

УДК 615.5-002-056.3:612.017.1

**ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ МОНОНУКЛЕАРНИХ КЛІТИН IN VITRO У ХВОРИХ НА АТОПІЧНИЙ ДЕРМАТИТ ЗА ПРОДУКЦІЄЮ ЦИТОКІНІВ (IL-10 І TGF- $\beta$ ) У ГОСТРОМУ І ХРОНІЧНОМУ ПЕРІОДІ ЗАХВОРЮВАННЯ**

КУРЧЕНКО А.І.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Нові наукові знання, що з'явилися, дозволяють припускати, що формування певного типу імунологічної відповіді в організмі залежить від здатності CD4+ Т-лімфоцитів-хелперів у різних умовах продукувати різні цитокіни. У зв'язку з цим важливого значення набуває вивчення функціональної активності двох типів Т-лімфоцитів-хелперів, здатних продукувати різні цитокіни [1]. Як стало відомо Т-хелпери I типу (Th1) секретують IL-2, IFN- $\gamma$  і TNF- $\alpha$  і сприяють в основному розвитку клітинної імунної відповіді. Т-хелпери II типу (Th2) продукують IL-4, IL-5, IL-6 і IL-13, які впливають на формування гуморальної імунної відповіді [2].

Останнім часом з'явилися повідомлення про існування популяції так званих Т-регуляторних клітин (Th3/Treg1), здатних продукувати IL-10 і TGF- $\beta$  [3]. З огляду на протиріччя в поглядах дослідників щодо визначення даної популяції лімфоцитів ми у своїх дослідженнях дотримувалися думки, що клітини, здатні продукувати IL-10 і TGF- $\beta$ , відносяться до Treg-лімфоцитів.

Необхідно відзначити, що комплексних досліджень функціональної активності імунокомпетентних клітин периферичної крові у хворих АД по їхній здатності продукувати різні цитокіни *in vitro* у доступній літературі виявилось не достатньо. Також відсутні дані про дослідження особливостей функціональної активності *in vitro* клітин імунної системи при IgE-залежній і IgE-незалежній формі АД.

Мета дослідження полягала в уточненні імунопатогенезу різних форм АД та пошуку додаткових диференційних критеріїв, що дозволять розмежувати IgE-залежну і IgE-незалежну форму захворювання, які базуються на особливостях функціональної активності клітин імунної системи периферичної крові зв'язаною із продукцією цитокінів.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ**

Визначення спонтанної та індукованої продукції цитокінів мононуклеарами периферичної крові *in vitro*.

Для вивчення здатності продукувати цитокіни ми одержували супернатанти відповідно до запропонованої методики. Виділені на стандартному градієнті фікол-верографіну (1,076-1,078) мононуклеарні клітини перифе-

ричної крові відмивали тричі в середовищі RPMI-1640, що містило 10% ембріональної телячої сироватки, 40 мкг/мл гентаміцину, 5x10 M2-меркаптоетанолу і 3% L-глутаміну. Клітинну суспензію в концентрації 1,5x10 кл/мл інкубували 24 години в CO<sub>2</sub>-інкубаторі при 37°C без стимулюючого агента та у присутності фітогемаглютиніну (50 мкг/мл). Після закінчення терміну інкубації клітини осаджували центрифугуванням при 1600 об/хв. протягом 10 хвилин, збирали супернатанти і зберігали до тестування при -20°C. Вміст цитокінів у супернатантах визначали за допомогою імуноферментного методу, згідно методики запропонованої виробником.

