УДК 575.22:616.155.32:[616-031.62–021.483–056.7]–053.2

Сравнительный анализ фенотипа Т- и В-лимфоцитов при аутоиммунном лимфопролиферативном синдроме и синдроме Вискотта-Олдрича

С.О. Шарапова[1], О.Е. Пащенко[2], И.Е. Гурьянова[1], А.А. Мигас[1], И.В. Кондратенко[2], М.В. Белевцев[1]

[1] Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минский район, д. Боровляны, Беларусь

[2] Российская детская клиническая больница, Москва, Россия

Comparative phenotypic analysis of T- and B-lymphocytes in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome and Wiskott-Aldrich syndrome

S.O. Sharapova[1], O.E. Paschenko[2], I.E. Guryanova[2], A.A. Migas[1], I.V. Kondratenko[2], M.V. Belevtsev[1]

[1] Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk region, v. Borovliany, Belarus

[2] Russian Children's Clinical Hospital, Moscow, Russia

Аннотация

Цель: выявить фенотипические изменения в формировании Т- и В-лимфоцитов, регуляторных цитокинов (BAFF, IL10) в периферической крови у пациентов с аутоиммунным лимфопролиферативным синдромом (АЛПС) и синдромом Вискотта-Олдрича (WAS) как иммунодефицитов с врожденным нарушением иммунологической регуляции.
Методы: цитофлуорометрический анализ образцов периферической крови 23 пациентов, 12 пациентов с АЛПС (8 мальчиков, 4 девочки и 11 мальчиков. Анализировали следующие субпопуляций Т-лимфоцитов: Т-лимфоциты (CD3+), Т-хелперы (CD3+CD4+), цитотоксические Т-клетки (CD3+CD8+), натуральные киллеры (CD3-CD16+CD56+), «тимические эмигранты» (CD4+CD31+CD45RA+), регуляторные Т-лимфоциты (CD4+CD25+CD127-); В-лимфоцитов - IgD-переключенные В-лимфоциты памяти (CD19+CD27+IgD), IgD-непереключенные В-лимфоциты памяти или IgD+ В-лимфоциты маргинальной зоны (CD19+CD27+IgD+), наивные IgD+ В-лимфоциты (CD19+CD27-IgD+), IgM-переключенные В-лимфоциты памяти (CD19+CD27+IgM-), IgM-непереключенные В-лимфоциты памяти или IgM+ В-лимфоциты маргинальной зоны (CD19+CD27+IgM+), наивные IgM+ В-лимфоциты (CD19+CD27-IgM+), функционально-незрелые В-лимфоциты (CD19+CD21-, CD19+CD21-CD38-, CD19+CD21-CD38++), предположительно регуляторные В-лимфоциты (CD20+CD5+, CD19+CD24++CD38++),

Summary

Objective: To identify phenotypic changes in the formation of T-and B -lymphocytes, regulatory cytokines (BAFF, IL10) in the peripheral blood of patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) and Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) as human model of inborn immunedysregulation.
Methods: Flowcytometric analysis of the following T- and B-cell subsets was performed in 23 patients, 12 patients with ALPS (8 boys, 4 girls and) and 11 boys with WAS, compared to age-matched controls: T cells (CD3 +), T -helper cells (CD3+CD4+), cytotoxic T cells (CD3+CD8+), natural killer cells (CD3-CD16+ CD56+), «thymic emigrants» (CD4+CD31+CD45RA+), regulatory T cells (CD4+CD25+CD127-), transitional (CD19+CD38++IgM++), $CD21^{low}$, $CD21^{low}CD38^{low}$, naпve (CD19+CD27-IgM+/IgD+), switched memory (CD19+CD27+IgM-/IgD-), marginal zone B cells (CD19+CD27+IgM+/IgD+), putative self-reactive B cells (CD19+IgD+IgM^{low}), putative regulatory B cells (CD19+CD24++CD38++), functionally immature B lymphocytes (CD19+CD21-, CD19+ CD21-CD38-, CD19+CD21-CD38++) and BAFF, IL10 serum levels were evaluated by ELISA assay.
Results and conclusions: Immunological manifestation of dysregulation by T -cell immunity is the reduction of recent thymic emigrants (CD4+CD45RA+CD31+) and regulatory T-lymphocytes (CD4+ CD25+CD127-) in patients with ALPS regardless the presence of mutation in the *Fas* gene and WAS

предположительно аутореактивные В-лимфоциты (CD19+IgD+IgM-); уровень BAFF, IL10 в сыворотке был определен методом ELISA.
Результаты и выводы: Иммунологическим проявлением дисрегуляции со стороны Т-клеточного иммунитета является снижение относительного содержания клеток, недавно мигрировавших из тимуса (CD4+CD45RA+CD31+) и регуляторных Т-лимфоцитов (CD4+CD25+CD127-) у пациентов с АЛПС вне зависимости от наличия мутации в гене *Fas* и у WAS с сопутствующей аутоиммунной патологией. Нарушение иммунологической регуляции проявляется относительной экспансией В-лимфоцитов с «предположительно» аутореактивными свойствами (CD19+IgD+IgM-/low), функционально незрелых В-лимфоцитов (CD19+CD21-CD38-) у пациентов с АЛПС и геномной мутацией в гене Fas, а также WAS и сопутствующей аутоиммунной патологией.

Ключевые слова
Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, синдром Вискотта-Олдрича, тимические эмигранты, регуляторные Т-лимфоциты, В-лимфоциты памяти, функционально незрелые В-лимфоциты, аутореактивные В-лимфоциты

associated with autoimmune pathology. Immunedysregulation appears relative expansion of B-lymphocytes with putative autoreactive properties (CD19+IgD+IgM-/low), functionally immature B lymphocytes (CD19+CD21-CD38-) in ALPS patients with genomic *Fas* mutation and WAS with related autoimmune diseases.

Keywords
Autoimmune lymphoproliferative syndrome, Wiskott-Aldrich syndrome , thymic emigrant, regulatory T-lymphocytes, memory B-lymphocytes, functional immature B - lymphocytes, "autoreactive" B-lymphocytes.

Введение

Первичные иммунодефициты (ПИД) составляют большую группу врожденных, генетических детерминированных заболеваний иммунной системы, в основе которых лежат более 260 генов. Их клинические проявления у пациентов очень разнообразны, но все пациенты с ПИД имеют повышенную чувствительность к инфекциям и склонность к развитию аутоиммунной и онкопатологии. [1]. Нарушение регуляции иммунного ответа приводит к развитию различных видов патологии, таких как лимфопролиферация, аутоиммунные процессы, формирование гранулем, гиперпродукция IgE [2]. Молекулярные и клеточные механизмы, ответственные за дисрегуляцию в иммунной системе очень отличаются при различных формах первичных иммунодефицитов. В некоторых иммунодефицитах в патогенез данного состояния вовлечены несколько механизмов. Иммунодефициты, ассоциированные с иммунодисрегуляцией, встречаются среди болезней с недостаточностью антителообразования, Т-клеточными дефектами, дефектами фагоцитарного ряда и недостаточностью системы комплемента [2].

Центральная толерантность обеспечивает делецию большинства аутореактивных Т- и В-лимфоцитов, однако даже у здоровых людей некоторые из этих клеток могут «ускользать» из тимуса, но механизмы периферической толерантности в норме предотвращают распознавание собственных антигенов этими клетками. В развитии аутоиммунитета у пациентов с ПИД кроме принятой теории нарушения механизмов толерантности вследствие различных генетических дефектов, также имеют место нарушения апоптоза или пролиферации, дефекты передачи сигнала или иммуно-опосредованное нарушение клиренса, аберрации в клеточных механизмах врожденного иммунитета [1]. Аутоиммунная манифестация была описана при многих формах первичных иммунодефицитах, независимо от природы иммунологического дефекта, лежащего в основе. В один генетический тип ПИД может быть вовлечено несколько механизмов развития аутоиммунитета и иммунодисрегуляции. Однако для многих форм ПИД аутоиммунная манифестация не отражает нарушение элиминации аутореактивных лимфоцитов или неэффективной работы механизмов периферической толерантности, а является причиной неспособности иммунной системы элиминировать патоген. Это часто приводит к продолжительному воспалительному ответу, который в свою очередь повреждает окружающие ткани [1].

