

УДК: 616.155.3-02: 616.72-002.77

НЕЙТРОПЕНИЯ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ И ЛЕЙКОЗ ИЗ БОЛЬШИХ ГРАНУЛЯРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ

В.А. Доронин¹, Е.А. Никитин², Ю.В. Сидорова², А.В. Пивник¹

РЕЗЮМЕ

Клинико-лабораторная картина лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов (ЛБГЛ) - нейтропения, спленомегалия, ассоциация с ревматоидным артритом (РА) - часто сходна с таковой при синдроме Фелти.

Цель. Сравнение клинико-гематологических, иммунофенотипических и иммуногенетических особенностей больных с синдромом Фелти и ЛБГЛ с и без РА.

Материалы и методы. Представлена клинико-лабораторная характеристика 10 больных с ЛБГЛ. Иммунофенотипическое исследование лимфоцитов проводилось с помощью моноклональных антител CD8-PE и CD3-FITC/CD16-PE (двойная метка) (Caltag, USA) методом проточной цитометрии (Partec, Daco). При исследовании клональной перестройки генов гамма-цепи Т-клеточного рецептора использовался ПЦР анализ конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК в растворе с низкой ионной силой.

Результаты. ЛБГА является отдельной нозологической формой. Заболевание часто ассоциируется с РА (около 20%). Пациенты с ЛБГЛ + РА и пациенты с синдромом Фелти имеют схожие иммуногенетические характеристики, которые не выявляются у больных с ЛБГЛ без РА.

Заключение. Морфологическое, иммунофенотипическое и молекулярногенетическое исследования являются крайне важными и высокорепрезентативными методами в дифференциальной диагностике нейтропии при РА. Синдром Фелти и ЛБГЛ являются вариантами синдрома, характеризующегося нейтропенией, спленомегалией, наличием РА и пролиферацией больших гранулярных лимфоцитов.

Ключевые слова: лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов, ревматоидный артрит, синдром Фелти.

Нейтропения при ревматоидном артрите (РА) является актуальной проблемой. Она осложняет течение РА, представляет дифференциально-диагностическую проблему и требует особой терапевтической тактики. Механизмы нейтропии при РА до сих пор изучены слабо. Они носят комплексный характер. У большей части больных с нейтропенией и РА обнаруживаются антитела против гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора (Г-КСФ) или антигенов на поверхности нейтрофилов [10, 16]. Возможно подавление продукции нейтрофилов в костном мозге цитотоксическими клетками [7]. Повреждение нейтрофилов может осуществляться иммунными комплексами [3, 2, 19]. Обсуждаются и не иммунные механизмы развития нейтропии: индукция апоптоза растворимым FAS-лигандом, индукция нечувствительности миелоидных предшественников к Г-КСФ [7]. Описаны случаи фагоцитоза нейтрофилов макрофагами костного мозга при синдроме Фелти [11]. Ранее к причинам нейтропии при данном синдроме относили секвестрацию нейтрофилов в селезенке.

В последние годы стало известно, что одной из причин нейтропии при РА может быть Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (Т-ЛБГЛ). В настоящее время морфология, функция и иммунологические характеристики больших гранулярных лимфоцитов (БГЛ) изучены подробно [21]. Они составляют 5-20% от общего количества лимфоцитов крови (в абсолютных значениях - от 250 до 450 в 1 мкл крови). Популяция БГЛ гетерогенна по функциональным и иммунофенотипическим характеристикам. Около 10-20% БГЛ относятся к цитотоксическим Т-лимфоцитам (Т-БГЛ) с иммунофенотипом CD3+, CD8+.

Т-БГЛ распознают чужеродный антиген в комплексе с молекулой главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса через Т-клеточный рецептор. Гены Т-клеточного рецептора в этих клетках перестроены. В западных странах ЛБГД в подавляющем большинстве случаев возникает именно из Т-БГЛ.

Около 80-90% БГЛ являются естественными киллерами (НК-клетки). НК-БГЛ принципиально отличаются от Т-БГЛ (таблица 1). Опухоли из НК-клеток в западных странах встречаются крайне редко, имеют совершенно иную клинику и не сочетаются с РА. В таблице 1 приведена сравнительная характеристика двух популяций БГЛ.