Для визначення цитокін-продукуючої здатності мононуклеари крові після виділення на стандартному градієнті щільності фікол-верографіну тричі відмивали в середовищі RPMI-1640, що містить 10% ембріональної телячої сироватки, 400 мкг/мл гентаміцину, 5x10-5 M2-меркаптоетанолу і 2 мл 3% L-глутаміну. Для одержання супернатантів зі спонтанною продукцією цитокінів мононуклеари в кількості 1,5x10<sup>6</sup> кл/мл інкубували протягом 24 годин у CO<sub>2</sub>-інкубаторі при 37°C. Для оцінки стимульованої продукції цитокінів клітини інкубували разом з відомими мітогенами, такими як протидіозан, фітогемагглютинін (ФГА) і конканавалін-А (Кон-А).

Для визначення змісту цитокінів у супернатантах в 96-лункові планшети додавали по 100 мкл «нульової дози» і стандартів M4 для побудови стандартної кривої. В інші лунки вносили по 50 мкл досліджуваного супернатанта з 50 мкл розчинника. До всіх лунок додавали по 25 мкл розчину поліклональних антитіл проти досліджуваних цитокінів.

Планшети інкубували при кімнатній температурі протягом 3 годин, лунки 5 разів ретельно промивали буфером і видаляли залишки. У кожну лунку вносили по 50 мкл кон'югату антитіл з лужною фосфатазою і інкубували при кімнатній температурі протягом 45 хвилин. Після повторного промивання планшетів в лунки вносили по 200 мкл кольороутворюючого агента для оцінки реакції. Після інкубації протягом 18 хвилин визначали оптичну щільність стандартів і зразків супернатантів при довжині хвилі 492 нанометра.

Для визначення IL-10 та TGF- $\beta$  використовували тест-системи фірм "Immunotech" і "Diaclone" (Франція).

Для достовірної оцінки результатів калібрувальна стандартна крива при побудові повинна бути лінійною і указувати на прямо пропорційний характер між рівнем концентрації цитокінів у супернатанті і оптичною щільністю. Отримані результати обчислювали шляхом їхньої інтер-

поляції з отриманої кривої. Границі нормальних значень зазначених параметрів були отримані на підставі результатів дослідження 35 здорових донорів відповідного віку.

Результати досліджень спонтанної та індукованої продукції мононуклеарними клітинами крові IL-10 у здорових і хворих з IgE-залежною і IgE-незалежною формами АД в гострому періоді захворювання представлені в табл. 1.

Таблиця 1

**Рівень спонтанної та індукованої продукції IL-10 in vitro мононуклеарними клітинами крові у хворих IgE-залежною і IgE-незалежною формою АД в гострому періоді захворювання (pg/ml)**

Форма АД	Продукція IL-10 мононуклеарними клітинами крові in vitro (pg/ml)	
	Спонтанна продукція	Індукована продукція
IgE-залежна (n=32)	175,4 $\pm$ 11,5*	687,3 $\pm$ 14,2*
IgE-незалежна (n=30)	125,4 $\pm$ 12,8*	487,5 $\pm$ 13,2*
Контрольна група (n=30)	137,4 $\pm$ 13,8	613,3 $\pm$ 14,8

Примітка:\* - достовірна відмінність щодо показників у здорових донорів (p < 0,05)

Як показано в табл. 1. у нормі спонтанна продукція IL-10 у середньому склала 137,4 $\pm$ 13,8 pg/ml. Активація мононуклеарів, виділених із крові здорових донорів мітогеном, приводила до підвищення індукованої продукції IL-10, рівень якого в середньому становив 613,3 $\pm$ 14,8 pg/ml.

Середній показник спонтанної продукції IL-10 у хворих IgE-залежною і IgE-незалежною формами АД в період загострення захворювання становив (175,4 $\pm$ 11,5 pg/ml) і (125,4 $\pm$ 12,8 pg/ml) відповідно (контроль 137,4 $\pm$ 13,8 пкг/л) (p<0,05).

При зіставленні отриманих результатів концентрація індукованої продукції IL-10 у супернатантах хворих IgE-залежною формою АД в гострому періоді становила 687,3 $\pm$ 14,2 pg/ml, що перевищувало показники в контрольній групі (613,3 $\pm$ 14,8 pg/ml) (p<0,05) і аналогічні показники у хворих IgE-незалежною формою АД (487,5 $\pm$ 13,2 pg/ml).