Генетический дефект апоптоза приводит к аутоиммунному лимфопролиферативному синдрому (АЛПС). Это генетическое заболевание, приводящее к дефекту FAS–зависимого апоптоза лимфоцитов (Fas R – Fas L), характеризующееся незлокачественной лимфопролиферацией - лимфоаденопатией (ЛАП), гепатоспленомегалией и аутоиммунной патологией (аутоиммунной цитопенией). Вторым, после лимфопролиферации, наиболее частым клиническим проявлением АЛПС является аутоиммунная патология,

а именно, иммуноопосредованные цитопении (иммунная тромбоцитопения (ИТП), аутоиммунная гемолитическая анемия (АИГА), нейтропения), которые встречаются в более чем в 70% случаев. Менее часто встречается: гломерулонефрит, аутоиммунный гепатит, первичный биллиарный цирроз, синдром Гийена-Барре, васкулит [5].

Главным лабораторным критерием аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома (АЛПС) является повышенное содержание в периферической крови дважды-негативных Т-лимфоцитов (ДНТ) с фенотипом CD3+TCRαβ+CD4-CD8- [6]. Это необычные Т-лимфоциты, которые синтезируют высокий уровень ИЛ-10 и плохо «подвергаются» апоптозу [7].

У пациентов с геномной мутацией в гене *Fas* среди показателей клеточного иммунитета описана экспансия CD8+ Т-лимфоцитов, TCRαβ+CD4-CD8-CD3+, TCRγδ+CD4-CD8-CD3+, CD3+HLA-DR+ [8].

Роль В-лимфоцитов в патогенезе АЛПС у людей изучена мало, большинство работ выполнено на мышах [7]. У пациентов описана поликлональная экспансия В-лимфоцитов с фенотипом CD20+CD5+, у 80% пациентов детектируется повышенный уровень поликлональных антител класса IgG и IgA и аутоантител у 70% [8]. Также у пациентов с АЛПС снижено содержание CD27+ В-лимфоцитов памяти, что свидетельствует о нарушении дифференцировки В-лимфоцитов в периферической крови [9].

Группа немецких ученых определяла 6 различных субпопуляций В-лимфоцитов и показала снижение относительного содержания В-лимфоцитов маргинальной зоны (MZB) (CD27+IgD+), переключенных В-лимфоцитов памяти (CD27+IgD-) и переключенных плазмобластов (CD38++CD24-), тем не менее, большинство пациентов имели повышенное содержание переходных, transitional В-лимфоцитов (CD38++IgM++) [9].

Также в группу синдромов с высокой склонностью к аутоиммунной патологии входит синдром Вискотта-Олдрича (WAS — Wiscott-Aldrich Syndrome). Это комплексное заболевание, которое характеризуется микротромбоцитопенией, экземой, иммунодефицитом, повышенным риском развития аутоагрессии и лимфомы. Специфический белок, получивший название «протеин синдрома Вискотта-Олдрича» (WASP — Wiscott-Aldrich Syndrome Protein) экспрессируется во всех гемопоэтических клетках, это регулятор полимеризации актина, он вовлечен в передачу сигнала в клетке, клеточное движение, формирование иммунологического синапса и апоптоз, связывает фермент глутатион-S-трансферазу, который необходим для поляризации Т-лимфоцитов в течение контакта с антигенпредставляющими клетками. WAS - это генетический дефект белка WAS, ген локализован на Х-хромосоме [10,11].

Аутоиммунные осложнения встречаются от 22 до 72% пациентов с WAS, наиболее часто встречается аутоиммунная гемолитическая анемия (36%), затем васкулит (включая церебральный васкулит; 29%), артриты (29%), нейтропения (25%), воспалительные заболевания кишечника (9%) и IgA-нефропатия (3%), дерматомиозит, увеит также были описаны у некоторых пациентов [12,13]. Более того, несколько аутоиммунных заболеваний может встречаться у одного пациента, что свидетельствует о неблагоприятном прогнозе [13].

Отсутствие или сниженная экспрессия белка Вискотта-Олдрича приводит к функциональным дефектам во всех иммунных клетках. Биологические основы данного заболевания характеризуются нарушением активации клеток, цитотоксической активности CD8+ клеток и естественных киллеров, супрессорной активности естественных регуляторных Т-клеток. У пациентов нарушена подвижность, адгезия и миграция В-лимфоцитов. Отсутствие WAS белка влияет на образование падосом, подвижность и премирование дендритными клетками антигена для Т-лимфоцитов, а также на фагоцитарную активность макрофагов, миграцию и адгезию нейтрофилов. Также WAS белок участвует в передаче сигнала от Т- и В-клеточных рецепторов [13].

Интерес к изучению фенотипических и функциональных характеристик В-лимфоцитов у пациентов с WAS вызван дисгаммаглобулинемией (снижен IgM, нормальный IgG, повышенный IgE) и сниженной или отсутствующей продукцией специфических антител к полисахаридам и другим Т-независимым Аг [11]. У пациентов с WAS на В-лимфоцитах снижена экспрессия CD21, CD35 (CR2, CR1 – рецепторы для компонентов системы комплемента) [14]. Нарушение экспрессии или функционирования этих рецепторов может повлиять на поддержание В-клеточной толерантности и спровоцировать развитие аутоиммунных заболеваний, вызванными иммунными комплексами, таких как СКВ и ревматоидный артрит [15]. У пациентов с WAS также описано повышенное содержание функционально незрелых В-лимфоцитов с фенотипом CD21- [14].

В периферической крови выживание аутореактивных В-лимфоцитов обеспечивает высокий уровень BAFF и APRIL, данные цитокины повышены при некоторых аутоиммунных заболеваниях и лимфопении [16]. У некоторых пациентов с WAS наблюдается повышенное содержание BAFF в сыворотке крови [17].

Цель нашей работы: выявить фенотипические изменения в формировании Т- и В-лимфоцитов и регуляторных цитокинов (BAFF, IL10) периферической крови у пациентов с аутоиммунным лимфопролиферативным синдромом (АЛПС) и синдромом Вискотта-Олдрича (WAS) как иммунодефицитов с врожденным дефектом периферической толерантности.

Материалы и методы

Пациенты и здоровые доноры

В исследование включено 23 пациента, 12 пациентов с АЛПС (8 мальчиков, 4 девочки) в возрасте от 3-лет до 15 лет и 11 мальчиков с WAS в возрасте от 4-х месяцев до 20 лет на момент исследования периферической крови.

На базе Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии был установлен диагноз АЛПС у 6 детей (3 мальчика, 3 девочки) и 6 детей (5 мальчиков, 1 девочка) в отделении клинической иммунологии Российской детской клинической больницы, г. Москва. Диагноз АЛПС был выставлен согласно критерием NIH International Workshop в 2009 [6]. Диагноз синдром Вискотта-Олдрича выставлялся по совокупности клинических и лабораторных данных, наличию мутации в гене *WAS* (у 5 мальчиков диагноз установлен в Беларуси и у 6 – в России).

Мутационный анализ гена *Fas* в геномной ДНК и углубленное иммунологическое исследование периферической крови всех пациентов было проведено в Центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (один пациент в г. Москва). Все пациенты, в зависимости от наличия геномной мутации, были разделены на две группы, с мутацией в кодирующей последовательности гена *Fas* (далее **АЛПС_*Fas*+**) и без обнаруженной мутации (**АЛПС_ *Fas*-**). Поиск мутаций в отсортированных дважды негативных Т-клетках и других генах не проводился. Данное разделение выполнялось для установления роли геномных мутаций в гене *Fas* на клиническое и лабораторное проявление нарушений иммунной регуляции.