Таблица 1.
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
НК- И Т-БГЛ

	Т-БГЛ	НК-БГЛ
Морфология	Большие гранулярные лимфоциты	
Антигенная специфичность распознавания	Есть	Нет
Гены Т-клеточного рецептора	Перестроены	Не перестроены
Распознавание мишени	Через Т-клеточный рецептор	Через рецепторы НК-клеток
Уничтожение мишени	Перфорины, гранзимы, индукция апоптоза в клетке мишени	
Иммунофенотип	CD3+, CD8+	CD3-, CD8-, CD16+, CD56+

* - Городской гематологический центр ГКБ им. С.П.Боткина, Москва

** - Гематологический Научный Центр РАМН, Москва.

С момента первого описания в 1977г Т-ЛБГЛ имел разные названия: Т-хронический лимфолейкоз, Т8-гиперлейкоцитоз, Т-лимфопролиферативное заболевание, Т-клеточный лимфоцитоз с нейтропенией [18]. В начале 90-х годов, после доказательства клональной природы этой болезни, Т-ЛБГЛ был выделен в отдельную нозологическую форму [14]. Диагностические критерии Т-ЛБГЛ таковы:

- 1) наличие лимфоцитоза за счет больших гранулярных лимфоцитов > 2000/мкл, сохраняющегося >6 мес;
- 2) иммунофенотип БГЛ (CD3+, CD8+);
- 3) нейтропения и/или другая цитопения, сохраняющаяся > 6 мес;

Наиболее характерными клиническими проявлениями Т-ЛБГЛ являются лимфоцитоз, нейтропения и спленомегалия. В таблице 2 представлены клинические данные по 10 больным с Т-ЛБГЛ, которые находятся под нашим наблюдением.

Таблица 2.

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ЛЕЙКОЗА ИЗ БОЛЬШИХ ГРАНУЛИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Клинические проявления	Число больных (n=10)	%
Средний возраст, годы	56 (27 - 82)	
Лимфоцитоз	10	100
Нейтропения < 2000/мкл	10	100
Анемия	4	40
Тромбоцитопения < 100 тыс./мкл	0	-
Спленомегалия	8	80
Лимфаденопатия	2	20
Поражение костного мозга	10	100
Сочетание с другими заболеваниями	РА - 2 АИГА-ПККА* - 2 Псориаз - 1	20 20 20

* - Аутоиммунная гемолитическая анемия, протекающая как парциальная красноклеточная аплазия костного мозга.

Т-ЛБГЛ и синдром Фелти имеют сходные клинические проявления. В подавляющем большинстве случаев Т-ЛБГЛ обнаруживаются увеличение селезенки и нейтропения. В 25 - 30% случаев Т-ЛБГЛ сочетается с РА. В свою очередь, до 1/3 больных РА с нейтропенией имеют клональную пролиферацию CD3+, CD8+, CD57+ клеток [4]. Интересно, что при синдроме Фелти и РА в сочетании с Т-ЛБГЛ заболеваемость у мужчин и женщин примерно одинакова (небольшое преобладание женщин), в то время как заболеваемость классическим РА у женщин в 2,5 - 3 раза выше, чем у мужчин. Наконец, имеется значительное иммуногенетическое сходство между РА + Т-ЛБГЛ и синдромом Фелти. Оба синдрома в 90% случаев ассоциируются с HLA-DR4 аллелем; причем нередко выявляется гомозиготность по нему, особенно часто встречается сочетание *0401/*0404. При РА частота выявления HLA-DR4 существенно ниже, а при Т-ЛБГЛ без РА не выше, чем в общей популяции (около 30%) [5, 20]. Недавно опубликованы результаты изучения HLA I класса при РА в сочетании с Т-ЛБГЛ и синдромом Фелти [6]. Это особенно интересно потому, что цитотоксические клетки стимулируются именно молекулами МНС I класса. Была выявлена очень сильная ассоциация между синдромом Фелти и аллелями I класса HLA-A*02 и Cw*0501. При РА в сочетании с Т-ЛБГЛ имела место достоверная ассоциация с аллелем HLA-B*44. Гаплотип B*44; DRB1*0401 чаще встречается при Т-ЛБГЛ + РА, чем при синдроме Фелти. Гаплотип HLA-A*02; B*44; Cw*0501 ассоциируется с обеими болезнями, хо-

тя эти ассоциации слабее и вторичны по отношению к основной ассоциации обоих синдромов с HLA-DRB1*0401. Т-ЛБГЛ без артрита не имеет ассоциации ни с HLA-DRB1 (=HLA-DR4), ни с молекулами МНС I класса. Таким образом, возможно, что синдром Фелти и Т-ЛБГЛ в сочетании с РА - проявления одного процесса, в ходе которого происходит пролиферация цитотоксических Т-клеток, причем некоторые клоны Т-клеток могут достигать размеров, выявляемых с помощью молекулярных и морфологических методов. Неизвестное пока трансформирующее событие, возможно случайное, приводит к малигнизации клона с развитием лейкоза из больших гранулярных лимфоцитов. По-видимому, Т-ЛБГЛ, как и клональная Т-клеточная пролиферация на фоне РА, развивается вследствие длительной антигенной стимуляции Т-клеток. В пользу этого свидетельствует ассоциация с молекулами HLA I и II классов: презентация аутоантигенов в контексте именно этих аллелей молекул МНС I и II классов может вызывать длительную стимуляцию Т-клеток. Обратный сценарий, когда РА развивается на фоне Т-ЛБГЛ, маловероятен, хотя такие случаи описаны [22].

