

УДК 616-056,3:616.5-053.2

**ЕКСПРЕСІЯ CLA-АНТИГЕНУ МОНОНУКЛЕАРНИМИ КЛІТИНАМИ
У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ ФОРМИ АТОПІЧНОГО ДЕРМАТИТУ***КУРЧЕНКО А.І.*

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Атопічний дерматит (АД) є поширеним запальним захворюванням шкіри алергічного характеру. Захворювання характеризується рецидивуючими екзематозними пошкодженнями шкіри, що мають типову локалізацію. Прояви алергічного запалення в шкірі умовно поділяють на дві стадії: гостру і хронічну. Гостра стадія характеризується інтенсивним свербінням, еритематозними папульозними висипаннями, що супроводжуються розчісуваннями, ерозіями і серозним ексудатом. Для хронічної стадії характерні гіперкератоз, ліхеніфікація і фіброзні папули.

Передбачається, що патогенетичні механізми захворювання пов'язані з особливостями розладів імунної реакції організму, в основі якої лежить генетичний фактор. При АД гістологічна картина запалення в шкірі проявляється формуванням клітинних інфільтратів, що складаються в основному з активованих Т-лімфоцитів хелперної субпопуляції (CD4+-клітини). Гостре запалення характеризується продукцією в зоні запалення проалергічних цитокінів (IL-4, IL-5, IL-13) [2, 3] і малою продукцією IFN- γ , TNF- α , що вказує на переважну роль в гострому запаленні хелперних Т-лімфоцитів другого типу (Th2). При стимуляції лімфоцитів, виділених з периферичної крові хворих на АД, в умовах *in vitro*, виявлено активну продукцію цими клітинами IL-4, що вказує на їх схильність до вироблення цитокінів Th2 типу ще до того як вони мігрують у шкіру. Потрапляючи в шкіру такі лімфоцити стимулюються тканинним мікрооточенням до підвищення рівня локальної продукції Th2-цитокінів. Таким стимулюючим ефектом проявляють себе алергени, бактеріальні суперантигени і епідермальні аутоантигени. Важливою ланкою у розвитку запалення при АД є міграція клітин запалення в шкіру. Т лімфоцити, мігруючи з крові в шкіру, експресують на своїй поверхні своєрідну органоспецифічну адгезивну молекулу CLA (cutaneous-lymphocyte-associated antigen). Цією молекулою (homing-рецептор) визначається шкірний тропізм клітини [4]. У процесі циркуляції, в субепідермальній венулах запаленої шкіри відбувається взаємодія CLA молекули Т-лімфоцитів з молекулами Е-селектину, що експресується ендотеліальними клітинами. Цей процес завершується екстравазацією і подальшою міграцією в зону запалення Т-лімфоцитів [5]. У крові хворих на АД має місце підвищення кількості Т-лімфоцитів, що експресують на своїй

поверхні CLA (10 - 15%). Ці лімфоцити являють собою хелперну (CD4+) популяцію [6, 7] з фенотипом клітин пам'яті і ефекторних клітин [2]. Трансформація гострого запалення в хронічну форму характеризується зміною профілю цитокінів, що продукуються клітинами інфільтрату в запаленій шкірі, де домінує рівень продукції IL-4 [8].

При хронічній формі АД продукція IFN- γ і Th1 типів цитокінів характерна не тільки для хелперних лімфоцитів, але й для CD8+-лімфоцитів [15]. Можна припустити, що при еволюції гострої форми АД в хронічну відбувається зміна міграційних властивостей лімфоцитів не тільки в хелперній (CD4+), але і в цитотоксичній (CD8+) популяції. Збільшення в крові чисельності CLA+ CD8+ клітин та їх подальше накопичення в шкірі, може призвести до зміни балансу продукції цитокінів в зоні запалення і до зміни якості запалення шкіри.

