

Downi sündroom – immuunsüsteemi häiretega kromosoomihaigus

Raivo Uibo¹, Tiina Talvik^{2,3}, Oivi Uibo^{2,3}, Tiia Reimand⁴, Kai Kisand¹, Liina Salur¹, Koit Reimand¹, Ija Talja¹, Riina Žordania⁵, Kaja Metsküla¹ – ¹TÜ arstiteaduskonna immunoloogia õppetool, ²TÜ lastekliinik, ³TÜ Kliinikumi lastekliinik, ⁴TÜ Kliinikumi ühendlabor, ⁵Tallinna Lastehaigla

autoantikehad, autoimmuunhaigused, Downi sündroom, rakuline immuunsus

Downi sündroomi (DS) ehk 21. kromosoomi trisoomia korral esineb mitmesuguseid haigusnähte, millest osa on seotud immuunsüsteemi funktsiooni häiretega. Artiklis käsitletud uuringust ilmnes, et 15aastastel ja vanematel DS-haigetel esineb tuumavastaseid ning retikuliinivastaseid antikehi oluliselt sagedamini kui tervetel. Üksikutel haigetel leiti ka pankrease saarekestete, kilpnäärme ja mao parietaalrakkude vastaseid autoantikehi. Perifeerse vere rakkude hulgas oli DS-haigetel märkimisväärselt suurenenud mälufunktsiooni omavate CD45RO+ lümfotsüütide hulk, mis võib olla üheks autoimmuunnähtude sagedasema esinemise põhjuseks neil haigetel.

Downi sündroom (DS) on enim levinud kromosoomihaigus, mille põhjuseks on 21. kromosoomi trisoomia (47,XX,+21 või 47,XY,+21) ja mis võib esineda kas regulaarse, translokatsiooni või mosaiikse vormina (1). Maailmas on DSi esinemisagedus 0,8–1,2 juhtu 1000 elusa vastsündinu kohta, Eestis aga hiljuti läbiviidud epidemioloogilise uuringu põhjal 1,17 juhtu 1000 elusa vastsündinu kohta (2). Kuigi kliinilistele sümptomitele tuginedes on DS kergesti äratuntav, kinnitab diagnoosi vaid tsütogeneetiline analüüs (1).

Downi sündroomiga haigetel on kirjeldatud mitmesuguseid arenguanomaaliaid, haigusi ja häireid, millest olulisemat tähelepanu pälvivad kaasasündinud südamerikked, seedetrakti väärengud ning haigused, endokriin- ja närvisüsteemi haigused, näiteks tsöliaakia, hüpotüreoos, nägemis- ja kuulmislangus (1). Et haigetel on ka suurenenud vastuvõtlikkus infektsioonidele, tugevnenud reaktiivsus mõningate toidukomponentide suhtes, viitab see samuti olulistele häiretele immuunsüsteemis, seda nii loomuliku kui ka adaptiivse ehk spetsiifilise immuunsuse osas (3). Ühe olulisema eripärana on rõhutatud autoimmuunhaiguste ja -fenomenide oluliselt sagedamat esinemist DSiga isikutel võrreldes tervetega (3, 4). Siiski on senistes uurin-

gutes keskendutud vaid ühe haiguse või kitsama autoimmuunhaiguste rühma või autoantikeha määramisele, sageli ei ole uurimisrühmad olnud piisava suurusega. Seetõttu on senistest uuringutest tekkinud üldpilt autoimmuunfenomenide esinemisest ja omavahelistest seostest DSi korral jäänud siiski üsna piiratuks.

