

Значення регуляторних Т-лімфоцитів у розвитку atopічного дерматиту у дітей

Чернишов П.В.

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ

РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-ЛИМФОЦИТЫ У ДЕТЕЙ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ И ИХ МЕСТО В МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА Чернышов П.В.

Клинический показатель SCORAD и уровни CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo} T-лимфоцитов были определены у детей с atopическим дерматитом. Обнаружены повышенные уровни CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo} T-лимфоцитов и их позитивная корреляция с показателем SCORAD, внутриклеточной продукцией интерлейкина-4 и интерферона-гамма, экспрессией CCR4 и CD28 T-лимфоцитами.

REGULATORY T-LYMPHOCYTES IN CHILDREN WITH ATOPIC DERMATITIS AND THEIR ROLE IN DEVELOPMENT OF IMMUNOPATHOLOGIC PROCESS Chernyshov P.V.

The clinical SCORAD-index and levels of CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo} T-lymphocytes have been determined in children with atopic dermatitis. The increased levels of CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo} T-lymphocytes and their positive correlation with SCORAD-index, intracellular production of IL-4 and IFN-gamma and expression of CCR4 and CD28 by T-cells have been revealed.

Атопічний дерматит (АД) є одним з найбільш розповсюджених захворювань шкіри. Захворюваність на АД серед дітей та дорослих молодого віку сягає 15 % [4]. Рівновага між алергією та толерантністю в значній мірі залежить від регуляторних Т-лімфоцитів. Індукована алерген-специфічними регуляторними Т-клітинами толерантність є нормальною імунологічною відповіддю на дію алергенів у здорових осіб, що не мають схильності до atopії. Таким чином, у здорових осіб зберігається нормальна функціональна відповідь алерген-специфічних регуляторних Т-лімфоцитів, а у осіб, схильних до atopії, така відповідь є порушеною. Це підтверджувалось у хворих на астму, алергічний риніт, контактний дерматит та АД. Відповідно, відновлення порушеної алерген-специфічної відповіді регуляторних Т-лімфоцитів та досягнення толерантності вважається надзвичайно важливим для досягнення гарних результатів лікування означених хвороб [16].

Спочатку регуляторні Т-лімфоцити було знайдено у мишей, а вже потім популяції регуляторних Т-лімфоцитів було ізольовано з периферичної крові, тимусу, лімфатичних вузлів та пуповинної крові людини. Проте, функ-

ціонально ці клітини у мишей та людей майже не розрізняються [1]. Утворення натуральних регуляторних Т-лімфоцитів у тимусі потребує фактору транскрипції *Foxp3*; також значну роль в їх утворенні відіграють:

- головний комплекс гістосумісності клас 2;
- власні ліганди, що експресуються клітинами епітелію;
- тимічний стромальний лімфопоетин.

Foxp3 пригнічує IL-2 та інші цитокіни, підтримує анергію та супресивну функцію регуляторних Т-лімфоцитів. За рахунок різних супресивних механізмів регуляторні Т-лімфоцити впливають на багато інших клітин (Т-лімфоцити, В-лімфоцити, дендритні клітини, натуральні кілери). У свою чергу, на проліферацію та функцію регуляторних Т-лімфоцитів впливають ліганди тол-лайн рецепторів та інші чинники [12]. Так, доведено, що механізм коstimуляції CD28 є важливим для розвитку та існування Т-регуляторних клітин [14, 15]. Регуляторні Т-клітини мають властивість експресувати рецептори, що відповідають за рух клітин, зокрема хемокіновий рецептор CCR4, який відповідає за хомінг до шкіри [6, 8].

Одним з найбільш показових маркерів регу-

ляторних *T*-лімфоцитів є фактор транскрипції *Foxp3*. Існує також декілька інших типів регуляторних *T*-лімфоцитів; більшість з них виникає у відповідь на антигенну стимуляцію. На деяких з них наявна експресія *Foxp3*, а на інших – ні [13].

