

Ocena stanu odporności komórkowej u dzieci z zespołem Downa poprzez określenie odsetka subpopulacji limfocytów T CD3+, CD4+ i CD8+ we krwi obwodowej metodą cytometrii przepływowej

Assessment of cellular immunity in children with Down syndrome by determining the ratio of subpopulations of T lymphocytes CD3+, CD4+ and CD8+ in peripheral blood using flow cytometric method

Anna Jakubiuk-Tomaszuk^{1,2}, Joanna Śmigielska-Kuzia¹, Jolanta Wysocka², Janusz Żak², Magdalena Cholewa¹, Beata Olchowik¹, Krzysztof Sendrowski¹

¹Klinika Neurologii i Rehabilitacji Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

²Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Pediatricznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

STRESZCZENIE

Zespół Downa jest najczęstszym zaburzeniem chromosomowym, któremu towarzyszą częste, przedłużające się infekcje spowodowane pierwotnym niedoborem odporności. Dotychczasowe badania nad podłożem immunologicznym nie wykazały spójnych wyników. Cele pracy. Ocena stanu odporności komórkowej u dzieci z zespołem Downa poprzez określenie odsetka limfocytów T CD3+, CD4+ i CD8+ we krwi obwodowej w porównaniu do grupy odniesienia. Materiał i metody. Badaniem objęto 28 dzieci (17 chłopców i 11 dziewcząt) z zespołem Downa w wieku od 6 do 12 roku życia. Grupę odniesienia stanowiło 26 dzieci (16 chłopców i 10 dziewcząt) w tym samym przedziale wiekowym. Wszystkie badane dzieci były bez cech infekcji i nie przyjmowały żadnych leków. Subpopulacje limfocytów T we krwi obwodowej oznaczono metodą cytometrii przepływowej. Wyniki. U dzieci z zespołem Downa stwierdzono statystycznie wyższy odsetek limfocytów T CD3+ i CD8+ we krwi obwodowej niż w grupie porównawczej. Nie wykazano różnic istotnych statystycznie odsetka limfocytów T z ekspresją receptora CD4+ w grupie dzieci z zespołem Downa w porównaniu do grupy odniesienia. Wykazano istotnie statystycznie niższą wartość wskaźnika Th/Ts w grupie dzieci z zespołem Downa niż w grupie porównywanej. Wnioski. Wyniki sugerują, że u dzieci z zespołem Downa występują zaburzenia odporności komórkowej, które mogą zwiększać skłonność do infekcji.

Słowa kluczowe: Zespół Downa, odporność komórkowa, subpopulacje limfocytów T, cytometria przepływową

ABSTRACT

Down syndrome is the most frequent chromosomal disorder accompanied by frequent and long lasting infections caused by the primary immunodeficiency. Up-to-date investigations of immunological conditions did not show any coherent results. The aim of the study: The assessment of cell immunity in children with Down syndrome using the ratio of lymphocyte T CD3+, CD4+ and CD8+ in peripheral blood in comparison with the reference group. Material and methods: The study was carried out on 28 children (i.e. 17 boys and 11 girls) with Down syndrome within the age range of 6 to 12. Reference group consisted of 26 children (i.e. 16 boys and 10 girls) in the same range of age. There were no signs of infections reported in the investigated groups; children did not take any drugs. Lymphocyte T subpopulations were determined by the flow cytometry method. Results: In the children with Down syndrome there were statistically higher percentages of T lymphocyte CD3+ and CD8+ in peripheral blood reported in comparison to the reference group. The ratio of T lymphocyte with CD4+ receptor expression did not show any statistical discrepancies between Down syndrome group and the reference group. The value of Th/Ts ratio in the group of Down syndrome children was significantly lower than in the reference group. Conclusion: Based on the obtained results it can be concluded that cell-mediated immunity dysfunction in children with Down syndrome might lead to increased susceptibility to infections.

