

Стан окремих показників імунної системи у дітей, хворих на дитячу екзему та атопічний дерматит

Ищейкин К.Е.

Українська медична стоматологічна академія, Полтава

СОСТОЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ ДЕТСКОЙ ЭКЗЕМОЙ И АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

Ищейкин К.Е.

Представлены результаты иммунологических исследований, анализ которых указывает на существование ряда основных факторов, определяющих развитие патологического процесса в иммунной системе организма детей, больных атопическим дерматитом и детской экземой: уровень иммуноглобулина E и T -регуляторных клеток; уровень T -хелперных клеток и состояние кислород-активирующей функции нейтрофилов; уровень иммуноглобулина G_4 ; уровень апоптоза T -хелперных клеток, в частности T -регуляторных клеток.

THE STATUS OF SOME IMMUNE SYSTEM INDICES IN CHILDREN SUFFERING THE INFANTILE ECZEMA AND ATOPIC DERMATITIS

Ishcheykin K.Ye.

There are presented the results of immunological researches, analysis of which reveals a range of major factors determining the pathologic process progress in the immune system of children suffering atopic dermatitis and infantile eczema: IgE and suppressor T cell level; helper T cell level and rate of the oxygen activation function of neutrophils; IgG_4 level; helper T cell apoptosis rate, in particular, that of suppressor T cells.

Вступ. Атопічний дерматит (АД) та справжня екзема посідають провідні місця за розповсюдженістю серед дерматозів людини, а також відносяться до алергодерматозів, яким притаманна постійна тенденція до зростання рівня захворюваності. Зокрема, питома вага дітей, хворих на АД, становить від 3 до 10 % дитячого населення.

Етіологія і патогенез АД та справжньої екземи не є повністю з'ясованими. На цей час доведена низка подібних чинників та механізмів, яким відводиться провідне або суттєве значення у розвитку цих дерматозів. Разом з тим, окремі гіпотези виникнення та особливості клінічної картини АД та справжньої екземи, зокрема:

- тип локалізації запального процесу на певних анатомічних ділянках шкіри;

- характер морфологічних елементів шкірної висипки, –

вказують на характерні відмінності кожної з відповідних нозологій.

Нез'ясованість етіопатогенезу та недостатня ефективність існуючих методів лікування АД та

справжньої екземи сприяють їх хронічно-рецидивуючому перебігу з поглибленням тяжкості клінічних проявів. На цей час встановлено, що найважливішою ланкою ланцюга імунних порушень при АД та дитячій екземі (ДЕ) слід вважати T -клітинний імунітет. Зокрема, доведена певна роль окремих цитокінів, що секретуються T -клітинами в розвитку АД [8] та їх регуляторними субпопуляціями [3].

Таким чином, важливим є подальше вивчення показників, що прямо або опосередковано характеризують стан T -хелперної ланки імунітету у хворих на АД та ДЕ.

Матеріали та методи дослідження. Комплексні клінічні та імунологічні дослідження були проведені у 24 дітей, хворих на АД, та у 24 дітей, які страждали на ДЕ. Середній вік обстежених дітей:

- хворих на ДЕ, складав $12,5 \pm 0,9$ року;

- хворих на АД, – $11,0 \pm 0,8$ року, –

що вказує на відсутність вірогідної різниці за віком.

Також не було вірогідної різниці між

відповідними групами пацієнтів за статтю:

- дівчаток в групах, хворих на ДЕ та АД, було 42 % та 46 %, відповідно;
- хлопчиків – 58 % та 54 %, відповідно.

Таким чином, відсутність вірогідних розбіжностей за цими показниками виключає можливість впливу вікових та статевих чинників на зміни показників стану імунної системи, які досліджувалися.

Кількість окремих субпопуляцій лімфоцитів оцінювали цитофлюориметричним методом. Використовували моноклональні антитіла до CD4, мічені фікоеритрином, та до CD25, мічені триколіровою міткою. Апоптоз лімфоцитів визначали за допомогою анексіну V, міченого флюоресцеїнізотіоціанатом. В якості ізо-типичного контролю використовували імуноглобуліни миші, мічені переліченими мітками. Усі використані реагенти вироблені "Caltag Laboratories", США. Оцінку флюоресценції клітин проводили на проточному цитофлюориметрі "EPICS XL-MCL" виробництва "Beckman Coulter" (США).