На початковому етапі регуляторні *T*-лімфоцити спробували визначати за наявністю експресії маркера *CD25* (інтерлейкін-2 рецептор) на поверхні *CD4+* лімфоцитів. Це виявилось проблематичним, бо маркер *CD25* мають також *T*-лімфоцити, які не є регуляторними клітинами, наприклад, під час активації імунної відповіді. Отже, лише частина клітин з фенотипом *CD4+CD25+* є регуляторними клітинами. Додаткове застосування вимірювання експресії *Foxp3* дозволило більш надійно ідентифікувати регуляторні *T*-лімфоцити (*CD4+CD25+Foxp3+* *T*-лімфоцити). Однак, *Foxp3* також тимчасово експресується на ефекторних *T*-лімфоцитах людини, які не є регуляторними клітинами. Саме через це, для більш точної ідентифікації регуляторних *T*-лімфоцитів вчені використовують відсутність, або низьку експресію поверхневого протеїну *CD127* (рецептор інтерлейкіну-7) у комбінації з наявністю маркерів *CD4* та *CD25* [17]. Експресія рецептора інтерлейкіну-7 (*CD127*) зворотно корелює з експресією *Foxp3* та супресивною функцією *T*-лімфоцитів-хелперів у людини. Виходячи з цього, було доведено, що *T*-лімфоцити-хелпери з низькою або негативною експресією *CD127* та високою експресією *CD25* є регуляторними *T*-лімфоцитами (*CD4+CD25^{high-intermediate}CD127^{low-negative}*) [9].

Регуляторні *T*-лімфоцити регулюють або пригнічують не тільки алергію, але й інші класи імунної відповіді, наприклад, відторгнення трансплантату, імунологія пухлин та проти-мікробна відповідь [18].

Вивчення значення регуляторних *T*-лімфоцитів при АД є актуальною темою. Так, Saragoni *et al* у своїй роботі визначали наявність регуляторних *T*-лімфоцитів у враженій шкірі хворих на АД та здорових волонтерів. У шкірі хворих на АД регуляторні *T*-лімфоцити знаходили у великих кількостях у сосочковому шарі дерми, періваскулярно та, у меншій кількості, у базальному шарі епідермісу. У зразках шкіри здорових волонтерів було знайдено поодинокі регуляторні *T*-лімфоцити, що інфільтрували обидва шари дерми [3].

Група американських вчених виявила вірогідне збільшення регуляторних *T*-лімфоцитів у

периферичній крові дорослих хворих на АД, у порівнянні з хворими на бронхіальну астму та здоровими донорами. Ці ж дослідники показали, що:

- у хворих на АД клітини з маркерами, що відповідають за хомінг до шкіри, частіше експресували властиві регуляторним *T*-лімфоцитам маркери, ніж такі клітини у хворих на бронхіальну астму та у здорових донорів;

- хворі на АД мали підвищені рівні регуляторних *T*-лімфоцитів з нормальною імуносупресивною активністю, але після стимуляції суперантигеном ці клітини втрачали свою імуносупресивну активність.

На підставі отриманих даних дослідники припускають наявність механізму, за рахунок якого суперантигени змінюють активацію *T*-лімфоцитів у пацієнтів з АД [11].

У дослідженні японських вчених рівні регуляторних *T*-лімфоцитів у периферичній крові дорослих хворих на АД також були вірогідно вищими, ніж у осіб без атопії. Цими ж вченими у хворих на АД була встановлена кореляція регуляторних *T*-лімфоцитів з клінічним показником *SCORAD* та рівнями еозинофілів у периферичній крові. Досліджувані клітини як у хворих на АД, так і в здорових донорів мали слабку здатність до продукції інтерферону-гамма та інтерлейкіну-4. Також не було знайдено відмінностей у супресивних здатностях регуляторних *T*-лімфоцитів між хворими на АД та здоровими донорами. При цьому, рівні регуляторних *T*-лімфоцитів у хворих на АД знижувались після покращення клінічних проявів на шкірі [7].

Берлінські вчені досліджували регуляторні *CD4+CD25+CD127^{low}* *T*-лімфоцити у хворих на АД, які лікувалися низькими дозами циклоспорину *A*. За їх даними, у хворих на АД, що лікувалися циклоспорином *A*, рівні регуляторних *T*-лімфоцитів були вірогідно вищими, ніж у групи здорових донорів. Вчені повідомили також про зниження здатності *T*-лімфоцитів до активації та вірогідне підвищення відсоткових та абсолютних рівнів регуляторних *CD4+CD25+CD127^{low}* *T*-лімфоцитів після початку застосування хворими циклоспорину *A*. Супресивні властивості *T*-регуляторних клітин у пацієнтів з АД не відрізнялися від таких у здорових донорів, але мали властивості хомінгу до шкіри. Автори вказаного дослідження, навіть, пояснюють механізм дії циклоспорину *A* при АД за рахунок впливу на регуляторні *T*-лімфоцити [2]. Даних про дослідження

$CD4+CD25+CD127^{low}$ регуляторних Т-лімфоцитів у дітей практично не існує, тоді як відомо, що АД у переважній більшості випадків починається з раннього дитячого віку.