Autoimmuunhaiguste serodiagnostikas kasutatakse tänapäeval üle 200 erineva autoantikeha tüübi (5). Autoimmuunhaiguste sõeluuringutes on rakendust leidnud siiski oluliselt väiksem arv autoantikehi, eeskätt siiski tuumavastased antikehad (ANA), mitokondritevastased antikehad (AMA), endomüüsiumivastased antikehad (EMA) või ka retikuliinivastased antikehad (ARA), parietaalrakkudevastased antikehad (PCA), kilpnäärme mikrosoomide vastased antikehad (TMA), pankrease saarekestete vastased antikehad (ICA) ja neerupealise koore mikrosoomide vastased antikehad (AAA) (5). Tuumavastased antikehad reageerivad väga mitmesuguste tuumas (ja osaliselt ka tsütoplasmas) esindatud autoantigeenidega, AMA korral on autoantigeeniks oksohapete dehüdrogenaasid, EMA ja ARA korral inimese koe II tüüpi transglutaminaas, PCA korral H+K+adenoosiinrifosfataas, TMA korral kilpnäärme peroksidaas,

AAA korral tsütokroom P450 steroidogeensed ensüümid, eeskätt 21-hüdroksülaas (5).

Eelnevalt tulenevalt seadsime **töö eesmärgiks** analüüsida nende, autoimmuunhaiguste diagnostikas enam kasutatavate autoantikehade esinemissagedust DSiga haigetel Eestis. Samuti hindasime osal DSiga haigetel rakulise immuunsuse põhinäitajaid, et saada vastus küsimusele immuunregulatsiooni võimalikest iseärasustest kui autoimmuunreaktsioonide tekke soodustajatest.

Uuritavad ja uurimismeetodid

Ajavahemikus 1999–2003 uurisime 145 DSi diagnoosiga isikut vanuses 1 kuu kuni 45 aastat (keskmine 11,4 aastat), kes elasid Eesti erinevates hooldekodudes (väikelaste-, kool- või hooldekodus), pöördusid konsultatsioonile Tartu Meditsiinigeneetika Keskusesse, Tallinna Lastehaigla geneetika kabinetti või kuulusid DSi tugirühma. Naissoost isikuid oli 68. Enamus uuritavatest (106) olid alla 15aastased lapsed. DS diagnoos oli kõigil kinnitatud tsütogeneetilisel analüüsil, mis tehti perifeerse vere lümfotsüütide kultuurist.

Downi sündroomiga haigetel saadud tulemusi võrreldi andmetega, mis pärinesid meie poolt varem tehtud kogurahvastiku (6) ja veredoonorite autoantikehade uuringutest (7).

Downi sündroomiga haigete hulgest moodustati uurimisrühm (16 isikut, sh 8 naissoost; keskmine vanus $9,3 \pm 8,3$ a) rakuimmuunsuse parameetrite hindamiseks. Samal ajal haiglas viibivate mitte-immunoloogiliste haigustega isikute hulgest leiti uuritavatele ealiselt vastavad kontrollid (16 isikut, sh 9 naissoost, keskmine vanus $9,3 \pm 8,1$ a).

Neis rühmades tehti perifeerse vere lümfotsüütide fenotüüpiseerimine pinnamarkerite (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD45RO, CD45RA ja CD56) alusel, kasutades voolutsütomeetrit FACS-Calibur ja vastavaid fluorokroomidega märgistatud monokloonseid antikehi (BD Biosciences, NJ, USA), järgides äsja publitseeritud meetodikat (8).

Downi sündroomiga haigete ja kontrollisikute vereseerumist määrati ANA, AMA, ARA, PCA, TMA ning ICA, kasutades kaudset immuunfluoresentsmeetodit ja antigeensete substraatidena näriliste organitest (ANA, ARA ja PCA puhul) või inimese operatsioonipreparaatidest (TMA, ICA korral) valmistatud külmutuslöike. Antikehi hinnati seerumi alglahjenduses 1 : 10 (v.a ICA, mille korral kasutati seerumi lahjendust 1 : 2 (9)) ja reaktsioon tehti kindlaks inimese IgG-vastase FITC-liitelise küüliku antikeha ning UV-mikroskoopia abil (6). Neerupealise tsütokroom P450 21-hüdroksülaasi vastased IgG-tüüpi autoantikehad (Anti-21OH) määrati seerumi lahjendusest 1 : 10, kasutades immunoblotanalüüsis inimese rekombinantset 21-hüdroksülaasi varem kirjeldatud meetodika alusel (10).