Для того чтобы проверить надежность фенотипических маркеров нарушения иммунной регуляции (потенциально «аутореактивных» В-лимфоцитов IgM-IgD+, функционально незрелых В-лимфоцитов CD21-CD38-, регуляторных Т-лимфоцитов CD4+CD25+CD127- и клеток, недавно мигрировавших из тимуса – «тимических эмигрантов» CD4+CD31+CD45RA+), мы оценили относительное содержание этих клеток у пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича. Для этого все пациенты с синдромом Вискотта-Олдрича были разделены на две группы в зависимости от наличия в анамнезе аутоиммунных заболеваний. Пациенты: 5 мальчиков в возрасте от 3-х месяцев до 5 лет на момент исследования периферической крови сформировали группу – **WAS_1**, 6 мальчиков в возрасте от 6 лет 6 месяцев до 20 лет с различными аутоиммунными и воспалительными осложнениями сформировали группу **WAS_2** (таблица 2).

В работе использовали иммунологические данные 84 условно здоровых детей в возрасте от 3-х месяцев до 20 лет (40 мальчиков, 44 девочки). Для анализа иммунологических показателей пациентов подбирали аналогичные группы по возрастному диапазону и медиане.

Для проведения научных и клинических исследований от родителей и опекунов всех пациентов и здоровых доноров было получено письменное информированное согласие.

Иммунофенотипическое исследования Т-лимфоцитов в цельной крови

Для всех ниже перечисленных исследований у пациентов брали периферическую кровь в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА (этилен-диамин тетрауксусная кислота). Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили методом пяти-семицветной проточной цитометрии с использованием процедуры безотмывачного лизирования (lyse/no-wash) на станции пробоподготовки и проточном цитофлуориметре FC500 (Beckman Coulter) и Navios (Beckman Coulter) с использованием моноклональных антител, конъюгированных с FITC, фикоэритрином (PE), ECD, PC-5, PC-7, APC, APC-Alexa 750 (Becton & Dickinson, USA, Immunotech, France, Beckman Coulter, USA, R&D, USA). Иммунологические параметры включали в себя следующие показатели клеточного иммунитета: стандартное иммунологическое исследование: Т-лимфоциты (CD3+), Т-хелперы (CD3+CD4+), цитотоксические Т-клетки (CD3+CD8+), В-лимфоциты (CD19+), натуральные киллеры (CD3-CD16+CD56+); дополнительное исследование: «тимические эмигранты» (CD3+CD4+CD31+CD45RA+), регуляторные Т-лимфоциты (CD4+CD25+CD127-), дважды негативные Т-лимфоциты (ДНТ) (CD3+CD4-

CD8-TCR±I+).

Иммунофенотипическое исследования В-лимфоцитов

Для определения иммунофенотипа В-лимфоцитов мононуклеары периферической крови выделяли на градиенте плотности фиколл-пака (Pharmacia, Швеция), отмывали в фосфатном буфере (PBS + 0,1% азид), инкубировали 15 минут в питательной среде RPMI-1640 при 37°C и 5% CO_2. Затем клетки осаждали и окрашивали моноклональными антителами.

Иммунологические параметры для дополнительного определения В-лимфоцитов включали в себя следующие маркеры: IgD-переключенные (switched) В-лимфоциты памяти (CD19+CD27+IgD-), IgD-непереключенные (non-switched) В-лимфоциты памяти или IgD+ В-лимфоциты маргинальной зоны (CD19+CD27+IgD+), наивные IgD+ В-лимфоциты (CD19+CD27-IgD+), IgM-переключенные В-лимфоциты памяти (CD19+CD27+IgM-), IgM-непереключенные В-лимфоциты памяти или IgM+ В-лимфоциты маргинальной зоны (CD19+CD27+IgM+), наивные IgM+ В-лимфоциты (CD19+CD27-IgM+), функционально-незрелые В-лимфоциты (CD19+CD21-, CD19+CD21-CD38-, CD19+CD21-CD38++), регуляторные В-лимфоциты (CD20+CD5+, CD19+CD24++CD38++), предположительно аутореактивные В-лимфоциты (CD19+IgD+IgM-).

Определение концентрации регуляторных цитокинов BAFF, IL10 определяли, используя ELISA наборы (Human BAFF/BlyS/TNFSF13B, IL10 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) согласно инструкции производителя в сыворотках, предварительно замороженных при -20°C.

Статистическая обработка результатов выполнена с использованием программы GraphPad Prism5. Количественные показатели представлены в виде медианы, 25-го и 75-го процентилей. Достоверность различий в сравниваемых группах количественных признаков оценивали по Mann-Whitney (U-критерий). Уровень $p < 0,05$ был принят за статистически значимый.

Результаты и их обсуждение

Характеристика обследованных пациентов, выявленные генетические изменения, возраста манифестации иммунологической дисрегуляции отражены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, практически для всех пациентов с **АЛПС_*Fas*+** характерна «полная» лимфопролиферация (Л/Г/С у 7 из 7 пациентов) на момент постановки диагноза, также для боль-

Таблица 1. Характеристика пациентов с АЛПС

№	Пол	Геномная мутация в гене *FAS*	Возраст манифест.	Тип манифестации	ДНТ, %
		Группа АЛПС_Fas+			
1	м	N264D	2 мес.	Л/Г/С*, АИГА**, ИТП***	8,6
2	д	V195VfsX20	3 года	Л/Г/С, ИТП	11
3	д	R250Q	1 год	Л/Г/С, ИТП,	6,8
4	д	W241A	4,5 мес.	Л/Г/С, АИГА	8,9
5	м	V227VfsX2	3 мес.	Л/Г/С, АИГА, ИТП	10,8
6	м	D260G	1 г. 9 мес.	Л/Г/С	26,1
7	м	c.676+5 G>A	1 мес.	/Г/С, АИГА, ИТП	26,3
		Группа АЛПС_Fas-			
8	м	Не обнаружена	5 лет	Л/Г/С	18,9
9	м	Не обнаружена	3года	Л/Г/С	4,5
10	м	Не обнаружена	2 г. 7 мес.	Л/Г/С, ИТП	3,1
11	д	Не обнаружена	12 лет	Л/Г/С Аутоиммунный гепатит	8,6
12	м	Не обнаружена	2 месяца	Л/Г/С, колит	3,5

Л/Г/С * – лимфаденопатия, гепатоспленомегалия
АИГА** – аутоиммунная гемолитическая анемия
ИТП*** – иммунная тромбоцитопения

шинства пациентов этой группы характерны аутоиммунные цитопении в анамнезе у 6 из 7 (у 3-х пациентов наблюдались сочетанные цитопении, что свидетельствовало о наличии Эванс синдрома). В группе **АЛПС_*Fas*-** аутоиммунные цитопении встречались гораздо реже, – в 20% случаев, у одной девочки (пациент №11) был диагностирован аутоиммунный гепатит и у одного мальчика (пациент №12) колит как главная манифестация заболевания.

Результаты исследования Т-клеток и ЕК у детей с АЛПС

При анализе Т-лимфоцитов было выявлено значимое снижение CD4+ Т-лимфоцитов в группе **АЛПС_*Fas*+** (рисунок 1А), натуральных киллеров в обеих группах пациентов (рисунок 1В) и увеличение CD8+ Т-лимфоцитов в группе **АЛПС_*Fas*+**. Анализ абсолютных значений вышеописанных популяций выявил значимые отличия только среди CD8+ Т-лимфоцитов – увеличение в группе **АЛПС_*Fas*+** (p=0,01) и натуральных киллеров – снижение в группе **АЛПС_*Fas*-** (p=0,04).

Состояние иммунологической дисрегуляции у пациентов с аутоиммунным лимфопролиферативным синдром выражается в стандартном иммунологическом исследовании в виде повышенного содержания активированных Т-лимфоцитов с фенотипом CD3+HLA-DR+. Как видно из рисунков 2А и 2Б пациенты из группы **АЛПС_*Fas*_+** имеют значительное увеличение относительного, и в абсолютного количества данных клеток.