Мета дослідження – визначити рівні регуляторних Т-лімфоцитів у хворих на АД дітей, перевірити наявність кореляційних зв'язків цих клітин з тяжкістю клінічних проявів дерматозу, внутришньоклітинною продукцією цитокінів, маркерами клітинного хомінгу та коstimуляції.

Матеріали та методи дослідження. Ми спостерігали хворих на АД дітей, діагноз яким встановлювався на підставі критеріїв запропонованих Hanifin та Rajka [5]. Для об'єктивізації тяжкості клінічних проявів АД застосовували клінічний інтегральний показник *SCORAD*. Підрахунок показника *SCORAD* проводився за стандартною методикою [13]. Обстеження проводилося перед початком лікування. У всіх дітей визначали рівні регуляторних клітин з фенотипом $CD4+CD25^{high-intermediate}CD127^{low-negative}$ (у подальшому цитуванні $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$), $CD3/CD4/CCR4$, $CD3/CD28/CD57$, внутришньоклітинну продукцію Т-лімфоцитами-хелперами інтерлейкіну-4 та інтерферону гамма за допомогою багатокольорової проточної цитометрії у периферичній крові. В якості контролю використовували показники 11 дітей такого ж віку без ознак atopії. На обстеження дітей та використання результатів для аналізу і публікацій було отримано згоду батьків.

Результати досліджень оброблялися методами математичної статистики. Для оцінки вірогідності різниці показників дітей з АД від групи контролю застосовували непарний *t* тест з поправками Велча. Різницю показників вважали вірогідною при $P < 0,05$. Кореляційні зв'язки визначали за допомогою непараметричного методу за Спірманом.

Результати досліджень та їх обговорення. Середній рівень регуляторних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ у периферичній крові хворих на АД дітей дорівнював $213,32 \pm 17,18 \times 10^6$ клітин/л. Відсотковий рівень цих клітин у хворих на АД пацієнтів дорівнював $8,90 \pm 0,33$ %. Середнє значення клінічного показника *SCORAD* у обстежених нами дітей з АД дорівнювало $26,11 \pm 2,46$.

Відсоткові значення регуляторних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ вірогідно корелювали з віком дітей хворих на АД ($r = 0,50$; $P < 0,01$). Абсолютні значення регу-

ляторних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ не мали статистично вірогідної кореляційної залежності з віком обстежених пацієнтів, але вірогідно корелювали з клінічним показником *SCORAD* ($r = 0,33$; $P < 0,05$).

Встановлено статистично вірогідну кореляцію абсолютних показників регуляторних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ з:

- рівнями внутришньоклітинної продукції інтерлейкіну-4 ($P < 0,01$), інтерферону-гамма ($P < 0,05$);

- експресією хемокінового рецептору *CCR4* ($P < 0,001$) Т-лімфоцитами-хелперами, коstimулюючою молекулою *CD28* на Т-лімфоцитах ($P < 0,001$).

Середнє значення відсоткового рівня регуляторних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ у дітей без atopії дорівнювало $8,08 \pm 0,88$ %, а середнє абсолютне значення цих клітин дорівнювало $146,82 \pm 14,02 \times 10^6$ клітин/л.

Абсолютні значення регуляторних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ були вірогідно вищими у дітей, хворих на АД, ніж у дітей без atopії ($P < 0,01$). Відсоткові значення регуляторних Т-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int}CD127^{lo}$ також були вищими у дітей, хворих на АД, але різниця не сягнула межі статистичної вірогідності.

