

Клинико-иммунологическая характеристика первичных иммунодефицитов, протекающих с хронической незлокачественной лимфопролиферацией

Ю.С. Жаранкова, С.Н. Алешкевич, С.О. Шарапова, И.С. Сакович, И.Е. Гурьянова, Е.А. Полякова, М.Г. Шитикова, Т.А. Углова, М.В. Белевцев

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск

Clinical and immunological characteristics of primary immunodeficiencies with chronic non-malignant lymphoproliferation

Yu.S. Zharankova, S.N. Aleshkevich, S.O. Sharapova, I.S. Sakovich, I.E. Guryanova, E.A. Polyakova, M.G. Shitikova, T.A. Uglova, M.V. Belevtsev

Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Аннотация

Цель. Повысить эффективность диагностики первичных иммунодефицитов (ПИД), протекающих с хронической незлокачественной лимфопролиферацией за счёт использования значимых клинико-иммунологических биомаркеров.

Материалы и методы. В работе были применены клинические, иммунологические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические методы исследования. В исследование включены пациенты Республики Беларусь с установленным диагнозом ПИД (n=58; 13,1% от общего числа пациентов с ПИД), в дебюте заболевания которых присутствовали лимфаденопатия, спленомегалия и/или экстранодальное лимфопролиферативное поражение, обнаруженные нами в ходе клинического исследования пациентов (посредством медицинского осмотра, компьютерной томографии, магнитно-резонансной томографии и ультразвукового исследования). Иммунологическое исследование проводилось методом многоцветного иммунофенотипирования на проточном цитофлюориметре Navios (фирмы Beckman Coulter) по безотмывочной технологии пробоподготовки. Комплекс независимых диагностических критериев ПИД-ассоциированной хронической незлокачественной лимфо-пролиферации определяли с помощью многофакторного метода бинарной логистической регрессии.

Заключение. Первичные иммунодефициты с хронической незлокачественной лимфопролиферацией характеризуются клинико-иммунологической вариабельностью. Впервые в Республике Беларусь проанализирован спектр иммунологических изменений у больных ПИД-ассоциированной хронической незлокачественной лимфо-пролиферацией. Наиболее информативными диагностическими критериями среди стандартных и минорных популяций лимфоцитов являются дважды негативные Т-лимфоциты, CD19+ и CD3+HLA-DR+.

Summary

Aim. To increase the efficiency of diagnosis of primary immunodeficiencies occurring with chronic non-malignant lymphoproliferation through the use of significant clinical and immunological biomarkers.

Materials and methods. Clinical, immunological, immunohistochemical and molecular genetic research methods were used in the work. The study included patients of the Republic of Belarus with an established diagnosis of PID (n=58; 13.1% of the total number of patients with PID), whose onset of the disease included lymphadenopathy, splenomegaly and/or extranodal lymphoproliferative lesions, which we discovered during a clinical study of patients (through physical examination, computed tomography, magnetic resonance imaging and ultrasound). The immunological study was carried out using multicolor immunophenotyping on a Navios flow cytofluorimeter (Beckman Coulter) using no-wash sample preparation technology. A set of independent diagnostic criteria for PID-associated chronic non-malignant lymphoproliferation was determined using a multivariate binary logistic regression method.

Conclusion. Primary immunodeficiencies with chronic non-malignant lymphoproliferation are characterized by clinical and immunological variability. For the first time in the Republic of Belarus, the spectrum of immunological changes in patients with PID-associated chronic non-malignant lymphoproliferation was analyzed. The most informative diagnostic criteria from among the standard and minor populations of lymphocytes are double-negative T-lymphocytes, CD19+ and CD3+HLA-DR+.

Ключевые слова

Первичный иммунодефицит, иммунная дисрегуляция, хроническая незлокачественная лимфопролиферация, минорные популяции лимфоцитов, иммуноглобулин.

Введение

Хроническая незлокачественная лимфопролиферация является одним из вариантов клинического проявления первичных иммунодефицитов (ПИД), включая болезни иммунной дисрегуляции, общую вариабельную иммунную недостаточность (ОВИН) с иммунной дисрегуляцией, а также редкие варианты аутовоспалительных синдромов и дефектов системы комплемента. ПИД-ассоциированная хроническая незлокачественная лимфопролиферация чаще всего клинически проявляется в виде лимфаденопатии и/или спленомегалии и представляет собой серьёзную диагностическую проблему, особенно в сфере онкологии и гематологии [1,2,3,4]. При некоторых вариантах ПИД развивается экстранодальное лимфопролиферативное поражение лёгких, печени, кишечника, которое может быть трудно интерпретируемым [2,5]. Механизмы развития ПИД-ассоциированной незлокачественной лимфопролиферации определяются генетическим дефектом, лежащим в основе заболевания [4]. К настоящему времени не изучены особенности клинико-иммунологической картины хронической незлокачественной лимфопролиферации у пациентов Республики Беларусь при различных формах врождённых дефектов иммунитета, установлению которых и было посвящено данное исследование. Своевременное выявление клинико-иммунологических предикторов ПИД у пациентов с хронической незлокачественной лимфопролиферацией позволяет сократить диагностический период и выбрать верную терапевтическую тактику.

Материалы и методы

Данное исследование было проведено на базе Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии (далее – Центр). В работе были применены клинические, иммунологические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические методы исследования. В исследование включены пациенты Республики Беларусь с установленным диагнозом ПИД (n=58; 13,1% от общего числа пациентов с ПИД), в дебюте заболевания которых присутствовали лимфаденопатия, спленомегалия и/или экстранодальное лимфопролиферативное

Keywords

Primary immunodeficiency, immune dysregulation, chronic non-malignant lymphoproliferation, minor populations of lymphocytes, immunoglobulin.

поражение, обнаруженные нами в ходе клинического исследования пациентов (посредством медицинского осмотра, компьютерной томографии, магнитно-резонансной томографии и ультразвукового исследования). Для установления хронической незлокачественной лимфопролиферации использовались клинические критерии, разработанные нами на основе больших диагностических критериев аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома (ESID – European Society for Immunodeficiencies) (рационализаторское предложение №121 от 06.09.2019). Гистологическое и иммунохимическое исследование с антителами против CD20, Pax5, CD3, CD4, CD8, TdT, Ki67, LMO2, CD10, CD79a, CD34, EBV подтверждало наличие лимфопролиферативного процесса в биопсийном материале (ткани лимфатического узла, селезёнки, лёгкого, кишечника, кожи) у пациентов с хронической незлокачественной лимфопролиферацией. Группа сравнения (ГС) сформирована из пациентов, направленных в Центр по поводу неуточнённой лимфаденопатии и/или спленомегалии, у которых диагноз ПИД впоследствии был исключён (n=101).

Мутационный анализ генов проводили методом секвенирования «следующего» поколения (NGS – next generation DNA sequencing) и методом стандартного исследования по Сэнгеру. При проведении NGS использовали разработанную нами кастомную панель из 350 генов, предположительно связанных с развитием ПИД. По результатам NGS анализировали кодирующие области генов, прилежащие к ним сайты сплайсинга, регуляторные области. Все клинически значимые генетические варианты подтверждали секвенированием по Сэнгеру. В случае подтверждённого генетического дефекта у пациентов, включённых в исследование, были обследованы родственники первой линии для определения характера наследования и пенетрантности гена.

Иммунологическое исследование проводилось методом многоцветного иммунофенотипирования на проточном цитофлюориметре Navios (фирмы Beckman Coulter) по безотмывочной технологии пробоподготовки. Материалом исследования являлась периферическая кровь. Иммунологическое обследование включало показатели стандартной иммунограммы

с определением клеток с иммунофенотипами: Т-лимфоциты, Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты, В-лимфоциты, натуральные киллеры, активированные Т-лимфоциты. А также дополнительные иммунофенотипические маркеры с учётом патогенеза ПИД: тимические мигранты, наивные Т-хелперы, Т-хелперы памяти, наивные CD8+ Т-лимфоциты, CD8+ памяти, регуляторные Т-лимфоциты, дважды негативные Т-лимфоциты, IgD-переключённые В-лимфоциты памяти, IgD-непереключённые В-лимфоциты памяти или В-лимфоциты маргинальной зоны, функционально-незрелые В-лимфоциты, регуляторные В-лимфоциты.