Как видно из таблицы 2, в 100% случаев у наших больных имелось поражение костного мозга. Опубликовано много работ об изменениях в костном мозге при синдроме Фелти. В большинстве из них исследован пунктат костного мозга, в котором нередко выявляется миелоидная гиперплазия и сдвиг в сторону более незрелых форм (отношение суммы промиелоцитов и миелоцитов и суммы метамиелоцитов и сегментоядерных форм выше, чем в норме). Следует отметить, что информативной является трепанобиопсия костного мозга, а не пунктат, поскольку лимфоидная инфильтрация костного мозга при Т-ЛБГЛ в большинстве случаев носит очаговый или интерстициальный характер, а в пунктате число лимфоцитов не увеличено или незначительно увеличено. Более того, степень инфильтрации костного мозга при Т-ЛБГЛ обычно невелика; иногда поражение костного мозга при окраске гематоксилин-эозином не выявляется, и подтвердить его может только иммуногистохимическое исследование [1]. В биоптате костного мозга при Т-ЛБГЛ нередко обнаруживается гиперплазия эритроидных и миелоидных предшественников с нарушением созревания на ранней или промежуточной фазах. Это указывает, что патогенез цитопений при Т-ЛБГЛ отчасти связан с высвобождением цитокинов клетками Т-ЛБГЛ, которые нарушают нормальную дифференцировку эритроидных и миелоидных предшественников [17]. В свете вышесказанного представление о том, что основной находкой в костном мозге при синдроме Фелти является миелоидная гиперплазия, требует пересмотра.

С практической точки зрения трепанобиопсия не может рассматриваться как один из первых дифференциально-диагностических тестов, поскольку диагноз может быть поставлен при исследовании мазка крови и иммунофенотипировании лимфоцитов.

Морфология больших гранулярных лимфоцитов в периферической крови очень характерна. Их диаметр обычно равен диаметру двух эритроцитов. Ядро круглое или овальное, лежит в центре или эксцентрично. Хроматин конденсирован, ядрышки не видны. Цитоплазма широкая, слабо-базофильная. Главным отличительным признаком является наличие в цитоплазме азурофильных гранул, размер и количество которых значительно варьирует.

Типичный иммунофенотип клеток Т-ЛБГЛ такой: CD3+, CD8+, CD4-, CD16+, CD57+. Клетки Т-ЛБГЛ экспрессируют и другие пан-Т-клеточные маркеры, такие как CD2, CD7, CD45RA, однако принципиальное значение имеют два маркера: CD3 и CD8. Возможны случаи реактивного (неопухолевого) CD8+ лимфоцитоза. Поставить диагноз в этой ситуации помогает одновременная экспрессия на CD3+ CD8+ клетках CD16 и CD57 антигенов. При реактивном лимфоцитозе эти антигены обычно не экспрессируются. Экспрессия CD56 на клетках Т-ЛБГЛ может свидетельствовать о неблагоприятном прогнозе.

Определение Т-клеточной клональности является методом, позволяющим подтвердить опухолевую природу заболевания. В основе определения Т-клеточной клональности лежит уникальность вариабельного региона Т-клеточного рецептора в каждом Т-лимфоците. Наличие в испытуемом образце примеси клональных клеток, содержащих одинаковый вариабельный регион Т-клеточного рецептора, можно выявить методами Саузерн-блоттинга и ПЦР. Чувствительность метода, используемого в настоящее время в ГНЦ РАМН, невелика: клональность выявляется, если 1,0 - 0,1% клеток в образце содержат одинаковый вариабельный регион. Во всех изученных нами случаях клональность процесса было доказана.

Механизмы нейтропении и цитопений при Т-ЛБГЛ плохо изучены. Прямой зависимости между выраженностью цитопений и степенью инфильтрации костного мозга нет. Однако, по крайней мере в половине случаев, цитопении связаны с прямым цитотоксическим действием клеток Т-ЛБГЛ на миелопоэз и эритропоэз [1]. В ряде случаев Т-ЛБГЛ выявляются антинейтрофильные антитела, однако их специфичность плохо доказана.