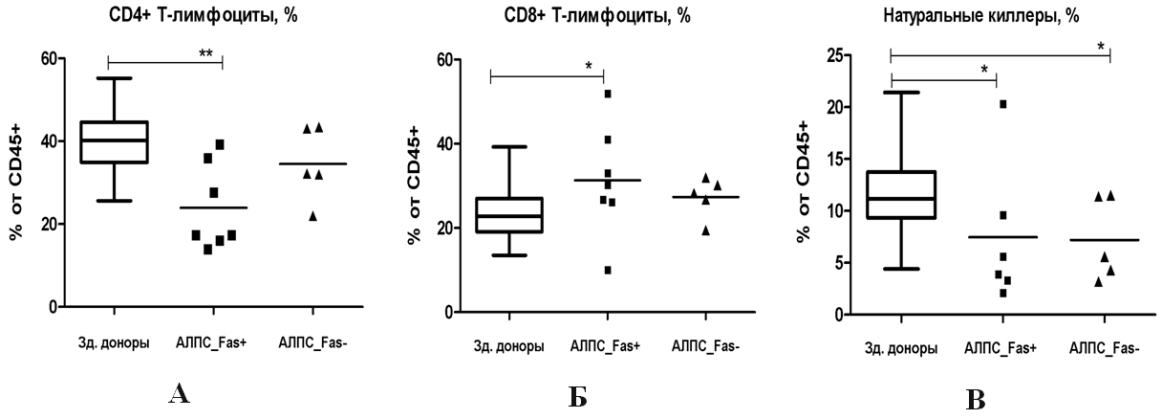

Рис. 1. Относительное содержание CD4+ (А), CD8+ Т-лимфоцитов (Б) и натуральных киллеров у пациентов с АЛПС и здоровых доноров

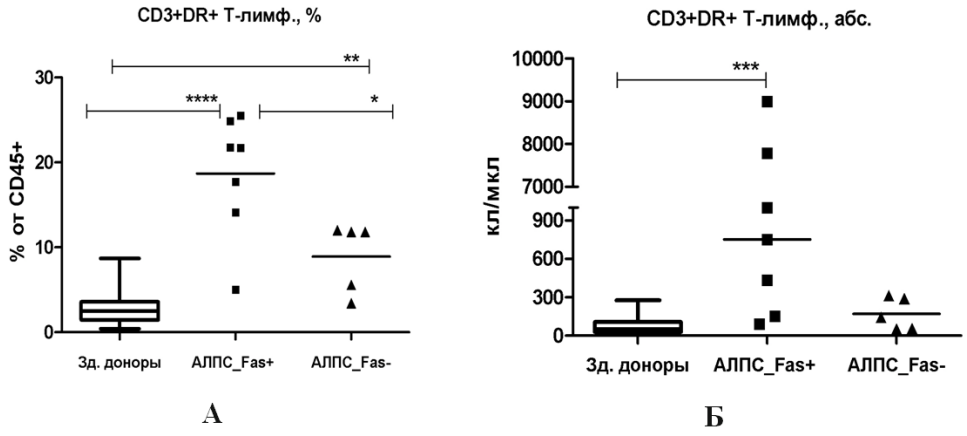

Рис. 2. Относительное (А) и абсолютное (Б) содержание активированных CD3+HLA-DR+ Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов с АЛПС и здоровых доноров

Субпопуляции Т-лимфоцитов у детей с АЛПС

Главные клетки, отражающие работу тимуса как органа центральной толерантности, это клетки, недавно мигрировавшие из тимуса – «тимические эмигранты». Функциональные особенности тимуса можно изучать посредствам количественного определения «тимических эмигрантов» (Recent thymic emigrants, RTE), а также по количеству TREC (TCR excision circle, кольцевые структуры ДНК Т-клеточного рецептора) [18,19]. «Тимические эмигранты» (CD3+CD4+CD45RA+CD31+) это наивные Т-лимфоциты, которые только что вышли из тимуса и еще не подверглись дальнейшей пролиферации и антигенной селекции, эта популяция содержит большое число TREC и доминирует в пуле наивных Т-лимфоцитов новорожденных. Нормальное число «тимических эмигрантов» в периферической крови отражает нормальное функционирование тимуса [18]. Мы проанализировали относительное и абсолютное содержание этих клеток среди CD4+ Т-хелперов. Вне зависимости от наличия мутации в гене *Fas* обе группы пациентов с АЛПС имели значимое снижение относительного содержания этих клеток (рисунок 3А), достоверно значимое снижение абсолютного содержания тимических мигрантов выявлено только у пациентов группы **АЛПС_*Fas*-** (p=0,01). Данный факт дает возможность предположить, что в патогенез аутоиммунной патологии у пациентов с АЛПС вовлечены механизмы центральной толерантности.

Нарушения в Т-клеточном звене периферической толерантности оценивали по относительному и абсолютному содержанию регуляторных Т-лимфоцитов. Значимое снижения этих клеток в относительном (рисунок 3Б) и абсолютном содержании (Здоровые доноры/ **АЛПС_*Fas*+** (p=0,005)) выявлено только у пациентов с АЛПС и обнаруженной мутацией в гене *Fas*.

Однако, проанализировать содержание регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови пациентов с АЛПС представляет собой методическую сложность, т.к. трудно подобрать клинически одинаковые «условия» у пациентов с данным диагнозом. Очень часто дети с АЛПС приходят в стационар с наличием аутоиммунной цитопении и/или другой аутоиммунной патологии, либо перед началом манифестации или после терапии, поэтому выбрать одну «точку» состояния пациентов часто не представляется возможным.

Показатели В-клеточного иммунитета у детей с АЛПС

Для того, чтобы охарактеризовать дифференцировку В-лимфоцитов у пациентов с АЛПС, мы определяли 11 следующих популяций в периферической крови: CD27-IgD+ наивные IgD+ В-лимфоциты (1), CD27+IgD+ В-лимфоциты маргинальной зоны (2), CD27+IgD- переключенные IgD+ В-лимфоциты памяти (3), CD27-IgM+ наивные IgM+ В-лимфоциты (4), CD27+IgM+ В-лимфоциты маргинальной зоны (5), CD27+IgM- переключенные IgM+ В-лимфоциты памяти (6), $CD21^{low}CD38^{low}$ функционально незрелые В-лимфоциты (7 и 8), CD38++CD24++, CD20+CD5+ регуляторные В-лимфоциты (9 и 10) и предположительно «аутореактивные» В-лимфоциты $IgD+IgM^{low}$ (11).

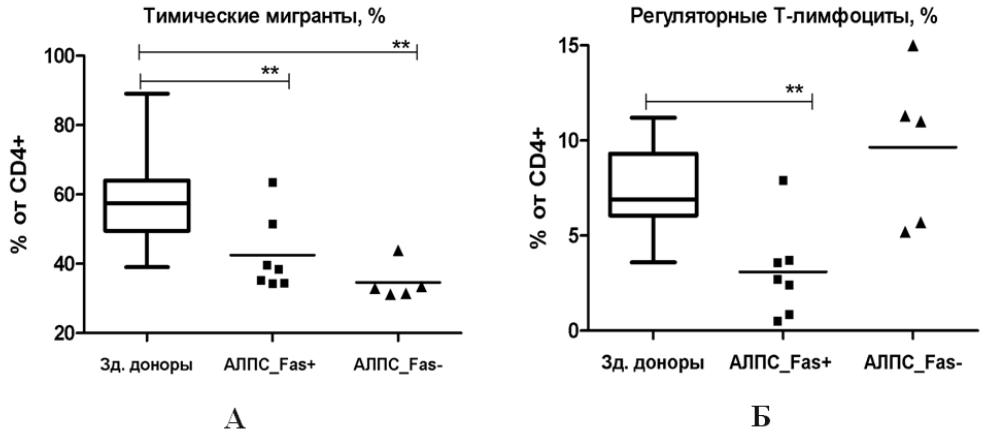

Рис. 3. Относительное содержание тимических мигрантов с фенотипом CD4+CD31+CD45RA+ (А) и регуляторных Т-лимфоцитов с фенотипом CD4+CD25+CD127- у пациентов с АЛПС и здоровых доноров

Общее нарушение в формировании CD27+ В-лимфоцитов памяти уже было описано [7]. В данной работе мы провели более детальный иммунофенотипический анализ В-лимфоцитов, с определением IgD+ и IgM+ В-лимфоцитов памяти.