Збільшена кількість регуляторних Т-лімфоцитів у периферичній крові хворих на АД дітей, яку ми встановили у своїй роботі, є додатковою підтримкою результатів інших дослідників, що показали підвищені рівні регуляторних Т-лімфоцитів як у периферичній крові, так й безпосередньо у вогнищах висипань на шкірі дорослих пацієнтів з АД. Сама наявність підвищеного рівня регуляторних Т-лімфоцитів у хворих на АД вказує на потенційно підвищений рівень захисту від розвитку аутоімунних та інфекційних процесів у таких хворих. У той же час, дані світової наукової літератури щодо розповсюдженості мікробних та аутоімунних процесів серед хворих на АД свідчать скоріше про зворотне. Виходячи з того, що, незважаючи на підвищений у хворих на АД рівень регуляторних Т-лімфоцитів, захворюваність на аутоімунні та інфекційні захворювання серед них щонайменше не нижча, ніж у популяції в цілому, можливо зробити висновок, що виникнення atopії в жодному разі не зводиться до простої нестачі регуляторних Т-лімфоцитів. Натомість, можливо припустити, що у хворих на АД регу-

ляторні *T*-лімфоцити мають певні відмінності у своїх властивостях, або що при atopії виникають такі реакції, які потребують компенсаторного збільшення цих клітин. Відомі на сьогодні спроби знайти які-небудь відмінності у властивостях регуляторних *T*-лімфоцитів хворих на АД та осіб без atopії не були успішними.

Встановлена нами пряма кореляційна залежність рівнів регуляторних *T*-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int} CD127^{lo}$ з віком пацієнтів вказує на постійне зростання цих клітин разом із розвитком дитини та, зокрема, розвитком її імунної системи. Такий результат повністю вкладається в сучасне уявлення щодо функцій регуляторних *T*-клітин, бо з віком набагато збільшується ризик виникнення та розвитку в організмі аутоімунних процесів, неухильно зростає й кількість мікробних агентів, з якими контактує людина і на які виникає певна імунна відповідь.

Відносно низький рівень кореляційної залежності між рівнями регуляторних *T*-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int} CD127^{lo}$ та тяжкістю клінічних проявів АД на шкірі хворих вказує на те, що вказані клітини не є ранніми маркерами запалення при АД. Отже, збільшення кількості регуляторних *T*-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int} CD127^{lo}$ у хворих на АД дітей обумовлено не стільки інтенсивністю запальної реакції у даний період часу, а скоріше наявністю у пацієнтів схильністю до atopії як такої. Тобто, згадана нами схильність до atopії проявляється в організмі-власнику, зокрема, у вигляді низької імунологічних реакцій, які є відмінними від таких у осіб без atopії. Одним з наслідків цього і є встановлене нами підвищення рівнів регуляторних *T*-лімфоцитів з фенотипом $CD4+CD25^{hi-int} CD127^{lo}$ у хворих на АД дітей. Таким чином, можливо припустити, що підвищення регуляторних *T*-лімфоцитів у більшій мірі пов'язане саме з хронічним перебігом АД, а не з періодичними загостреннями цього захворювання.

У цьому сенсі важливим є проведене в нашій роботі дослідження зв'язків регуляторних *T*-лімфоцитів з іншими важливими ланками імунопатологічного процесу при АД, зокрема, кореляція рівнів регуляторних клітин з рівнями

внутрішньоклітинної продукції:

- властивого для імунної відповіді *T*-хелперів другого типу цитокіну – інтерлейкіну-4;
- властивого для імунної відповіді *T*-хелперів першого типу цитокіну – інтерферону-гамма.

Більш виражена кореляція виявилася саме з внутрішньоклітинною продукцією інтерлейкіну-4, що відображає притаманний АД тип відповіді *T*-хелперів другого типу. Про наявність потужного зв'язку регуляторних *T*-лімфоцитів з імунною відповіддю *T*-хелперів другого типу свідчить й кореляція цих клітин з експресією властивого для відповіді *T*-хелперів другого типу хемокінового рецептору *CCR4* на *T*-лімфоцитах-хелперах. Наявність такої кореляційної залежності вказує на те, що чим більше синтезується регуляторних *T*-лімфоцитів, тим більше їх спрямовується до уражених ділянок на шкірі пацієнтів. У свою чергу, потужна кореляція рівнів регуляторних *T*-лімфоцитів з експресією молекули *CD28* доводить на практиці важливість механізму коstimуляції *CD28* для синтезу регуляторних *T*-лімфоцитів при АД.