Keywords: Down syndrome, cellular immunity, lymphocytes T subpopulations, flow cytometric method

Zespół Downa (ZD), ang. Down syndrome, OMIM #190685 jest najczęstszym zaburzeniem chromosomowym, któremu towarzyszą pierwotne niedobory odporno-

ści. ZD w ogólnej populacji występuje z częstością około 1/650 wśród żywo urodzonych i charakteryzuje go ponad sto różnych cech klinicznych i fenotypowych, które wystę-

pują w różnych kombinacjach. Objawy zespołu Downa wywołane są nadekspresją genów z chromosomu 21. Najczęściej obserwuje się ZD w formie prostej trisomii chromosomu 21, rzadziej w formie translokacji chromosomowej robertsonowskiej, mozaiki chromosomowej czy duplikacji regionu krytycznego zespołu Downa (Down Syndrome Critical Region, DSCR).

Zaburzenia układu odpornościowego u osób z zespołem Downa mają złożoną etiologię. Dotychczasowe badania nad pierwotnym defektem odporności nie wykazały spójnych wyników. Obserwowano zaburzenia parametrów leukocytów, limfocytów, CD4+, CD8+, komórek NK i stężenia IgA, IgM, IgG oraz zaburzenia funkcji monocytów [1-3]. Sugerowano występowanie wtórnych niedoborów odporności związanych ze znacznym wzrostem apoptozy komórek populacji limfocytów T CD3+ i B CD19+, przyspieszonym starzeniem się i niedoborem cynku w surowicy zależnym od funkcji genu SOD1 [4]. Czynniki te mogą pogłębiać dysfunkcję układu immunologicznego. Dodatkowo na wzrost ryzyka rozwoju infekcji wpływają warunki anatomiczne, obniżone napięcie mięśniowe, wrodzone wady serca i refluks żołądkowo-jelitowy [5].

Zaburzona sprawność odpowiedzi immunologicznej wiąże się z występowaniem zwiększonej podatności na rozwój częstych, przedłużających się infekcji, chorób autoimmunologicznych i nowotworowych [6-8]. Częste infekcje u osób z zespołem Downa objawiają się: przewlekłymi infekcjami górnych i dolnych dróg oddechowych, przewlekłym katarzem, przerostem migdałków podniebnych i infekcjami ucha środkowego [2,5,7,9].

Stopień sprawności układu odpornościowego warunkuje krótkotrwałość i pomyślny lub przedłużony, nawracający i niepomyślny przebieg procesu zapalnego. Odporność komórkowa, związana z występowaniem i aktywnością leukocytów obdarzonych zdolnością do pochłaniania i wewnątrzkomórkowego trawienia lub usuwania ciał obcych, decyduje o ukierunkowaniu odpowiedzi immunologicznej. Ocena sprawności odporności komórkowej u dzieci z zespołem Downa może przyczynić się do zrozumienia patogenezy przewlekłych i częstych infekcji.

CEL

Celem pracy była ocena stanu odporności komórkowej u dzieci z rozpoznaniem zespołem Downa poprzez określenie odsetka limfocytów T CD3+, CD4+ i CD8+ we krwi obwodowej w porównaniu do grupy dzieci zdrowych.

MATERIAŁ

Badaniem objęto grupę 28 dzieci (17 chłopców i 11 dziewcząt) z potwierdzonym badaniem cytogenetycznym zespołem Downa – prosta trisomia chromosomu 21 pary (47,XY,+21 lub 47,XX,+21) w wieku od 6 do 12 roku życia (średni wiek 8 lat i 2 miesiące). Grupę odniesienia stanowiło 26 dzieci (16 chłopców i 10 dziewcząt) w wieku od 6 do 12 roku życia (średni wiek 9 lat). Wszystkie badane dzieci były bez cech infekcji i nie przyjmowały żadnych leków, w tym immunotropowych, od co najmniej 4 tygodni. Materiałem

do badań była krew pełna w ilości 1,5 cm³, którą pobierano w godzinach rannych z żyły odłokciowej do probówki z EDTA-K3.

W każdym przypadku pisemną zgodę na pobranie krwi wyrażali prawni opiekunowie dziecka. Na przeprowadzenie doświadczeń uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku R-I-002/485/2010.