Результати спонтанної та індукованої продукції IL-10 у хворих з IgE-залежною і IgE-незалежною формами АД в хронічному періоді захворювання представлені в табл. 2.

Таблиця 2

**Рівень спонтанної та індукованої продукції IL-10 in vitro мононуклеарними клітинами крові у хворих IgE-залежною і IgE-незалежною формою АД в хронічному періоді захворювання (pg/ml).**

Форма АД	Продукція IL-10 мононуклеарними клітинами крові in vitro (pg/ml)	
	Спонтанна продукція	Індукована продукція
IgE-залежна (n=33)	158,6 $\pm$ 13,1	689,5 $\pm$ 18,8*
IgE-незалежна (n=32)	165,3 $\pm$ 15,5*	808,6 $\pm$ 17,2*
Контрольна група (n=30)	137,4 $\pm$ 13,8	613,3 $\pm$ 14,8

Примітка:\* - достовірна відмінність щодо показників у здорових донорів (p < 0,05)

Як показано в табл. 2., при аналізі рівня спонтанної продукції IL-10 у групах хворих з IgE-залежною і IgE-незалежною формою АД в хронічному періоді захворювання достовірно збіль-

шення показників спонтанної продукції цитокіна до 165,3 $\pm$ 15,5 pg/ml спостерігалось тільки у хворих IgE-незалежною формою захворювання (контроль 137,4 $\pm$ 13,8 pg/ml) (p<0,05).

Деякі розходження в групах хворих з IgE-залежною і IgE-незалежною формою АД в хронічному періоді захворювання були виявлені і при зіставленні показників індукованої продукції клітинами IL-10.

З наведених даних виходить, що найбільший рівень індукованої продукції IL-10 спостерігався в групі хворих з IgE-незалежною формою АД в хронічному періоді захворювання і склав  $808,6 \pm 17,2$  pg/ml у порівнянні з контролем ( $613,3 \pm 14,8$  pg/ml) ( $p < 0,05$ ) і рівнем індукованої продукції цитокіну клітинами ( $689,5 \pm 18,8$  pg/ml) у групі у хворих з IgE-залежною формою АД.

Деякі дослідники відзначають, що в умовах хронічного алергічного запалення виявляються Т-клітини, для яких характерна відносно висока продукція TGF- $\beta$ . Передбачається, що ці клітини є регуляторними лімфоцитами (Treg) типу, для яких характерні ці властивості. Можливо, саме

активація цих клітин, продукуючих TGF- $\beta$ , викликає перемикання патологічного процесу з Th2 на Th1 тип імунної відповіді. Можна припустити, що таке перемикання супроводжується зміною напруженості і активності запалення, супроводжується хронізацією алергічного запалення, склерозуванням і ліхеніфікацією шкіри в умовах АД.

У цьому зв'язку метою нашого дослідження було проведення вивчення продукції TGF- $\beta$  мононуклеарними клітинами периферичної крові хворих IgE-залежною та IgE-незалежною формою АД в умовах гострого і хронічного запалення.

Результати дослідження продукції TGF- $\beta$  у супернатантах периферичної крові здорових донорів і хворих IgE-залежною й IgE-незалежною формою АД в умовах гострого періоду захворювання представлені в табл. 3.