Визначення концентрації імуноглобулінів проводили:

- імуноглобуліну E – за принципом сендвіч імуноензиматичного аналізу за допомогою набору реагентів ООО «Хема-Медика» (РФ);
- імуноглобуліну G₁ – за принципом сендвіч імуноензиматичного аналізу за допомогою набору реагентів ООО «Полигност» (РФ);
- імуноглобуліну G₄ – за принципом сендвіч імуноензиматичного аналізу за допомогою набору реагентів ООО «Хема-Медика» (РФ).

Визначення концентрації трансформуючого фактору росту бета проводили за принципом сендвіч імуноензиматичного аналізу за допомогою набору реагентів DRG Instruments GmbH (ФРН) для визначення в сироватці та плазмі крові в інтервалі концентрацій 0-600 пкг/мл.

Визначення концентрації інтерлейкіну-10 проводили за принципом сендвіч імуноензиматичного аналізу за допомогою набору реагентів ООО «Протеиновый контур» (РФ) для визначення в біологічних рідинах в інтервалі концентрацій 0-3200 пг/мл.

Отримані у процесі обстеження пацієнтів

кількісні показники обробляли методами математичної статистики з розрахунком середніх вибірових значень (M), дисперсії (σ) та помилок середніх значень (m) у групах обстежених осіб.

Вірогідність відмінностей отриманих результатів для різних груп визначалася за допомогою t -критерію Стьюдента. Відмінності вважали вірогідними при загальноприйнятій у медико-біологічних дослідженнях імовірності помилки $p < 0,05$. Імовірність помилки оцінювали згідно таблиць Ст'юдента з урахуванням розміру експериментальних груп.

Для аналізу взаємозв'язків кількісних параметрів, які вивчалися, визначали коефіцієнт парної кореляції Пірсона r . Коефіцієнт кореляції вважали вірогідним у разі імовірності помилки $p < 0,05$, яка визначалась шляхом співставлення із критичним значенням за таблицею залежності розмірів дослідної групи, коефіцієнтів кореляції та імовірності помилок. Для визначення взаємозв'язків показників, які могли мати нелінійний характер, також розраховували непараметричний критерій кореляції τ Кендалла. Для пошуку ознак найбільш інформативних щодо розпізнавання нозологій, які вивчалися, використовували дискримінантний аналіз, який дозволяє отримати досить просту розрахункову формулу, коефіцієнти для якої можна внести у таблицю. Для аналізу взаємозв'язків різних показників проводили факторний аналіз за методом головних компонент [1, 2].

Обчислення проводили на персональному комп'ютері із використанням програм "Statistica for Windows. Version 5.0" та «SPSS for Windows. Release 13.0».

Результати досліджень та їх обговорення.

Основна увага нашого дослідження була сфокусована на визначенні рівня CD4⁺ клітин (T-хелперні клітини), CD4⁺ CD25⁺ клітин (T-регуляторні клітини), а також на визначенні стану спонтанного апоптозу цих клітин за рівнем експресії диференційної мембранної молекули – фосфатидилсерину, яку оцінювали за рівнем зв'язування Анексіну V, міченого ФІТЦ.

Згідно з даними, представленими в Табл. 1, за рівнем CD4⁺ клітин у периферичній крові

Таблиця 1 - Показники стану T-хелперної популяції у хворих на атопічний дерматит та дитячу екзему

Показник, %%	Група пацієнтів					
	ДЕ, n = 24			АД, n = 24		
	M	m	N	M	m	N
CD4 ⁺ клітини	39,30	2,08	23	38,73	2,37	24
CD4 ⁺ CD25 ⁺ клітини	4,92	1,02	24	5,67	1,84	24
CD4 ⁺ AnV ⁺ клітини	4,30	0,48	24	3,14	0,50	24
CD4 ⁺ CD25 ⁺ AnV ⁺ клітини	37,50	3,45	24	32,28	3,25	24

ПРИМІТКА: вірогідної різниці між показниками немає.

