FERTILE WOMEN FROM THE REGION OF STARA ZAGORA

Emil Slavov, Sevdalin Alekova, Krasimira Halacheva,

*Department of Molecular Biology, Immunology and Medical Genetics, Faculty of Medicine, Trakia University, 6000 Stara Zagora, Bulgaria.
e-mail: e_slav67@mf.uni-sz.bg*

ABSTRACT

Pregnancy as an immunological phenomenon is associated with specific changes in cellular immunity. These changes are reversible and recovered several months after birth. Many cellular mechanisms take part in the regulation of the immune system during the pregnancy. The balance between peripheral and uterine NK cells plays an important role to support this mechanism. Several disturbances in the immune regulation are associated with the development of pathological pregnancies and subsequent abortions. To analyze the dynamic of cell populations during pregnancy is necessary to compare them with the reference ranges obtained for health nonpregnant women of reproductive age. In attempt to survey this problem we decided to study the distribution of lymphocyte populations in healthy women from the region of Stara Zagora. 27 women aged $35 \pm 5,4$ years, after normal pregnancy and delivery of two and more children were included in the study. We found percentage of B-, T-lymphocytes, helper-inducer and suppressor-cytotoxic lymphocytes, NK-cells and NKT-cells, in the group studied comparable to that of national reference range. Significantly higher percentage of suppressor(CD8+CD11B+) and lower of cytotoxic (CD8+CD11B-) T-lymphocytes were also detected. These data allow to conclude that normal values of B-, T lymphocytes, NK-cells and NKT-lymphocytes in peripheral venous blood of healthy women from the Stara Zagora region are comparable with the nationally accepted reference ranges.

Key words: Reproduction, lymphocyte populations, NK cells, suppressor-cytotoxic lymphocytes

Нормалното функциониране на имунната система се осъществява под действието на специфична регулация и баланс между отделните лимфоцитни популации. Редица имунодефицитни, малигнени и автоимунни болести се свързват с промени в количествения състав и функционалната активност на отделните имунокомпетентни клетки.

Бременността като имунологичен феномен също се свързва със специфични промени в отделните лимфоцитни популации (Asar 2011 Piccinni 2003 GENNARO1997). Този функционален дисбаланс участва в поддържането на майчино-феталния толеранс и има значение за нормалното протичане на бременността.

Анализът на състоянието на клетъчния имунитет най-често се извършва чрез определяне процента на отделните лимфоцитни популации и сравняването им с предварително определени граници на нормата. Нормалните стойности на отделните лимфоцитни популации се движат в широки граници и варират под действието на различни демографски показатели (възраст, полови, расови различия) (2,3,7,13). От друга страна

редица фактори, свързани с начина на живот и влиянието на околната среда (стрес, тютюнопушение, физическа активност) също оказват влияние върху честотата на отделните лимфоцитни популации (8). В проведено мултицентрично проучване за определяне границите на нормата на периферни кръвни клетки във възрастни се дискутира и влиянието на методологичните фактори (процедура на подготовка на пробите, вид на използваните моноклонални антитела и марка на цитометъра) върху получените резултати (12). Ефекта на всички горепосочени фактори върху определянето на нормалните стойности на лимфоцитните популации предполага всяка имунологична лаборатория да изготви свои собствени граници на нормата за отделните лимфоцитни популации и да ги сравни с национално утвърдените такива. Към момента на проучването не съществуват данни за разпределението на отделните лимфоцитни популации в периферна кръв на здрави контроли от региона на Стара Загора. Това определи и целта на настоящата работа: Да проучим разпределението на основните лимфоцитни популации на здрави жени, във фертилна възраст, от региона на Стара Загора.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследвани са 27 жени на възраст $35 \pm 5,4$ години, родили по две и повече деца, след нормално протекла бременност и раждане без усложнения. Всички включени в проучването са без анамнестични данни за хронични възпалителни, инфекциозни и автоимунни заболявания и след медицински преглед са установени като клинично здрави, с нормални: кръвна картина, липиден профил и стойности на кръвна захар.

От всички включени в проучването беше взета по 2 мл. периферна венозна кръв с Na_2EDTA .

До 6 часа след венепункцията кръвта беше имунофенотипизирана на поточен цитометър Beckman Coulter FC500.