Таблиця 3

**Рівень спонтанної та індукованої продукції TGF- $\beta$  *in vitro* мононуклеарними клітинами крові у хворих IgE-залежною і IgE-незалежною формою АД в гострому періоді захворювання (pg/ml)**

Форма АД	Продукція TGF- $\beta$ мононуклеарними клітинами крові <i>in vitro</i> (pg/ml)	
	Спонтанна продукція	Індукована продукція
IgE-залежна (n=32)	$65,4 \pm 2,1^*$	$87,9 \pm 3,4^*$
IgE-незалежна (n=30)	$185,3 \pm 15,8^*$	$227 \pm 18,7^*$
Контрольна група (n=30)	$85,3 \pm 1,6$	$118,6 \pm 12,2$

Примітка: \* - достовірна відмінність щодо показників у здорових донорів ( $p < 0,05$ )

Як показано в табл. 3. у нормі спонтанна продукція TGF- $\beta$  у середньому склала  $85,3 \pm 1,6$  pg/ml. Активація *in vitro* мононуклеарів, виділених із крові здорових донорів мітогеном, приводила до підвищення індукованої продукції TGF- $\beta$ , рівень якої в середньому становив  $118,6 \pm 12,2$  pg/ml.

При дослідженні *in vitro* продукції TGF- $\beta$  клітинами у хворих IgE-залежною формою АД в гострому періоді захворювання виявлений вірогідно низький рівень як спонтанної ( $65,4 \pm 2,1$  pg/ml; контроль -  $85,3 \pm 1,6$  pg/ml) ( $p < 0,05$ ), так і стимульованої ( $87,9 \pm 3,4$  pg/ml; контроль -  $118,6 \pm 12,2$  pg/ml) ( $p < 0,05$ ) продукції TGF- $\beta$ .

При порівнянні отриманих даних варто відзначити, що для хворих з IgE-незалежною формою АД в гострому періоді захворювання були характерні вірогідно високі рівні як спонтанної ( $185,3 \pm 15,8$ ; контроль -  $85,3 \pm 1,6$  pg/ml) так і індукованої ( $227 \pm 18,7$ ; контроль -  $118,6 \pm 12,2$  pg/ml) продукції TGF- $\beta$  мононуклеарними клітинами ( $p < 0,05$ ).

Результати продукції клітинами TGF- $\beta$  у хворих з IgE-залежною і IgE-незалежною формами АД в хронічному періоді захворювання представлені в табл. 4.

Таблиця 4

**Рівень спонтанної та індукованої продукції TGF- $\beta$  *in vitro* мононуклеарними клітинами крові у хворих IgE-залежною і IgE-незалежною формою АД в хронічному періоді захворювання (pg/ml).**

Форма АД	Продукція TGF- $\beta$ мононуклеарними клітинами крові <i>in vitro</i> (pg/ml)	
	Спонтанна продукція	Індукована продукція
IgE-залежна (n=33)	$87,5 \pm 3,5^*$	$105,3 \pm 11,2^*$
IgE-незалежна (n=32)	$153,8 \pm 16,6^*$	$177,5 \pm 12,6^*$
Контрольна група (n=30)	$85,3 \pm 1,6$	$118,6 \pm 12,2$

Примітка: \* - достовірна відмінність щодо показників у здорових донорів ( $p < 0,05$ )

Як показано в табл. 4., при аналізі рівня спонтанної продукції TGF- $\beta$  у групах хворих з IgE-залежною і IgE-незалежною формою АД в хронічному періоді захворювання спостерігалося достовірно збільшення показників спонтанної продукції цитокіну до  $87,5 \pm 3,5$  pg/ml і  $153,8 \pm 16,6$  pg/ml відповідно (контроль  $85,3 \pm 1,6$  pg/ml) ( $p < 0,05$ ).

Істотні розходження в групах хворих з IgE-залежною і IgE-незалежною формою АД в хронічному періоді захворювання спостерігалися й при аналізі показників індукованої продукції клітинами TGF- $\beta$ . При зіставленні показників індукованої продукції TGF- $\beta$  у хворих з IgE-залежною і IgE-незалежною формами АД в хронічному періоді захворювання в групі хворих з IgE-незалежною формою було відзначено достовірно підвищення величин цих показників (IgE-незалежна -  $177,5 \pm 12,6$  pg/ml; IgE-залежна -  $105,3 \pm 11,2$  pg/ml; контроль -  $118,6 \pm 12,2$  pg/ml) ( $p < 0,05$ ).

