

УДК 612.017.1:616.514-092

## Цитокиновый профиль и показатели Т-клеток у больных аутоиммунной формой хронической крапивницы

Н.И. Баранова, Л.А. Ащина, Е.А. Орлова

ГБОУ ДПО ПИУВ Минздрава России, кафедра аллергологии и иммунологии, Пенза, Россия

## Cytokines profile and status of the T-cells in patients with chronic autoimmune urticaria

N.I. Baranova, L.A. Ashina, E.A. Orlova

Government Education Institution of Additional Professional Education of the Federal Agency of Public Health Services and Social Development Penza Institution of Advanced Medical Studies, allergology and immunology department, Russia

### Аннотация

Проведено исследование 30 больных с аутоиммунной хронической крапивницей (ХАК) и 15 здоровых лиц контрольной группы с целью изучения цитокиновых механизмов регуляции и основных показателей Т-клеток при этой патологии. Полученные данные характеризовались повышением CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, а также ИЛ-10, ИЛ-17, IFN- $\gamma$ , снижением ИЛ-4 и ИЛ-18 у больных ХАК, что подтверждает аутоиммунный процесс с активацией Th1 популяции лимфоцитов. Длительный хронический воспалительный процесс в коже при сочетании с аутоиммунной патологией в определенный момент могут приводить к несбалансированной продукции как про-, так и противовоспалительных цитокинов, что в конечном итоге, способствует дальнейшей активации процесса у больных ХАК.

### Ключевые слова

Цитокины, иммунный статус, хроническая аутоиммунная крапивница

### Summary

The aim of this study was to assess role of cytokines and T-cells in the development of chronic autoimmune urticaria. We have examined 30 patients with chronic autoimmune urticaria and 15 control group. Our results indicate that the patients with chronic autoimmune urticaria has specific change in parameters of T-lymphocyte (mainly CD4), had higher levels IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$  and lower IL-4, IL-18, that disbalance of cytokines profile connected with Th1. We propose that such changes play a regulatory role in the development of chronic autoimmune urticaria.

### Key words

Cytokines, immune status, chronic autoimmune urticaria

### Введение

Проблема хронической крапивницы (ХК) на сегодняшний день остается одной из сложнейших в клинической аллергологии. По распространенности ХК занимает третье место после поллиноза и бронхиальной астмы и составляет от 0,1% до 5% [1, 2]. У 70-80% ХК причина остается неизвестной - хроническая идиопатическая крапив-

ница (ХИК). Аутоиммунная форма крапивницы (ХАК) составляет 35-40% от ХИК и является наиболее тяжелой формой заболевания.

Иммунологические механизмы с участием Th1, Th2, Th17 и продуцируемые этими клонами регуляторных цитокинов в патогенезе ХАК являются ведущими и менее изученными. Имеющиеся немногочисленные данные по это-

му вопросу, свидетельствуют о несбалансированности хелперных клонов лимфоцитов, приводящих к развитию аутоиммунных заболеваний [3]. Так, в ряде работ показано, что в ходе иммунного ответа при аутоиммунных нарушениях происходит нарушение двух взаимосвязанных процессов, а именно: активация CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов Th1 типа, характеризующаяся избыточным синтезом ИЛ-2, IFN- $\gamma$ , ИЛ-17, с одновременным повышением цитокинов Th2 типа [4]. Более того, по мнению некоторых авторов при аутоиммунных процессах происходит нарушение иммунологической толерантности клонов Т- и В-лимфоцитов к аутоантигенам, в результате чего запускается механизм развития воспаления и происходит повреждение собственных тканей организма [5]. Огромную роль в этом процессе играют нарушение синтеза цитокинов. Есть исследования иностранных авторов, показывающие, что хронически высокий уровень IFN- $\gamma$ , как и дефицит IFN- $\alpha$  могут привести к образованию аутоантигенов и развитию аутоиммунного заболевания [6,7]. Однако, на основании других исследований доказана роль цитокинов ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-18, подавляющих этот процесс [8]. Приведенные публикации были посвящены изучению цитокинов в кровотоке без анализа выработки цитокинов в ситуациях, сопряженных с дисбалансом регуляторных факторов, а именно в цельной крови без выделения мононуклеарных клеток. Однако в последние годы активно развивается новое направление в современной иммунодиагностике – метод *ex vivo*, позволяющий оценивать спонтанную продукцию цитокинов клетками крови, и индуцированную продукцию, отражающую потенциальные возможности активации клеток [9].

**Цель работы:** оценка состояния иммунной системы по показателям клеточного иммунитета, уровню сывороточных цитокинов, а также спонтанная и индуцированная продукция клетками крови цитокинов методом *ex vivo* у больных ХАК.