Т-ЛБГЛ характеризуется стабильным клиническим течением с очень медленной прогрессией. Описаны случаи спонтанной регрессии Т-ЛБГЛ. Ведущей проблемой при данной патологии являются цитопении и инфекции.

В настоящее время Т-ЛБГЛ не излечим. По данным M.V.Dhodapkar с соавт. медиана выживаемости при Т-ЛБГЛ превышает 10 лет [8]. В связи с длительным хроническим течением болезни оправдана выжидательная тактика и стремление избегать аплазирующей химиотерапии. Показаниями к терапии являются нейтропения менее 500 клеток/мкл, осложненная частыми инфекциями, глубокая анемия, значительная спленомегалия с цитопениями, а

также наличие признаков прогрессии. К числу последних относятся быстрый рост лимфоцитоза и увеличение органов (селезенки), симптомы интоксикации (потеря веса более 15% за 6 мес, резистентная к антибиотикам лихорадка более 2 нед). Ввиду редкости этой нозологии стандартная терапия не разработана. В случае глубокой нейтропении применяют метотрексат в виде монотерапии или в сочетании с преднизолоном [13], циклоспорин [9], ростовые факторы [12]. Назначая метотрексат внутрь в дозе 10 мг/м² один раз в нед, Т.Р. Loughran и соавт. [15] удалось получить существенное улучшение (повышение уровня нейтрофилов более 500 клеток/мкл) у 5 из 10 больных; при этом в трех случаях была достигнута молекулярная ремиссия. По данным тех же авторов, монотерапия преднизолоном оказывает только временный эффект: с уменьшением дозы уровень гранулоцитов снижается, а лимфоцитоз вновь возрастает. При значительном увеличении селезенки и сопутствующей тромбоцитопении или анемии рекомендуется спленэктомия или применение метотрексата в сочетании с преднизолоном или без него. При нейтропении спленэктомия неэффективна. Кроме того, после спленэктомии количество БГЛ обычно возрастает. Наконец, при выраженной прогрессии применяют полихимиотерапию (циклофосфан, доксорубин, винкристин, преднизолон), флюдарабин. Однако в таких случаях ответ на лечение обычно плохой.

Таким образом, причины нейтропении при РА носят комплексный характер. Одной из них может быть Т-ЛБГЛ. Клинические и иммуногенетические проявления синдрома Фелти и Т-ЛБГЛ во многом совпадают. Обследование больного с РА и нейтропенией должно включать просмотр мазка периферической крови, иммунофенотипирование лимфоцитов крови и определение Т-клеточной клональности.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Agnarsson B.A., Loughran T.P. Jr, Starkebaum G., Kadin M.E. The pathology of large granular lymphocyte leukemia. *Hum Pathol.*, 1989, 20 (7), 643-51.
2. Breedveld F.C., Lafeber G.J., Doekes G. et al. Felty, syndrome: autoimmune neutropenia or immune-complex-mediated disease? *Rheumatol. Int.*, 1985, 5 (6), 253-8.
3. Breedveld F.C., Lafeber G.J., de Vries E. et al. Immune complexes and the pathogenesis of neutropenia in Felty's syndrome. *Ann.Rheum.Dis.*, 1986, 45(8), 696-702.
4. Bowman S.J., Corrigall V., Panayi G.S., Lanchbury J.S. Hematologic and cytofluorographic analysis of patients with Felty's syndrome. A hypothesis that a discrete event leads to large granular lymphocyte expansions in this condition. *Arthr. Rheum.*, 1995,38(9), 1252-9.
5. Bowman S.J., Sivakumaran M., Snowden N. et al. The large granular lymphocyte syndrome with rheumatoid arthritis. Immunogenetic evidence for a broader definition of Felty's syndrome. *Arthr. Rheum.*, 1994,37(9), 1326-30.
6. Coakley G., Brooks D., Iqbal M. et al. Major histocompatibility complex haplotypic associations in Felty's syndrome and large granular lymphocyte syndrome are secondary to allelic association with HLA-DRB1 *0401. *Rheumatol.*, 2000, 39, 393-398
7. Coakley G., Iqbal M., Brooks D. et al. CD8+, CD57+ T cells from healthy elderly subjects suppress neutrophil development in vitro: implications for the neutropenia of Felty's and large granular lymphocyte syndromes. *Arthr.Rheum.*,2000,43(4),834-43.
8. Dhodapkar M.V., Li C.Y., Lust J.A. et al. Clinical spectrum of clonal proliferations of T-large granular lymphocytes: a T-cell clonopathy of undetermined significance? *Blood.* 1994, 84(5), 1620-7.
9. Gabor E.P., Mishalani S., Lee S. Rapid response to cyclosporine therapy and sustained, remission in large granular lymphocyte leukemia. *Blood.*,1996,87(3),1199-200.
10. Hellmich B., Csernok E., Schatz H. et al. Autoantibodies against granulocyte colony-stimulating factor in Felty's syndrome and neutropenic systemic lupus erythematosus. *Arthr. Rheum.*, 2002,46(9),2384-91.
11. Kumakura S., Kobayashi S., Ishikura H. Neutrophil phagocytosis in Felty's syndrome. *Am J. Med.*, 2001,111(7),579-80.
12. Lamy T., LePrise P.Y., Amiot L. et al. Response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) but not to G-CSF in a case of agranulocytosis associated with large granular lymphocyte (LGL) leukemia. *Blood*,1995,85(11),3352-3.
13. Lamy T.,Loughran TP. Large Granular lymphocyte leukemia. *Cancer Control.*, 1998,5(1),25-33.
14. Loughran T.P. Jr.Clonal diseases of large granular lymphocytes. Review. *Blood*, 1993,82(1),1-14.
15. Loughran T.P.Jr.,Kidd P.G., Starkebaum G. Treatment of large granular lymphocyte leukemia with oral low-dose methotrexate. *Blood*,1994,84(7),2164-70.