Комплекс независимых диагностических критериев ПИД-ассоциированной хронической незлокачественной лимфопролиферации определяли с помощью многофакторного метода бинарной логистической регрессии. Обучающая выборка состояла из 134 пациентов с хронической незлокачественной лимфопролиферацией, из которых у 33 генетически верифицирован ПИД. Результирующая (зависимая) переменная была кодирована следующим образом: 1 – хроническая незлокачественная лимфопролиферация с генетически верифицированным ПИД (n=33), 0 – ГС (n=101). В качестве независимых (влияющих) переменных выступали 13 параметров иммунограммы.

Информированное согласие получено у всех пациентов или их официальных представителей.

Результаты исследования

Хроническая незлокачественная лимфопролиферация в дебюте заболевания имела место у 58 пациентов (13,1%) со следующими нозологиями: аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (АЛПС) (n=12), синдром активации фосфоинозитид-3-киназы δ (n=6), дефекты Т-регуляторных лимфоцитов (n=8), X-сцепленный лимфопролиферативный синдром (n=4), ОВИН (n=26), дефицит C2 системы комплемента (n=1), дефекты активации инфламмосом с TIM3 дефицитом (n=1). Диагностический период варьировал от 1 месяца до 23 лет (медиана 7,8 года).

С использованием методов молекулярно-генетического исследования у 34 из 58 пациентов были установлены следующие генетические дефекты: FAS-TNFRSF6 (n=12), PIK3CDGOF (n=6), STAT3GOF (n=3), LRBA (n=2), SH2D1A (n=2), XIAP (n=2), NFkB1 (n=), NFkB2 (n=1), CTLA4 (n=3), C2 (n=1), HAVCR2 (n=1). У одного пациента с АЛПС был идентифицирован новый

вариант мутации в гене FAS ex.7, c.566-568 del ACAAGAATT (pTrp189_Val190delTyrLysAsnLeu), который ранее не был описан. У 24 пациентов с ОВИН генетический дефект не был идентифицирован, диагноз был установлен на основании клиничко-лабораторных данных (ESID Registry – Working Definitions for Clinical Diagnosis of PID).

Клиническая характеристика пациентов с ПИД, протекающих с хронической незлокачественной лимфопролиферацией

У большинства пациентов хроническая незлокачественная лимфопролиферация (ХНЛ) была представлена лимфаденопатией и/или спленомегалией (рис. 1). Двое пациентов с синдромом активации фосфоинозитид-3-киназы δ имели стойкую гиперплазию лимфоидного глоточного кольца (рис. 1g). Хроническая незлокачественная лимфопролиферация в виде экстранодального лимфопролиферативного поражения (лёгких, кишечника, печени или кожи (рис. 2, 3, 4)) отмечалась у 100% пациентов с мутацией в гене LRBA, у 66,7% с мутациями в генах STAT3GOF, у 100% пациентов с мутациями в гене CTLA-4, у 65,4% пациентов с ОВИН. У 7 пациентов с ОВИН (26,9%) и у одного пациента с мутацией CTLA-4 (33,3%) была выполнена колоноскопия с биопсией кишечника, которая демонстрировала фолликулярную гиперплазию и очаговую лимфоидную инфильтрацию кишечника (рис. 3b-f). У семерых пациентов развилась лимфома, в том числе ассоциированная с вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ) В-клеточная лимфома у пациента с мутацией в гене SH2D1A (XLPI) и пациента с мутацией в гене CTLA-4 (дефекты Т-reg) (рис. 3a).

ВЭБ-ассоциированная хроническая незлокачественная лимфопролиферация

В качестве основного первичного иммунного механизма, приводящего к ВЭБ-ассоциированной лимфопролиферации у пациентов с ПИД, рассматривают дефект Т-клеточного контроля за вирусом. Утрата такого иммунного контроля может быть полной и приводить к летальному инфекционному мононуклеозу, а может быть частичной и приводить к развитию других лимфопролиферативных заболеваний [6,7]. В норме иммунный ответ на активную (острую или реактивацию латентной) ВЭБ-инфекцию осуществляется посредством элиминирования инфицированных вирусом В-клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами (преимущественно CD8+) и NK-клетками, а также действием ней-

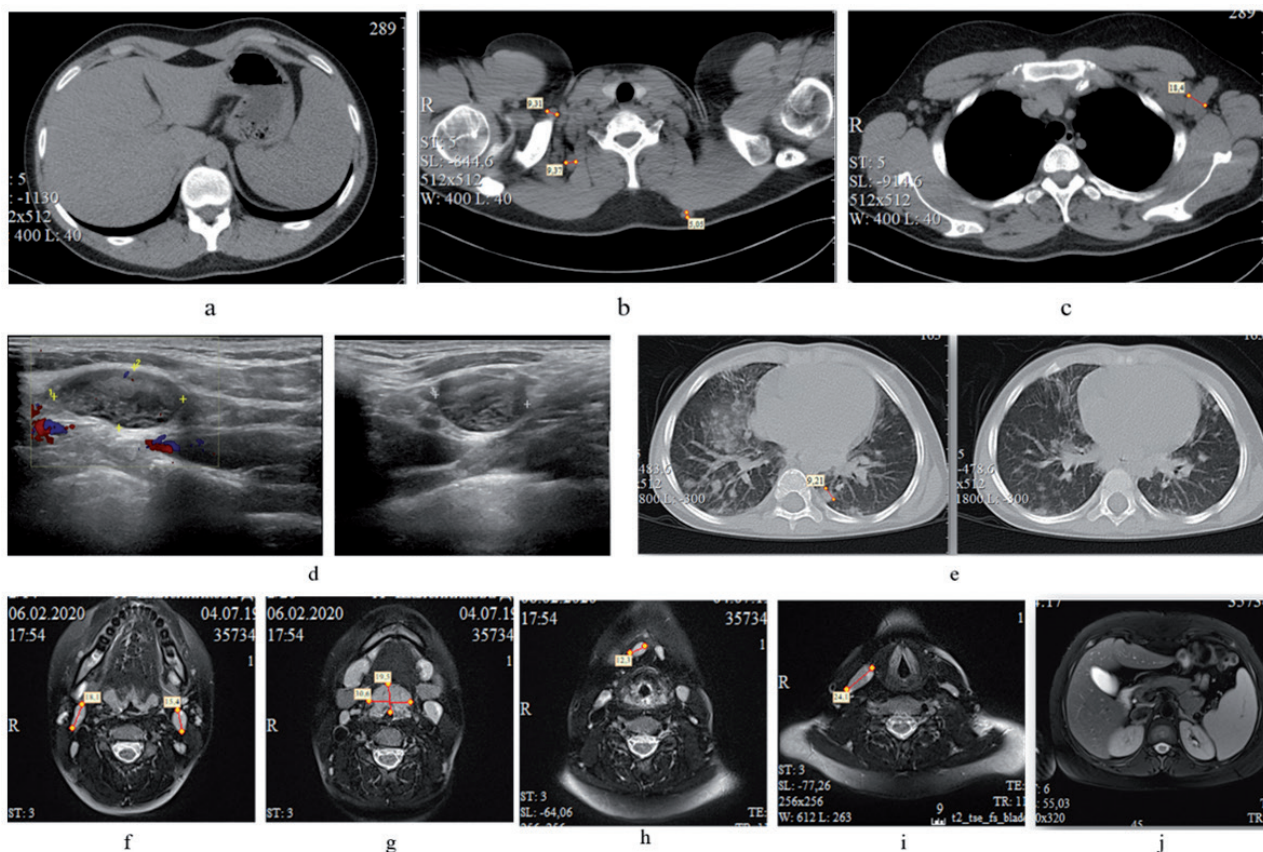


Рис. 1. Проявления хронической незлокачественной лимфопролиферации у пациентов с верифицированным первичным иммунодефицитом

