

УДК 616.5-001.1-002-056.3:612.017.1:576.3:612.112.94

ОСОБЛИВОСТІ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОЇ ПРОДУКЦІЇ ІНТЕРФЕРОНУ-ГАММА ТА ІНТЕРЛЕЙКІНУ-4 Т-ЛІМФОЦИТАМИ-ХЕЛПЕРАМИ У ХВОРИХ НА АТОПІЧНИЙ ДЕРМАТИТ

П.В. Чернишов

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ

Ключові слова: псоріаз, atopічний дерматит, Т-лімфоцити-хелпери першого та другого типу.

Атопічний дерматит (АД) — захворювання з хронічним перебігом, спадковою схильністю, яке характеризується екзематозними та ліхеніфікованими висипаннями, аномаліями клітинного імунітету у шкірі з дизрегуляцією Т-клітинної ланки та гіперчутливістю до імунних та неімунних стимулів [1]. АД є одним з найпоширеніших хронічних захворювань в індустриальних країнах Заходу. Захворювання має хронічний рецидивуючий перебіг, негативно впливає на життя родини хворого і погіршує його якість життя [7]. За даними ВООЗ, на АД щорічно реєструється до 1 млн нових випадків захворювання [2].

Етіологія цього дерматозу досі невідома, але існують дані щодо ролі спадкових факторів та факторів навколишнього середовища у розвитку цього захворювання [12].

Зростання рівня захворюваності на АД та досить висока резистентність до загальноприйнятої терапії потребують детального вивчення його патогенезу [3].

Незважаючи на прогрес у розумінні імунологічних феноменів, пов'язаних з АД, патогенез цього захворювання залишається не з'ясованим [14]. Теза щодо провідної ролі активованих Т-лімфоцитів у розвитку імунного запалення при АД спонукала науковців ретельно дослідити їх функції та властивості. Так, було встановлено, що Т-лімфоцити-хелпери при atopічному дерматиті проявляють переважно властивості Т-лімфоцитів-хелперів другого типу (Th₂), тобто продукують властиві для цього типу імунної відповіді цитокіни.

На відміну від АД, псоріаз є хронічним запальним захворюванням з переважанням Th₁-типу імунної відповіді [15]. Інтерферон-гамма (ІФН-γ) — один з основних цитокінів, властивих для цього типу імунної відповіді, вважається важливим медіатором у цитокіновому каскаді при псоріазі [10]. ІФН-γ сприяє диференціюванню наївних Т-лімфоцитів-хелперів у Т-хелпери першого типу та пригнічує проліферацію Т-хелперів другого типу [4]. Запальні процеси сприяють міграції Т-хелперів першого типу, що продукують ІФН-γ, до шкіри. Ці Т-лімфоцити-хелпери відповідають за розвиток патологічного процесу у шкірі, що призводить до виникнення гіперпроліферації та інфільтрації [6]. Продукцію ІФН-γ переважно вивчали в сироватці крові та супернатантах, стимульованих мітогенами культур

Т-лімфоцитів, а місцево — за допомогою імуногістохімічних методів. У зв'язку з тим, що центральною клітиною-продуцентом ІФН-γ є Т-лімфоцит, актуальною є проблема вивчення продукції цього цитокіну безпосередньо у Т-лімфоцитах периферичної крові, тобто внутрішньоклітинно [11].

Інтерлейкін-4 (ІЛ-4) вважається одним з головних цитокінів, що визначають Th₂-тип імунної відповіді. Гіперпродукцію цього цитокіну зафіксовано як у ділянках висипань на шкірі, так і у периферичній крові хворих на АД [8]. Існують численні дослідження, в яких було встановлено підвищену експресію цитокінів, властивих Th₂-типу імунної відповіді, та знижену здатність продукувати ІФН-γ мононуклеарними клітинами периферичної крові у хворих на АД. Також повідомляється про знижену продукцію не тільки ІФН-γ, а й ІЛ-4 Т-лімфоцитами-хелперами периферичної крові у хворих на АД порівняно з нормою [5, 9].

Переважаання певного типу імунної відповіді не може повністю виключити можливості впливу іншого, тобто пригніченого, типу імунної відповіді у розвитку та підтриманні хвороби. Так, існують дані щодо участі властивих Th₁-типу імунної відповіді цитокінів у патогенезі АД. Тобто хоча АД розглядають як захворювання з переважанням Th₂-імунної відповіді, сучасні дослідження встановили, що цитокіни, властиві Th₁-типу імунної відповіді, насамперед ІФН-γ, відіграють важливу роль у патогенезі цього типу дерматозу, особливо за умови наявності хронічних висипань [13].