16. Maher G.M., Hartman K.R. Detection of antineutrophil autoantibodies by flow cytometry: use of unfixed neutrophils as antigenic targets. *J.Clin.Lab.Anal.*, 1993,7(6),334-40.
17. Matutes E. T-cell lymphoproliferative disorders. Classification, clinical and laboratory aspects. Ed: A. Polliack. Harwood Academic Publishers., 1999, 23.
18. McKenna R.W., Parkin J., Kersey J.H. et al. Chronic lymphoproliferative disorder with unusual clinical, morphological, ultrastructural and membrane surface marker characteristics. *Am. J. Med.*, 1977,62(4),588-96.
19. Petersen J., Wiik A. Lack of evidence for granulocyte specific membrane-directed autoantibodies in neutropenic cases of rheumatoid arthritis and in autoimmune neutropenia. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. [C].*, 1983,91(1),15-22.
20. Starkebaum G., Loughran T.P. Jr, Gaur L.K. et al. Immunogenetic similarities between patients with Felty's syndrome and those with clonal expansions of large granular lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthr.Rheum.*, 1997,40(4),624-6.
21. Timonen T., Saksela E., Ranki A., Hayry P. Fractionation, morphological and functional characterization of effector cells responsible for human natural killer activity against cell-line targets. *Cell Immunol.*, 1979,48(1),133-48.
22. Yoe J., Gause B.L., Curti B.D. et al. Development of rheumatoid arthritis after treatment of large granular lymphocyte leukemia with deoxycoryformycin. *Am.J. Hematol.*, 1998,57(3),253-257.

Поступила 4.10.02

Abstract:

Neutropenia in rheumatoid arthritis and large granular lymphocyte leucosis

V.A. Doronin, E.A. Nikitin, J.V. Sidorova, A.V. Pivnik

Objective. Pts with chronic clonal proliferation of large granular lymphocytes (LGL leukemia) often have neutropenia, splenomegaly, and rheumatoid arthritis (RA), thereby resembling the manifestations observed in pts with Felty's syndrome. The present study sought to indicate that pts with these disorders represent two distinct subsets. We compare clinical, hematological, immunophenotyping and immunogenetic features in Felty's syndrome pts with and without the LGL leukemia.

Material and methods 10 pts with T-LGL leukemia were studied. Surface phenotype was estimated using monoclonal antibodies CD8-PE and CD3-FITC/CD16-PE (two-color) (Caltag, USA) by the flow cytometric analysis (Partec, Daco). Analysis of TCR gene rearrangement was performed by using PCR-LIS SSCP (low ionic strength single strand conformational polymorphism). Comparison with Felty's syndrome and RA pts based on the review of literature.

Results. LGL leukemia is a distinct clinicopathologic entity often associated with RA. LGL leukemia pts with RA showed the same immunogenetic associations seen in RA/Felty's syndrome, while LGL leukemia pts without arthritis did not.

Conclusion. Hematologic, immunophenotyping and molecular genetic analysis are very important and highly representative tools in differential diagnosis of neutropenia in RA, and propose that Felty's syndrome and LGL leukemia represent different variants of broader syndrome comprising RA, neutropenia, LGL expansions, and splenomegaly.

Key words: *Large granular lymphocytes leukemia, rheumatoid arthritis, Felty's syndrome.*