

АТАКСИЯ-ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИЯ: РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА

**Шарапова С.О.¹, Сакович И.С.¹, Роговая Е.В.², Кирильчик Е. Ю.²,
Канашикова Т.А.², Антипенко В.П.²**

¹ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии»,
²Белорусский государственный медицинский университет,

Беларусь, Минск

В данной статье представлены результаты исследования количественных и качественных показателей Т-клеточного иммунитета и дендритных клеток у детей с атаксией-телеангиэктазией (АТ). Авторами исследования выявлено значительное снижение соотношения миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток у детей с АТ в сравнении со здоровыми донорами. Со стороны Т-клеточного иммунитета отмечено увеличение относительного содержания зрелых активированных Т-лимфоцитов, снижение процентного содержания наивных Т-лимфоцитов и недавних тимических мигрантов на фоне значительного повышения Т-клеток памяти, что является важным для понимания механизмов нарушений регуляции иммунных процессов при АТ.

Ключевые слова: атаксия-телеангиэктазия; дендритные клетки; недавние тимические мигранты; врожденные ошибки иммунитета.

ATAXIA-TELEANGIECTASIA: RESULTS OF A STUDY OF DENDRITIC CELL POPULATIONS AND T-CELL IMMUNITY

**Sharapova S.O.¹, Sakovich I.S.¹, Rogovaya E.V.², Kirilchik E.Yu.²,
Kanashkova T.A.², Antipenko V.P.²**

¹RSPC for Children's Oncology, Hematology and Immunology,
²Belarusian State Medical University

Belarus, Minsk

This article presents the results of a study of quantitative and qualitative indicators of T-cell immunity and dendritic cells in children with ataxia-telangiectasia (AT). The authors of the study revealed a significant decrease in the ratio of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in children with AT in comparison with healthy donors. On the part of T-cell immunity, an increase in the relative content of mature activated T-lymphocytes, a decrease in the percentage of naive T-lymphocytes and recent thymic emigrants was noted, against the background of a significant increase in memory T-cells, which is important for understanding the mechanisms of dysregulation of immune processes in AT.

Key words: *ataxia-telangiectasia; dendritic cells; recent thymic emigrants; inborn immune errors.*

Атаксия-телеангиэктазия (АТ, синдром Луи-Бар) представляет собой аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями в гене АТМ (*от англ. Ataxia-Telangiectasia Mutated*). В Международной классификации болезней (МКБ-10) АТ относится к группе G11.3 (Мозжечковая атаксия с нарушением репарации ДНК) по основной функции гена АТМ, кодирующего белок АТМ, представляющий собой серин/треониновую киназу, участвующую в контроле клеточного цикла и активации систем репарации ДНК. Наряду с прогрессирующей мозжечковой атаксией, глазодвигательными нарушениями, телеангиэктазиями склер, эндокринными расстройствами, при АТ отмечаются иммунные нарушения, которые лежат в основе клинических проявлений иммунодефицита.

Хотя дисфункция многих факторов клеточного и гуморального иммунитета считается важной в патогенезе АТ [2,6], не выяснено, какие типы клеток играют основную роль.

Наиболее эффективными профессиональными АПК, способными индуцировать адаптивный иммунный ответ являются дендритные клетки. Миелоидные ДК имеют мощный потенциал для захвата антигенов, что позволяет им эффективно стимулировать Т-клетки, плазмоцитоидные дендритные клетки являются основными продуцентами $IFN\alpha/\beta$.

ДК представляют собой гетерогенную группу клеток, разделяемых на подгруппы в зависимости от онтогенеза, фенотипических особенностей, тканевого распределения и профиля транскрипции. В периферической крови выделяют два основных подтипа дендритных клеток, имеющих различных предшественников в костном мозге и несущих на своей поверхности специфические маркеры: миелоидные (мДК, $Lin-HLADR^{+11c^{+}}$) и плазмоцитоидные (пДК, $Lin-HLADR^{+123^{+}}$) ДК. Недостаточность и дисфункция ДК описана при ряде первичных иммунодефицитов [1,2,5,10], однако данные по изучению миелоидной и плазмоцитоидной популяций ДК у пациентов с АТ в зарубежной и отечественной литературе практически отсутствуют.