a, b, c – КТ-картина гепатоспленомегалии, паховой, подмышечной лимфаденопатии у пациента с аутоиммунным лимфопролиферативным синдромом; d – УЗИ-картина надключичной лимфаденопатии с признаками патологической перестройки лимфоузла у пациента с ОБВИ; e – РКТ-картина лимфоцитарно-гранулематозного интерстициального поражения лёгких, гепатоспленомегалии у пациента с дефектами Т-регуляторных лимфоцитов – мутация LRBA; f, g, h, i, j – МРТ-картина гипертрофии Вальдейерова кольца – гипертрофия, преимущественно за счёт язычной миндалины (20433 макс поперечный размер язычной миндалины), гипертрофии подчелюстных л/у с обеих сторон до 15-18 мм, подбородочных л/у – до 12 мм, у пациента с синдромом активации фосфоинозитид-3-киназы δ.

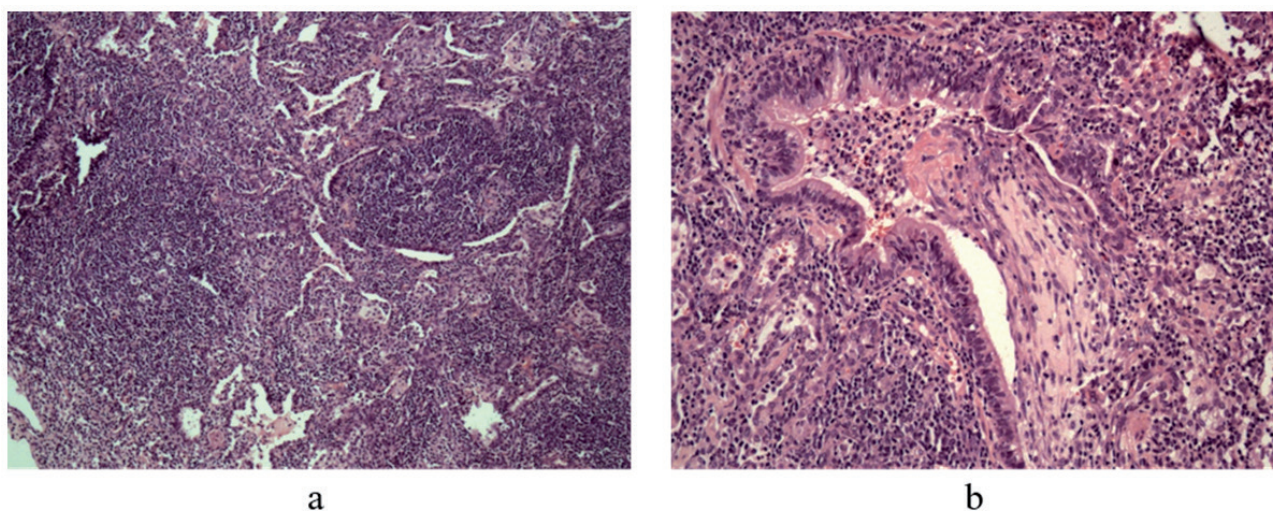


Рис. 2. Биопсия лёгкого у пациентки с LRBA мутацией

a – участки ткани паренхимы лёгкого: нормальное альвеолярное строение полностью отсутствует. В межальвеолярных перегородках – выраженная лимфоплазмочитарная инфильтрация, формирование лимфоидных фолликулов, гематоксилин-эозин, $\times 100$; b – стенка бронхов инфильтрирована лимфоцитами, с образованием фибропластической пробки, гематоксилин-эозин, $\times 100$.

трализирующих антител, которые тормозят распространение вируса между клетками мишенями. Клиническая значимость нарушений, связанных с ВЭБ, указывает на важность проведения ПЦР-анализа ДНК ВЭБ у пациентов с признаками иммунодефицита или иммунной дисрегуляции и лимфопролиферации. Пациенты с дефектной функцией киллинга, как при X-сцепленном лимфопролиферативном синдроме I, II (XLP1 и XLP2), или пациенты с нарушениями, связанными с контрольными точками клеточного цикла, имеют повышенную восприимчивость к развитию ВЭБ-ассоциированного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH).

В Республике Беларусь диагноз X-сцепленного лимфопролиферативного синдрома установлен нами у 4 пациентов. На момент исследования живы 2 пациента. У одного пациента развилась ВЭБ-ассоциированная лимфома Беркитта. У одного пациента ВЭБ-инфекция приняла быстро прогрессирующее течение, что привело к летальному исходу. У двоих пациентов незлокачественная лимфопролиферация развилась на фоне ВЭБ-индуцированного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза.

Редкие варианты ПИД, ассоциированные с лимфопролиферацией

В публикациях последних лет рассматриваются новые клинические и диагностические аспекты, связанные с мутацией *HAVCR2* [8].

В Республике Беларусь такое заболевание было подтверждено нами у одной пациентки 15 лет, обследованной по поводу недифференцированного лимфопролиферативного заболевания кожи и подкожно-жировой клетчатки. Методом полного геномного секвенирования был выявлен патогенный гомозиготный вариант в экзоне 2 гена *HAVCR2* с.А291G, кодирующем Т-клеточный иммуноглобулин муцин-3 (TIM-3), ингибирующий рецептор, который экспрессируется на Т-клетках и клетках врожденного иммунитета. Нарушение экспрессии TIM-3 приводит к стойкой активации Т-клеток и повышению продукции воспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β) [8]. У пациентки диагностирована подкожная панникулитоподобная Т-клеточная лимфома (ПТКЛ) и гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз.

АЛПС-подобный иммунофенотип у пациентов с ПИД-ассоциированной хронической незлокачественной

лимфопролиферацией

Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (АЛПС) представляет собой первичный иммунодефицит из группы болезней иммунной дисрегуляции, в основе которого лежат дефекты FAS-зависимого апоптоза лимфоцитов. У большинства пациентов (60-70%) выявляется мутация в гене FAS. Мутация *CASP10* – у 2-3% пациентов. В 20-30% случаев выявить мутацию не удаётся. Дефектный апоптоз вызывает накопление циркулирующих и паракортикальных дважды негативных Т-лимфоцитов (TCRab+CD3+CD4-CD8-), что приводит к хронической лимфопролиферации и клиническому увеличению лимфатических узлов и/или селезёнки. На сегодняшний день описано несколько десятков ПИД со схожим клинико-иммунологическим фенотипом.

В Республике Беларусь диагноз АЛПС выставлен у 12 пациентов, все случаи генетически верифицированы. У одного пациента был идентифицирован новый вариант мутации в гене FAS ex.7, с.566-568 del ACAAGAATT (pTrp189_Val190delTyrLysAsnLeu), который ранее не был описан. Медиана возраста манифестации АЛПС составила 2,6 года (0,5; 6). Медиана возраста постановки диагноза – 14,8 лет (1; 35).

Изолированная спленомегалия отмечалась нами у 16,7% пациентов (n=2). У 83,3% пациентов (n=10) она сочеталась с периферической лимфаденопатией. У 50% пациентов (n=6) – с висцеральной/мезентериальной лимфаденопатией. У одного пациента развилась В-клеточная лимфома – возраст манифестации 45 лет.

Повышение TCRab+CD3+CD4-CD8- > 6% у пациентов с АЛПС отмечалось в 100% случаев (min 7,6%; max 40%). Дифференциальная диагностика была основана на результатах иммунологического и молекулярно-генетического тестирования.

