

ФОНОВЫЙ УРОВЕНЬ СЫВОРОТОЧНЫХ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ.*КУРЧЕНКО А.И.*

Национальный медицинский университет имени А.А.Богомольца

Атопический дерматит (АД) представляет собой хроническое рецидивирующее аллергическое заболевание кожи с характерной клинической картиной. Как известно, несмотря на однородность клинических признаков заболевания, атопический дерматит имеет как минимум две описанные патогенетически различные формы. Это аллергическая IgE-зависимая форма, которая развивается на фоне присутствия в крови высокого уровня общего и аллергенспецифического IgE и так называемая IgE-независимая форма, в патогенезе которой отсутствует четкий механизм развития гиперчувствительности немедленного типа [4,8].

Известно, что высокий уровень эозинофилии, сопровождаемый гиперпродукцией IgE, наблюдается у большинства пациентов с клиническим диагнозом АД и является основным лабораторным иммунологическим критерием этого заболевания. Однако, клинические проявления АД могут наблюдаться у пациентов при отсутствии этих выраженных иммунологических лабораторных изменений. Чаще всего такая ситуация встречается у больных с IgE-независимой (неаллергической) формой атопического дерматита [9].

Дальнейший поиск критериев, позволяющих дифференцировать различные формы АД, наталкивает исследователей на раскрытие новых патогенетических механизмов формирования заболевания, как на уровне периферической крови, так и на уровне пораженной кожи больных. Одним из таких критериев может служить различный уровень цитокинов наблюдаемый в сыворотке крови больных IgE-зависимой и IgE-независимой формой АД [6].

Как известно, существуют большие различия в сывороточной концентрации цитокинов вырабатываемых лимфоцитами Th1 и Th2 профиля в крови больных АД при обострении и хроническом течении заболевания. По мнению многих авторов, обострение АД чаще всего связано с усиленным синтезом IL-4, 5 и IL-10, а хронический процесс наоборот чаще характеризуется увеличением продукции IFN- γ [3].

Однако, при сравнении показателей Th1 и Th2 цитокинового профиля периферической крови у больных с IgE-зависимой и IgE-независимой формой АД выявленных различий оказалось недостаточно.

Некоторый прогресс в понимании этого вопроса наметился после последних сообщений о патогенетической роли IL-12 и IL-18 в формировании и развитии атопических состояний. Открытие и описание механизмов действия IL-18 *in vitro* и *in vivo* у лабораторных животных позволяет судить о ключевом участии этого цитокина в формировании кожной аллергической реакции у больных АД [10]. Было отмечено, что уровень IL-18 может коррелировать с уровнем эозинофилии и концентрацией растворимого рецептора IL-2 (sIL-2R) в сыворотке крови [5].

Интерес к IL-18 возник после сообщения о том, что этот цитокин обладает способностью в содружестве с IL-12 индуцировать синтез IFN- γ [7]. Как известно, IL-12 способствует дифференцировке Т-лимфоцитов из Th0 в Th1, стимулирует продукцию IFN- γ и усиливает экспрессию рецептора к IL-18 на Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах и натуральных киллерах (NK). Однако, IL-18 в содружестве с IL-2, может также способствовать синтезу Th2 цитокинов и увеличению продукции IgE [2,10]. Аналогичная взаимосвязь наблюдается при синергизме IL-2 и IL-12. Известно, что IL-2 может индуцировать продукцию IFN- γ и уменьшать IL-4- индуцируемую продукцию IgE. В то же время IL-2 способен индуцировать продукцию IL-10, который вместе с IL-12 снижает синтез γ -INF [10]. Несмотря на то, что такие перекрестно-реагирующие реакции Th1/Th2 синтеза цитокинов хорошо описаны, остается неясным, как вышеописанные цитокины ведут себя при различных патологических состояниях. Дальнейшее исследование цитокинового профиля крови больных АД может быть полезным для оценки вариантов течения и тяжести этого заболевания.

Целью исследования явилось изучение уровня сывороточных IL-2, IL-10, IL-12 и IL-18 у больных различными формами АД для поиска дополнительных иммунологических дифференциальных критериев IgE-зависимой и IgE-независимой формы заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под нашим наблюдением находились исключительно взрослые пациенты (65 человек в возрасте от 18 до 55 лет) с клиническими проявлениями АД. В первую группу вошли 33 человека IgE-зависимой формой АД, диагноз которых отвечал критериям, предложенным Hanifin

& Rajka. Эти пациенты указывали на проявления atopических заболеваний у родственников в анамнезе и обнаруживали высокие уровни концентрации общего IgE в сыворотке крови. Вторую группу составили 32 человека с IgE-независимой формой АД, диагноз которых также отвечал критериям, предложенным Hanifin & Rajka, но не имеющих atopического анамнеза и повышенного уровня общего сывороточного IgE. Контрольную группу составили 30 здоровых доноров.