В связи с этим, для понимания механизмов нарушений регуляции иммунных процессов при АТ, целью работы являлась оценка количественных и качественных показателей подтипов дендритных клеток (миелоидных и плазмоцитоидных), а также показателей Т-клеточного иммунитета у детей с АТ.

В исследование было включено 7 пациентов в возрасте от 2 до 10 лет, находившихся на лечении в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» в 2011-2023 гг. с диагнозом «синдром Луи-Бар». Информированное согласие на проведение

исследований было получено у родителей всех пациентов. Диагноз был выставлен согласно критериям ESID (European Society for Immunodeficiency) [8]. Контрольная группа (здоровые доноры в возрасте от 2 до 10 лет) составила 46 детей.

Относительное количество и фенотипическую характеристику подтипов дендритных клеток периферической крови (миелоидных и плазмоцитоидных) оценивали в общем пуле моноклеарных клеток по прямому и боковому светорассеиванию с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Популяцию дендритных клеток и их подтипов определяли с применением негативной селекции по линейным маркерам CD3, CD14, CD19 и позитивной селекции по маркерам HLA-DR, CD11c, CD123. Подтипы дендритных клеток периферической крови характеризовали следующим фенотипом: миелоидные ДК (мДК) – CD3⁻CD14⁻CD19⁻HLA-DR⁺CD11c⁺CD123⁻, плазмоцитоидные ДК (пДК) – CD3⁻CD14⁻CD19⁻HLA-DR⁺CD11c⁻CD123⁺.

Определение субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови проводили с использованием проточного цитофлуориметра Navios (Becton Dickinson, Великобритания) в соответствии со стандартной диагностической панелью: CD3⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, CD4⁺CD8⁻, CD4⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺, CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺, CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺. Дополнительно определяли количество ранних тимических мигрантов CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺. Для иммунофенотипирования использовали моноклональные антитела Xb10 (Чехия).

Статистическую обработку данных, полученных в результате исследований, проводили общепринятыми методами. Для сравнения групп данных использовали непараметрические методы (U-критерий Манна-Уитни); в качестве критерия достоверности различий принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Определение относительного количества ДК периферической крови в группах здоровых доноров и детей с АТ не выявило значимых различий: процентное содержание мДК (87,9%±6,39 при 66,8%±10,2 в контрольной группе) и пДК (4,35%±2,96 при 12,5%±8,1 в контрольной группе) достоверно не отличалось от аналогичных показателей здоровых доноров. Наряду с этим, были выявлены существенные изменения в соотношении подтипов ДК у детей с АТ по сравнению с контролем. Соотношение мДК/пДК было достоверно выше у детей с АТ при сравнении с соответствующим показателем в контрольной группе (15,9±2,47 при 5,97±2,26 соответственно, $p < 0,05$) (рис. 1), преимущественно за счет уменьшения количества пДК (во многом определяющих специфику воспалительного процесса), что может иметь важное патогенетическое значение.

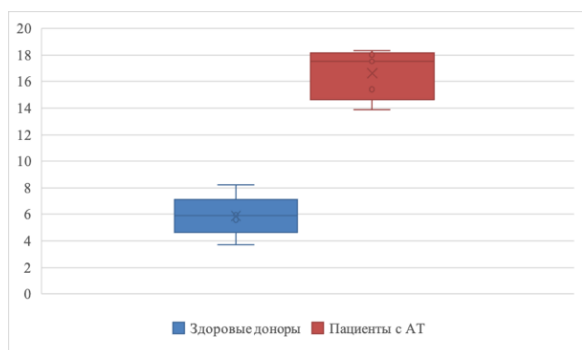


Рисунок 1. Соотношение миелоидных и плазмоцитоидных ДК (мДК/пДК) в периферической крови детей с атаксией-телеангиэктазией (АТ)

При развитии патологических процессов регуляторная активность дендритных клеток может изменяться как в сторону подавления, так и в сторону активации иммунных реакций. Нарушение периферической активации Т-клеток может играть критическую роль в развитии иммунных нарушений при АТ.