Oznaczenie subpopulacji limfocytów metodą cytometrii przepływowej

Oznaczenia subpopulacji limfocytów T przeprowadzono metodą cytometrii przepływowej na cytometrze Coulter FC500 (Beckman Coulter). Przed zakwalifikowaniem próbek do analizy cytometrycznej oceniono żywotność komórek poprzez barwienie błękitem tryptanu. Do badań wybrano próbki, w których żywotność monocytów wynosiła co najmniej 98%. W każdej próbie oceniano 10 tys. komórek. Próbkę krwi (po 100 µl) były inkubowane przez 30 minut w temperaturze pokojowej, w ciemności z przeciwciałami monoklonalnymi (10 µl) sprzężonymi z odpowiednimi fluorochromami (anty-CD3, anty-CD4, anty-CD8 firmy Beckman Coulter). Po inkubacji próbki poddano lizie w automatycznej stacji lizowania (Epics-Q-Prep). Jako kontroli izotypowej użyto przeciwciał mysich IgG1 i IgG2a (Beckman Coulter). Wszystkie pomiary cytometryczne zostały wykonane w czasie do 60 minut od zakończenia inkubacji.

Analiza statystyczna

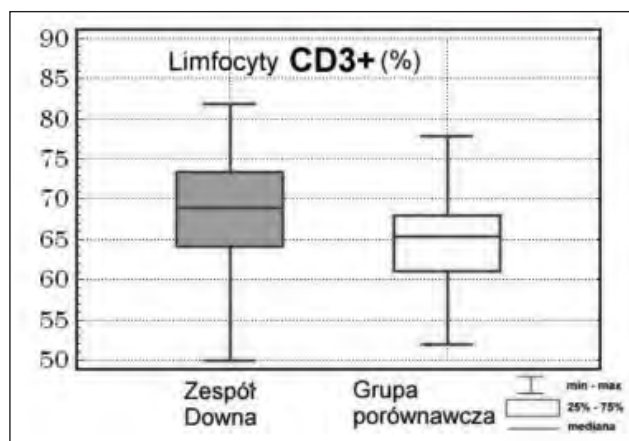
Uzyskane dane wprowadzono do programu Microsoft Excell for Windows 2007, a następnie po uporządkowaniu przeniesiono do programów Medcalc 7.0, w których przeprowadzono ich analizę statystyczną. Ponieważ dane nie miały cech rozkładu normalnego, do porównywania uzyskanych wyników w grupie badanej i porównawczej użyto testu nieparametrycznego U-Manna-Whitneya. Wartość $p < 0,05$ uznano za istotną statystycznie.

WYNIKI

W grupie dzieci z zespołem Downa we krwi obwodowej stwierdzono statystycznie wyższy odsetek limfocytów T CD3+ (CD3+ 69,0 vs. 64,85%, $p < 0,04$) (tabela I i rycina 1).

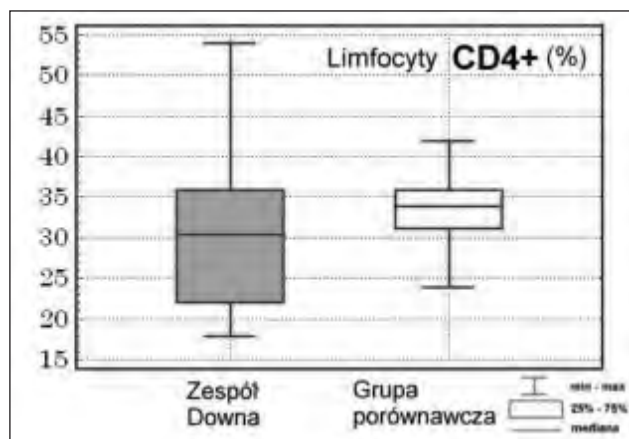
Tabela I. Subpopulacje limfocytów T CD3+, CD4+, CD8+ oraz wskaźnik Th/Ts (CD4+/CD8+) u dzieci z zespołem Downa i w grupie porównawczej *T lymphocyte subpopulations CD3+, CD4+, CD8+ and Th/Ts ratio in children with Down syndrome and in the comparison groups*

| Oceniane grupy dzieci | Zespół Downa | Grupa porównawcza | Analiza statystyczna |
|------------------------------------|------------------|-------------------|----------------------|
| Liczba dzieci w badanej grupie | N=28 | N=26 | |
| Limfocyty T CD3+ (%) $\chi \pm SD$ | 69 \pm 8,56 | 64,85 \pm 6,16 | p < 0,04 |
| Limfocyty T CD4+ (%) $\chi \pm SD$ | 30,21 \pm 8,69 | 33,81 \pm 4,43 | NS |
| Limfocyty T CD8+ (%) $\chi \pm SD$ | 36,29 \pm 9,95 | 26,46 \pm 5,17 | p < 0,01 |
| Wskaźnik Th/Ts $\chi \pm SD$ | 0,92 \pm 0,41 | 1,33 \pm 0,35 | p < 0,001 |