Все пациенты с АЛПС характеризовались нормальным содержанием иммуноглобулинов А, М, G, и имели нормальное содержание Т-регуляторных лимфоцитов.

АЛПС-подобный клинико-иммунологический фенотип с повышением содержания TCRab+CD3+CD4-CD8- > 6% и хронической незлокачественной лимфопролиферацией также имели пациенты, у которых методом секвенирования «следующего поколения» выявлены другие патогенные генетические варианты: у одной пациентки гомозиготная мутация в 6 экзоне гена *C2* (с.839_866del, p.M280fs), у двоих пациентов (сиблинги) – гетерозиготная мутация во втором

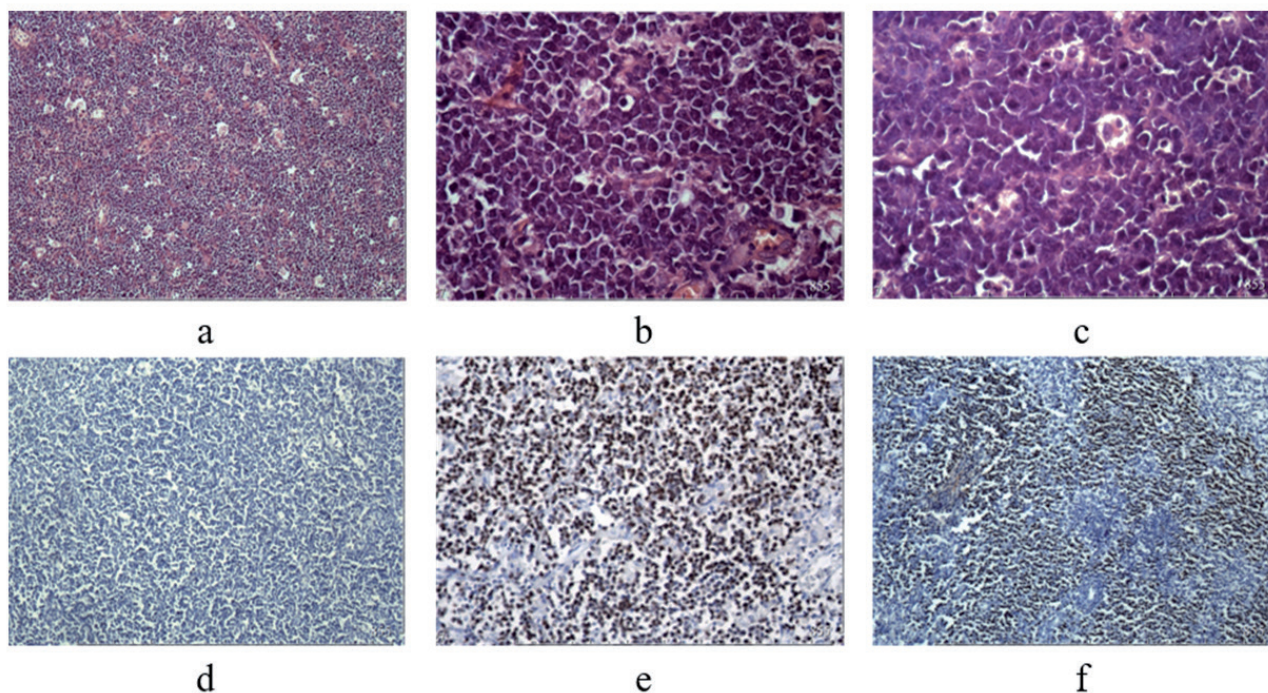


Рис. 3. Биопсия лимфатического узла и кишечника у пациента с CTLA-4

a – участки ткани лимфоузла totally замещены опухолью из мономорфных атипичных клеток среднего размера с крупным ядром с глыбчатым хроматином и редкими ядрышками, с высокой митотической активностью, формированием очагов некроза и реактивной гистиоцитарной инфильтрацией. ИГХ: CD20(+++), CD10(не работает), bcl2(-), bcl6(+++), CMYC(+++), Tdt(-), ki67(95%). Заключение: Лимфома Беркитта ICD-O 9687/3.

b – участок слизистой оболочки тонкой кишки с сохранённой структурой, наличием нескольких гиперплазированных лимфоидных фолликулов, эозинофильной инфильтрации.

c – участок слизистой оболочки толстой кишки с наличием гиперплазированного фолликула, очаговой лимфоидной инфильтрации и большого количества эозинофилов.

d, e, f – участки слизистой оболочки толстой кишки сохранённой гистоархитектоникой, с наличием фолликулярной гиперплазии, очаговой лимфоидной инфильтрации, мелких очажков некроза и диффузной эозинофильной инфильтрации.

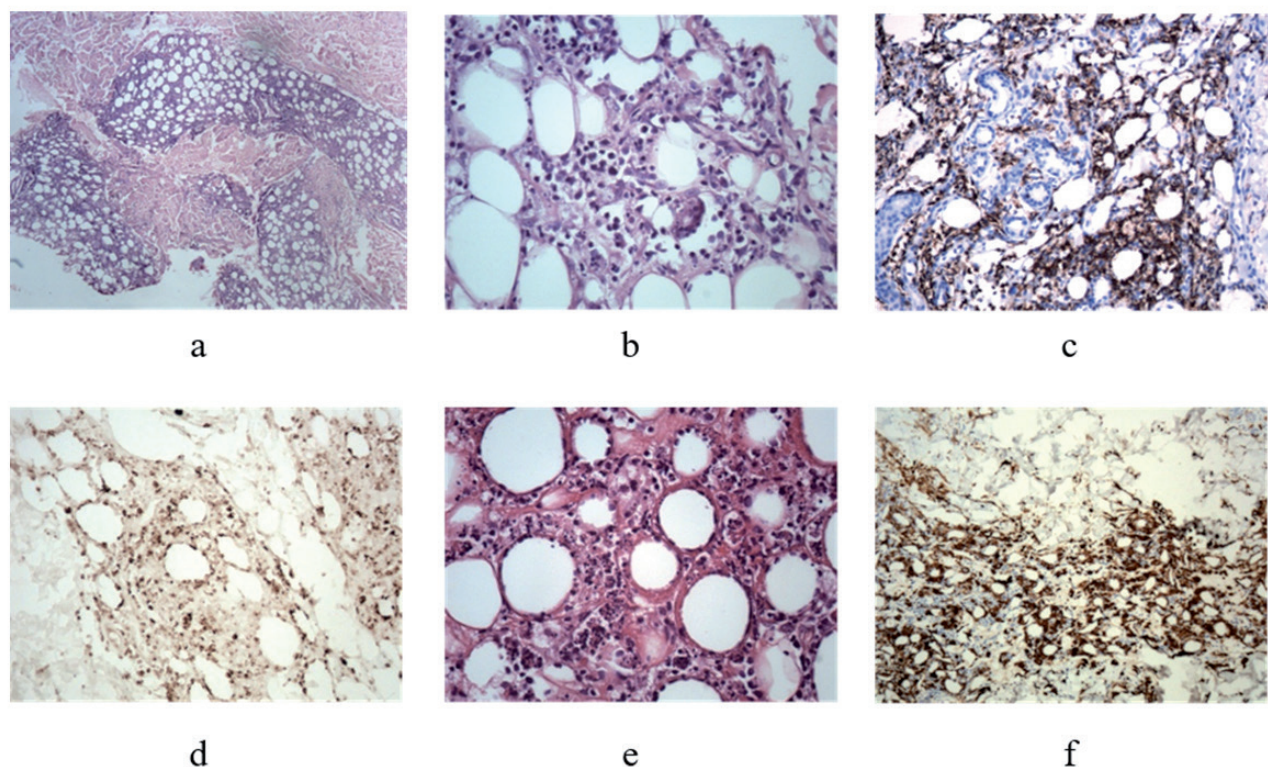


Рис. 4. Биопсия кожи у пациентки с подкожной панникулитоподобной Т-клеточной лимфомой и гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом на фоне TIM-3 дефицита

экзоне гена CTLA-4 (с.151C>T (p.Arg51*), у двоих пациентов – гетерозиготные мутации в 8 (с.779 T>C (p.Leu260Pro)) и 5 экзонах гена STAT3GOF (с.454 C->T (p.Arg152Trp)) соответственно.