Отримані нами дані у сукупності з даними наукової літератури дають підстави зробити висновки про те, що кількість регуляторних *T*-лімфоцитів у хворих на АД теоретично може знижуватися при відтворенні стану толерантності і, відповідно, послабленні atopії, але це зниження є вторинним явищем і не повинно бути значним у порівнянні з рівнями регуляторних *T*-лімфоцитів у осіб без atopії. Значне ж падіння рівнів регуляторних *T*-лімфоцитів є небезпечним через підвищення ризику виникнення аутоімунних, інфекційних хвороб та порушення протиопухлинного імунітету. Це, у свою чергу, доводить небезпечність та, ймовірно, недоцільність застосування медикаментозних засобів, вибірково спрямованих проти регуляторних *T*-лімфоцитів у хворих на АД. Скоріш за все, можливий терапевтичний результат від застосування таких засобів буде значно нижчим за можливі побічні ефекти, пов'язані насамперед з порушенням захистом від аутоімунних та інфекційних процесів. Важливим науковим та практичним завданням є дослідження впливу існуючих терапевтичних засобів на динаміку регуляторних *T*-лімфоцитів у хворих на АД.

ЛІТЕРАТУРА

1. Baecher-Allan C., Viglietta V., Hafler D.A. Human $CD4+CD25+$ regulatory T cells // *Semin. Immunol.* – 2004. – Vol. 16, No 2. – P. 89-98.
2. Brandt C., Pavlovic V., Radbruch A. et al. Low-dose cyclosporine A therapy increases the regulatory T cell population in patients with

- atopic dermatitis // *Allergy*. – 2009. – Vol. 64, No 11. – P. 1588-1596.
3. *Caproni M., Antiga E., Torchia D. et al.* FoxP3-expressing T regulatory cells in atopic dermatitis lesions // *Allergy Asthma Proc.* – 2007. – Vol. 28, No 5. – P. 525-528.
 4. *Darsow U., Wollenberg A., Simon D. et al.* ET-FAD/EADV eczema task force 2009 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis // *JEADV*. – 2010. – Vol. 24. – P. 317-328.
 5. *Hanifin J., Rajka G.* Diagnostic features of atopic dermatitis // *Acta Derm. Venereol.* - 1980. - Vol. 92. - P. 44.
 6. *Hirahara K., Liu L., Clark R.A. et al.* The majority of human peripheral blood CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells bear functional skin-homing receptors // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177. – P. 4488–4494.
 7. *Ito Y., Adachi Y., Makino T. et al.* Expansion of FOXP3-positive CD4+CD25+ T cells associated with disease activity in atopic dermatitis // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2009. – Vol. 103, No 2. – P. 160-165.
 8. *Lim H.W., Broxmeyer H.E., Kim C.H.* Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3+ regulatory T cells // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177. – P. 840–851.
 9. *Liu T., Putnam A.L., Xu-yu Z. et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ Tregs // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203. – P. 1701-1711.
 10. *Ou L.S., Goleva E., Hall C., Leung D.Y.* T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2004. – Vol. 113, No 4. – P. 756-763.
 11. *Raimondi G., Turner M.S., Thomson A.W., Morel P.A.* Naturally occurring regulatory T cells: recent insights in health and disease // *Crit. Rev. Immunol.* – 2007. – Vol. 27, No 1. – P. 61-95.
 12. *Rouse B.T.* Regulatory T cells in health and disease // *J. Int. Med.* – 2007. – Vol. 262, No 1. – P. 78-95.
 13. *Severity* scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic dermatitis // *Dermatology*. – 1993. - Vol. 186. – P. 23-31.
 14. *Tai X., Cowan M., Feigenbaum L., Singer A.* CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2 // *Nat. Immunol.* – 2005. – Vol. 6. – P. 152–162.
 15. *Tang Q., Henriksen K.J., Boden E.K. et al.* Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171. - P. 3348-3352.
 16. *Hertzen von L.C., Savolainen J., Hannuksela M. et al.* Scientific rationale for the Finnish Allergy Programme 2008-2018: emphasis on prevention and endorsing tolerance // *Allergy*. – 2009. – Vol. 64, No 5. – P. 678-701.
 17. *Wikipedia* contributors. Regulatory T cell. Wikipedia, The Free Encyclopedia. Oct. 10, 2009, 01:37 UTC. Available at: http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Regulatory_T_cell&oldid=318983121
 18. *Yamazaki S., Steinman R.M.* Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3+ regulatory cells // *J. Dermatol. Sci.* – 2009. – Vol. 54, No 2. – P. 69-75.