не було відмін між хворими на ДЕ та АД – $39,30 \pm 2,08$ та $38,73 \pm 2,37$, відповідно. Неістотною також була різниця в рівні клітин, що експресували $CD4^+ CD25^+$ – $4,92 \pm 1,02$ та $5,67 \pm 1,84$, відповідно. Відповідні дані свідчать про відсутність різниці в кількісних характеристиках *T*-хелперних клітин та їх регуляторної субпопуляції. Це дає можливість передбачити подальші, більш тонкі порушення функціонування імунної системи, які лежать в основі розвитку АД та дитячої (неатопічної) екземи.

У подальшому нами були досліджені рівні мембранної асиметрії *T*-хелперних клітин. Згідно з даними, наведеними в Табл. 1, рівень апоптичних клітин у популяції $CD4^+$ -клітин та $CD4^+ CD25^+$ клітин суттєво не відрізняється між групами дітей, хворих на ЕД та АД. Зокрема, рівень $CD4^+ CD25^+ AnV^+$ клітин у групах дітей, хворих на ДЕ та АД, становив $37,50 \pm 3,45$ та $32,28 \pm 3,25$, відповідно.

Враховуючи відсутність вірогідних змін між кількісними показниками вмісту в периферійній крові *T*-хелперних клітин та їх регуляторної субпопуляції, доцільним було дослідити концентрацію в сироватці крові *TFR*- β та ІЛ-10, які секретуються цими клітинами. Визначені показники концентрації відповідних цитокінів наведені в Табл. 2.

Згідно з даними Табл. 2, концентрація *TFR*- β в групах дітей, хворих на ДЕ та АД, складала $548,68 \pm 44,61$ та $419,96 \pm 62,40$, відповідно, а концентрація ІЛ-10 – $314,92 \pm 45,34$ та

$498,23 \pm 72,92$, що демонструє відсутність вірогідних відмін, але вказує на наявність визначеного перехресту:

- підвищення рівня *TFR* - β та зниження ІЛ-10 – при ДЕ;
- зниження рівня *TFR* - β та підвищення ІЛ-10 – при АД.

Слід зазначити, що показники концентрації цитокінів у сироватці крові мають значні індивідуальні варіації; тому середні значення можуть не відображати реальної цитокінової регуляції, що вказує на доцільність використання більш прецизійних статистичних методів оцінки. Зокрема, відповідно до результатів досліджень ряду авторів, при використанні культивацийних технологій були виявлені певні зміни цих показників [4, 5]. *T*-хелперні клітини та їх регуляторна субпопуляції, разом із цитокінами, що секретуються, мають вплив на рівень антитіл, які синтезуються *B*-клітинами, а також впливають на переключення синтезу окремих субкласів імуноглобулінів, що сьогодні вважається однією з провідних ланок регуляції імунної відповіді.

Нами було досліджено вміст основних імуноглобулінів, які, згідно з сучасними даними, беруть провідну участь в реалізації алергічного запалення – імуноглобулінів *E*, *G*₁ та *G*₄. Крім того, було досліджено концентрацію імуноглобулінів *E*, *G*₁ та *G*₄ у сироватці крові хворих на ДЕ та АД. Результати проведених досліджень представлено у Табл. 3.

Таблиця 2 - Показники концентрації трансформуючого фактору росту бета та інтерлейкіну-10 у сироватці крові хворих на atopічний дерматит та дитячу екзему

Показники	Група пацієнтів					
	ДЕ, n = 24			АД, n = 24		
	<i>M</i>	<i>m</i>	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>m</i>	<i>N</i>
Концентрація <i>TFR</i> - β , пкг/мл	548,68	44,61	24	419,96	62,40	23
Концентрація ІЛ-10, пг/мл	314,92	45,34	17	498,23	72,92	24

ПРИМІТКА: вірогідної різниці між показниками немає.

Таблиця 3 - Показники концентрації імуноглобулінів *E*, *G*₁ та *G*₄ у сироватці крові хворих на atopічний дерматит та дитячу екзему

Показники	Група пацієнтів						<i>p</i>
	ДЕ, n = 24			АД, n = 24			
	<i>M</i>	<i>m</i>	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>m</i>	<i>N</i>	
Концентрація <i>IgE</i> ₂ , МО/мл	62,98	9,89	20	620,20	117,86	20	< 0,0001
Концентрація <i>IgG</i> ₁ , мг/мл	2,90	0,27	21	2,01	0,32	24	< 0,05
Концентрація <i>IgG</i> ₄ , г/л	1,18	0,19	21	1,64	0,24	24	

ПРИМІТКА: *p* – показник вірогідності різниці між даними груп з ДЕ та АД.