ОВИН-подобный иммунофенотип у пациентов с ПИД-ассоциированной хронической незлокачественной лимфопротиперацией

Хроническая незлокачественная лимфопротиперация является одним из вариантов клинической презентации у пациентов с ОВИН. Патогенез незлокачественной лимфопротиперации при ОВИН до конца не выяснен, и в настоящее время изучается роль генетических факторов и иммунологических особенностей в развитии хронической незлокачественной лимфопротиперации в этой группе ПИД. Тем не менее, несмотря на то, что чёткой взаимосвязи генотип-фенотип у пациентов с ОВИН не определено, мутации NF-κB1, NF-κB2 и TNFRSF13B (дефицит TAC1), по-видимому, связаны с развитием лимфопротиперации и аутоиммунной патологии. Мутация NF-κB1 является наиболее распространённым молекулярным дефектом, наблюдаемым в большой когорте пациентов с ОВИН, протекающей с лимфопротиперацией [9,10,11].

В Республике Беларусь 30,9% пациентов с ОВИН (n=26) на момент постановки диагноза имели лимфаденопатию и/или спленомегалию. У 7,7% (n=2) из 26 были установлены патогенные генетические дефекты NFκB1 ex.6, p.Gly92Val (n=1), NFκB2 ex.22, с.2557C>T (p.Arg853*) (n=1). У 24 пациентов с ОВИН генетический дефект не был идентифицирован, диагноз был установлен на основании клинико-лабораторных данных (ESID Registry – Working Definitions for Clinical Diagnosis of PID). ОВИН характеризуется снижением не менее двух изотипов иммуноглобулинов, слабым антительным ответом на вакцинацию, снижением переключённых В-клеток памяти, при условии исключения других причин гипогаммаглобулинемии.

Медиана возраста манифестации составила 4,9 года (1; 24). Сочетание лимфаденопатии и спленомегалии имелось у 76,9% (n=20). У 15,4% (n=4) пациентов периферическая лимфаденопатия сочеталась с медиастиальной лимфаденопатией. У 11,5% пациентов (n=3) была диагностирована В-клеточная фолликулярная лимфома. У 26,9% пациентов (n=7) с хронической диареей – фолликулярная гиперплазия и очаговая лимфоидная инфильтрация кишечника.

По результатам иммунологического исследования у пациентов с ОВИН было выявлено достоверное снижение уровня иммуноглобулинов G (p<0,001), иммуноглобулина M (p<0,05) и иммуноглобулина A (p<0,001). Также у большинства пациентов было выявлено резкое снижение титра специфических антител против антигенов групп крови.

Гипогаммаглобулинемия со снижением IgA, IgG и/или IgM на <2SD от возрастной нормы отмечалась у 100% пациентов с мутацией LRBA (n=2), у 33,3% пациентов (n=1) с мутацией CTLA-4 (n=2) и 33,3% пациентов (n=1) с мутацией STAT3GOF. Большинство пациентов с ОВИН имели статистически значимое снижение относительного содержания IgD-переключённых и IgD-непереключённых В-лимфоцитов памяти, а также 66,7% пациентов с синдромом активированной фосфоинозитид-3 киназы (n=4), 100% пациентов с мутацией LRBA (n=2), 66,7% пациентов с мутацией CTLA-4 (n=2) и 33,3% пациентов с мутацией в гене STAT3GOF (n=1) (рис. 7).

Клиническими признаками синдрома активированной фосфоинозитид-3 киназы δ являются хроническая незлокачественная лимфопротиперация и аутоиммунная патология. В основе заболевания лежат мутации молекулярного комплекса фосфоинозитид-3-киназы (PI3K). Гиперактивация комплекса PI3K, главным образом за счёт усиления функции сигнального пути mTOR, приводит к ОВИН-подобному иммунофенотипу [12]. Синдром активации фосфоинозитид-3-киназы δ в Республике Беларусь был установлен у 6 пациентов из 5 семей. Все пациенты дебютировали на первом году жизни. Медиана возраста постановки диагноза – 7,7 лет (1; 15). У всех пациентов на момент постановки диагноза имели место лимфаденопатия и/или спленомегалия. Двое пациентов имели стойкую гиперплазию лимфоидного глоточного кольца. У троих 50% пациентов (n=3) периферическая лимфаденопатия и спленомегалия сочетались с висцеральной/мезентериальной лимфаденопатией. У 50% пациентов (n=3) лимфаденопатия/спленомегалия были ассоциированы с ВЭБ-инфекцией.

Таким образом, 66,7% (n=2) пациентов с мутацией STAT3GOF, 66,7% (n=2) пациентов с мутацией CTLA-4 при определении минорных популяций лимфоцитов имеют повышение TCraB+CD3+CD4-CD8- более 6% (рис. 6).

ПИД-ассоциированная хроническая незлокачественная лимфопротиперация со снижением T-регуляторных

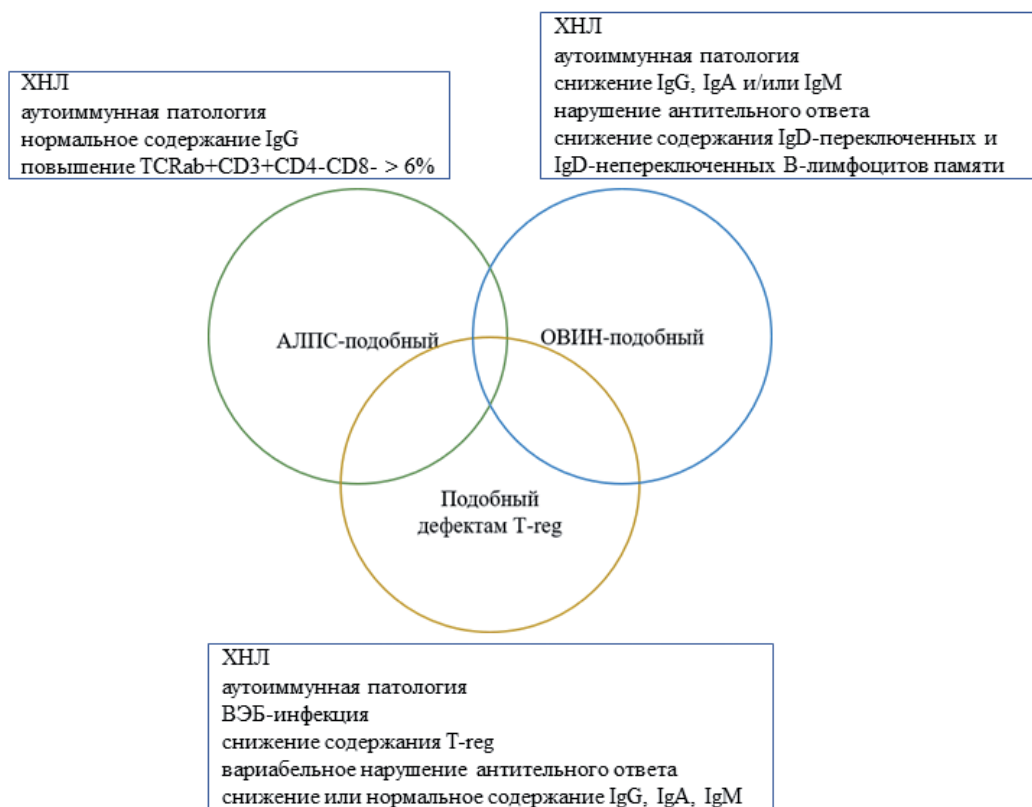


Рис. 5. Клинико-иммунологические фенотипы у пациентов с ПИД-ассоциированной хронической незлокачественной лимфопролиферацией