Перші публікації, що з'явилися у періодичних виданнях останніх років були присвячені так званім Treg лімфоцитам, які були виділені в окрему групу клітин за їхню здатність обмежувати поширення запального процесу. На думку авторів, ці клітини здатні попереджати виникнення аутоімунних реакцій і визначають розвиток стану імунологічної толерантності. Відомо, що їх функціональна регуляторна активність обумовлена синтезом TGF- $\beta$  і особливо IL-10, дефіцит яких здатний визначати формування, у тому числі персистуючого алергічного запалення. Однак детального вивчення функціональної активності Treg клітин по їхній здатності продукувати цитокіни *in vitro* в умовах гострого і хронічного запалення при АД, в доступній літературі не виявлено.

У зв'язку із цим, було проведено дослідження *in vitro* продукції ключових цитокінів Treg профілю ( TGF- $\beta$  і IL-10) мононуклеарними клітинами периферичної крові у хворих IgE-залежною і IgE-незалежною формою АД в гострому і хронічному періоді захворювання.

Нещодавно стало відомо, що IL-10 є досить важливим імунорегуляторним цитокіном, який продукується популяцією Т-регуляторних клітин (Treg). З'ясувалося, що IL-10 здатен пригнічувати синтез цитокінів Th1 профілю, а також функцію активованих моноцитів і NK-клітин. Дослідження *in vitro* показали, що під впливом IL-10 у моноцитах пригнічується експресія білків HLA і пов'язана із цим їх антигенпрезентуюча функція. Впливаючи на лімфоцити, IL-10 здатний пригнічувати синтез IL-2, у результаті чого знижується проліферативна активність Т-клітин.

У цьому зв'язку представляється цікавим вивчення продукції IL-10 мононуклеарними клітинами периферичної крові хворих IgE-залежною і

IgE-незалежною формою АД в гострому і хронічному періоді захворювання.

Як з'ясувалося, розходження між IgE-залежною та IgE-незалежною формами АД відзначені і в індукованій продукції клітинами IL-10. Вагомим діагностичним критерієм розмежування різних клінічних форм АД може слугувати показник індукованої *in vitro* продукції клітинами крові IFN- $\gamma$ , рівень продукції якого в хронічній стадії IgE-залежної форми АД значно перевершував рівень продукції при IgE-незалежній формі.

Необхідно відзначити, що при IgE-незалежній формі АД, хронізація запального процесу збігається із присутністю в крові клітин з високою здатністю до продукції TGF- $\beta$ .

## ВИСНОВКИ

1. У хворих IgE-залежною формою АД не спостерігається посилення спонтанної та індукованої продукції *in vitro* клітинами IL-10 як у гострому, так і в хронічному періоді захворювання, що пов'язано із пригніченням функції лімфоцитів.
2. У хворих IgE-незалежною формою АД спостерігається достовірно посилення індукованої продукції клітинами IL-10 у хронічному періоді захворювання.
3. У хворих IgE-залежною формою АД, на відміну від IgE-незалежної, спостерігалося достовірно зниження показників спонтанної та індукованої продукції TGF- $\beta$  клітинами *in vitro* в умовах загострення алергічного запалення, що ймовірно пов'язано із пригніченням функції Treg лімфоцитів.
4. Хронічний період захворювання у хворих IgE-незалежною формою АД характеризувався достовірним підвищенням рівня *in vitro* спонтанної й індукованої продукції клітинами TGF- $\beta$ .

## ЛІТЕРАТУРА

1. Kay AB. T cells in allergy and anergy. *Allergy* 1999;54:29–30.
2. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F et al. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 2001;166:5530–5539.
3. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001;182:207–214.
4. Akdis CA, Joss A, Akdis M et al. Mechanism of IL-10-induced T cell inactivation in allergic inflammation and normal response to allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;124:180–182.