Як видно з цієї таблиці, в групі пацієнтів з АД реєструвався вірогідно підвищений рівень імуноглобуліну $E - 620,20 \pm 117,86$ проти $62,98 \pm 9,89$ у групі ДЕ ($p < 0,0001$), що є цілком логічним у зв'язку з тим, що рівень цього імуноглобуліну є одним з критеріїв встановлення діагнозу АД. Разом з тим, у хворих на ДЕ реєструвався вірогідно вищий рівень імуноглобуліну $G_1 - 2,90 \pm 0,27$ проти $2,01 \pm 0,32$.

Таблиця 4 - Показники активності нейтрофільних лейкоцитів у венозній крові хворих на atopічний дерматит та дитячу екзему

Показники	Група пацієнтів					
	ДЕ, $n = 24$			АД, $n = 24$		
	M	m	N	M	m	N
НСТ-тест, СЦК	1,85	0,03	24	1,88	0,04	24
ЛКБ-тест, СЦК	1,75	0,02	24	1,77	0,03	24

ПРИМІТКА: вірогідної різниці між показниками немає

Отримані попередньо результати, які демонстрували можливість наявності певних кореляційних зв'язків, вказували на необхідність проведення кореляційного аналізу між показниками в групах дітей, хворих на ДЕ та АД, окремо.

Проведений аналіз довів, що у дітей, хворих на ДЕ, існують:

- а) сильні позитивні кореляційні зв'язки між:
 - $CD4^+ CD25^+ AnV^+$ та $CD4^+ AnV^+4$;
 - вмістом імуноглобуліну E та $CD4^+$ клітинами;
 - концентрацією IgG_1 та інтерлейкіну-104;
 - IgG_4 та ЛКБ;
 - НСТ та ЛКБ;
- б) сильні негативні кореляційні зв'язки між:
 - $TFR-\beta$ та $CD4^+$;
 - IgG_4 та інтерлейкіном-104;
 - IgG_1 та IgG_4 .

Виявлені кореляційні зв'язки в цілому відображають основні тенденції сучасних поглядів на розвиток запалення:

- роль T -хелперних клітин у регуляції продукції імуноглобуліну E ;
- участь інтерлейкіну 10 в регуляції продукції імуноглобуліну G_1 ;
- функційний антагонізм між субкласами імуноглобулінів G_1 та G_4 .

Натомість, при АД існують:

- а) сильні позитивні кореляційні зв'язки між:
 - $CD4^+ CD25^+$ та $CD4^+ AnV^+$;
 - $CD4^+ CD25^+ AnV^+$ та $CD4^+ AnV^+$;
- б) сильні негативні кореляційні зв'язки між:
 - $CD4^+$ та інтерлейкіном 10;

Для отримання об'єктивної характеристики процесу, нами були вивчені показники активності нейтрофільних лейкоцитів у венозній крові хворих на АД та ДЕ (Табл. 4.). Отримані результати демонструють відсутність вірогідних змін між показниками кисень-активуючої функції нейтрофільних гранулоцитів (НСТ-тест) та вмісту в них лізосомальних катіонних білків (ЛКБ-тест).

- $CD4^+ AnV^+$ та НСТ;
- $CD4^+ AnV^+$ та ЛКБ;
- IgG_1 та IgG_4 .

Отже, існують певні розбіжності в кореляційних зв'язках між показниками стану імунної системи в групах дітей, хворих на АД та ДЕ. У хворих на АД спостерігається:

- негативний вплив інтерлейкіну 10 на вміст T -хелперних клітин;
- можливий вплив T -регуляторних клітин на підсилення апоптозу T -хелперних клітин;
- підсилений апоптоз усіх популяцій T -хелперних клітин.

Для оцінки показників, які виступають визначальними в розрізненні досліджених груп хворих – дітей з АД і ДЕ, був проведений дискримінантний аналіз. Отримані результати виявили, що для дискримінантного аналізу можливим є використання двох основних показників – концентрація імуноглобуліну E та інтерлейкіну-10. Для дискримінантного аналізу з точністю розпізнавання 86 % достатньо двох показників – концентрація IgE та концентрація ИЛ-10.