Чрез петцветен анализ беше изследвана експресията на повърхностно клетъчните молекули CD3, CD4, CD8, CD11b, CD19, CD56 по лимфоцитните популации. Подготовката на пробите беше извършена чрез метода “лизиране без промиване”. Съгласно протокола на производителя към 100 μl периферна венозна кръв бяха прибавени по 10 μl от съответно маркираните моноклонални антитела. След 15 мин. инкубация на тъмно пробите бяха лизирани, фиксирани и стабилизирани на автоматичната станция Coulter TQ-prep, Beckman Coulter.

Статистическия анализ на данните беше извършен на STATISTICA 6. Средната стойност и стандартното отклонение на изследваната група за всяка популация беше сравнена със съответните референтни граници (10).

РЕЗУЛТАТИ

Данните за разпределението на основните лимфоцитни популации в периферна венозна кръв на изследваните здрави контроли са представени на фиг. 1 и таблица 1. Средните стойности, получени за всички изследвани лимфоцитни популации попадат в утвърдените за страната референтни граници. Стандартните отклонения на всички анализирани популации се различават несъществено от тези на границите на нормата. Анализът на резултатите по лимфоцитни популации показва, че двама изследвани (7,4% от здравите контроли) са с повишени стойности и двама (7,4% от здравите контроли) с понижени стойности на В-лимфоцити (CD19+). Един изследван (3,7%) е с понижени стойности на Т-лимфоцити (CD3+). Проучването на Т-лимфоцитните субпопулации показва отклонения от границите на нормата за хелперно-индусерните лимфоцити (CD3+CD4+) при двама изследвани (един с леко повишени и един с долно-гранични стойности) (фиг.1). Супресорно-цитотоксичните лимфоцити (CD3+CD8+) са с повишени стойности, спрямо референтните граници при трима и понижени при един изследван. По съществени отклонения от границите на нормата се

установяват за цитотоксичната субпопулация (CD8+CD11b-), където общо 10 изследвани (37%) са с отклонения от установените референтни граници (фиг.2). 18,5% от тях са установени с понижени нива на цитотоксичните Т-лимфоцити, 14,8% - с долно гранични и само един (3,7%) - с повишени стойности на CD8+CD11b- лимфоцити. Супресорните Т-лимфоцити (CD8+CD11b+) са повишени в 6 (22,2%) от изследваните. НКТ лимфоцитите са установени с отклонения (горногранични) в два случая. Единствено за стойностите на НК клетките в изследваната група не се установяват отклонения от референтните граници.

ОБСЪЖДАНЕ

Проведеното от нас изследване акцентуира върху нормалните стойности на основните лимфоцитни популации на жени във фертилна възраст. То проучва баланса между В-, Т-лимфоцитните популации и НК-клетките, както и между хелперно-индусерните и супресорно-цитотоксичните Т-лимфоцитни субпопулации в здрави, жени, раждали по повече от едно здраво дете. Получените резултати интерпретираме в контекста на липсващи до момента проучвания за разпределение на лимфоцитни популации в здравето население на регион Стара Загора и необходимостта от изходна база за проследяване динамиката на наблюдаваните показатели в процеса на нормална и патологична бременност - цел на наши бъдещи изследвания. Въпреки съществуващите данни за зависимост между хормоналните промени по време на месечния цикъл и специфичните промени в лимфоцитните популации (8,9) не използвахме подбор на изследваните въз основа на стадия от месечния овариален цикъл. В проучването не извършихме и подбор по фактори като телесно тегло, тютюнопушене, професия, спортна активност. Така подбрана на случаен принцип, групата от изследвани жени позволява да получим възможно най-достоверни данни за разпределението на лимфоцитните популации в периферната венозна кръв на жени от региона на Стара Загора. Ние не установихме съществени отклонения в процента на В- и Т-лимфоцитите в изследваната от нас група в сравнение с националните референтни граници. В подобна посока са и данните за хелперно-индусерните и супресорно-цитотоксичните Т-лимфоцити. Само един изследван е с абнормно съотношение между хелперно-индусерните и супресорно-цитотоксичните лимфоцити ($\text{ratio CD4/CD8} = 3$) за сметка на понижени на супресорно-цитотоксичните Т-лимфоцити. При анализа на резултатите, ние обърнахме особено внимание върху CD56 положителните клетъчни популации: НК клетки (CD3-CD56+) и НКТ лимфоцитите (CD3+CD56+). Тези популации имат регулаторна роля в хода на нормална бременност и са с доказано участие в поддържането на майчино-феталния толеранс (1). От друга страна съществуват противоречиви данни за значението на процента на периферните НК клетки (CD3-CD56+) като рисков фактор за нормалното протичане на бременността. В контекста на тези факти резултатите от нашето проучване имат за задача да установят нормалните стойности на CD3-CD56+ НК клетки в здрави фертилни жени от регион Стара Загора, които да бъдат използвани като обичайна база за сравнение при проследяване динамиката на тази клетъчна популация в хода на бременността. Наличието на такъв сравнителен показател е необходимо предвид изключително ниски процент жени с репродуктивни проблеми, мониторирани за нива на НК клетки преди забременяване. Установените от нас средна стойност и стандартно отклонение на НК клетките $12,6 \pm 4,4$ попадат в национално утвърдените референтни граници за тази лимфоцитна популация. Ние не установяваме здрави фертилни жени с понижени стойности на НК клетките, а само три от изследваните (11,11%) са с нива на НК клетките в периферна кръв над 20%.