В результате данной работы нами выявлено достоверное увеличение относительного содержания зрелых активированных Т-лимфоцитов $CD3^+HLADR^+$ ($18,9 \pm 1,68\%$ при $3,1 \pm 2,23\%$ в группе здоровых детей ($p < 0,05$)) у детей с АТ (рис.2)

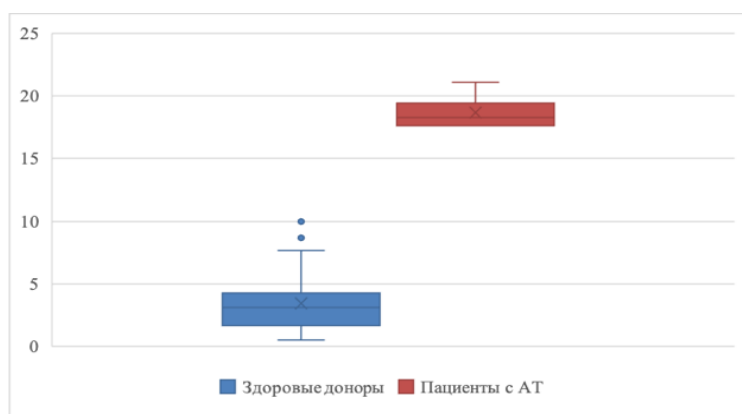


Рисунок 2. Относительное содержание Т-лимфоцитов с фенотипом $CD3^+HLADR^+$ у детей с атаксией-телеангиэктазией (АТ)

Анализ распределения Т-лимфоцитов, экспрессирующих поверхностный антиген, характерный для «наивных» Т-клеток ($CD45RA^+$) и Т-клеток «памяти» ($CD45RO^+$), у пациентов с АТ по сравнению со здоровыми донорами показал, что у пациентов с АТ наблюдался выраженный дефицит $CD4^+/CD45RA^+$ лимфоцитов ($2,56 \pm 1,23\%$ при $39,7 \pm 10,3\%$ у здоровых детей ($p < 0,05$)) (табл. 1). Молекулы $CD45RA$ экспрессировались на $CD8^+$ лимфоцитах аналогично показателям здоровых доноров. Это исключает генерализованный дефект регуляции или дифференциальный сплайсинг как причину дефектной экспрессии $CD45RA$ на $CD4^+$ клетках [9]. В то же время относительное количество клеток памяти с фенотипом $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ было значительно повышено ($44,8 \pm 7,9\%$ при $14,1 \pm 6,26\%$ у здоровых детей ($p < 0,05$)), а соотношение $CD3^+CD4^+CD45RA/RO$ было достоверно снижено ($0,06 \pm 0,035\%$ в сравнении с $2,75 \pm 1,29\%$ у здоровых детей ($p < 0,05$)), что

может свидетельствовать об увеличении продолжительности жизни Т-клеток и нарушении иммунной защиты.

Таблица 1. Относительное содержание субпопуляций Т-лимфоцитов у детей с атаксией-телеангиэктазией (АТ)

	Пациенты с АТ, n=7	Здоровые доноры, n=46
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁺	2,56*(1,33-3,79)	38,4(27,5-49,3)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺	44,8*(36,9-52,7)	13,95(7,69-20,21)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA/RO	0,06*(0,025-0,095)	2,75(1,46-4,04)
PTE CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD31 ⁺	3,3*(2,35-4,25)	59,0(50,04-67,96)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RA ⁺	18,3(12,1-24,5)	24,98(17,08-32,88)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RO ⁺	36,3*(27,54-45,06)	7,7(1,7-13,7)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RA/RO	0,46*(0,08-0,84)	3,37(1,07-5,67)