### Материалы и методы

Было обследовано 30 пациентов ХАК в возрасте от 23 до 68 лет (49 $\pm$ 11). В контрольную группу были включены 15 практически здоровых людей, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой. Диагноз ХАК устанавливался на основании жалоб, данных анамнеза, клинической картины, длительности заболевания, анализа данных сопутствующих заболеваний.

Для подтверждения диагноза ХАК всем пациентам ставилась проба с аутосыывороткой [10]. В исследовании были взяты пациенты, имеющие положительную пробу с аутосыывороткой диаметром 7 мм и более, который является диагностическим критерием ХАК [11].

Материалом для исследования служили клетки периферической крови, супернатант стимулированных клеток и сыыворотка крови пациентов и здоровых лиц контрольной группы.

Имунофенотипирование субпопуляций Т-лимфоцитов проводили методом непрямой мембранной иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител серии ИКО (ООО «Сорбент», г. Москва). Цитокины ИЛ-4, IFN- $\gamma$ , ИЛ-10, ИЛ-17, ИЛ-18 в сыыворотке и супернатанте стимулированных клеток проводили методом ИФА и наборами (ЗАО Вектор-Бест, г. Новосибирск). Супернатант стимулированных клеток для исследования получали по методу [12].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica» версии 6,0. Для сравнения значений использовали метод числовых характеристик по критерию Манна-Уитни с оценкой распределения переменных. Связь показателей с помощью корреляционного анализа оценивали по методу Спирмана [13].

### Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показателей клеточного иммунитета и результатов ключевых цитокинов у больных ХАК выявили следующие изменения (табл.1). Из данных таблицы следует, что абсолютное содержание CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, а также относительное количество CD8<sup>+</sup> лимфоцитов достоверно не отличалось от показателей контрольной группы, однако было получено статистически достоверное более высокое относительное количество CD4<sup>+</sup> лимфоцитов у больных ХАК по сравнению с контрольной группой ( $p=0,032$ ). Данный факт может свидетельствовать об активации хелперной популяции лимфоцитов при аутоиммунном процессе. Наши данные согласуются с исследованиями [14]. Как следствие активации CD4<sup>+</sup> популяции у больных ХАК, отмечено повышение ИРИ ( $p=0,029$ ). Изучение показателей ключевых цитокинов в сыыворотке крови у больных ХАК по сравнению с группой контроля показало характерные изменения, отражающие аутоиммунный процесс. Как следует из данных таблицы 1 у больных ХАК были достоверно по-

вышены показатели ИЛ-10 в сыворотке крови ( $p=0,001$ ), что говорит об активации аутоиммунного процесса. Однако спонтанная и ФГА-индуцированная продукция данного цитокина не отличалась от результатов контрольной группы. Противоположная тенденция наблюдалась по показателям ИЛ-4, которые были достоверно снижены в сыворотке у больных ХАК ( $p=0,0001$ ), и не отличались от показателей группы контроля в спонтанной и ФГА-индуцированной продукции. Этот факт можно объяснить тем, что в механизме аутоиммунного воспаления активируется преимущественно популяция Th1 лимфоцитов, угнетая показатели Th2 лимфоцитов. В нашей работе были получены достоверно сниженные показатели ИЛ-18 в сыворотке крови по сравнению с группой контроля ( $p=0,030$ ). Снижение показателей было получено и в спонтанной ( $p=0,0071$ ), и в ФГА-индуцированной продукции ( $p=0,0021$ ). Данный факт по показателям ИЛ-18 согласуется с результатами других

авторов, где не было получено достоверных данных повышения показателя ИЛ-18 у больных ХАК [14]. В нашей работе мы не получили достоверных изменений по показателям IFN- $\gamma$  в сыворотке крови, однако в супернатанте стимулированных клеток этот показатель был достоверно выше у больных ХАК по сравнению с контрольной группой как в спонтанной продукции IFN- $\gamma$  ( $p=0,0134$ ), так и в ФГА-стимулированной продукции IFN- $\gamma$  ( $p=0,000001$ ). Данный цитокин является зависимым от регуляции его ИЛ-18. Поэтому, скорее всего, снижение показателя IFN- $\gamma$  в нашей работе мы получили из-за низких показателей ИЛ-18.