Уровень сывороточных цитокинов (IL-2, IL-10, IL-12, IL-18) определяли при помощи твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Для определения концентрации цитокинов использовали коммерческие наборы тест-систем фирм "IMMUNOTECH" и "DIACLONE", Франция.

Вкратце. В 96-луночные планшеты добавляли по 100 мкл «нулевой дозы» и стандартов M4 в соответствующие лунки для построения стандартной кривой. В остальные лунки добавляли по 50 мкг исследуемой сыворотки. Затем в каждую лунку вносили по 25 мкл крольчихных поликлональных антител. Планшеты инкубиро-

вали при комнатной температуре на протяжении 3 часов. Лунки 5 раз тщательно промывали буферным раствором и удаляли остатки промывающей жидкости. После промывания в каждую лунку добавляли по 50 мкл конъюгата крольчихных антител и щелочной фосфатазы. Инкубацию проводили при комнатной температуре на протяжении 45 минут. Повторяли промывание планшеты пять раз и вносили в каждую лунку по 200 мкл приготовленного хромогенного агента. После последней 20-минутной инкубации проводили определение оптической плотности стандартов и исследуемых образцов сыворотки при помощи иммуноферментного анализатора STAT-FAX-303 PLUS, США при длине волны в 492 нанометра. Полученные количественные результаты статистически обрабатывались стандартной компьютерной программой Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования уровня сывороточных цитокинов (IL-2, IL-10, IL-12, IL-18) у больных IgE-зависимой и IgE-независимой формой АД представлены на рисунке 1.

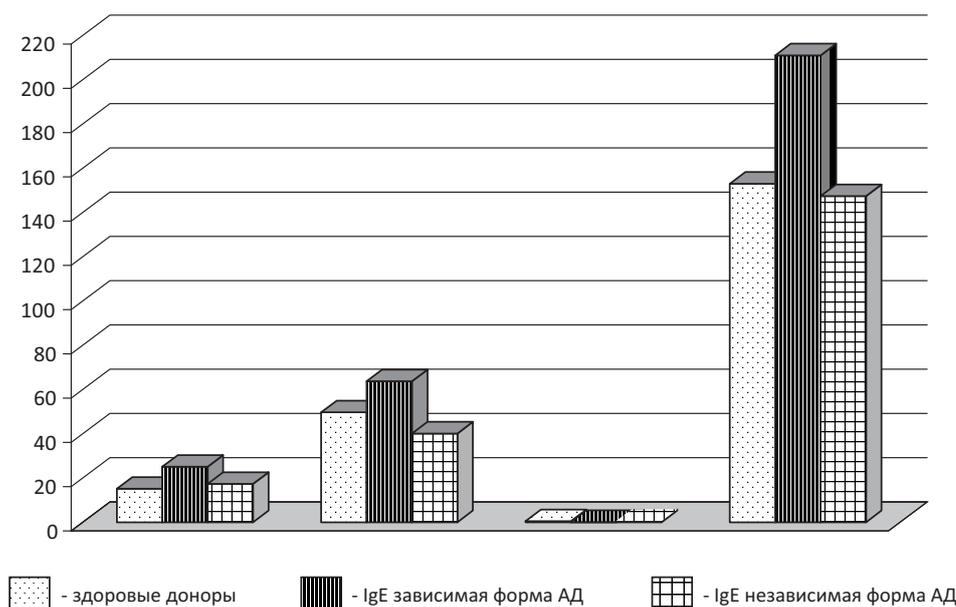


Рисунок 1. Сравнительная характеристика уровня цитокинов в сыворотке крови больных IgE зависимой и IgE независимая формой АД.

Как видно из рисунка, у больных с IgE-формой АД наблюдается резкое увеличение концентрации IL-18 в сыворотке периферической крови ($211,3 \pm 4,6$ пкг/мл), по сравнению с показателями в группе больных IgE-независимой формой АД ($147,4 \pm 5,2$ пкг/мл) ($p < 0,05$) и нормальных доноров ($153 \pm 2,5$ пкг/мл) ($p < 0,05$). При этом у больных IgE-зависимой формой АД наблюдалось увеличение показателя концентрации IL-2

($251 \pm 1,5$ пкг/мл) и IL-10 ($63,7 \pm 4,1$ пкг/мл) в сыворотке крови. Уровень концентрации IL-12 был достоверно снижен и составил 0,1 пкг/мл.