Большинство пациентов с АЛПС имели сниженное относительное содержание В-лимфоцитов памяти, причем всех 4 популяций (IgD+/IgM+ переключенных и маргинальной зоны и) (рисунок 4А и 4Б).

Глубокий дефицит В-лимфоцитов маргинальной зоны наблюдался у пациентов обоих групп – здоровые доноры/ **АЛПС_*Fas*+** (p<0,0001), здоровые доноры/ **АЛПС_*Fas*-** (p=0,004), что в свою очередь приводило к повышенному содержанию наивных В-лимфоцитов.

Более того, у большинства пациентов с геномной мутацией в гене *Fas* наблюдалась экспансия функционально незрелых В-лимфоцитов с различным фенотипами, CD38- (рисунок 5В), что свидетельствует о нарушении нормальной дифференцировки В-лимфоцитов в периферической крови пациентов с АЛПС.

Однако, в этом исследовании, нас интересовали клетки с иммунорегуляторными свойствами, такие как «предположительно» регуляторные В-лимфоциты с фенотипом CD38++CD24++ и CD5+CD20+.

У пациентов с геномной мутацией в гене *Fas* наблюдалось повышенное содержание предположительно регуляторных клеток с фенотипом CD38++CD24++ (рисунок 6А), достоверно зна-

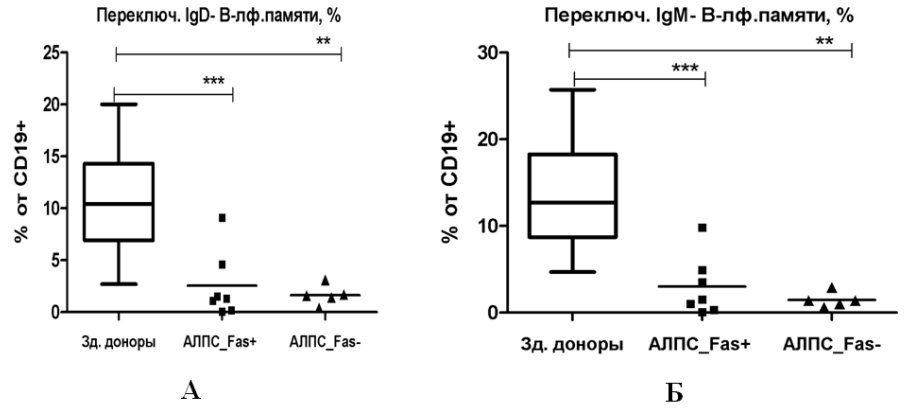

Рис. 4. Относительное содержание переключенных IgD-В-лимфоцитов (А) и IgM-В-лимфоцитов памяти (Б) у пациентов с АЛПС и здоровых доноров

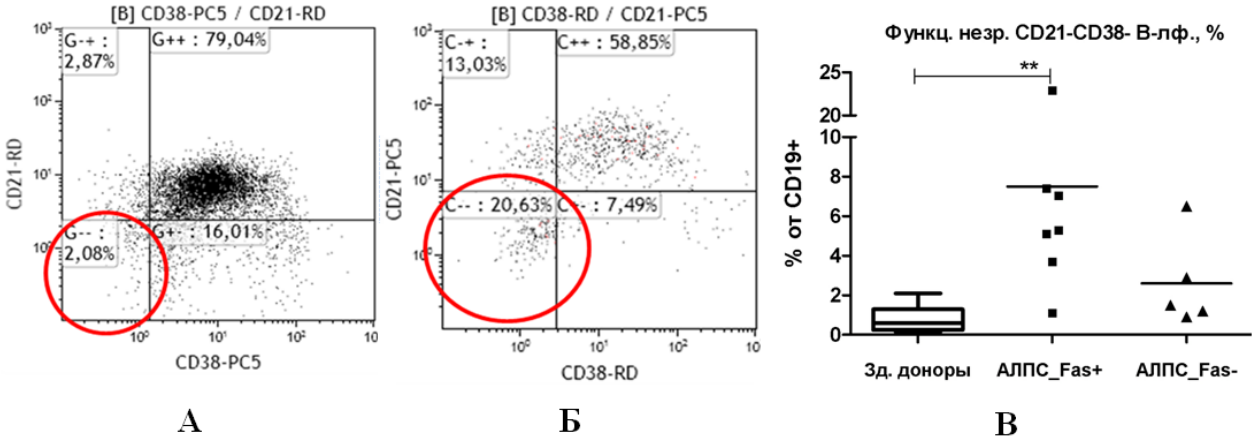

Рис. 5. Содержание CD21-CD38- В-лимфоцитов у здорового донора (А), у пациента с АЛПС (Б), относительное содержание CD21-CD38- В-лимфоцитов у пациентов с АЛПС и здоровых доноров (В)

чимых отличий между CD5+CD20+ у пациентов с АЛПС и здоровыми донорами обнаружено не было (рисунок 6Б).

Негативная селекция В-лимфоцитов в костном мозге не приводит к полной элиминации всех аутореактивных клонов В-лимфоцитов, т.к. в костном мозге ауто-антигены представлены в гораздо меньшей концентрации, чем в периферической циркуляции. Отсюда, значительное число В-лимфоцитов, покидающих костный мозг, проходят селекцию в периферической циркуляции [20,21]. Нарушение иммунологической толерантности приводит к формированию и закреплению пула В-лимфоцитов, способных распознать собственные антигены [21]. С точки зрения клинической иммунологии, большой интерес представляет собой фенотип мембран этих В-лимфоцитов, для возможности их быстрого определения в периферической крови.

В недавних работах, выполненных на клетках крови человека, была идентифицирована потенциально «аутореактивная» субпопуляция В-лимфоцитов CD19+CD27-IgD+IgM$^{low/-}$ – поздние переходные клетки, (late transitional cells), которые составляют приблизительно 2,5% от всех В-лимфоцитов в периферической крови [22].

Как видно на рисунке 7В практически у всех пациентов с аутоиммунным лимфопролиферативным синдромом, вне зависимости от наличия мутации в гене *Fas*, наблюдалась экспансия потенциально «аутореактивных» В-лимфоцитов в периферической крови.

