

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКОЙ ГРАНУЛЕМАТОЗНОЙ БОЛЕЗНЬЮ

И.С. Сакович, С.Н. Алешкевич, С.О. Шарапова

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии

Хроническая гранулематозная болезнь (ХГБ) — первичный иммунодефицит, причиной которого является генетический дефект фермента NADP-оксидазы, при котором полностью отсутствует «кислородный взрыв», при нормальном фагоцитозе во всех миелоидных клетках (нейтрофилах, эозинофилах, моноцитах, и макрофагах) [1]. Описано несколько генетических дефектов, приводящих к развитию ХГБ. Все они приводят к нарушению синтеза субъединиц NADPH-оксидазы. Около 90% всех случаев ХГБ в Беларуси связано с мутациями в гене *CYBB*, локализованного на X хромосоме. Нарушения синтеза остальных субъединиц вызываются мутациями генов *CYBA*, *NCF1*, *NCF2*, *NCF4* и наследуются аутосомно-рецессивно [2]. ХГБ проявляется с раннего детства обычно с развития гнойных лимфаденитов, остеомиелитов, тяжелых пневмоний. В дальнейшем регистрируются тяжелые рецидивирующие бактериальные и/или грибковые инфекции респираторного и желудочно-кишечного тракта. Часто при ХГБ формируются тяжелые кожные абсцессы с образованием воспалительных гранул, которые со временем поражают практически все органы, включая легкие, печень, кости и головной мозг. После вакцинации БЦЖ формируются вакцин-ассоциированные инфекции [3].

Цель работы — определение параметров клеточного и гуморального иммунитета у пациентов с X-сцепленной хронической гранулематозной болезнью в Беларуси.

Материал и методы. Для исследования использовалась периферическая кровь 14 мальчиков с мутацией в гене *CYBB* из Беларуси и 67 здоровых разнополых доноров, которые были разделены на 2 группы согласно возрасту на момент исследования. В 1-ю группу были включены 5 пациентов с X-ХГБ в возрасте от 7 мес. до 3 лет (медиана возраста — 1,7 года), во 2-ю — 9 пациентов с X-ХГБ от 3 до 18 лет (медиана — 8,5 года) и 47 здоровых доноров (медиана — 9 лет) от 3 до 18 лет. Здоровые доноры также были разделены на 2 группы аналогичного возрастного диапазона (n=20, n=47).

Определение параметров клеточного иммунитета проводили с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Был проведен анализ следующих популяций лимфоцитов: Т-лимфоциты (CD45+CD3+), активированные Т-лимфоциты (CD3+HLADR+), Т-хелперы (CD3+CD4+), Т-цитотоксические лимфоциты (CD3+CD8+), натуральные киллеры (CD16+CD56+), натуральные Т-лимфоциты (CD3+CD16+CD56+), тимические мигранты (CD4+CD45RA+CD31+), Т-регуляторные лимфоциты (CD4+CD25+CD127low), В-лимфоциты (CD45+CD19+), изотип-непереключенные и переключенные В-лимфоциты памяти (CD19+CD27+IgD+/-). Для оценки гуморального иммунитета определяли уровень иммуноглобулинов G, M и A методом нефелометрии. Мутационного анализа гена *CYBB* проводили методом прямого секвенирования. Все данные были обработаны с помощью непараметрических методов статистики в пакете GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, SD). Область исследования, информация для пациентов и форма согласия были утверждены комитетом по этической экспертизе научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Результаты и их обсуждение. Статистически значимых отличий в содержании лейкоцитов в периферической крови у детей старшей (p=0,2) и младшей (p=0,07) возрастных групп по сравнению со здоровыми донорами не было установлено. Но в младшей возрастной группе наблюдается снижение содержания лимфоцитов (%p=0,009, абс. p=0,7). Содержание лимфоцитов у детей старшей возрастной группы не отличается от этих показателей в группе здорового контроля (%p=0,2; абс. p=0,7).

При исследовании клеточного иммунитета нами было установлено, что у пациентов с Х-ХГБ в старшей возрастной группе наблюдается повышение содержания активированных Т-лимфоцитов (CD45+CD3+HLADR+) ($\%p=0,0001$, абс. $p=0,04$) (рисунок 1). При анализе этого показателя в младшей возрастной группе статистически значимых отличий не выявлено ($\%p=0,07$, абс. $p=0,051$).