При исследовании уровня сывороточных цитокинов у больных IgE-независимой формой АД было обнаружено достоверное снижение IL-10 (40 пкг/мл). Показатели концентрации IL-2, IL-12 и IL-18 практически не отличались от показателей у здоровых лиц.

Обнаруженные в нашем исследовании иммунологические изменения подтвердили более ранние сообщения о значительном увеличении уровня IL-18 в сыворотке больных АД по сравнению с аналогичными показателями у здоровых лиц [5].

Однако, нами были выявлены резкие отличия между уровнями сывороточного IL-18 у больных IgE-зависимой и IgE-независимой формой АД. Как оказалось, резкое увеличение IL-18 в сыворотке крови наблюдалось у всех больных IgE-зависимой формой АД, в отличие от неизменных показателей уровня этого цитокина, а также IL-2 и IL-12 у больных IgE-независимой формой АД. Это дает основание полагать, что дисбаланс цитокинов не является ведущим патогенетическим фактором в развитии IgE-независимой формы АД, о чем сообщалось ранее [1].

Как известно, IL-18 является синергистом IL-12 в индукции синтеза IFN- γ . Однако, IL-18 также способен индуцировать синтез IL-13 и является синергистом IL-2 в продукции цитокинов Th2 профиля. Это наталкивает на мысль, что увеличение синтеза IL-18 в условиях обнаруженного высокого уровня IL-2 сдвигает синтез цитокинов у больных IgE-зависимой формой АД в сторону продукции цитокинов лимфоцитами Th2 типа, таких как IL-4 и особенно IL-10 [5,7]. В подтверждение этого вывода, у пациентов с IgE-зависимой формой АД в нашем исследовании обнаружено увеличение сывороточной концентрации IL-10.

Недавно было показано также, что совместное применение препаратов IL-18 и IL-2 у мышей приводило к независимому от синтеза IL-4 увеличению продукции IgE. Была также обнаружена эозинофильная инфильтрация бронхов, увеличение продукции IgE и усиленный синтез цитокинов Th2 клетками и при комбинированном внутривенном введении IL-18 и аллергена амброзии у мышей [7]. Эти данные могут свидетельствовать о важной патогенетической роли IL-18 в развитии бронхиальной астмы.

ВЫВОДЫ

1. Высокий уровень IL-18, обнаруженный у больных IgE-зависимой формой атопического дерматита в нашем исследовании подтверждает возможную связь между концентрацией цитокина и стадией развития кожного заболевания.
2. Увеличение уровня IL-18 при условии снижения концентрации IL-12 в крови больных IgE-зависимой формой АД может служить важным критерием для дальнейшей дифференциальной диагностики различных форм АД.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Furie M, Sugiyama H, Tsukamoto K et al.* Serum soluble IL-2 receptor (sIL-2R) and eosinophil cationic protein (ECP) levels in atopic dermatitis // *J. Dermatol. Sci.* - 1994. 7.-P. 89-95.
2. *Hoshino T, Wiltrout RH, Young HA.* IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response // *J. Immunol.* - 1999. V.162.- P. 5070-7.
3. *Jeannin P, Delneste Y, Seveso M et al.* IL-12 synergizes with IL-2 and other stimuli in inducing IL-10 production by human T cells // *J. Immunol.* - 1996. V. 156.-P. 3159-65..
4. *Leung DY.* Pathogenesis of atopic dermatitis// *J Allergy Clin. Immunol.* - 1999. V.104. S99-108.
5. *Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S et al.* Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity // *Adv. Immunol.* - 1998. V.70. -P.281-312.
6. *Werfel T, Kapp A.* What do we know about the etiopathology of the intrinsic type of atopic dermatitis? // *Curr. Probl. Dermatol.* - 1999. V.28.-P. 29-36.
7. *Wild JS, Sigounas A, Sur N et al.* IFN- γ -inducing factor (IL-18) increases allergic sensitization, serum IgE, Th2 cytokines, and airway eosinophilia in a mouse model of allergic asthma // *J. Immunol.* - 2000. V.164.-P. 2701-0.
8. *Wollenberg A, Bieber T.* Atopic dermatitis: from the genes to skin lesions // *Allergy* - 2000. V.55. -P. 205-13.
9. *Wuthrich B.* Clinical aspects, epidemiology, and prognosis of atopic dermatitis // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* - 1999.V. 83.-P. 464-470
10. *Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T et al.* IL-12 up-regulated IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN- γ . // *J. Immunol.* - 1998. V.161. -P.3400-7.

РЕЗЮМЕ

ФОНОВИЙ РІВЕНЬ СИРОВАТКОВИХ ЦИТОКІНІВ У ХВОРИХ НА АТОПІЧНИЙ ДЕРМАТИТ

Курченко А.І.