Содержание ИЛ-17 в сыворотке у больных по сравнению с аналогичными данными у здоровых не имело значимых отличий, однако спонтанная продукция этого цитокина была достоверно выше ( $p=0,000004$ ), а ФГА-стимулированная продукция ИЛ-17 – достоверно ниже показателей контрольной группы ( $p=0,000058$ ). Та-

**Таблица 1. Показатели абсолютного и относительного содержания популяций Т-лимфоцитов и показатели цитокинов у больных с хронической аутоиммунной крапивницей и контрольной группы**

Показатели	Группы обследованных	
	Ме [LQ/UQ]	
	Группа больных ХАК (n=30)	Контрольная группа (n=15)
CD4, абсолютное кол-во $\times 10^9$ кл/л	1,32[0,91-1,64]	1,24[1,1-1,4]
CD8, абсолютное кол-во $\times 10^9$ кл/л	0,78[0,55-0,97]	0,81[0,66-0,95]
CD4, %	48,0 *[39,0 – 55,0]	42,0 [38,0 – 46,0]
CD8, %	19,5 [16,0 – 22,0]	22,0[(18,0 – 29,0)]
ИРИ	2,2 *[1,8 – 3,2]	1,8[1,5 – 2,2]
ИЛ 4 сыв., пг/мл	0 **[0 – 0,5]	4,6 [0,21 – 5,0]
ИЛ 4 сп., пг/мл	0,6 [0,1 – 4,8]	0,6[(0,2 – 1,8)]
ИЛ 4 ФГА, пг/мл	0,6 [0,1 – 5,1]	0,45 [0,24 – 1,2]
ИЛ 10 сыв., пг/мл	6,65*[(2,0 – 10,5)]	2,1 [0,5 – 3,5]
ИЛ 10 сп., пг/мл	11,1 [8,2 – 30,4]	13,5 [6,6 – 19,7]
ИЛ 10 ФГА, пг/мл	24,8[(13,2 – 47,9)]	23,5[0 – 40,0]
ИЛ 17 сыв., пг/мл	0[(0 – 7,1)]	0[(0 – 1,2)]
ИЛ 17 сп., пг/мл	58,3 **[53,0 – 98,1]	2,4[1,0 – 10,0]
ИЛ 17 ФГА, пг/мл	73,65 **[55,9 – 105,0]	422,0 [70,0 – 1500,0]
ИЛ 18 сыв., пг/мл	73,55*[(53,2 – 124,1)]	115,6 [74,9 – 121,3]
ИЛ 18 сп., пг/мл	32,1 **[18,1 – 49,7]	50,0 [23,0 – 115,0]
ИЛ 18 ФГА, пг/мл	31,3 **[16,8 – 49,5]	50,0 [12,0 – 120,0]
ИФН- $\gamma$ сыв., пг/мл	0 [0 – 19,6]	0,5 [0 – 7,1]
ИФН- $\gamma$ сп., пг/мл	16,4*[4,5 – 58,0]	4,0 [0 – 14,0]
ИФН- $\gamma$ ФГА, пг/мл	121,5 **[28,5 – 357,4]	1200,0 [165,0 – 7450,0]

\* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ;

Сыв. – содержание цитокинов в сыворотке;

Сп. – содержание цитокинов в супернатанте при спонтанной продукции клетками;

ФГА – содержание цитокинов в супернатанте при ФГА- индуцированной продукции клетками.

кая разнонаправленность полученных данных еще лишней раз доказывает участие Th17 наряду с Th1 популяций лимфоцитов в патогенезе аутоиммунных заболеваний. Истинный смысл полученных результатов будет известен только после дальнейших глубоких исследований роли Th17 в патогенезе аутоиммунных заболеваний, а также у больных ХАК.

Корреляционный анализ с определением ранговой корреляции Спирмана (табл. 2)

позволил установить в группе больных ХАК статистически достоверно более высокие корреляционные коэффициенты между CD4+ и ИЛ-17 ( $r=0,72$ ,  $p=0,0076$ ), также между показателями ИЛ-18 (спонтанная продукция) и ИЛ-4 стимулированная ФГА ( $r=0,59$ ,  $p=0,023$ ), и между IFN- $\gamma$  (спонтанная продукция) и IFN- $\gamma$  ФГА-индуцированная, и отсутствие такой связи в контрольной группе.