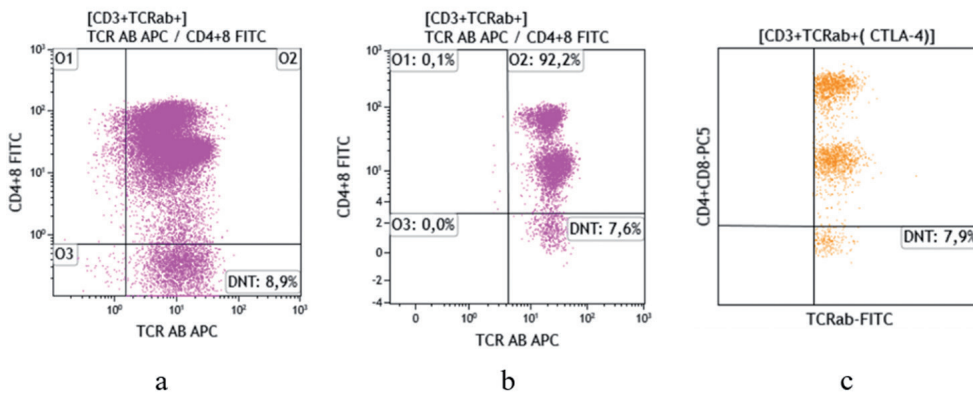


Рис. 6. Содержание TCRab+CD3+CD4-CD8- от TCRab+CD3+ Т кл. у пациентов с АЛПС (а), STAT3GOF (b), CTLA-4 (c)

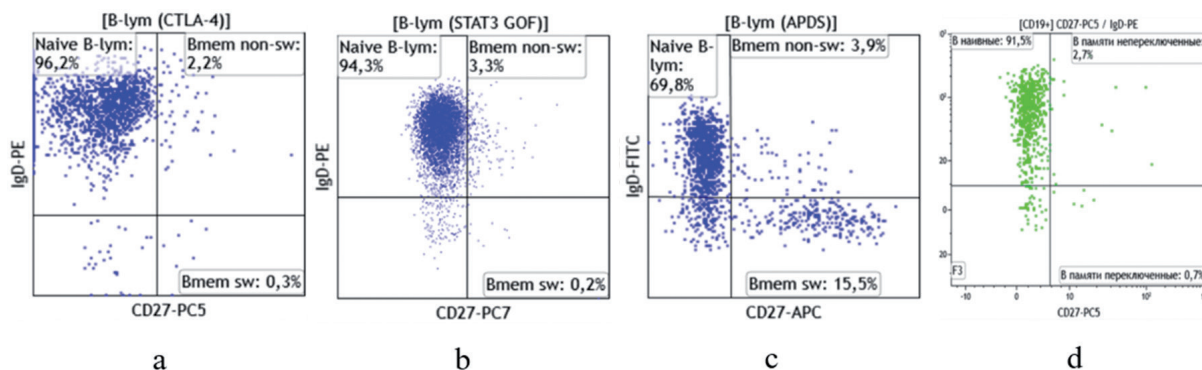


Рис. 7. Содержания IgD-переключённых и IgD-непереключённых В-лимфоцитов памяти с CTLA-4 (а), STAT3GOF (b), APDS (c), ОВИН (d)

лимфоцитов

Дополнительным критерием оценки иммунологической дисрегуляции является оценка регуляторных Т-лимфоцитов. На сегодняшний день описаны молекулярные дефекты, приводящие к нарушению функции Т-регуляторных лимфоцитов: дефицит цитотоксического Т-лимфоцитарного антигена-4 (CTLA-4), дефицит LRBA с аутоантителами, дефектами клеток Treg, аутоиммунной инфильтрацией и энтеропатией (LATAI), дефицит CD25, усиление функции преобразователя сигнала и активатора транскрипции (STAT) [13,14,15].

В Республике Беларусь у 8 пациентов из 6 семей были идентифицированы генетические дефекты, приводящие к дефектам Т-регуляторных лимфоцитов: STAT3GOF (Signal transducer and activator of transcription 3 gain-of-function) (n=3), LRBA (Lipopolysaccharide (LPS) – responsive beige-like anchor) (n=2), CTLA-4 4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4) (n=3). На момент исследования один пациент с установленной мутацией LRBA умер. Хроническая незлокачественная лимфопролиферация была представлена лимфаденопатией и/или спленомегалией, а также экстранодальным лимфопролиферативным поражением лёгких, кишечника, печени. У двух пациентов с мутацией LRBA КТ-исследование демонстрировало генерализованную лимфаденопатию с вовлечением медиастинальных, бронхопульмональных лимфатических узлов, гепатоспленомегалию, а также множественное очаговое поражение лёгких.

У пациентов с мутациями STAT3GOF, CTLA-4, LRBA отмечалось снижение Т-регуляторных лимфоцитов менее 3,5% в 100% случаев (рис. 8), у пациентов с ОВИН – в 11,5% случаев (n=3). У пациентов с ОВИН мы исследовали относительное и абсолютное содержание регуляторных Т-лимфоцитов с фенотипом CD4+CD25++CD127-. Значимые отличия были получены только при анализе относительного содержания регуляторных Т-лимфоцитов среди CD4+ Т-хелперов, это снижение в группе ОВИН ($p<0,01$) по сравнению с данными здоровых детей, что может отчасти являться причиной дисбаланса субпопуляций Т-лимфоцитов.

Клинические фенотипы различных Treg-патий совпадают, поэтому установление молекулярного диагноза важно для выбора терапевтической тактики.

У 33,3% пациентов с CTLA-4 (n=1) и 66,7% (n=2) с мутацией STAT3GOF хроническая незлокачественная лимфопролиферация была ас-

социирована с ВЭБ-инфекцией. Один пациент с CTLA-4 развил ВЭБ-ассоциированную лимфому Беркитта.

Для оценки классифицирующей способности показателей иммунограммы, по которым выявлены статистически значимые различия групп с ПИД-ассоциированной хронической незлокачественной лимфопротиферацией и ГС, был выполнен ROC-анализ с построением характеристических кривых (рис. 9).

Как следует из изображённых на рисунках ROC-кривых и из рассчитанных точечных и интервальных оценок площади под кривыми (AUC) (табл. 1), все показатели иммунограммы, кроме относительного содержания CD3+, характеризовались качеством классификации не ниже хорошего в соответствии с экспертной шкалой оценки площади под ROC-кривой. Среднее значение и значение нижней границы 95% доверительного интервала AUC ($<0,6$) содержания CD3+ свидетельствовали о неудовлетворительном качестве классификации пациентов по данному показателю. В связи с этим этот параметр был исключён из последующего анализа.

Результаты сравнительного анализа и ROC-анализа групп пациентов с ПИД-ассоциированной хронической незлокачественной лимфопротиферацией и ГС послужили основанием для формирования совокупности потенциальных диагностических критериев для выполнения многофакторного анализа.

По итогам прямого пошагового включения переменных в модель был получен комплекс наиболее информативных диагностических критериев из числа стандартных и минорных популяций лимфоцитов. В комплекс вошли 3 показателя: содержание дважды негативных лимфоцитов, CD19+ и CD3+HLA-DR+ (табл. 2). В соответствии со значениями отношения шансов (ОШ) наиболее информативным в дискриминации пациентов с ЛП, связанной и не связанной с ПИД, являлся показатель дважды негативных лимфоцитов (ОШ – 2,43 (95% ДИ: 1,35-4,38)).