* - достоверность различий (p<0,05)

Дополнительно, в данной группе пациентов с АТ отмечается достоверное повышение процентного содержания Т-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺ (36,3±8,76% при 8,2±4,8% у здоровых детей (p<0,05)) и существенное снижение соотношения CD3⁺CD8⁺CD45RA/RO (p<0,05). Избирательный дефицит CD4⁺CD45RA⁺ может обеспечивать клеточную основу некоторых функциональных Т-клеточных нарушений у пациентов с АТ.

Клетки CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ (недавние мигранты из тимуса (RTE)) представляют собой лимфоциты, которые лишь недавно покинули тимус и не подверглись дальнейшей пролиферации (о чем свидетельствуют высокие концентрации TREC) и селекции антигенов. Недавние исследования указывают на высокую степень взаимосвязи между уровнем тимических мигрантов и TREC [3,4,7], а также на ключевую роль молекулы CD31 в регуляции эффекторной функции Т-лимфоцитов [11]. Выявленное нами значительное снижение относительного количества CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ Т-клеток в группе детей с АТ (6,6±3,03% в сравнении со здоровыми детьми (59,0±8,9%) (p<0,05)) является косвенным отражением нарушения созревания Т-лимфоцитов как одного из механизмов развития иммунологических нарушений у таких пациентов.

Список литературы:

1. Bigley, V. Human dendritic cell immunodeficiencies / V. Bigley, U. Cytlak, M. Collin // Seminars in Cell & Developmental Biology/ – 2019. – V.86. – P. 50-61.
2. Bigley, V. Dendritic cell analysis in primary immunodeficiency / V. Bigley, D. Bargeb, M. Collin // Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. – 2016. – P. 530–540.

3. Boyarchuk, O. TREC/KREC levels in children with ataxia-telangiectasia / Boyarchuk O. [et al.] // Immunologic Research.. – 2021. – V. 69. – P. 436–444.
4. Диагностическая значимость определения продуктов реаранжировок Т- и В-клеточных рецепторов TREC и KREC у пациентов с врожденными ошибками иммунитета / Е. А. Полякова [и др.] // Вест. Нац. акад.наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2023. – Т. 20, N 3. – С. 226–235.
5. Da Qian. Dendritic cell vaccines in breast cancer: Immune modulation and immunotherapy / Da Qian, Jialu Li [et al.] // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2023. – V. 162. – P. 430–476.
6. Kraus, M. Disturbed B and T cell homeostasis and neogenesis in patients with ataxia telangiectasia / Kraus M. [et al.] // Journal of Clinical Immunology. – 2014. – V. 34. – P. 561–572.
7. Полякова, Е.А. Количественное определение кольцевых фрагментов ДНК Т- и В-клеточного рецептора TREC/KREC у пациентов с атаксией-телеангиэктазией с мутацией в гене ATM / Е.А. Полякова, И.Е. Гурьянова, М.В. Стёганцева [и др.] // Immunopathology, Allergology, Infectology. – 2022. – №2. – С. 6-11.
8. Ochs, H. D. Primary Immunodeficiency diseases / H. D. Ochs // Oxford University Press – 2013. – 930 p.
9. Paganelli, R. Selective deficiency of CD4+/CD45RA+ lymphocytes in patients with ataxia-telangiectasia/ R. Paganelli [et al.] // J Clin Immunol. –1992. – V.12(2). – P. 84-91.
10. Schraml, B.U. Defining dendritic cells / B.U. Schraml // Curr. Opin. Immunol. – 2015. – V.32. – P.13-22.
11. Schoenaker, M.H.D. Early diagnosis of ataxia telangiectasia in the neonatal phase: a parents' perspective / M.H.D. Schoenaker[et al.] // European Journal of Pediatrics. – 2020. – V.179. – P.251–256.