**Таблица 2. Уровень корреляции между показателями цитокинов и относительным содержанием лимфоцитов у больных с хронической аутоиммунной крапивницей и контрольной группы**

Показатели	Коэффициент корреляции, r (p)	
	Контрольная группа (n=15)	Опытная группа (n=30)
ИЛ4/ИЛ4 сп.	+0,67 (p=0,0084)	
ИЛ4/ИЛ4 ФГА	+0,64 (p=0,013)	
ИЛ4 сп/ ИЛ4 ФГА	+0,75 (p=0,0016)	
CD4/ИЛ17 ФГА		+0,72 (p=0,007)
ИЛ18 сп/ИЛ4 ФГА		+0,59 (p=0,023)
ИЛ18 ФГА/ИЛ4 ФГА		+0,82 (p=0,0003)
ИФН- $\gamma$ сп/ ИФН- $\gamma$ ФГА		+0,68 (p=0,028)

### Вывод

Таким образом, полученные данные у больных ХАК характеризуются повышением CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, а также повышением ИЛ-10, ИЛ-17, IFN- $\gamma$ , снижением ИЛ-4 и ИЛ-18, что подтверждает аутоиммунный процесс с активацией Th1 популяции лимфоцитов. Вероятно,

смысл полученных результатов сводится к тому, что длительный хронический воспалительный процесс в коже при сочетании с аутоиммунной патологией в определенный момент приводят к неуправляемой продукции как про-, так и противовоспалительных цитокинов, способствуя дальнейшей активации процесса.

### Литература

1. Груздева М.С., Данилычева И.В., Болдырева М.Н. Хроническая идиопатическая крапивница. Некоторые аспекты диагностики аутоиммунных нарушений. *Росс. аллергол. ж.* 2006; 6: 36-41.
2. Курбанова А.А., Знаменская Л.Ф., Кохан М.М. и др. Крапивница: Клинические рекомендации; 2007, 36 с.
3. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии. М.: «ГЭОТАР – Медиа»; 2009, 345 с.
4. Тыртышная Г.В., Парохонский А.П. Взаимосвязь нарушений иммунной и эндокринной систем при аутоиммунной патологии. *Современные наукоемкие технологии;* 2007; 2: 80-81.
5. Davidson A, Diamond B. Autoimmune disease. *New. Engl. Med.* 2001; 345: 340-50.
6. Skyrkovich SV, Skyrkovich SS, Kelly JA. Anticytokine therapy – new approach to the treatment of autoimmune and cytokine – disturbance diseases. *Medical Hypotheses.* 2002; 59(6): 770-80.
7. Dos Santos JC, Azor MH, Nojima VY, Lourenco FD, et al. Increased circulating pro-inflammatory and imbalanced regulatory T-cell. *Int Immunopharmacol.* 2008; 8 (10): 1433-40.
8. Gin CY, Wang DL, Fang ZD. Effect of integrative Chinese and Western medicine in treating chronic urticaria and its impact on interleukin-10 and interleukin-8 in peripheral blood. *Zhongguo zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 2008; 28(4): 358-60.

9. Рыжикова С.Л., Дружинина Ю.Г., Рябичева Т.Г. и соавт. Стандартизация методики определения продукции цитокинов клетками крови *ex vivo*. Клиническая лабораторная диагностика. 2011; 11: 49-53.
10. Hide M., Francis DM., Grattan CE. et al. Autoantibodies against the high-affinity IgE receptor as a cause of histamine release in chronic urticaria. *N. Engl. J. Med.* 1993; 328: 1599-1604.
11. Больц Е.А. Методы диагностики аутоиммунной крапивницы и эффективность лечения с использованием отечественного препарата «Габриглобин IgG». Дисс.... канд. мед. наук: 14.03.09. Пенза – Москва, 2012; 138 с.
12. Исаченко Е.Г., Виткина Т.И., Бердышев Е.В. Патент № 2192008 (РФ). Способ прогнозирования развития аллергопатологии на доклиническом этапе. *Бюлл.* 2002; 30: 10 с.
13. Халафян А.А. Статистический анализ данных. М., 2006.
14. Marta Ferrer<sup>1</sup> and Allen P Kaplan<sup>2</sup>. Progress and Challenges in the Understanding of Chronic Urticaria. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology.* 2007; 3: 31-35.

#### Сведения об авторах:

Баранова Надежда Ивановна – ведущий научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории, ассистент кафедры аллергологии и иммунологии ГБОУ ДПО ПИУВ Минздрава России, д.б.н., доцент.

440060 Россия, г. Пенза, ул. Стасова 8 А, ЦНИЛ, кафедра аллергологии и иммунологии.

Тел.: 8 (841-2) 43-43-57, факс 8 (841-2) 96-45-44, 8 (841-2) 43-58-97

E-mail: giuv@sura.ru

Ащина Людмила Андреевна – аспирант кафедры аллергологии и иммунологии ГБОУ ДПО ПИУВ Минздрава России.

Орлова Екатерина Александровна – ассистент кафедры аллергологии и иммунологии ГБОУ ДПО ПИУВ Минздрава России, к.м.н.

Поступила 6.12.2012 г.