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця

Перехресний вплив деяких цитокинів на співвідношення між Th1 і Th2 лімфоцитами в умовах атопічного дерматиту залишається до теперішнього часу до кінця не з'ясованим. Ми досліджували рівні сироваткових цитокинів (IL-2, IL-10, IL-12, IL-18) у хворих з IgE-залежною і IgE-незалежною формою АД. Як виявилось, у хворих на IgE-залежну форму АД, на відміну від IgE-незалежної форми, спостерігається достовірне збільшення рівня IL-18 в сироватці

крові. Знайдене збільшення рівня IL-18 в крові хворих на IgE-залежну форми АД за умови зниженої концентрації IL-12 може служити важливим критерієм для диференціальної діагностики різних форм АД.

Ключові слова: атопічний дерматит, цитокін, інтерлейкін.

We investigated serum levels of several cytokines (IL-2, IL-12, IL-10 and IL-18) in patients with IgE-dependent and IgE-independent forms of AD. Serum IL-18 levels in patients with IgE-dependent form of AD were significantly higher than those in IgE-independent form and healthy controls. These results suggest the value of serum IL-18 levels as a parameter of AD activity and may support a possible role for IL-18 in the pathogenesis of AD.

Key words: atopic dermatitis, cytokine, interleukin

SUMMARY

SERUM CYTOKINE LEVELS FROM ATOPIC DERMATITIS PATIENTS

Kurchenko A.I.,

O.O. Bogomolec National Medical University

The crossregulation of Th1/Th2 derivation and function in AD patients are incompletely characterized.

УДК [577.21:616.5-002]-053.3/.5

ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНУ БІЛКА КЛІТИН КЛАРА У ХВОРИХ НА АТОПІЧНУ БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ

ЛЯХОВСЬКА Н.В., ШЛИКОВА О.А., ІЗМАЙЛОВА О.В., КАЙДАШЕВ І.П.

Науково-дослідний інститут генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Атопічна бронхіальна астма (АБА) є типовим представником мультифакторного захворювання. Генетичні аспекти астми та атопії широко вивчаються. Генів-кандидатів та локусів хромосом, що вірогідно відповідають за виникнення даної патології велика кількість. Найчастіше в літературних джерелах посилаються на ділянки хромосом 5q23-31,6p21.1-p23, 11q13, 12q14-24.33 і 13q11-32. Необхідність використання широкогеномного скринінгу зумовлена тим що локуси, які зчеплені з БА або бронхіальною гіперреактивністю подекуди не проявляють зчеплення з рівнем IgE та наявністю специфічної сенсibiliзації за результатами прик-тесту.

Особливу увагу привертає довгий кінець 11 хромосоми, оскільки тут були ідентифіковані декілька генів – кандидатів, в тому числі поверхневих маркерів лімфоцитів CD20 і бета-ланцюга рецептора з високою афіністю IgE (FcεRI-13), а також ген білка клітин Клара [1]. З моменту описання Максом Кларом в епітелії периферичних повітроносних шляхів людини клітин з цитоплазматичними гранулами пройшло більше 70 років (Clara M., 1937). Є чимало синонімів назви білків клітин Клара (Clara Cell - CC), які пов'язані з вагою та функцією: SCGB1A1, CC10, CC16, CCSP або утеро-

глобін. Однак до теперішнього часу відомості щодо локалізації цих клітин в епітелії легенів суперечливі, а про їх кількісну характеристику при патологічних процесах частіше судять за рівнем специфічного для цих клітин білка, що виявляється в бронхоальвеолярних змивах, сироватці крові (Bernard AM et al., 1992; Singh G. et al., 1997). Існують переконливі дані про його інгібіторну активність щодо фосфоліпази A2, а також про імуномодулюючі властивості даного білка, включаючи пригнічення передачі сигналів гамма інтерферону і регуляцію Th1 та Th2 лімфоцитів [2]. Клітини Клара являються, ніби «цитоекологічним форпостом» легенів. (Plopper C. et al., 1991; Романова Л.К., 2000).

Сьогодні проведена обмежена кількість досліджень щодо впливу генетичних варіантів CC16 на розвиток АБА, та їх результати неоднозначні (Baldini et al., 1998; Gui et al., 2003; Kalyoncu et al., 2003; Laing et al., 1998a; Laing et al., 1998; Sengler et al., 2003; Sharma and Ghosh, 2004). Більшість наукових розробок в малих популяційних виборках підтверджують асоціацію між поліморфізмом CC16 та ризиком виникнення астми (Candelaria et al., 2005; Kalyoncu et al., 2003; Laing et al., 1998; Mansur et al., 2002; Saadat et al., 2004).