Оценка качества приближения полученной статистической модели (Omnibus Test) показала, что общая значимость всей модели высока ($\chi^2=74,03$, $p<0,001$). Значение $\chi^2=14,06$ в тесте Хосмер-Лемешоу, сравнивающем эмпирические и теоретические (предсказанные по модели) частоты, соответствовало уровню значимости $p=0,086$. Поскольку $p>0,05$, полученную регрессионную модель можно признать адекватной.

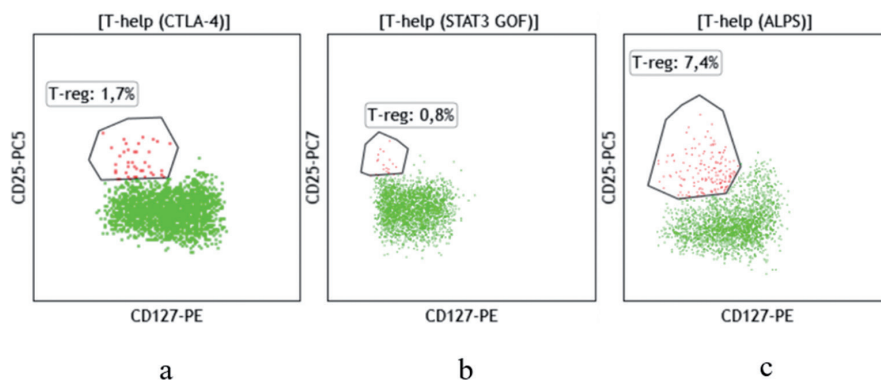


Рис. 8. Содержание Т-регуляторных лимфоцитов у пациентов с CTLA-4 (а), STAT3GOF (b), АЛПС (с)

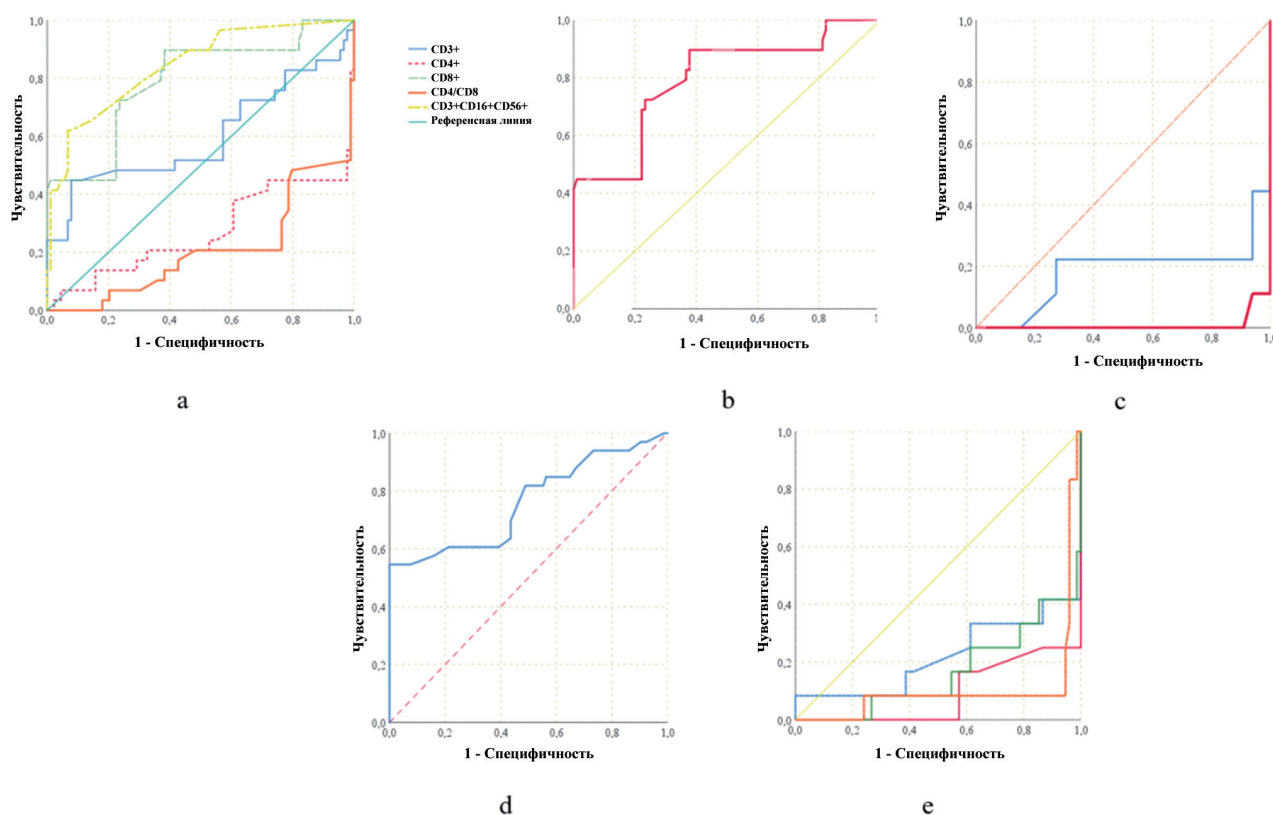


Рис. 9. ROC-кривые классификации пациентов с ПИД-ассоциированной хронической незлокачественной лимфопролиферацией и ГС: а – по содержанию субпопуляций Т-лимфоцитов; б – по содержанию CD3+HLA-DR+; с – по содержанию тимических мигрантов и Т-регуляторных лимфоцитов; д – по содержанию TCRab+CD3+CD4-CD8-; е – по содержанию популяций В-лимфоцитов

Параметры диагностической модели с применением лишь стандартных показателей иммунограммы представлены в таблице 3.

Общая значимость всей модели высока ($\chi^2=57,73$, $p<0,001$). В тесте Хосмер-Лемешо $\chi^2=11,42$ ($p=0,179$). Полученная регрессионная модель соответствует требованиям применимости.

Заключение

Первичные иммунодефициты с хронической незлокачественной лимфопролиферацией характеризуются клинико-иммунологической вариабельностью. Впервые в Республике Беларусь проанализирован спектр иммунологических изменений у пациентов с ПИД-ассоциированной хронической незлокачественной лимфопролиферацией. ПИД-ассоциированный синдром лимфопролиферации у пациентов Республики Беларусь

Таблица 1. Характеристики ROC-кривых классификации пациентов с хронической незлокачественной лимфопротиферацией на фоне генетически верифицированного первичного иммунодефицита и группы сравнения

Показатель	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка	95% ДИ
CD3+, %	0,598	0,072	0,458-0,739
CD4+, %	0,270	0,064	0,145-0,396
CD8+, %	0,791	0,051	0,691-0,892
CD4/CD8	0,207	0,052	0,105-0,309
CD3+ CD16/CD56+, %	0,844	0,043	0,761-0,928
Тимические мигранты, %	0,182	0,106	0-0,389
Т-регуляторные лимфоциты, %	0,008	0,011	0-0,029
CD3+HLA-DR+, %	0,776	0,121	0,62-0,88
Дважды негативные Т-лимфоциты, %	0,760	0,055	0,652-0,869
CD19+, %	0,218	0,093	0,036-0,401
В лимфоциты, абсолютное число	0,092	0,050	0-0,189
CD19+ CD27+IgD-, %	0,163	0,069	0,027-0,299
CD19+CD27+IgD+, %	0,098	0,061	0-0,218

Таблица 2. Переменные, вошедшие в многофакторную модель диагностики ПИД-ассоциированной хронической незлокачественной лимфопротиферацией с применением показателей иммунограммы (модель 1)

Переменная	Коэффициент регрессии	Статистика Вальда		ОШ (95% ДИ)
		χ^2	p	
Дважды негативные Т-лимфоциты	0,89	8,79	0,003	2,43 (1,35-4,38)
CD19+	-0,281	12,74	<0,001	0,76 (0,65-0,88)
CD3+HLA-DR+	0,133	4,37	0,037	1,14 (1,1-1,31)
Константа	-0,897	3,31	0,046	-