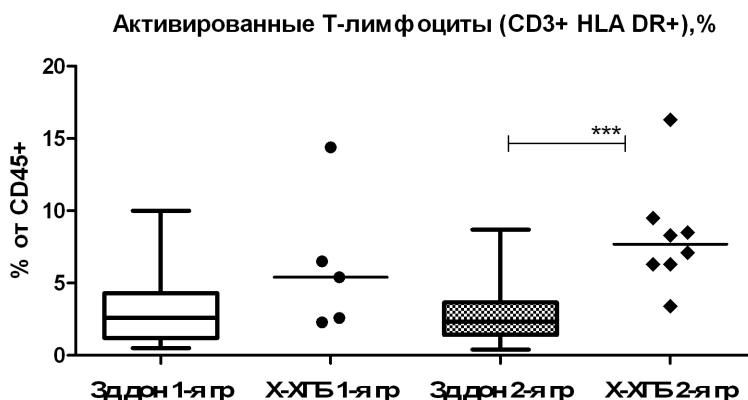
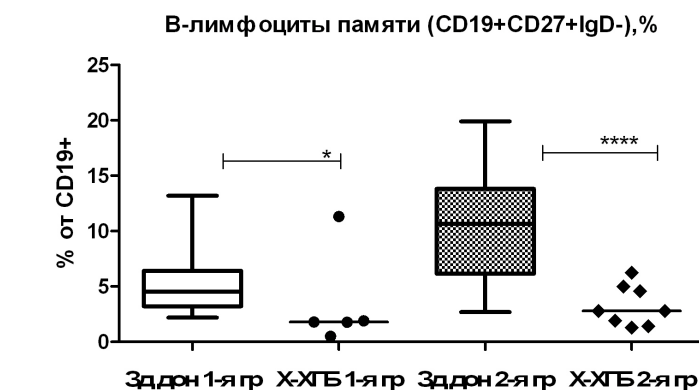
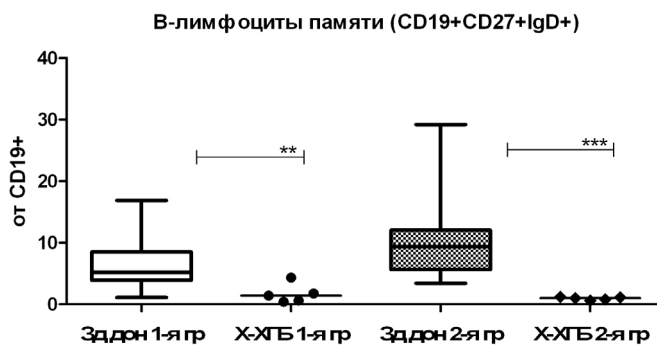


Рисунок 1 — Содержание активированных Т-лимфоцитов у пациентов с Х-ХГБ и здоровых доноров, %

Также у пациентов старшей возрастной группы было выявлено повышенное содержание В-лимфоцитов (CD45+CD19+) по сравнению со здоровыми донорами аналогичного возраста ($\%p=0,0081$ и абс. $p=0,04$). У пациентов младшей возрастной группы статистически значимых отличий в содержании В-лимфоцитов не выявлено ($\%p=0,06$, абс. $p=0,36$). Дальнейшее изучение субпопуляций В-лимфоцитов выявило снижение изотип-переключенных (CD19+CD27+IgD-) и непереключенных (CD19+CD27+IgD+) В-лимфоцитов памяти у пациентов с Х-ХГБ в младшей (CD19+CD27+IgD- $\%p=0,04$, абс. $p=0,2$; CD19+CD27+IgD+ $\%p=0,006$, абс. $p=0,01$) и старшей (CD19+CD27+IgD- $\%p=0,001$, абс. $p=0,05$; CD19+CD27+IgD+ $\%p=0,003$, абс. $p=0,02$) (рисунок 2).



а)



б)

Рисунок 2 — Содержание изотип-переключенных (а) и непереключенных (б) В-лимфоцитов памяти у пациентов с Х-ХГБ и здоровых доноров, %

Также нами было отмечено, что 4 пациента имеют нормальный уровень изотип-переключенных В-лимфоцитов памяти. Статистический анализ показал, что данный показатель у этих пациентов статистически не отличается от аналогичного в группе здоровых доноров ($p=0,12$).

Исследования гуморального иммунитета показали повышение уровня иммуноглобулина М в младшей группе пациентов с Х-ХГБ по сравнению со здоровым контролем ($p=0,01$) (рисунок 3).