Усе наведене вище свідчить про важливість проведення порівняльного дослідження рівнів внутрішньоклітинної продукції цитокінів, властивих Th₁- та Th₂-типам імунної відповіді, Т-лімфоцитами-хелперами у хворих на АД з хронічними висипаннями, у нормі та при псоріазі.

Матеріали та методи дослідження

У дослідженні взяли участь 20 дорослих хворих на АД з хронічними висипаннями на шкірі та 24 дорослих хворих на псоріаз. Імунологічні показники визначали у всіх хворих та в 11 здорових донорів, які ввійшли до групи контролю.

Для визначення внутрішньоклітинної продукції ІФН-γ та ІЛ-4 використовували триколіоровий реа-

гент, який виявляє ці цитокіни у CD4 Т-лімфоцитах (Intracellular Cytokine Detection Kit FastImmune IFN-gamma FITC/IL-4 PE, Becton Dickinson, США). Визначення субпопуляцій та маркерів проводили за допомогою триколіорової цитофлюорометрії (FACScan, Becton Dickinson) відповідно до протоколу Becton Dickinson. Активацію лімфоцитів за допомогою РМА (форбол 12-мірістат 13-ацетат) та йономіцину виконували у присутності брэфелдіну А, який пригнічує внутрішньоклітинний транспорт, а отже, антигени та цитокіни, вироблені під час активації, залишаються всередині клітини, що дає змогу після їх внутрішньоклітинного нагромадження визначати цитокіни за допомогою лазерної флоуцитометрії. Кров пацієнта з активованими лімфоцитами обробляли лізуючим розчином, а потім — пермеабілізуючим (обидва розчини Becton Dickinson) для того, щоб моноклональні антитіла і флуорохроми могли проникнути крізь мембрани клітин. 10 хвилин витримували у темряві. Відсоток відмивання обробляли моноклональними антитілами, до яких приєднані флуорохроми (FITC, PE, PerCP). Відсоток позитивних за ІФН- γ та ІЛ-4 CD4+ Т-лімфоцитів визначали за допомогою триколіорової флоуцитометрії.

Для оцінки вірогідності різниці показників хворих на псоріаз, пацієнтів з АД та групи контролю застосовували непарний t-тест з поправками Велча.

Результати та їхнє обговорення

При визначенні рівнів внутрішньоклітинної продукції цитокінів Т-лімфоцитами-хелперами периферичної крові середній рівень ІФН- γ у хворих на АД дорівнював ($25,01 \pm 1,87$) %, у хворих на псоріаз — ($51,61 \pm 4,05$) %, а у групі контролю — ($25,09 \pm 1,96$) %. Середні рівні внутрішньоклітинної продукції ІЛ-4 Т-лімфоцитами-хелперами периферичної крові становили ($2,77 \pm 0,22$) % у хворих на АД та ($1,69 \pm 0,18$)% — у групі контролю.

Таким чином, рівні внутрішньоклітинної продукції ІФН- γ у досліджених нами хворих на АД з хронічними висипаннями виявилися вірогідно нижчими за такі у хворих на псоріаз ($P < 0,001$) і статистично не відрізнялися від показників групи контролю (рис. 1). Внутрішньоклітинна продукція ІФН- γ у хворих на псоріаз була вірогідно вищою за показники групи контролю ($P < 0,001$). Рівні внутрішньоклітинної продукції ІЛ-4 у хворих на АД були вірогідно вищими, ніж у групі контролю ($P < 0,01$) (рис. 2).

Отже, незважаючи на переважання Th₂-типу імунної відповіді при АД, продукція ІФН- γ у дорослих хворих з хронічними висипаннями виявилася не нижчою, ніж у нормі. Це особливо важливо, оскільки існують літературні дані щодо пригнічення ІФН- γ -залежної проліферації Т-лімфоцитів другого типу у хворих на АД [4]. Ймовірно, зазначене явище пояснюється певним балансом різноспрямованих впливів різних цитокінів. Про це свідчать і вірогідно вищі рівні внутрішньоклітинної продукції ІЛ-4 в обстежених нами хворих на АД. Однак цей баланс не є сталим, а він може змінюватися залежно від дії різноманітних чинників, інтенсивності та тривалості патологічного процесу. Отримані нами дані дають

змогу чіткіше уявити вплив Th₁-типу імунної відповіді при такому захворюванні з переважанням Th₂-типу імунної відповіді, як АД. Повідомлення щодо участі Th₁-тип імунної відповіді у розвитку АД, особливо за наявності у хворих хронічних висипань [13], не спростовують дані щодо переважання Th₂-типу імунної відповіді, а лише розширюють наші знання і розуміння імунологічних механізмів цього дерматозу. При загальному переважанні процесів, властивих Th₂-типу імунної відповіді, зокрема гіперпродукції ІЛ-4, певну роль у розвитку АД відіграють процеси, пов'язані з Th₁-типом імунної відповіді, вплив якого, ймовірно, посилюється за умови наявності у хворих хронічних висипань за рахунок насамперед підвищення продукції ІФН- γ . Крім того, не можна забувати про більш лабільні механізми на локальному рівні, де динаміка імунопатологічного процесу може відбуватися швидше, а зміни показників будуть помітнішими.