Tööle andsid nõusoleku Tartu Ülikooli inim-uuringute eetika komitee ning DSiga haigete vanemad või hooldekodude juhatajad. Statistiline töötlus toimus SAS/STAT (version 7.1, 2006, StatSoft, Inc. USA) abil. Statistiliselt oluliseks peeti p väärtusi alla 0,05.

Tulemused

106-l alla 15aastasel DSiga haigel esines autoantikehi üksikute uuritel, seejuures ANA oli neljal lapsel,

Tabel 1. IgG-tüüpi autoantikehade esinemine 15aastastel ja vanematel Downi sündroomiga haigetel võrreldes samavanuste tervete kontrollisikutega

Antikeha tüüp	Downi sündroomiga haiged (%)	Kontrollisikud (%)	Erinevus p (χ^2 -test)
ANA	4/39 (10,3)	14/945 (1,5)	0,0001
AMA	0/39 (0)	2/945 (0,2)	>0,05
ARA	2/39 (5,1)	0/945 (0)	0,0000
PCA	2/39 (5,1)	13/945 (1,4)	>0,05
TMA	1/39 (2,6)	30/945 (3,0)	>0,05
ICA	1/39 (2,6)	3/142	>0,05
Anti-21OH	0/35 (0)	0/20	>0,05

Tabel 2. Perifeerse vere lümfotsüütide tähtsamate alarühmade rakkude hulk (%) Downi sündroomiga haigetel ning vastavatel kontrollisikutel

Rakkude rühmad	Downi sündroomiga haiged	Kontrollisikud	Erinevus p (t-test)
T-rakud*	75,53 ± 7,90	70,51 ± 7,43	>0,05
NK-rakud*	12,45 ± 6,62	14,52 ± 7,63	>0,05
B-rakud*	8,46 ± 5,47	13,19 ± 7,42	0,05
Th-rakud*	32,93 ± 10,01	40,92 ± 6,33	0,01
CTL rakud*	34,95 ± 9,56	25,26 ± 4,68	0,001
CD45RA+ T-rakud**	65,42 ± 12,91	76,16 ± 8,03	0,008
CD45RO+ T-rakud**	54,17 ± 16,86	33,69 ± 12,31	0,0005

* kõigi lümfotsüütide hulgast

** T-lümfotsüütide hulgast

PCA kahel lapsel, TMA ühel ja EMA kahel lapsel. Tuumavastaste ja retikuliinivastaste antikehade esinemissagedus oli 15aastastel ja vanematel DSiga haigetel oluliselt suurem kui kontrollrühmas (vt tabel 1). Seejuures esinesid tuumavastased antikehad kuni 45aastastel DSiga haigetel seitse korda sagedamini kui samavanustel kontrollisikutel. Seevastu AMA ja Anti-21OH puudusid meie uuritud DSiga haigete veres.

Perifeerse vere lümfotsüütide põhialarühmade ehk T-, B- ja NK-rakkude esinemises DSiga haigetel olulisi erinevusi tervetest ei leitud, v.a B-rakkude mõnevõrra väiksem hulk DSiga haigetel (vt tabel 2). Seevastu oli nii CD4+ kui ka CD8+ rakkude hulk erinev DSi ja kontrollrühmas. Iseäranis suured erinevused DSi ja kontrollrühma vahel olid CD45RO+ T-rakkude esinemises: neid rakke oli DSiga haigetel olulisel määral rohkem kui tervetel.

Arutelu

Töös uuriti autoimmuunsuse enam levinud markerite esinemist 145-l DSiga haigel. Uurimiserühma küllaldane suurus võimaldas meil saada unikaalseid tulemusi ka suhteliselt harva esinevate autoantikehade kohta võrreldes seniste uuringutega, kus on piiratud enamasti väiksemate uuringurühmadega (4, 11).