Це дає підставу для подальшого дослідження кількісних змін чисельності циркулюючих CLA+Т лімфоцитів CD4+ і CD8+ субпопуляцій у хворих на хронічну форму атопічного дерматиту.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

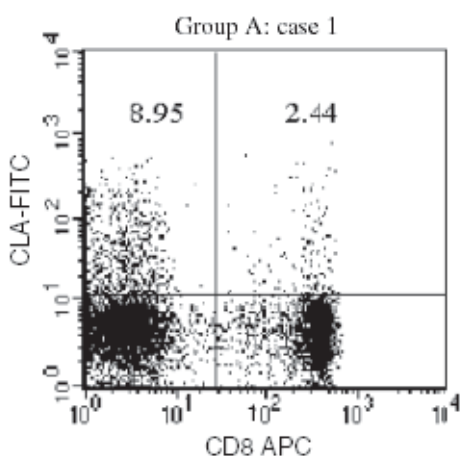
Досліджена група хворих на хронічну форму АД загальною кількістю 35 осіб вікової групи більше 25 років. Діагностика АД ґрунтувалася на критеріях, запропонованих Hanifin і Rajka [9]. У всіх хворих відзначено позитивний тест до різного виду алергенів. Контрольну групу склали здорові особи. Оцінку імунного статусу хворих здійснювали за допомогою імунологічного моніторингу методом імунофенотипування з ідентифікацією популяційного і субпопуляційного складу мононуклеарів крові відповідним набором моноклональних антитіл (МКАт) (CD3, CD4, CD8, CLA). Не пізніше 6-ти годин після взяття крові з ліктьової вени клітини фарбували відповідними типами МКАт, що входять в набір Simultest IMK PLUS (Becton Dickinson, USA) і специфічними МКАт до поверхневих CD антигенів лімфоцитів (CD - cluster differentiation). До 20 мкл відповідних МКАт, кон'югованих з флуоресцеїнізотіоціонатом (FITC) і фікоеритрином (PE) додавали 100 мкл цільної гепаринизованої крові хворих, змішували на вихровому змішувачі "Vortex" і інкубували 15-30 хвилин при кімнатній температурі (18-22 ° C). Потім до зразків додавали по 2 мл лізуючого еритроцити розчину (Reagent-

10 Lising Solution (Becton Dickinson)) у співвідношенні 1:10 з дистильованою водою і інкубували 10-12 хвилин при кімнатній температурі. Лімфоцити периферичної крові осаджали центрифугуванням при 300g протягом 5 хвилин після одноразового відмивання забуференим фосфатам фізіологічним розчином (PBS); пофарбовані лімфоцити фіксували 1% параформальдегідом на PBS і аналізували на проточному цитофлуориметрі Becton Dickinson (USA) не пізніше 24 годин після фарбування.

ОТРИМАНІ РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати нашого дослідження показують, що в крові хворих на хронічну форму АД кількість лімфоцитів хелперної (CD4+) субпопуляції, що експресують адгезивну молекулу CLA+, була значно вище (CLA+ CD4+ 29,34%), ніж кількість CLA+клітин у контрольній групі (11,52%) (рис. № 1).

Хворий на хронічну форму АД №1



Здоровий донор

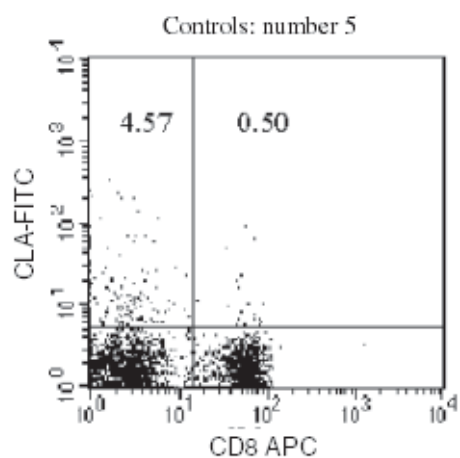


Рис. 1. Проточна цитофлуориметрія. Експресія молекули CLA на CD4+ і CD8+ лімфоцитах у хворого на хронічну форму АД та у здорового донора.

Зазначені зміни вказують на те, що в умовах хронічного запалення значна частина лімфоцитів хелперної популяції має схильність до міграції в шкіру, що збігається з даними попередніх досліджень [8]. Ці результати також підкріплюють припущення, що в умовах АД функціонує імунологічний механізм, при посередництві якого здійснюється виборче програмування CD4+ Т-лімфоцитів на міграцію в шкіру, що проявляється в експресії клітинами CLA молекули.