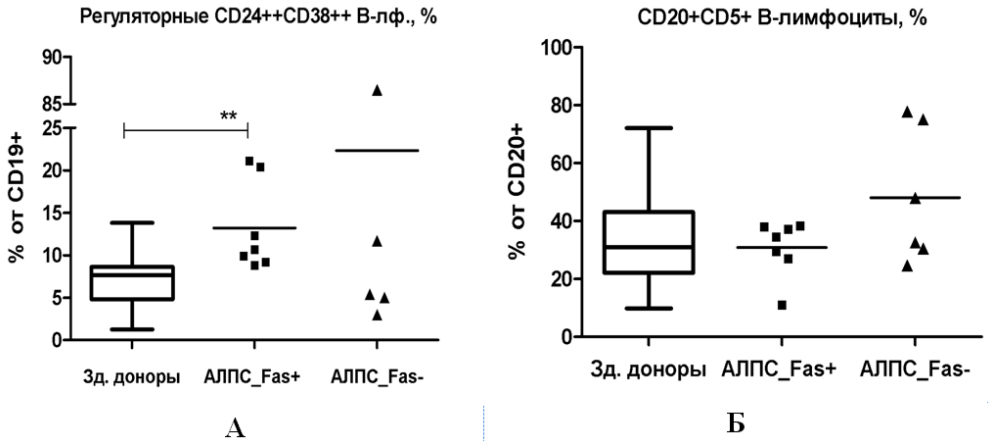

Рис. 6. Относительное содержание «предположительно» регуляторных В-лимфоцитов CD38++CD24++ (А) и CD20+CD5+ (Б) у пациентов с АЛПС и здоровых доноров

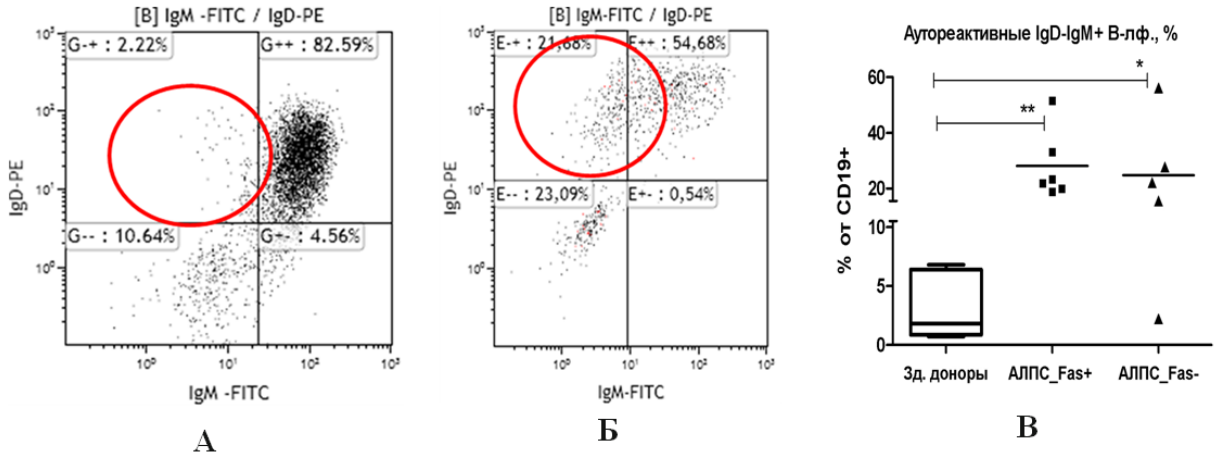

Рис. 7. Нормальное содержание IgD+IgM- В-лимфоцитов у здорового донора (А), экспансия «аутореактивных» В-лимфоцитов у пациента с АЛПС (Б), относительное содержание IgD+IgM- В-лимфоцитов у пациентов с АЛПС и здоровых доноров (В)

Фенотипические характеристики Т- и В-лимфоцитов у пациентов с синдром Вискотта-Олдрича

Для того, чтобы проверить надежность фенотипических маркеров иммунологической дисрегуляции (потенциально «аутореактивных» В-лимфоцитов IgM-IgD+, функционально незрелых В-лимфоцитов CD21-CD38-, регуляторных Т-лимфоцитов CD4+CD25+CD127- и «тимических эмигрантов» CD4+CD31+CD45RA+), мы оценили относительное содержание этих клеток у пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича.

Синдром Вискотта-Олдрича – заболевание с повышенным риском развития аутоагрессии. Пациенты с аутоиммунной и воспалительной манифестацией обычно формируют группу высокого риска с плохим прогнозом [12].

В исследуемой нами выборке пациентов аутоиммунные и воспалительные осложнения были описаны в 60% (у 6 из 10 пациентов), которые развили хотя бы один аутоиммунный или воспалительный признак, наиболее частый из которых это аутоиммунная гемолитическая болезнь (АИГА), у 2 пациентов развился васкулит, у 1 аутоиммунная нейтропения (таблица 2).

Учитывая, что аутоиммунные осложнения у пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича развиваются с возрастом, мы проанализировали относительное содержание клеток с регуляторными и аутоагрессивными свойствами в двух группах (с наличием аутоиммунных и воспалительных осложнений и без). Группу пациентов без аутоагресии составили самые маленькие пациенты (**WAS_1** – пациенты №8-11), во вторую группу вошли дети №1-№6, которые сформировали **WAS_2**.

Исследование фенотипических характеристик Т-лимфоцитов у пациентов с WAS

При анализе «главных» Т-клеток иммунной регуляции – тимических эмигрантов и регуляторных Т-лимфоцитов, было выявлено значимое снижение только тимических мигрантов у пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича и наличием аутоиммунной патологии (WAS_2) (рисунок 8А). Достоверных отличий в содержании регуляторных Т-лимфоцитов у пациентов и здоровых доноров в аналогичном возрастном диапазоне не было выявлено (рисунок 8Б).

Исследование фенотипических характеристик В-лимфоцитов у пациентов с WAS

Фенотипический анализ В-лимфоцитов также выявил экспансию функционально незрелых и аутореактивных В-лимфоцитов у пациентов с синдромом Вискотт-Олдрич с возрастом и сопутствующей аутоиммунной и воспалительной патологией (рисунок 9А и 9Б).

Исследование регуляторных цитокинов у пациентов с аутоиммунным лимфопролиферативным синдромом и синдромом Вискотта-Олдрича

Процесс селекции переходных В-лимфоцитов (transitional B cells) в периферии также контролируется наличием BAFF. BAFF это фактор выживания В-лимфоцитов, увеличение уровня

Таблица 2. Характеристика пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича

Пациент_№	Мутация в гене *WAS*	Аутоиммунная патология	Возраст аутоим. патологии	Возраст на момент исследования
Пациент_1	R86H	Геморрагический васкулит, кожно-суставная форма	8 лет	21 год
Пациент_2	L105P	Васкулит	11 лет	12 лет
Пациент_3	ivs6+5nt G>A	АИГА	6 л. 2 м.	7 лет 11 мес.
Пациент_4	652delG	Иммунная тромбоцитопения, н.д. иммунная нейтропения	7 лет 2 мес.	
Пациент_5	del_1-9	АИГА	2 года	6 лет 6 мес.
Пациент_6	D77H	Иммунная тромбоцитопения	3 года	5 лет
Пациент_7	R86H	нет		1 год 4 мес.
Пациент_8	R321X	нет		8 мес.
Пациент_9	G322X	нет		4 мес.
Пациент_10	R321X	нет		3 мес.

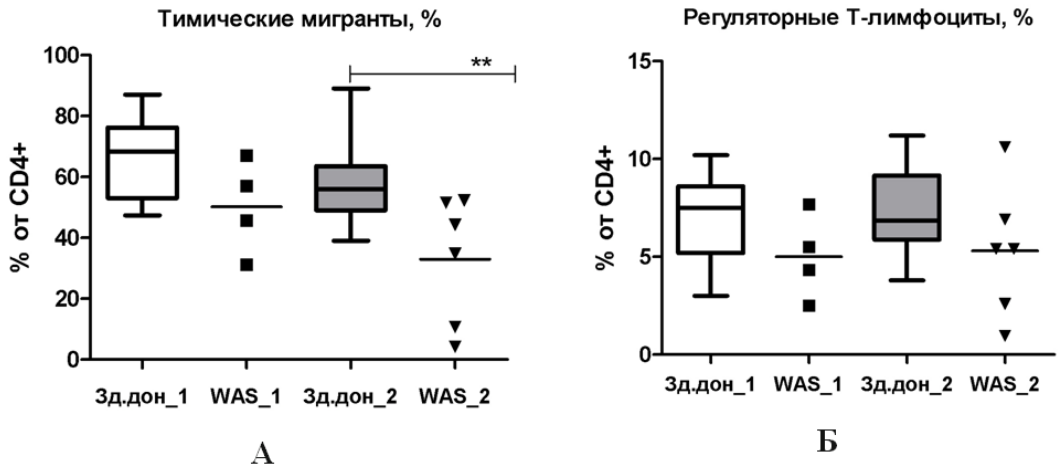

Рис. 8. Относительное содержание тимических мигрантов (А) и регуляторных Т-лимфоцитов (Б) у пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича и здоровых доноров