Анализът на данните за НКТ лимфоцитите (CD3+CD56+) не установява различия спрямо приетите референтни граници, като преобладаващата част от изследваните са със стойности на НКТ лимфоцитите популации значително под 10%.

В проведеното от нас проучване изследвахме и разпределението на повърхностно клетъчната молекула CD11b (MAC1) върху CD8 позитивните Т-лимфоцити. Редица

проучвания акцентуират върху участието на тази молекула в регулацията на имунния отговор, ролята и като активационен маркер за CD8 позитивните лимфоцити и като маркер диференциращ между паметовите и ефекторните CD8+ субпопулации (4,5). Ние проучихме двете основни CD11b съдържащи Т-лимфоцитни субпопулации: супресорните Т-лимфоцити (CD8+CD11b+) и цитотоксичните Т-лимфоцити (CD8+CD11b-). Установените и за двете популации данни се различават от тези на национално утвърдените референтни граници. Докато популацията на цитотоксичните Т-лимфоцити се характеризира с долно граничните и понижени нива, то супресорните Т-лимфоцити имат тенденция за повишени стойности. Необходими са допълнителни проучвания в тази насока за да се установи дали нормалните нива на фертилните жени от региона на Стара Загора се различават по тези показатели от населението в останалите региони на Република България.

Като имаме предвид представените по-горе данни може да направим следните изводи:

Не се установява изразен дисбаланс в основните лимфоцитни популации сред изследваните жени от региона на Стара Загора.

Нормалните стойности на основните лимфоцитни популации (В-, Т- лимфоцити, НК-клетки и НКТ-лимфоцити) в периферната венозна кръв на жени от региона на Стара Загора са съизмерими с национално приетите референтни граници.

Получените резултати могат да бъдат предпоставка за разработване на вътрелабораторни референтни граници.

ЛИТЕРАТУРА:

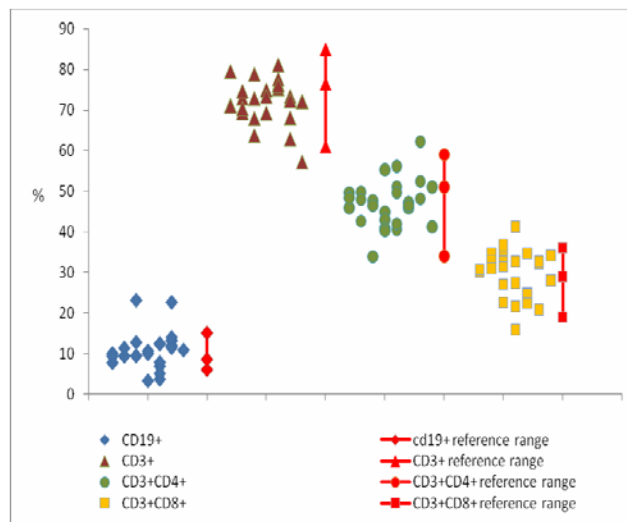
1. Acar, N., Ustunel, I., Demir, R. 2011. Uterine natural killer (uNK) cells and their missions during pregnancy: A review. *Acta histochemica* ,113, 82–91.
2. Bisset, L.R., Lung, T.L. et al. 2004. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *European Journal of Haematology* ,72(3), 203-212.
3. Bulati, M., Buffa, S., Candore, G. et al. 2011. B cells and immunosenescence: A focus on IgG+IgD–CD27– (DN) B cells in aged humans *Ageing Research Reviews*,10, 274–284
4. Christensen JE, Andreasen SO, Christensen JP, Thomsen AR. 2001. CD11b expression as a marker to distinguish between recently activated effector CD8(+) T cells and memory cells. *Int Immunol. Apr*;13(4):593-600.
5. Fiorentini, S., Licenziati, S., Alessandri,G., et al. 2001. CD11b Expression Identifies CD8+CD28+ T Lymphocytes with Phenotype and Function of Both Naive/Memory and Effector Cells *The Journal of Immunology*, 166: 900–907
6. Gennaro, S., Fehder, W., Gallagher, P. et al. 1997. Lymphocyte, Monocyte, and Natural Killer Cell Reference Ranges in Postpartal Women *Clin Diagn Lab Immunol*, 4(2), 195–201.
7. Klose, N., Coulibaly, B., Tebit, D., et al. 2007. Immunohematological Reference Values for Healthy Adults in Burkina Faso. *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY*, 782–784
8. Lee, S., Kim, J., Jang,B. et al. 2010. Fluctuation of Peripheral Blood T, B, and NK Cells during a Menstrual Cycle of Normal Healthy Women. *The Journal of Immunology*, 185, 756–762.
9. Martínez-García, E.A. Sánchez-Hernández, P.E., Chavez-Robles, B. et al. 2011. The Distribution of CD56dimCD16+ and CD56brightCD16- Cells are Associated with Prolactin Levels during Pregnancy and Menstrual Cycle in Healthy Women. *American Journal of Reproductive Immunology*, 65(4),433-437.
10. Naumova, E., Altunkona, I., 2008. *Clinical Immunology. Hand book*. 2nd ed. Published by “Litse”.
11. Piccinni, M.-P. 2003. Role of immune cells in pregnancy. *Autoimmunity*, 36(1),1-4.
12. Santagostino, A., Garbaccio, G., Pistorio, A. et al. 1999. An Italian national multicenter study for the definition of a reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica*,84,499-504.