Більше того, згідно з даними [6] цією властивістю наділяються Т-лімфоцити хелперні популяції другого типу (Th2), які налаштовані на продукцію як проалергічних цитокінів (IL-4, IL-5, IL-13), так і виявляють TNF-α специфічну реактивність на певний алерген. Механізми, що визначають перетворення “наївних” CD4+ Т-клітин в Th2 лімфоцити до теперішнього часу залишаються нез’ясованими. Передбачається [10, 11], що дендритні клітини (ДК) шкіри, мігруючи із зони запалення в лімфатичний вузол, сприяють виборчій поляризації “наївних” CD4+ Т-клітин в Th2 лімфоцити. Такі властивості ДК набувають після взаємодії в зоні запалення з кератиноцитами, які виділяють специфічний цитокін - тимічний стромальний лімфопоетин (TSLP - thymic stromal lymphopoietin). У людини, в умовах *in vitro* TSLP активує CD11c+ дендритні клітини (ДК) і стимулює їх до вироблення хемокінів, що залучають Th2 лімфоцити. Більш того, встановлено, що “наївні” CD4+ Т-клітини під впливом стимульованих TSLP ДК, проліферують і диференціюються у Th2 лімфоцити з цитокінів відповідною потенцією до продукції IL-4, IL-5, IL-13 і TNF-α (10). Тим часом кератиноцити в умовах гострого і хронічного запалення при АД інтенсивно експресують TSLP [10]. Існує припущення, що TSLP відіграє важливу роль у становленні запалення в шкірі при АД, оскільки трансгенні миші, експресуючі епідермальний TSLP трансген мають клінічні, гістологічні, клітинні та біохімічні характеристики АД людини [10,11]. При хронічній формі АД не спостерігається програмування міграційної спрямованості в CD8+ популяції Т лімфоцитів. Дійсно, за результатами нашого дослідження, в умовах хронічного запалення шкіри, в периферичній крові хворих на АД не відзначено підвищення вмісту CLA+ CD8+ лімфоцитів (АД – 5.31%; контрольна група – 4.42%).

З аналізу отриманих результатів випливає, що еволюція гострого запалення шкіри в хронічну форму в умовах АД не визначається CD8+ Т лімфоцитами. Можна припустити, що існують різні, незалежні механізми регуляції експресії CLA адгезивної молекули як у хелперної (CD4+), так і, окремо, в CD8+ популяціях. Це підтверджує висновок про те, що при хронічній

формі АД має місце вибіркоче програмування CD4 + лімфоцитів на міграцію в шкіру. Потрібно відзначити, що до теперішнього часу залишається не відомим, що ж визначає появу при АД Т-лімфоцитів зі здатністю експресувати CLA антигени. Існують дві моделі. Згідно з першою поява в клітинах молекул, що визначають їх тропізм, є процес випадковий, пов'язаний з генерацією в умовах становлення імунної відповіді популяції клітини якої йдуть з кровотоку в специфічний орган [12, 13]. Згідно з другою - молекула (CLA), якою визначається шкірний тропізм (homing) Т-лімфоцитів, привноситься в клітини в початковій фазі антигенної активації, при взаємодії з антигенпрезентуючою клітиною. Останнім часом з'являються дані експериментальних досліджень, що більше підкріплюють другу модель [11, 14]. Передбачається, що дендритні клітини, мігруючи зі шкіри в лімфатичний вузол, не тільки відіграють вирішальну роль в поляризації "наївних" CD4+ Т-клітин в Th2 лімфоцити, а й визначають їх шкірний тропізм в умовах АД.

ВИСНОВКИ

Для хронічної форми АД характерне підвищення в CD4+ Т лимфоцитарній популяції крові чисельності CLA+ клітин з вираженою міграційною спрямованістю у шкіру і не відзначено змін в чисельності CLA+ клітин в CD8 + Т лімфоцитарній субпопуляції. Міграція і накопичення ефektorних CD4+ Т клітин в запаленій шкірі при хронічній формі АД підтримується активною продукцією специфічних CD4+ Т клітин, що несуть молекулу шкірного тропізму (CLA).