Töö kinnitab seniseid uurimustulemusi autoimmuunreaktsioonide sagedasest esinemisest DSi korral. Samas saime ka märkimisväärseid uusi andmeid autoimmuunsuse markerite ja DSi seoste kohta. Neist tuleb esile tõsta iseäranis kahte uurimustulemust, millest esmajoones väärivad märkimist süsteemsetele autoimmuunhaigustele iseloomuliku antikeha ANA sageda esinemine DSiga haigetel, eriti 15aastastel ja

vanematel, kellel leidsime neid antikehi 10,3%-l. Senini on süsteemseid sidekoehaigusi DSiga haigetel diagnoositud suhteliselt harva, mistõttu ANA suurt esinemissagedust võib pidada suurenenud autoimmunisatsiooniriski peegelduseks DSiga haigetel. Äsja ilmunud Nisihara ja kaasautorite (2007) uuring tõdes, et ka reumatoidartriidile iseloomulikud tsüklilise tsitrullineeritud peptiidi (CCP) antikehad esinevad ligemale pooltel DSiga haigetel ilma vastava kliinilise leiuta (12). Analoogselt sellega oleme varem leidnud ka 41%-l DSiga haigetel gliadiinivastaseid antikehi, mis lastel seostuvad tavaliselt tsöliaakiaga. Seevastu diagnoosisime meie uuritud DSiga haigete hulgas tsöliaakiat vaid 3%-l, mis on aga mitu korda sagedam leid võrreldes kogurahvastikuga (13). Ka tsöliaakiale spetsiifilisi retikuliinivastaseid antikehi leidsime oma töös oluliselt sagedamini (5,1%-l) kui samavanuselises kogurahvastikurühmas (ühelgi 945 isikust ei leitud antikehi). Tsöliaakiale iseloomulike antikehade esinemissagedus DSiga haigetel ületas ka senini kõige suurema kogurahvastikus täheldatud tsöliaakia esinemissageduse, mis hiljutise soomlaste uuringu põhjal oli 1,9% (14).

Elundispetsiifilistest autoimmuunhaigustest ja nendega assotsieeruvatest autoantikehadest on rõhutatud senini enim kilpnäärmehaiguste sagedast esinemist DSi korral (3). Meie haigete hulgas täheldatud TMA leidu vaid kahel 145-st DSiga haigest on raske seletada millegi muuga kui kasutatud TMA testi väikese spetsiifilisusega. Tõepoolest, hilisemas katseuuringus (publitseerimata andmed), kus kasutasime uuringuks tundlikumat uurimismeetodit, TPO-vastaste antikehade määramist

ensüümvahendatud immuunmeetodil (s.o TMA test, kus kasutatakse puhastatud antigeeni), leidsime 52 uuritud DSiga haige vereseerumist 9-l TMA, mis sarnaneb teiste seni publitseeritud uurimistulemustega (15).

Mõnevõrra üllatav oli ka ICA väike esinemisagedus, kuigi ICA leiule iseloomulikku I tüüpi diabeeti peetakse DSi korral sageli kaasuvaks haiguseks (3). Samas on võimalik, et DSiga kaasnevale diabeedile pole iseloomulik mitte niivõrd ICA kui teised I tüüpi diabeediga seostuvad, näiteks glutamaadi dekarboksülaasi, türosiini fosfataasi ja insuliini antikehad, mida Gillespie ja kaasautorid leidsid 15,1%-l uuritustest (16). Ainus senine uuring, kus on analüüsitud 21-OH vastaste autoantikehade esinemist DSiga haigetel, tuvastas ühe antikehade positiivse juhu 48 seas, kuid uuritavate rühm oli neil kaks korda vanem (keskmine vanus 22,9 a; meil 11,4 a). Vanuse suurenedes teatavasti kasvab oluliselt autoantikehade (ja autoimmuunhaiguste) esinemise võimalus (5).