У нашому дослідженні рівні внутрішньоклітинної продукції ІФН- γ Т-лімфоцитами-хелперами у хворих на АД виявилися найвищими саме у хворих з наявністю хронічних висипань.

У групі контролю і у хворих на АД значно більша кількість Т-лімфоцитів-хелперів здатні продукувати ІФН- γ , ніж ІЛ-4 (для обох груп $P < 0,001$). Наведе-

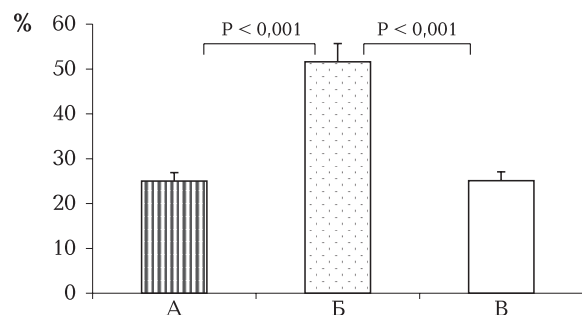


Рис. 1. Рівні внутрішньоклітинної продукції ІФН- γ Т-лімфоцитами-хелперами у хворих на атопічний дерматит (А), на псоріаз (Б) та у групі контролю (Б)

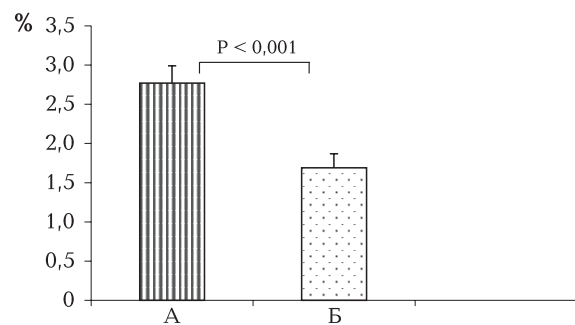


Рис. 2. Рівні внутрішньоклітинної продукції ІЛ-4 Т-лімфоцитами-хелперами у хворих на атопічний дерматит (А) та у групі контролю (Б)

ний факт свідчить про переважання біологічних процесів за участю ІФН- γ як у нормі, так і при патології. Зазначене превалювання, ймовірно, можливо екстраполювати і на загальний баланс Th_1 - та Th_2 -типів імунної відповіді в організмі людини.

Висновки

Вірогідне підвищення рівнів внутрішньоклітинної продукції ІФН- γ Т-лімфоцитами-хелперами у хворих на псоріаз порівняно з групою контролю та хворими на АД є доказом переважання Th_1 -типу імунної відповіді при цьому типі дерматозу та важливого значення ІФН- γ для розвитку псоріазу.

Підвищена внутрішньоклітинна продукція ІЛ-4 у хворих на АД із хронічними висипаннями порівняно з групою контролю за відсутності відмінності між ними щодо продукції ІФН- γ свідчить про переважання Th_2 -типу імунної відповіді при АД, навіть у хворих з такими проявами, що характеризуються відносним підсиленням впливу Th_1 -типу імунної відповіді.