ЛІТЕРАТУРА

1. Eichenfield L.F., Hanifin J.M., Luger T.A., et al. Consensus conference of pediatric atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2003. V.49, p.1088-1095
2. Wollenberg A., Bieber T. Atopic dermatitis: from the genes to skin lesions. *Allergy.* 2000, v.55, p/205-213.
3. Renz H., Jujo K., Bradley K.L. Enhanced IL-1 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon-gamma. *J. Invest. Dermatol.* 1992, v.99, p.403-408.
4. Fuhlbrigge R.C., Kieffer J.D., Armerding D., Kupper T.S. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature* 1997; v.389, 978-981.
5. Santamaria Babi L., Picker L.J., Perez Soler M.T. et al. Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J. Exp. Med.* 1995, v. 181, p. 1935-1940.
6. Teraki Y., Hotta T., Shiohara T. Increased circulating skin-homing cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA)+ type 2 cytokine-producing cells, and decreased CLA+ type 1 cytokine-producing cells in atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 2000. v.143, p. 373 – 378.
7. Dworzak M.N., Froschl G., Printz D et al. Skin-associated lymphocytes in peripheral blood of patients with atopic dermatitis: signs of subset expansion and stimulation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999. V.103, p. 901-906.
8. Antunez C., Torres M.J., Mayorga C., et al. Different cytokine production and activation marker profiles in circulating cutaneous-lymphocyte-associated antigen T cells from patients with acute or chronic atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy.* 2004. V.34, p.559-566.
9. Hanifin J.M., Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm. Veneriol. (Stockh.) Suppl.* 1980, v.92, p.44-47.
10. Soumelis V., Reche P.A., Kanzler H., et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat. Immunol.* 2002. V.3, p.673-680.
11. Yoo J., Omori M., Gyarmati D., et al. Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J. Exp. Med.* 2005. V.202, p.541-549.
12. Davenport M.P., Grimm M.C., Lloyd A.R. A homing selection hypothesis for T-cell trafficking. *Immunology Today.* 2000, v.21, p.315 – 317.
13. Campbell D.J., Butcher E.C. Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4 (+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J. Exp. Med.* 2002, v.195, p. 135 – 141.
14. Weninger W., Manjunath N., Andrian U. Migration and differentiation of CD8+ T cells. *Immunological Reviews.* 2002, v.186, p.221-223.
15. De Panfilis G. CD8+ cytolytic T lymphocytes and the skin. *Exp. Dermatol.* 1998. V.7, p.121-131.

РЕЗЮМЕ

**ЭКСПРЕССИЯ CLA-АНТИГЕНА
МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ У БОЛЬНЫХ
ХРОНИЧЕСКОЙ ФОРМОЙ АТОПИЧЕСКОГО
ДЕРМАТИТА**

Курченко А.И.

*Национальный медицинский университет
имени А.А. Богомольца*

Острое воспаление при атопическом дерматите (АД) подкрепляется направленной миграцией в кожу CD4+ Т лимфоцитов, имеющих на своей поверхности адгезивную молекулу кожного тропизма (CLA). Цель исследования явилось изучение особенностей миграционных свойств как CD4+, так и CD8+ Т лимфоцитов в условиях хронической формы АД. Иммунофлуоресцентным методом на проточном цитофлуориметре определяли численные соотношения CD4+ и CD8+ Т лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих адгезивную молекулу кожного тропизма - CLA. Относительно показателей здоровых лиц выявлено увеличение численности CLA+ клеток в CD4+ Т лимфоцитарной популяции и не отмечено изменений в численности CLA+ клеток в CD8+ Т лимфоцитарной популяции. Эволюция острой формы АД

в хроническую не связана с изменением миграционных свойств в циркулирующей популяции CD8+ Т клеток.

SUMMARY

**CLA-ANTIGEN EXPRESSION INSIDE OF THE T
LYMPHOCYTES POPULATION OF PERIPHERAL
BLOOD IN CHRONIC ATOPIC DERMATITIS**

Kurchenko A.I.

O.O. Bogomolec National Medical University

Accute inflammation in atopic dermatitis (AD) is supported with the influx from blood into skin of the CD4+ T lymphocytes that expressed on their surface a molecule for skin tropism (CLA). We investigated migration properties of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in chronic form of AD. Using immunofluorescence method and flow cytometry technics the quantitative relation of CLA+ CD4+ and CLA+ CD8+ T lymphocytes of pripheral blood were estimated. In chronic form of AD the rise in numbers of CLA+ CD4+ T lymphocytes were found without any quantitative changes in CLA+ CD8+ T lymphocytes subpopulation. Evolution of the accute AD in the chronicAD is not connected with changes in the skin tropism of CD8+ cells of peripheral blood.