Таблица 3. Переменные, вошедшие в многофакторную модель диагностики ПИД-ассоциированной хронической незлокачественной лимфопротиферацией с применением стандартной панели показателей иммунограммы (модель 2)

Переменная	Коэффициент регрессии	Статистика Вальда		ОШ (95% ДИ)
		χ^2	p	
IgG	0,243	6,55	0,011	1,13 (1,08-1,27)
CD4+	-0,12	5,43	0,021	0,89 (0,77-0,94)
CD19+	-0,376	16,27	<0,001	0,69 (0,57-0,82)
CD3+HLA-DR+	0,12	3,95	0,047	1,14 (1,1-1,31)
Константа	-0,897	3,88	0,049	-

преимущественно представлен незлокачественной В-клеточной пролиферацией, приводящей к лимфаденопатии и/или спленомегалии, у 7 пациентов (12,1%) диагностирована лимфома. Причинами развития ХНЛ у пациентов Республики Беларусь были врождённые дефекты апоптоза, ВЭБ-инфекция, пролиферация клона аутореактивных лимфоцитов, хроническая персистирующая инфекция. Для большинства ПИД отсутствовали специфические иммунологические изменения. Пациенты с ХНЛ могут иметь АЛПС-подобный иммунофенотип, ОВИН-подобный иммунофенотип или снижение Т-регуляторных лимфоцитов. Повышение TCRab+CD3+CD4-CD8- от

TCRab+CD3+ Т кл. > 6% отмечается у 100% пациентов с АЛПС. АЛПС-подобный клинико-иммунологический фенотип с повышением содержания TCRab+CD3+CD4-CD8- > 6% и хронической незлокачественной лимфопротиферацией имеют 66,7% (n=2) пациентов с мутацией STAT3GOF, 66,7% (n=2) пациентов с мутацией CTLA-4. АЛПС-подобный клинико-иммунологический фенотип с повышением содержания TCRab+CD3+CD4-CD8- > 6% и хронической незлокачественной имела пациентка с гомозиготной мутацией в 6 экзоне гена C2 (с.839_866del, p.M280fs).

Ассоциации синдрома лимфопротиферации с ВЭБ среди пациентов с АЛПС выявлено не было.

ВЭБ-ассоциированная лимфопрлиферация отмечалась у всех пациентов с X-сцепленным лимфопрлиферативным синдромом, у 50% пациентов с синдромом активированной фосфоинозитид-3-киназы дельта, у 37,5% пациентов с дефектами T-регуляторных лимфоцитов. Гипогаммаглобулинемию со снижением IgA, IgG и/или IgM на <2SD от возрастной нормы (ОВИН-фенотип) имеют 100% пациентов с мутацией LRBA (n=2), 33,3% пациента (n=1) с мутацией CTLA-4 (n=2) и 33,3% пациента (n=1) с мутацией STAT3GOF. Большинство пациентов с ОВИН

имеют статистически значимое снижение относительного содержания IgD-переключённых и IgD-непереключённых В-лимфоцитов памяти, а также 66,7% пациентов с синдромом активированной фосфоинозитид-3 киназы (n=4), 100% пациентов с мутацией LRBA (n=2), 66,7% пациентов с мутацией CTLA-4 (n=2) и 33,3% пациентов с мутацией в гене STAT3GOF (n=1).

У пациентов с мутациями STAT3GOF, CTLA-4, LRBA отмечается снижение T-регуляторных лимфоцитов менее 3,5% в 100% случаев, у пациентов с ОВИН – в 11,5% случаев (n=3).

Наиболее информативными диагностическими критериями из числа стандартных и минорных популяций лимфоцитов являются дважды негативные T-лимфоциты, CD19+ и CD3+HLA-DR+.

Литература

1. Natkunam Y., Gratzinger D., Chadburn A. Immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders: time for reappraisal? *Blood*. 2018;132(18):1871–1878. doi:10.1182/blood-2018-04-842559
2. Picard C., Gaspar B.H., Al-Herz W. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *Journal of Clinical Immunology*. 2017;38(1):96–128. doi:10.1007/s10875-017-0464-9
3. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 2017.
4. Costagliola G., Consolini R. Lymphadenopathy at the crossroad between immunodeficiency and autoinflammation: An intriguing challenge. *Clinical & Experimental Immunology*. 2021;205(3):288–305. doi:10.1111/cei.13620
5. McCusker C., Upton J., Warrington R. Primary immunodeficiency. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2018;14(S2). doi:10.1186/s13223-018-0290-5
6. McClain K.L. Peripheral lymphadenopathy in children: Etiology, 2019.
7. Sánchez-Ramón S., Bermúdez A., González-Granado L. Primary and Secondary Immunodeficiency Diseases in Oncohaematology: Warning Signs, Diagnosis, and Management. *Frontiers in Immunology*. 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.00586
8. Wegehaupt O., Groß M., Wehr C., et al. TIM-3 deficiency presenting with two clonally unrelated episodes of mesenteric and subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma and hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatric Blood & Cancer*. 2020;e28302. doi:10.1002/pbc.28302
9. Turpin D., Furudoi A., Parrens M. Increase of follicular helper T cells skewed toward a Th1 profile in COVID patients with non-infectious clinical complications. *Clinical Immunology*. 2018;197:130–138. doi:10.1016/j.clim.2018.09.006
10. Gangemi S., Allegra A., Musolino C. Lymphoproliferative disease and cancer among patients with common variable immunodeficiency. *Leukemia Research*. 2015;39(4):389–96. doi:10.1016/j.leukres.2015.02.002
11. Sander C.A., Medeiros L.J., Weiss L.M. Lymphoproliferative Lesions in Patients with Common Variable Immunodeficiency Syndrome. *The American Journal of Surgical Pathology*. 1992;16(12):1170–1182. doi:10.1097/0000478-199212000-00004
12. Luo Y., Xia Y., Wang W. Identification of a novel de novo gain-of-function mutation of PIK3CD in a patient with activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome. *Clinical Immunology*. 2018;197:60–67. doi:10.1016/j.clim.2018.08.007
13. Schubert D., Bode C., Kenefack R., et al. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nature Medicine*. 2014;20(12):1410–1416. doi:10.1038/nm.3746
14. Alkhairy O.K., Abolhassani H., Rezaei N. Spectrum of Phenotypes Associated with Mutations in LRBA. *Journal of Clinical Immunology*. 2015;36(1):33–45. doi:10.1007/s10875-015-0224-7
15. Fabre A., Marchal S., Barlogis V. Clinical aspects of STAT3 gain-of-function germline mutations: A Systematic Review. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2019;6:48–53. doi:10.1016/j.jaip.2019.02.018

Сведения об авторах

Жаранкова Юлия Сергеевна – врач-детский онколог-гематолог, врач-иммунолог Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии. 220004, Беларусь, г. Минск, ул. Мельникайте 8. E-mail: marukovich85@mail.ru.

Алешкевич Светлана Николаевна – врач-детский онколог-гематолог Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Шарапова Светлана Олеговна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии научного отдела Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Сакович Инга Сергеевна – старший научный сотрудник лаборатории иммунологии научного отдела Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Гурьянова Ирина Евгеньевна – кандидат биологических наук, зав. лабораторией молекулярно-генетических исследований Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Полякова Екатерина Александровна – кандидат биологических наук, зав. лабораторией генетических биотехнологий Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Шитикова Мария Григорьевна – врач клинической лабораторной диагностики высшей категории, зав. клинико-диагностической лабораторией Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Углова Татьяна Алексеевна – кандидат медицинских наук, доцент, врач-детский онколог-гематолог, ведущий научный сотрудник Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Белевцев Михаил Владимирович – кандидат биологических наук, заместитель директора по научной работе Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Поступила 10.08.2023.