Autoimmuunreaktsioonide otseseks tekkepõhjuseks on häired nii tsentraalsete kui ka perifeersete immunoloogiliste tolerantsusmehhanismide kujunemisel (17). Mis on DSi puhul hulga autoimmuunnähtude (ja ka muude immuunhäirete) tekke põhjuseks, ei ole seni selge. Oletus, et teatav mõju on autoimmuunsuse regulaatorgeenil (*auto-immune regulator*) AIRE-l (11), mis asub samuti selles kromosoomis (s.o 21. kromosoomis), vajab edasist uurimist.

Oluline on aga meie tulemus, mis rajaneb selleks eraldi koostatud uurimisrühmal ning sooliselt ja ealiselt vastavatel kontrollidel ning mis näitas, et DSiga haigetel on T-rakkude hulgas mälu funktsiooni omavate lümfotsüütide osakaal suurenenud. Mis on aga selle otseseks põhjuseks, on raske öelda. Võib vaid

oletada, et põhjuseks on immuunsüsteemi enneaegne vananemine ja regulatsioonimehhanismide häirumine, millele on viidatud ennegi (3, 4, 18). Edasised uuringud peaksid selgitama, mis on autoimmuunnähtude ja nendega seostuvate autoimmuunhaiguste patogeneesimehhanismid DSi korral. Siinjuures tuleks põhitähelepanu pöörata just immuunregulatsiooni ja tolerantsuse mehhanismidele neis kudedes, mis on kõige enam DSi puhul haaratud autoimmuunprotsessidest.

Kokkuvõte

Uuringutulemused näitavad mitmete autoimmuunnähtude mõnevõrra sagedasemat esinemist DSiga haigetel võrreldes samavanuseliste tervete isikutega. Eeskätt puudutab see tsöliaakia ja tõenäoliselt ka autoimmuunse türeoidiidiga assotsieeruvaid autoantikehi. Tuumavastaste antikehade sage esinemine DSiga haigetel väärrib edasist analüüsi tuumas reageerivate autoantigeenide suhtes. Eelsoodumus autoantikehade tekkeks võib olla seotud oluliste nihetega DSiga haigete rakulistes immuunreaktsioonides, milles kesksel kohal on mälu rakkude hulga suurenemine, mis võib olla üheks autoimmuunnähtude sagedasema esinemise põhjuseks neil haigetel.

Tänuavaldus

Uurimistööd on toetanud Eesti Teadusfond (grandid nr 4437 ja 6514). Autorid tänavad kõiki Downi sündroomiga haigeid ja nende vanemaid või hooldajaid uuringute võimaldamise eest ning raviarste, meditsiiniõdesid ja laborante uuringute tegemise eest. Eriti tahame tänada ÜMPI immunoloogia labori töötajaid Anu Kaldmat, Kadri Eomäed ja Ele Pransu laboratoorsete uuringute ettevalmistamise eest.