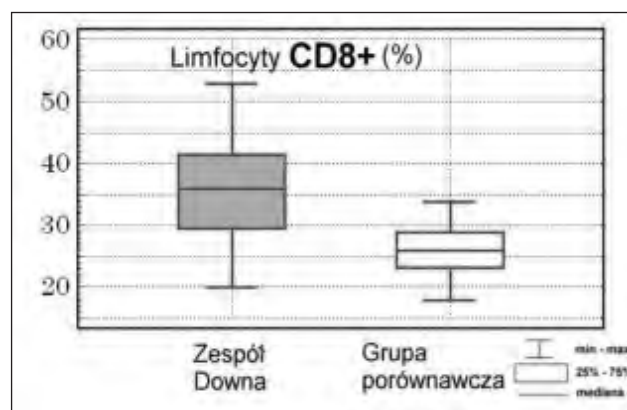
Ryc. 1. Subpopulacja limfocytów T CD3+ w grupie dzieci z zespołem Downa i w grupie porównawczej *Subpopulation of T lymphocyte CD3+ in children with Down syndrome and in the comparison groups*

Odsetek limfocytów T z ekspresją receptora CD4+ w grupie badanej był nieznacznie niższy niż w grupie odniesienia i wynosił CD4+ 30,21 vs. 33,81%, ale różnica nie była istotna statystycznie (tabela I i rycina 2).



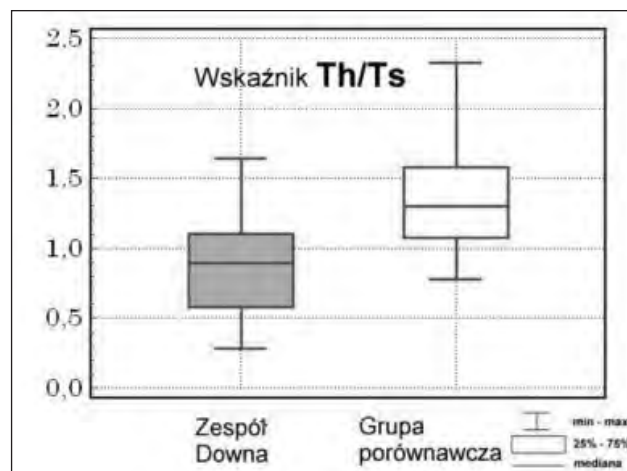
Ryc. 2. Subpopulacja limfocytów T CD4+ w grupie dzieci z zespołem Downa i w grupie porównawczej *Subpopulation of T lymphocyte CD4+ in children with Down syndrome and in the comparison groups*

U dzieci z zespołem Downa odsetek limfocytów CD8+ był statystycznie znacznie wyższy niż w grupie porównawczej (CD8+ 36,29, vs. 26,46%, p < 0,01) (tabela I i rycina 3).



Ryc. 3. Subpopulacja limfocytów T CD8+ w grupie dzieci z zespołem Downa i w grupie porównawczej *Subpopulation of T lymphocyte CD8+ in children with Down syndrome and in the comparison groups*

Stwierdzono istotnie statystycznie niższą wartość wskaźnika Th/Ts w grupie dzieci z zespołem Downa niż w grupie odniesienia, odpowiednio: Th/Ts 0,92 vs. 1,33, p < 0,001 (tabela I i rycina 4).



Ryc. 4. Wskaźnik Th/Ts w grupie dzieci z zespołem Downa i w grupie porównującej. *Th/Ts ratio in children with Down syndrome and in the comparison groups.*

DYSKUSJA

Limfocyty T krwi obwodowej pełnią ważną rolę regulacyjną i efektorową w układzie immunologicznym. Funkcje regulacyjne dotyczą praktycznie wszystkich etapów odpowiedzi swoistej i wywierane są poprzez nasilenie (limfocyty T z ekspresją receptora CD4+) lub hamowanie (limfocyty T z cząsteczką CD8+) odpowiedzi immunologicznej. Natomiast funkcje efektorowe polegają na działaniu cytotoksycznym. Dojrzałe limfocyty T cechuje obecność na powierzchni swoistego receptora TCR (T Cell Receptor) dla antygenów połączonego z cząsteczką CD3. W pracy oceniano odsetek limfocytów T z ekspresją receptorów CD3+, CD4+ i CD8+ we krwi obwodowej oraz wskaźnik Th/Ts u dzieci z zespołem Downa. Wyniki porównano z grupą dzieci zdrowych w tym samym przedziale wiekowym od 6 do 12 roku życia.