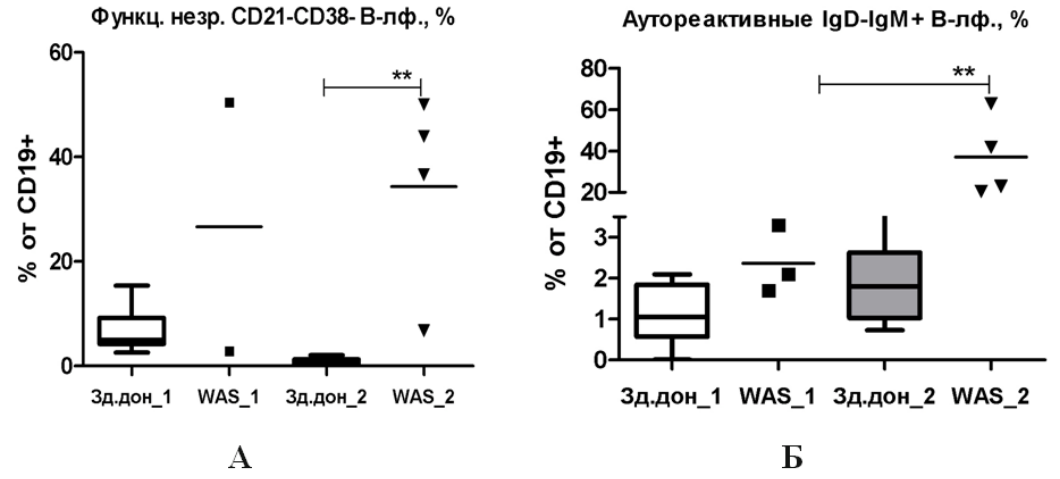

Рис. 9. Относительное содержание CD21-CD38- В-лимфоцитов (А) и IgD+IgM- В-лимфоцитов (Б) у пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича и здоровых доноров

BAFF может увеличивать число В-лимфоцитов в периферической циркуляции. Рецептор для BAFF (BAFF-R) впервые экспрессируется во время переходной стадии и его экспрессия увеличивается по мере созревания В-лимфоцитов. Таким образом, переходные и зрелые В-лимфоциты могут связывать BAFF и наличие этого цитокина обусловлено размером пула зрелых В-лимфоцитов. Большое количество зрелых В-лимфоцитов снижает уровень циркулирующего BAFF. Эти данные дают возможность предполагать, что уровень BAFF напрямую контролирует негативную селекцию незрелых В-клеток в периферии [23,24].

Мы проанализировали концентрацию данного цитокина в сыворотке периферической крови пациентов с АЛПС и синдромом Вискотта-Олдрича (WAS). Значимое увеличение BAFF наблюдали во всех группах вышеописанных пациентов (рисунок 10А и 10Б). Причем увеличение уровня данного цитокина у пациентов с АЛПС без мутации в гене Fas и маленьких пациентов с WAS без клинической манифестации аутоиммунной патологии, свидетельствует о наличии иммунной дисрегуляции еще до экспансии функционально

незрелых и регуляторных Т- и В-лимфоцитов и клинического проявления аутоиммунитета.

Также в обследованных нами группах было обнароужено значимое увеличение IL-10, как одного из главных регуляторных цитокинов (рисунок 11А и Б). Причем в обеих группах пациентов с АЛПС наблюдали увеличение уровня данного цитокина более чем в 20-60 раз по сравнению со здоровыми детьми, что подтверждает наличие диагноза аутоиммунный лимфопролиферативный синдром у пациентов без обнаруженной мутации в гене Fas, так как IL-10 – один из главных диагностических маркеров данной патологии [25].

Выводы

1. У пациентов с аутоиммунным лимфопролиферативным пролиферативным синдромом (АЛПС) в периферической крови наблюдается снижение относительного содержания клеток, недавно мигрировавших из тимуса – «тимических эмигрантов» (CD4+CD45RA+CD31+) ($p<0,01$), а у пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича данное снижение наблюдается

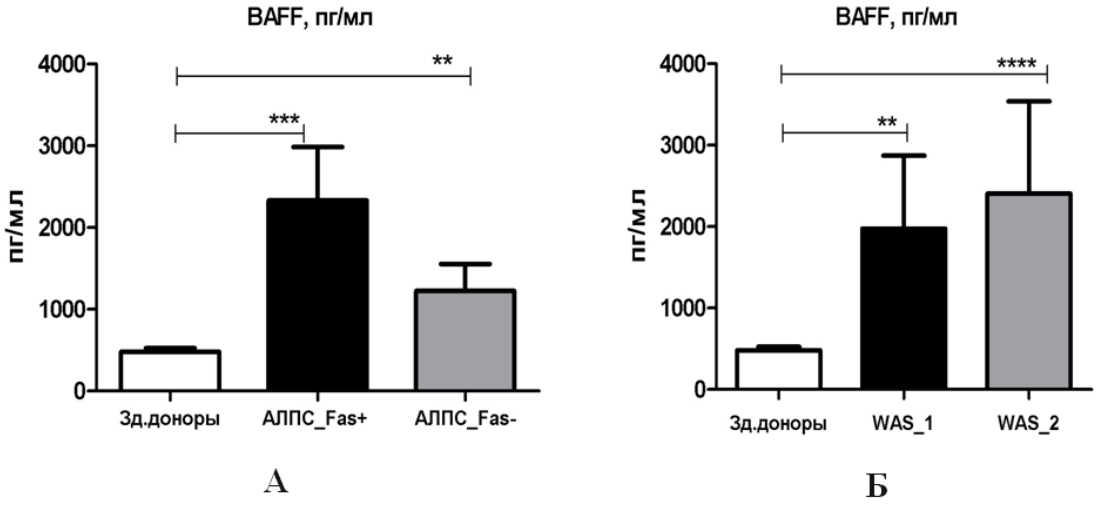

Рис. 10. Концентрация BAFF у пациентов с АЛПС (А), синдромом Вискотта-Олдрича (Б) и здоровых доноров

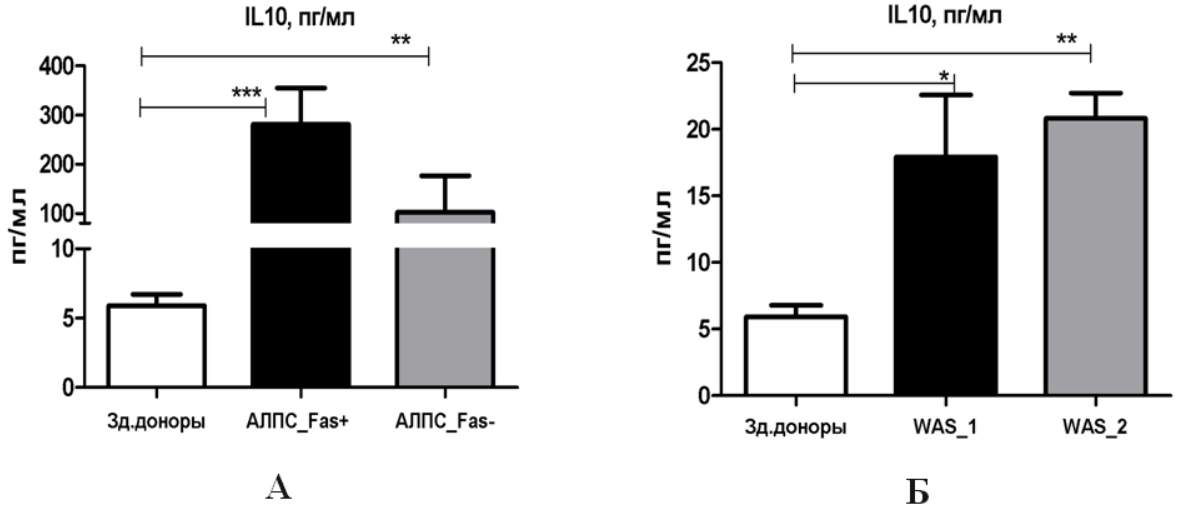

Рис. 11. Концентрация IL-10 у пациентов с АЛПС (А), синдромом Вискотта-Олдрича (Б) и здоровых доноров

только у пациентов с сопутствующей аутоиммунной патологией. Относительное снижение регуляторных Т-лимфоцитов наблюдается у пациентов с АЛПС и геномной *Fas* мутацией ($p<0,01$) по сравнению со здоровыми детьми.