5. Segal BM, Dwyer BK, Shevach EM. An interleukin (IL) -10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *JExp Med* 1998;187:537–46.
6. Bellinghausen I, Knop J, Saloga J. The role of interleukin 10 in the regulation of allergic immune responses. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;126:97–101.
7. Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* 2001;103:131–136.
8. Sundstedt A, Hoiden I, Rosendahl A et al. Immunoregulatory role of IL-10 during superantigen-induced hyporesponsiveness in vivo. *J Immunol* 1997;158:180–186.
9. Akdis CA, Blaser K. IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. *Faseb J* 1999;13:603–609.

## SUMMARY

### FUNCTIONAL ACTIVITY OF MONONUCLEAR CELLS *IN VITRO* AT PATIENTS WITH AD IN THE ACUTE AND CHRONIC PERIOD OF DISEASE

*Kurchenko A.I.*

O.O. Bogomolec National Medical University

With purpose to elucidate the role of IL10 and TGF- $\beta$  producing lymphocytes (T reg cells) in pathogenesis of clinical forms AD the investigation of blood mononuclear cells of the patient with IgE-mediated (n=30) and non-IgE-mediated AD (n=30) was done. The isolated from blood mononuclear cells were cultured in vitro in presence of mitogen stimulators (induced cytokine production) or without it (spontaneous cytokine production). The supernatant fluid after culture was used for detection of IL10 and TGF- $\beta$  cytokines in immunoenzyme method. The acute and chronic IgE-mediated AD was not characterized with any changes in the level of spontaneous and induced production of IL10 by the cultured cells but had showed the reduction in spontaneous and induced production of TGF- $\beta$ . The cultured mononuclear cells of patients with chronic non-IgE-mediated AD were characterized with the rise in induced production of IL10 and the rise in spontaneous and induced production of TGF- $\beta$ .

УДК 616.345.566-344.52:616.567-957.345-02

## СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПОЛЛИНОЗОМ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ АСИТ + IMMUFIX (WELLMUNE® БЕТА-ГЛЮКАН)

*КУЗНЕЦОВА Л.В., КУЗНЕЦОВ А.Г., ЮРКИНА А.В., КРАВЧЕНКО Е.В.*

Национальная медицинская академия последипломного образования  
имени П.Л.Шупика

Патогенетические механизмы аллергического воспаления обращают на себя внимание и вызывают особый интерес аллергологов и клинических иммунологов, при этом большое внимание придается исследованию кооперативных взаимодействий между клетками иммунной системы, обеспечиваемых секрецией и рецепцией цитокинов [1, 4, 10, 15, 16]. Понятие цитокины объединяет в себе большое количество эндогенных биологически активных соединений, включающих интерлейкины (в настоящее время описано около полутора десятков интерлейкинов) интерфероны, колониестимулирующие факторы, трансформирующие факторы, факторы, некротизирующие опухоли, и ряд других соединений. В формировании аллергического воспаления принимает участие множество различных

медиаторов воспаления, их функции во многом взаимосвязаны, но о течении воспалительного процесса с определенной долей вероятности можно судить по некоторым цитокинам, играющим центральную роль в развитии воспалительной реакции [2, 3, 4, 9]. К их числу относятся интерферон (ИНФ- $\gamma$ ), а также фактор некроза опухоли (ФНО- $\alpha$ ) и интерлейкин 1 (ИЛ-1 $\beta$ ).

Известно, что попадание в организм антигена активирует макрофаги и вызывает секрецию ими ряда медиаторов, в том числе и ИЛ-1 $\beta$ , стимулирующего пролиферацию Т-клеток и являющегося главным медиатором развития местной воспалительной реакции при любом типе воспаления. Кроме того, доказано, что в физиологических условиях ИЛ-1 $\beta$  способен повышать активность Th1-клеток, стимулируя секрецию ими