W przeprowadzonych badaniach własnych wykazano statystycznie wyższy odsetek limfocytów T z ekspresją receptora CD3+ w grupie dzieci z zespołem Downa w wieku od 6 do 12 roku życia w porównaniu z grupą odniesienia. Natomiast z badań Elsayed i wsp. przeprowadzonych u dzieci z ZD w grupie wiekowej od 4 miesiąca życia do 14 roku życia wynika, że odsetek limfocytów T z ekspresją receptora CD3+ nie różnił się od wartości uzyskanych w grupie dzieci zdrowych [4].

W przeprowadzonych badaniach obserwowaliśmy niższe wartości odsetka limfocytów T CD4+ u dzieci z zespołem Downa w porównaniu z grupą odniesienia, chociaż różnica nie była istotna statystycznie. Cocchi i wsp. badając dzieci z zespołem Downa w przedziale wiekowym od 1 do 5 roku życia również obserwowali tendencję spadkową tej subpopulacji limfocytów [1]. Inni autorzy [3,10,11] wykazali niższe wartości limfocytów T CD4+ w starszych grupach wiekowych osób z zespołem Downa. Natomiast Cetiner i wsp. odnotowali wyższe wartości odsetka limfocytów T CD4+ w grupie 32 dzieci z ZD w wieku od 1 do 7 roku życia w odniesieniu do grupy kontrolnej, jednakże różnice nie były statystycznie znamienne [12].

W badaniach własnych dzieci z zespołem Downa stwierdzono istotnie statystycznie wyższy odsetek limfocytów CD8+ niż w grupie porównawczej. Badacze Cocchi i wsp. stwierdzili nieznacznie wyższy odsetek limfocytów T CD8+ u dzieci z zespołem Downa w wieku od 1 do 5 roku życia [1]. Odmienne obserwacje opisali Corsi i wsp., którzy w grupie dzieci z zespołem Downa obserwowali odsetek limfocytów T CD8+ podobny do wartości stwierdzanych u dzieci zdrowych i znacznie niższy odsetek komórek CD4+ [11].

W odniesieniu do uzyskanych wyników nasuwa się wniosek, iż subpopulacja limfocytów T CD4+ u dzieci z zespołem Downa jest porównywalna do grupy odniesie-

nia i nie ulega ilościowym zmianom. Natomiast znacząco wyższe są odsetki limfocytów T z ekspresją receptorów CD3+ i CD8+ u dzieci z zespołem Downa. Wyższe wartości limfocytów T z ekspresją receptora CD8+ mogą być wynikiem częstych infekcji. Kusters i wsp. wykazali zbliżone odsetkowe wartości limfocytów T u osób z ZD w różnych grupach wiekowych w odniesieniu do grup porównywanych i nie stwierdzili wyraźnego wzrostu limfocytów w pierwszym roku życia, co może sugerować nieskuteczną reakcję na stymulację antygenem [2]. Wątpliwe również pozostaje, czy limfocyty T prezentują prawidłowy fenotyp i funkcję. Badacze sugerują, iż za osłabienie sprawności układu immunologicznego odpowiedzialna jest nieprawidłowa funkcja limfocytów T, a nie ich liczba. Elsayed i wsp. podkreślają fakt, iż dysfunkcja układu immunologicznego w większym stopniu dotyczy odporności komórkowej niż humoralnej [4]. Opisywane odmienności budowy anatomicznej i mniejszy rozmiar grasicy u noworodków z zespołem Downa oraz wzrost ekspresji wydzielanych cytokin TNF- α (Tumor Necrosis Factor) i interferonu- γ mogą odpowiadać za zmienioną funkcję limfocytów T [2,8].