2. Дисрегуляция иммунной системы сопровождается относительной экспансией предположительно аутореактивных В-лимфоцитов с фенотипом (CD19+IgD+IgM-) у пациентов с АЛПС ($p<0,01$ и $p<0,05$) и WAS с аутоиммунной патологией ($p<0,05$), наличием функционально незрелых В-лимфоцитов (CD19+CD21-CD38-) у пациентов с АЛПС и геномной мутацией в гене Fas ($p<0,01$) и при WAS с сопутствующем аутоиммунным синдромом ($p<0,01$), а также повышением уровня BAFF и IL-10 у всех пациентов с АЛПС и WAS вне зависимости от деления на группы.

Литература

1.Todoric K. Koontz JB. Mattox D. Tarrant Koontz TK. Autoimmunity in Immunodeficiency. Curr Allergy Asthma Rep 2013; 13(4):361-370.

2. Speckmann C. Rohr J. Ehl S. Primary Immunodeficiency Diseases: Definition, Diagnosis, and Management / Chapter 5_Genetic Disorders of Immune Regulation; 2008: 167-194.

3. Notarangelo LD. Gambineri E. Badolato R. Immunodeficiencies with Autoimmune Consequences. Advances in immunology 2006; 89:321-70.

4. Чепель Э., Хейни М. и соавт. Основы клинической иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008: 10-416.

5. Straus SE. Sneller M. Lenardo MJ. et al. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. Ann Intern Med 1999; 130:591-601.

6. Oliveira JB. Bleesing JJ. Dianzani U. Fleisher TA. Jaffe ES. Lenardo MJ. Rieux-Laucat F. Siegel RM. Su HC. Teachey DT. Rao VK. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome: report from the 2009 NIH International Workshop. Blood 2010; 116(14): 35-40.

7. Rensing-Ehl A. Warnatz K. Fuchs S. Schlesier M. et al. Clinical and immunological overlap between autoimmune lymphoproliferative syndrome and common variable immunodeficiency. Clinical Immunology 2010; 137, 357-365.

8. Bleesing JJ. Brown MR. Straus SE. Dale JK. Siegel RM. Lenardo M. Puck JM. Fleisher TA. Immunophenotypic profiles in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome. Blood 2001; 98: 2466-2473.

9. Caminha I. Fleisher TA. Hornung RL Dale JK. Niemela JE. Price S. Davis J. Perkins K. Dowdell KC. Brown MR. Rao VK. Oliveira JB. Using biomarkers to predict the presence of FAS mutations in patients with features of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. J Allergy Clin Immunol 2010; 125: 946-949.

10. Thrasher AJ. Burns SO. WASP: a key immunological multitasker. Nat Imm Rev 2010; 10(3): 182-192.

11. Ochs HD. Mutations of the Wiskott–Aldrich Syndrome Protein affect protein expression and dictate the clinical phenotypes. Immunol Res 2009; 44:84-88.

12. Dupuis-Girod S, Medioni J, Haddad E, Quartier P, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, et al. Autoimmunity in Wiskott-Aldrich Syndrome: Risk Factors, Clinical Features, and Outcome in a Single-Center Cohort of 55 Patients. Pediatrics 2003; 111: 622-627.

13. Catucci M. Castiello MC. Pala1 F. Bosticardo M. Villa A. Autoimmunity in Wiskott–Aldrich syndrome: an unsolved enigma. Front Imm 2012; 3: 209-219.

14. Park J., Shcherbina AY, Rosen FS., Prodeus AP., Remold-O'Donnell E. Phenotypic perturbation of B cells in the Wiskott-Aldrich syndrome. Clin. Exp.Immunol. 2005; 139: 297-305.

15. Erdei A. Isaak A. Torok K. Sandor N. Kremlitzka M. Prechl J. Bajtay Z. Expression and role of CR1 and CR2 on B and T lymphocytes under physiological and autoimmune conditions. Mol Immunol 2009; 46: 2767-2773.

16. Townsend MJ. Monroe JG. Chan AC. B-cell targeted therapies in human autoimmune diseases: an updated perspective. Immunol Rev 2010; 237: 264-283.

17. Janda A. Rensing-Ehl A. Eibel H. et al. Elevated Serum BAFF Levels in Patients with Autoimmunity and Lymphoproliferation. Scandinavian Journal of Immunology 2011; 74: 518-519.

18. Kohler S. Thiel A. Life after the thymus: CD31_ and CD31_ human naive CD4_ T-cell subsets. Blood 2009; 113: 769-774.

19. Hollander G, Gill J, Zuklys S, Iwanami N, Liu C, Takahama Y. Cellular and molecular events during early thymus development. Immunol Rev 2006; 209: 28–46.

20. Allman DM. Ferguson SE. Lentz VM. et al. Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrowderived B cells. J Immunol 1993; 151: 4431-4444.

21. Hartley SB. Crosbie J. Brink R. et al. Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane bound antigens. Nature 1991; 353: 765-769.

22. Meffre E. Wardemann H. B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. Curr Opin Immunol 2008; 20: 632-638.

23. Batten M. Groom J. Cachero TG. et al. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. J Exp Med 2000; 192: 1453-1466.

24. Hsu BL. Harless SM. Lindsley RC. et al. Cutting edge: BLyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. J Immunol 2002; 168: 5993-5996.

25. Rensing-Ehl A. Janda A. Lorenz MR. Gladstone BP. Fuchs I. Abinun M. Albert M. et al. Sequential decisions on FAS sequencing guided by biomarkersin patients with lymphoproliferation and

autoimmune cytopenia. Haematologica 2013. [Epub ahead of print].

Сведения об авторах:

Светлана Олеговна Шарапова - научный сотрудник лаборатории иммунологических исследований научного отдела. ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». Адрес: 223040, Минский район, Боровлянский с/с, д. Боровляны, ул. Фрунзенская д.43. Email: sharapovasv@gmail.com

Ольга Евгеньевна Пащенко - врач-иммунолог отделения клинической иммунологии Российской детской клинической больницы, к.м.н., доцент кафедры иммунологии Российского государственного медицинского университета им. Н.И. Пирогова (РНИМУ). Российская детская клиническая больница, Российский государственный медицинский университет им. Н.И. Пирогова (РНИМУ). Адрес: Россия, г. Москва, 101000, пр. Ленинский, 117, корп. 6.

Ирина Евгеньевна Гурьянова - младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований научного отдела. ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». Адрес: 223040, Минский район, Боровлянский с/с, д. Боровляны, ул. Фрунзенская д.43.

Александр Александрович Мигас - научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований научного отдела. ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». Адрес: 223040, Минский район, Боровлянский с/с, д. Боровляны, ул. Фрунзенская д.43.

Ирина Вадимовна Кондратенко - заведующая отделением клинической иммунологии Российской детской клинической больницы, д.м.н., профессор

Место работы: Российская детская клиническая больница. Адрес: Россия, г. Москва, 101000, пр. Ленинский, 117, корп. 6.

Михаил Владимирович Белевцев - заместитель директора по науке, к.б.н. ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». Адрес: 223040, Минский район, Боровлянский с/с, д. Боровляны, ул. Фрунзенская д.43.

Поступила 4.11.2013 г.