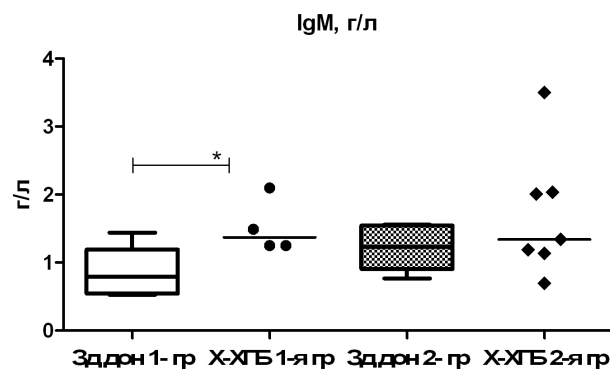


Рисунок 3 — Концентрация иммуноглобулина М (г/л) у пациентов Х-ХГБ и здоровых доноров

Уровни иммуноглобулинов G и A у пациентов с Х-ХГБ из младшей возрастной группы и здоровых доноров статистически значимо не отличаются ($p=0,2$; $p=0,5$). Не выявлено статистически значимых отличий в уровнях иммуноглобулинов G, М и А у пациентов старшей возрастной группы ($p=0,6$; $p=0,2$; $p=0,7$).

Заключение. В младшей возрастной группе пациентов с Х-ХГБ выявлено снижение процентного содержания лимфоцитов в периферической крови и увеличение содержания иммуноглобулина М по сравнению со здоровым контролем.

У пациентов с Х-ХГБ старше 3-х лет наблюдается увеличение количества активированных Т-лимфоцитов, а также В-лимфоцитов по сравнению с группой здоровых доноров аналогичного возраста.

Содержание изотип-переключенных и непереключенных В-лимфоцитов памяти (CD19+CD27+IgD+/-) снижено во всех возрастных группах пациентов с Х-ХГБ, однако некоторые из них имеют нормальный уровень изотип-переключенных В-лимфоцитов памяти.

CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN CHILDREN WITH CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE

I.S. Sakovich, S.N. Aleshkevich, S.O. Sharapova

Chronic Granulomatous Disease (CGD) is a rare phagocytic disorder involving a reduced nicotinamide dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase complex that results in defective superoxide generation in which phagocytic cells are unable to kill certain bacteria and fungi after ingesting them.

Aim of study: To investigate the parameters of cellular and humoral immunity in patients with X-linked chronic granulomatous disease in Belarus.

Peripheral blood 14 boys with the gene mutation *CYBB* and 67 healthy donors from Belarus was used who were divided into 2 groups according to age at the time of the study.

Cellular immunity parameters were carried out by analysis of lymphocyte subsets, using flow cytometry method. Immunoglobulin levels were determined by nephelometry. For mutation analysis *CYBB* gene sequencing was used. All results were processed using methods of non-parametric statistics and compared with healthy controls (GraphPad Prism 5.0).

A reduction in the percentage of lymphocytes in the peripheral blood ($\%p=0.009$, abs. $p=0.7$) and increased level of IgM ($p=0.01$) were showed in the younger age group of patients with X-CGD showed compared with healthy control. An increased number of activated T-lymphocytes ($\%p=0.0001$, abs. $p=0.04$) and B-lymphocytes ($\%p=0.0081$, abs. $p=0.04$) were showed in patients with X-CGD older than 3 years compared to healthy donors of the same age.

Isotype-switched (1st group $\%p=0.04$, abs. $p=0.2$; 2nd group $\%p=0.001$, abs. $p=0.05$) and non-switched (1st group $\%p=0.006$, abs. $p=0.01$; 2nd group $\%p=0.003$, abs. $p=0.02$) B-memory cells were decreased in all age groups of patients with X-CGD, but 4 patients have a normal level of isotype-switched memory B lymphocytes ($p=0.12$).

Литература

1. Chronic granulomatous disease: the European experience / J.M. Van den Berg [et al.] // PLoS One. — 2009. — Vol. 4. — e5234.

2. Assari, T. Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD / T. Assari // *Med. Immunol.* — 2006. — Vol. 5. — P. 4

3. Bylund, J. Chronic granulomatous disease: From genetic defect to clinical presentation / J. Bylund, D. Goldblatt, D. Speert // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2005. — Vol. 568. — P. 67–87.