Oceniona proporcja komórek limfocytów CD4+ do CD8+ jest określana mianem wskaźnika odporności Th/Ts. Własne badania w grupie dzieci z zespołem Downa wykazały istotnie statystycznie niższą wartość wskaźnika w stosunku do grupy porównywanej. Na obniżenie wartości wskaźnika ma wpływ znaczny wzrost odsetka komórek z ekspresją receptora CD8+ i towarzyszący spadek wartości subpopulacji komórek CD4+ [8]. Cocchi i wsp. wykazali, iż wartość wskaźnika Th/Ts drastycznie spada u dzieci z ZD w wieku od 3 do 6 miesiąca życia. Wskaźnik ten w kolejnych latach, aż do 5 roku życia był stabilny, jednakże utrzymywał się poniżej wartości prawidłowej. [1]. W grupie dzieci z ZD w wieku od 1 do 7 roku życia badanych przez Cetiner i wsp. wartość wskaźnika odporności była nieznacznie wyższa, jednakże nieistotna statystycznie [12]. Wskaźnik Th/Ts jest pośrednią miarą sprawności czynnościowej układu immunologicznego. Nawracające zakażenia u osób z zespołem Downa mogą być czynnikiem obniżającym wartość wskaźnika Th/Ts, co może świadczyć o nieprawidłowej regulacji ogólnoustrojowych procesów immunomodulacyjnych.

WNIOSEK

Uzyskane przez nas wyniki sugerują, że u dzieci z zespołem Downa występuje zaburzenie odporności komórkowej. Podjęty problem jest kontynuowany, a wyniki dotyczące odporności humoralnej będą tematem odrębnej publikacji.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Cocchi G., Mastrocola M., Capelli M. et al.: Immunological patterns in young children with Down syndrome: is there a temporal trend? *Acta Paediatr* 2007; 96: 1479–1482.
- [2] Kusters M.A., Verstegen R.H., Gemen E.F., et al.: Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: a review. *Clin Exp Immunol* 2009; 156: 189–93.
- [3] Dion N., Kishnani P.S., Zimmerman S.: Clinical manifestations of hematologic and oncologic disorders in patients with Down syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2006; 142C: 149–157.
- [4] Elsayed S.M., Elsayed G.M.: Phenotype of apoptotic lymphocytes in children with Down syndrome. *Immun Ageing* 2009; 6: 2.
- [5] Ram G., Chinen J.: Infections and immunodeficiency in Down syndrome. *Clin Exp Immunol* 2011; 164: 9–16.
- [6] Bloemers B.L., van Bleek G.M., Kimpen J.L. et al.: Distinct abnormalities in the innate immune system of children with Down syndrome. *J Pediatr* 2010; 156: 804.
- [7] Hilton J.M., Fitzgerald D.A., Cooper D.M.: Respiratory morbidity of hospitalized children with Trisomy 21. *J Paediatr Child Health* 1999; 35: 383–386.
- [8] Nespoli L., Burgio G.R., Ugazio A.G. et al.: Immunological features of Down's syndrome: a review. *J Intellect Disabil Res* 1993; 37: 543–51.
- [9] Yang Q., Rasmussen S.A., Friedman J.M.: Mortality associated with Down's syndrome in the USA from 1983 to 1997: a population-based study. *Lancet* 2002; 359: 1019–1025.
- [10] Ribeiro L.M., Jacob C.M., Pastorino A.C. et al.: Evaluation of factors associated with recurrent and/or severe infections in patients with Down's syndrome. *J Pediatr* 2003; 79: 141–148.
- [11] Corsi M.M., Ponti W., Venditti A. et al.: Proapoptotic activated T-cells in the blood of children with Down's syndrome: relationship with dietary antigens and intestinal alterations. *Int J Tissue React* 2003; 25: 117–125.
- [12] Cetiner S., Demirhan O., Inal T.C. et al.: Analysis of peripheral blood T-cell subsets, natural killer cells and serum levels of cytokines in children with Down syndrome. *Int J Immunogenet* 2010; 37: 233–237.

Adres do korespondencji:

Anna Jakubiuk-Tomaszuk, Klinika Neurologii i Rehabilitacji Dziecięcej, Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego, ul. Waszyngtona 17, 15-274 Białystok, e-mail: ajaktom@gmail.com