У групі контролю і у хворих на АД значно більша кількість Т-лімфоцитів-хелперів має здатність до продукції ІФН- γ , ніж до продукції ІЛ-4, що свідчить про переважання в організмі людини біологічних процесів за участю ІФН- γ як у нормі, так певною мірою при АД.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Калужная Л.Д. Атопический дерматит. Современные вопросы диагностики и лечения // Клінічна імунологія, алергологія, інфектологія.— 2006.— № 1.— С. 19—22.
2. Рыжко П.П., Сафонова Я.Н., Рощенко А.В. Рациональность применения нового нестероидного крема «Элидел» в лечении атопического дерматита // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол.— 2005.— № 1.— С. 46—49.
3. Степаненко В.І, Іщейкін К.Є., Рыжко П.П., Кайдашев І.П. Імуносупресивна терапія при атопічному дерматиті // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол.— 2005.— № 1.— С. 19—22.
4. Abbas A.K., Lichtman A.H. Cellular and molecular immunology.— Philadelphia: Saunders, 2003.— 269 p.
5. Aleksza M., Lukacs A., Antal-Szalmas P. et al. Increased frequency of intracellular interleukin (IL)-13 and IL-10, but not IL-4, expressing CD4+ and CD8+ peripheral T cells of patients with atopic dermatitis // Br. J. Dermatol.— 2002.— Vol. 147.— P. 1135—1341.
6. Ghoreschi K., Mrowietz U., Rocken M. A molecule solves psoriasis? Systemic therapies for psoriasis inducing interleukin 4 and Th2 responses // J. Mol. Med.— 2003.— Vol. 81.— P. 471—480.
7. Holm E.A., Esmann S., Jemec G.B.E. The handicap caused by atopic dermatitis — sick leave and job avoidance // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.— 2006.— Vol. 20.— P. 255—259.
8. Jung T., Moessner R., Neumann C. Naive CD4+ T cells from patients with atopic dermatitis show an aberrant maturation towards IL-4-producing skin-homing CLA+ cell // Exp. Dermatol.— 2003.— Vol. 12.— P. 555—562.
9. Kallstrom E., Roscher I., Andreasson A. et al. Decreased frequency of intracellular IFN-gamma producing T cells in whole blood preparations from patients with atopic dermatitis // Exp. Dermatol.— 2002.— Vol. 11.— P. 556—563.
10. Koga T., Duan H., Urabe K. et al. In situ localization of IFN-gamma-positive cells in psoriatic lesional epidermis // Eur. J. Dermatol.— 2002.— Vol. 12.— P. 20—23.
11. Maino V.C., Picker L.J. Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression // Cytometry.— 1998.— Vol. 34.— P. 207—215.
12. Sebok B., Schneider I. et al. Familial and environmental factors influencing atopic dermatitis in the childhood // J. Eur. Acad. Dermatol. and Venereol.— 2006.— Vol. 20.— P. 418—422.
13. Shimada Y., Takehara K., Sato S. Both Th2 and Th1 chemokines (TARC/CCL17, MDC/CCL22, and Mig/CXCL9) are elevated in sera from patients with atopic dermatitis // J. Dermatol. Sci.— 2004.— Vol. 34.— P. 201—208.
14. Simon D., Braathen L.R., Simon H.U. Eosinophils and atopic dermatitis // Allergy.— 2004.— Vol. 59.— P. 561—570.
15. Vestergaard C., Deleuran M., Gesser B., Gronhoj Larsen C. Expression of the T-helper 2-specific chemokine receptor CCR4 on CCR10-positive lymphocytes in atopic dermatitis skin but not in psoriasis skin // Br. J. Dermatol.— 2003.— Vol. 149.— P. 457—463.

ОСОБЕННОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА И ИНТЕРЛЕЙКИНА-4 Т-ЛИМФОЦИТАМИ-ХЕЛПЕРАМИ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

П.В. Чернышов

Внутриклеточную продукцию интерферона-гамма и интерлейкина-4 Т-лимфоцитами-хелперами периферической крови определяли у 20 больных атопическим дерматитом, 24 больных псориазом, а также у 11 здоровых доноров, которые составили группу контроля. Уровни внутриклеточной продукции интерферона-гамма Т-лимфоцитами-хелперами у больных атопическим дерматитом с хроническими высыпаниями оказались достоверно сниженными в сравнении с таковыми у больных псориазом ($P < 0,001$), но не отличались от показателей группы контроля. Уровни внутриклеточной продукции интерлейкина-4 Т-лимфоцитами-хелперами у больных атопическим дерматитом были достоверно выше, чем в группе контроля ($P < 0,01$). Данные нашего исследования подтвердили преобладание Th_1 -типа иммунного ответа при псориазе по сравнению с атопическим дерматитом, даже при условии наличия хронических высыпаний, и Th_2 -типа иммунного ответа — при атопическом дерматите по сравнению с нормой.

PECULIARITIES OF THE INTRACELLULAR PRODUCTION OF IFN-GAMMA AND IL-4 BY HELPER T CELLS IN ATOPIC DERMATITIS PATIENTS**P.V. Chernyshov**

Intracellular production of IFN-gamma and IL-4 by helper T cells was investigated in twenty atopic dermatitis (AD) patients with chronic lesions, twenty four psoriatic patients and eleven healthy controls were studied. Our data showed that intracellular production of IFN-gamma by peripheral CD4+ cells was lower in AD patients even with chronic lesions in comparison with psoriatic patients ($P < 0.001$) but were not differ from controls. Levels of intracellular IL-4 in AD patients were significantly higher than in healthy controls ($P < 0.01$). Despite the important role of both Th₂ and Th₁ immune responses in AD chronic lesions and Th₁ in psoriatic lesions, we have confirmed prevalence of systemic Th₁ immune response in adult psoriatic patients in comparison with adult AD patients with chronic lesions and prevalence of Th₂ response in AD patients in comparison with healthy controls.