13. Yan, J., Greer, J., Hull, R. et al. 2010. The effect of ageing on human lymphocyte subsets: comparison of males and females. *Immunity & Ageing*, 7:4

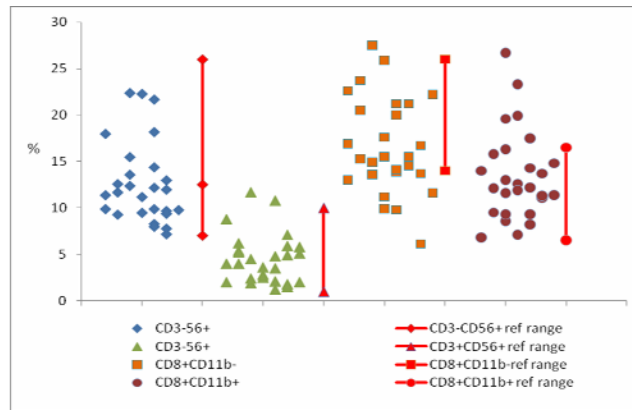
Таблица 1. Стойности на някои лимфоцитни популации в периферна венозна кръв на здрави жени от регион Стара Загора, сравнени с националните референтни граници.

Представени са средната стойност и границата между 5 и 95 перцентил.

Lymphocyte subpopulations	Group of healthy women		National reference range	
	Median value	Range (mean±2SD)	Median value	Range (mean±2SD)
B lymphocytes (CD19+)	10,7	3,7 – 17,8	8,5	6 – 15
T lymphocytes (CD3+)	72,5	61,7 – 82,6	76,5	61 – 85
Helper-inducer T lymphocytes (CD3+CD4+)	47,2	35,5 – 58,7	51,0	34 - 59
Supressor-cytotoxic T lymphocytes (CD3+CD8+)	31,0	17,7 – 41,4	29,0	19 - 36
Ratio CD4/CD8	1,5	0,6 – 2,73	nd	0,9 – 3,0
NK cells (CD3-CD56+)	11,7	3,8 – 21,5	12,5	7 - 26
NKT cells (CD3+CD56+)	4,0	0 -9,9	nd	nd
Supressor T lymphocytes (CD8+CD11b+)	12,2	3,8 - 23	nd	6,5 – 16,5
Cytotoxic T lymphocytes (CD8+CD11b-)	15,5	6,2 - 27	nd	14 - 26



Фиг.1. Процент на В-лимфоцити, Т-лимфоцити, хелперно-индусерни и супресорно цитотоксични лимфоцити в периферна венозна кръв на здрави жени от региона на Стара Загора.



Фиг.2. Процент на НК клетъчни и супресорно цитотоксични лимфоцити в в периферна венозна кръв на здрави жени от региона на Стара Загора.