Для визначення основних факторів, що визначають розвиток патологічного процесу в групах хворих на ДЕ та АД, був проведений факторний аналіз, який виявив чотири головні компоненти (1, 2, 3 та 4) із власними значеннями 30,01641; 46,26817; 58,13310 та 68,05104%, відповідно.

Для визначення показників, які дають найбільш визначальні внески в процес, було вивчено завантаження факторів (варимаксне обертан-

ня з нормалізацією). Аналіз показав, що

- 4 фактор, який має найбільший відсоток накопиченого власного значення, утворюється переважно показниками концентрації імуноглобуліну *E* (завантаження > 0,70), вмісту $CD4^+ CD25^+$ (завантаження < 0,70);

- 3 фактор – показниками $CD4^+$, НСТ-тесту (завантаження > 0,70) та ЛКБ-тесту (завантаження < 0,70);

- 2 фактор – показниками концентрації імуноглобуліну G_4 (завантаження > 0,70);

- 1 фактор переважно формується показниками, які відображають апоптоз *T*-хелперних клітин ($CD4^+ AnV^+$) та їх регуляторної субпопуляції ($CD4^+ CD25^+ AnV^+$) (завантаження > 0,70).

Таким чином, дані факторного аналізу вказують на наявність основних факторів, які визначають розвиток патологічного процесу в імун-

ній системі при АД та ДЕ:

- рівень імуноглобуліну *E* та *T*-регуляторних клітин;

- рівень *T*-хелперних клітин та стан кисень-активуючої функції нейтрофілів (в меншому ступені вміст їх лізосомальних катіонних білків);

- рівень імуноглобуліну G_4 ;

- рівень апоптозу *T*-хелперних клітин, зокрема, *T*-регуляторних клітин.

Результати проведених нами досліджень узгоджуються з даними деяких зарубіжних авторів щодо важливості окремих субпопуляцій *T*-регуляторних клітин та цитокінів, які вони декретують у динаміці розвитку деяких дерматозів [6, 7], що розширює уявлення щодо патогенезу АД та ДЕ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лоули Д.Н., Максвелл А.Э. Факторный анализ. – М.: Мир, 1967. – 144 с.
2. Славин М.Б. Методы системного анализа в медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1989. – 302 с.
3. Verhagen J., Akdis M., Traidl-Hoffmann C., Schmid-Grendelmeier P., Hijnen D., Knol E.F., Behrendt H., Blaser K., Akdis C.A. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin // J. Allergy Clin. Immunol. - 2006. - Vol. 117, No 1. – P. 176-183.
4. Sohn M.H., Song J.S., Kim K.W., Kim E.S., Kim K.E., Lee J.M. Association of interleukin-10 gene promoter polymorphism in children with atopic Dermatitis // J. Pediatr. – 2007. - Vol. 150, No 1. - P. 106-108.
5. Katagiri K., Arakawa S., Hatano Y. In vivo levels of IL-4, IL-10, TGF-beta1 and IFN-gamma mRNA of the peripheral blood mononuclear cells in patients with alopecia areata in comparison to those in patients with atopic dermatitis // Arch. Dermatol. – 2007. - Vol. 298, No 8. - P. 397-401.
6. Seneviratne S.L., Jones L., Bailey A.S., Black A.P., Ogg G.S. Severe atopic dermatitis is associated with a reduced frequency of IL-10 producing allergen-specific $CD4^+$ T cells // Clin. Exp. Dermatol. - 2006. - Vol. 31, No 5. - P. 689-694.
7. Caproni M., Torchia D., Antiga E., Volpi W., del Bianco E., Fabbri P. The effects of tacrolimus ointment on regulatory T lymphocytes in atopic dermatitis // J.Clin. Immunol. - 2006. - Vol. 26, No 4. - P. 370-375.
8. Rigotti E., Piacentini G.L., Ressa M., Pigozzi R., Boner A.L., Peroni D.G. Transforming growth factor-beta and interleukin-10 in breast milk and development of atopic diseases in infants // Clin. Exp. Allergy. - 2006. - Vol. 36, No 5. - P. 614-618.