Kirjandus

1. Roizen NJ, Patterson D. Down's syndrome. *Lancet* 2003;362:1281–9.
2. Reimand T, Õunap K, Zordania R, et al. Descriptive epidemiology of Down's syndrome in Estonia. *Paediatr Perinatal Epidemiol* 2006;20:512–9.
3. Cuadrado E, Barrena MJ. Immune dysfunction in Down's syndrome: primary immune deficiency or early senescence of the immune system. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;78:209–14.
4. Ugazio AG, Maccario R, Notarangelo LD, et al. Immunology of Down syndrome: a review. *Am J Med Genet Suppl* 1990;7:204–12.
5. Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL. *Autoantibodies*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Science; 2007.
6. Metsküla K, Jõgi T, Kivik T, et al. Autoantibodies in an unselected population sample. *Central Eur J Immunol* 2001;26:157–63.
7. Haller K, Kisand K, Pisarev H, et al. Insulin gene VNTR, CTLA-4 +49A/G and HLA-DQB1 alleles distinguish latent autoimmune diabetes in adults from type 1 diabetes and from type 2 diabetes group. *Tissue Antigens* 2007;69:121–7.
8. Kisand KE, Prökk T, Kisand KV, et al. Propensity to excessive proinflammatory response in chronic Lyme borreliosis. *APMIS* 2007;115:134–41.
9. Rajasalu T, Haller K, Salur L, et al. Insulin VNTR I/III genotype is associated with autoantibodies against glutamic acid decarboxylase in newly diagnosed type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2007;23 (in press).
10. Uibo R, Aavik E, Peterson P, et al. Autoantibodies to cytochrome P450 enzymes P450sc, P450c17 and P450c21 in autoimmune polyglandular disease types I and II and in isolated Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:323–8.
11. Söderbergh A, Gustafsson J, Ekwall O, et al. Autoantibodies linked to autoimmune polyendocrine syndrome type I are prevalent in Down syndrome. *Acta Paediatr* 2006;95:1657–60.
12. Nishihara RM, Skare TL, Silva MB, et al. High positivity of anti-CCP antibodies in patients with Down syndrome. *Clin Rheumatol* 2007; Mar 27. PMID: 17387532. DOI: 10.1007/s10067-007-0606-1. (Epub ahead of print).
13. Uibo O, Teesalu K, Metsküla K, et al. Screening for celiac disease in Down's syndrome patients revealed cases of subtotal villous atrophy without typical for celiac disease HLA-DQ and tissue transglutaminase antibodies. *World J Gastroenterol* 2006;12:1430–4.
14. Tikkakoski S, Savilahti E, Kolho KL. Undiagnosed coeliac disease and nutritional deficiencies in adults screened in primary care. *Scand J Gastroenterol* 2007;42:60–5.
15. Karlsson B, Gustafsson J, Hedov G, et al. Thyroid dysfunction in Down's syndrome: relation to age and thyroid autoimmunity. *Arch Dis Child* 1998;79: 242–5.
16. Gillespie KM, Dix RJ, Williams AJ, et al. Islet autoimmunity in children with Down's syndrome. *Diabetes* 2006;55:3185–8.
17. Coodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, et al. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 2005;435:590–6.
18. Lin SJ, Wang JY, Klickstein LB, et al. Lack of age-associated LFA-1 up-regulation and impaired ICAM-1 binding in lymphocytes from patients with Down syndrome. *Clin Exp Immunol* 2001;126:54–63.

Summary

Down syndrome – a chromosomal disease with immune system disturbances

Down syndrome (chromosome 21 trisomy) is the most frequent chromosomal disorder with diverse clinical signs. Many of these are due to dysfunction of the immune system.

Aim. To study the prevalence of common autoantibodies in 145 Down syndrome patients (aged 1 months to 45 years; 68 female) and to compare these data to autoantibody prevalence in age and sex matched controls; to analyse peripheral blood cellular immunity characteristics in comparison to controls in order to find out possible causes of autoimmunity predisposition in Down syndrome patients.

Methods. Indirect immunofluorescence for detection of nuclear, mitochondrial, reticulin, gastric parietal cell, thyroid microsomal and pancreatic islet cell antibodies, immunoblot for detection of cytochrome P450 21-hydroxylase antibodies, and flow cytometry with fluorochrome marked monoclonal antibodies for peripheral blood lymphocytes phenotyping.

Results. In the younger Down syndrome patient group (age below 15 years) autoantibodies were detected in single cases. Patients 15 years of age or older had a significantly higher prevalence of

nuclear and reticulin antibodies than the controls ($P = 0.0001$ and $P < 0.0001$, respectively). Mitochondrial antibodies and antibodies to cytochrome P450 21-hydroxylase were not found in any of the 145 Down syndrome patients. Among cellular immunity characteristics, the most prominent difference was revealed in the amount of T lymphocytes with the memory (CD45RO+)

phenotype being much higher in Down syndrome patients compared to the controls ($P = 0.0005$).

Conclusion. Down syndrome patients may have several common autoantibodies among which some have significantly higher prevalence compared to age and sex matched controls. Down syndrome patients have more memory T lymphocytes in peripheral blood, which might be a sign of propensity to develop such autoantibodies.

raivo.uibo@ut.ee