

А.І. Березнякова, В.Ф. Черемісіна, О.Д. Жемела

Особливості стану гуморального та клітинного імунітету у щурів з алергічним дерматитом

У роботі вивчено показники гуморального та клітинного імунітету у щурів з алергічним дерматитом: імуноглобулінів (Ig) класу А, Е, G, М; циркулюючих імунних комплексів (ЦІК); зрілих Т-лімфоцитів, хелперних, супресорних, В-лімфоцитів, недиференцованих лімфоцитів. Встановлено, що у щурів з алергічним дерматитом найбільш активна гуморальна ланка імунітету. Однією з ланок патогенезу цього захворювання є підвищення вмісту ЦІК у крові та зниження Т-хелперів у загальній кількості Т-лімфоцитів. Інформаційним показником з високим рівнем кореляції є IgE, що підтверджує доцільність його визначення в плазмі крові при гострому дерматиті для характеристики лімфоцитів-маркерів апоптозу та прогнозу захворювання. Визначена негативна кореляційна залежність між концентраціями СД95 – маркера апоптозу і IgE в групі здорових і хворих тварин може свідчити про участь системи апоптозу в регуляції продукції загального IgE.

Ключові слова: алергічний дерматит, імуноглобуліни, циркулюючі імунні комплекси.

ВСТУП

Незважаючи на значні успіхи, які досягнуті у вивченні патогенезу запальних захворювань шкіри, проблема діагностики і лікування дерматитів залишається актуальною. Оскільки, на відміну від системних змін, дослідженню яких присвячено багато праць [1–4], особливостям місцевого імунітету при дерматитах приділяється значно менше уваги як клініцистів, так і експериментаторів [5]. Водночас патогенетично значущі відхилення відбуваються саме на топічному рівні [6, 7]. Дані багатьох досліджень свідчать про важливе місце у розвитку запального процесу у шкірі імунних реакцій, опосередкованих Т-лімфоцитами [8–10]. Зокрема, встановлено підвищення вмісту Т-хелперів (СД4) та Т-супресорів (СД8) лімфоцитів у шкірі хворих на псоріаз в порівнянні зі здоровою шкірою. Однак дані досить суперечливі: деякі автори відмічають надлишок СД4-лімфоцитів, інші – СД8 [9, 10]. Важливе місце в патогенезі алергічних захворювань відводять і циркулюючим імунним комплексам (ЦІК). Встановлено, що

вони формуються після кожної зустрічі антигена з антитілом та порушуються зусиллями мононуклеарних фагоцитів по закінченні активації комплементу [11–13]. Формування ЦІК являє собою фізіологічні механізми захисту, наслідком яких є швидке усунення як ендогенних, так і екзогенних антигенів (віруси, мікроорганізми, антигени, гриби тощо) ретикуло-ендотеліальною системою. Підвищення вмісту ЦІК у різноманітних біологічних середовищах, наприклад, у сироватці крові спостерігається при багатьох запальних захворюваннях і тому їх визначення є важливим показником при оцінці загального стану організму.

Мета нашої роботи – вивчити патогенетичні особливості показників гуморального та клітинного імунітету у щурів з алергічним дерматитом.

МЕТОДИКА

Експерименти проведено на 30 нелінійних щурах-самцях, масою 180,0–200,0 г, які зна-

ходилися в умовах віварію на однаковому харчовому та водному режимах. Тварини були розподілені на 2 групи. До I контрольної групи ввійшли 10 інтактних тварин, до II групи – 20 тварин з модельованим алергічним дерматитом [14].

Для дослідження показників імунної системи використовували кров з хвостової вени щурів, яку відбирали вранці натщесерце (у тварин в клітках на ніч забирали залишки їжі та води). В крові визначали такі показники: вміст імуноглобулінів (Ig) класу А, Е, G, М; ЦІК, кількість зрілих Т-лімфоцитів (СД3), хелперних (СД4), супресорних (СД8), загальну кількість В-лімфоцитів (СД19), недиференційованих лімфоцитів (СД56). Дослідження проводили за методикою, яка додавалася до цієї панелі моноклональних антитіл. Мікроскопію виконували на мікроскопі фірми «Люам РІ». Алергічний дерматит викликали введенням 2,4-динітрохлорбензолу (ДНХБ): 3 краплі 5%-го його розчину одноразово у вигляді аплікації наносили на місце сенсibiliзації (поверхня спини) з додатковим нанесенням на 7 інших ділянок шкіри по 1 краплі 1%-го розчину. У розвитку сенсibiliзації у щурів за клінічною та морфологічною картиною шкіри [15] розрізняли 2 етапи. Перший етап – первинно-контактна реакція (через 24 год) у вигляді обмежуваного набряку та гіперемії. Ця реакція має риси неспецифічного запалення з деякими ознаками початку розвитку сенсibiliзації. Другий етап (на 8-му добу) – спонтанна запальна реакція (реакція спалахування) з тотальним некрозом епідермісу та утворенням великих субепідермальних міхурів. Ця реакція розвинулася на основі ослаблення імунної системи та обов'язковим компонентом при цьому була інфільтрація з наявністю базофілів. Важкість алергічного дерматиту оцінювали за загальним станом і поведінкою тварин за ступенем розвитку дерматиту: 0 балів – видимих ушкоджень не спостерігалось; 1 бал – слабо виражена гіперемія з дрібнолускатим пошархненням; 2 бали – помірно виражена

гіперемія, злушення, крапчасті крововиливи; 3 бали – виражена гіперемія, виразки шкіри; 4 бали – різка еритема з явищами геморагій, вираженою інфільтрацією, виразками.

Усі дослідження проводили відповідно до національних «Загальноетичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2011), які узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), та схвалені 1-м Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) [16]. Усі маніпуляції, які викликали біль, здійснювали під барбаміловим наркозом. Одержані результати опрацьовані статистично за допомогою пакета програм Statistica for Windows 6.0 з використанням критерію t Стьюдента та кореляційного аналізу. Вірогідно значимою вважали різницю при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для вивчення інтенсивності імунологічних реакцій у щурів з алергічним дерматитом ми проаналізували показники клітинного і гуморального імунітету щодо значень інтактних тварин. При аналізі показників імунного статусу щурів з алергічним дерматитом встановлені зміни у фенотипі Т-клітин відносно контролю (табл. 1). Так, загальна кількість Т-лімфоцитів (СД3) значно знижена в групі щурів з алергічним дерматитом ($55,0 \pm 9,3$ щодо $62,4 \pm 5,0$; $P < 0,05$), що відображає дефіцит Т-клітинних механізмів захисту, які здійснюють імунологічний контроль за антигенним гомеостазом організму. Підрахунок відносного числа Т-хелперів (СД4) показав зниження і цієї популяції Т-лімфоцитів у щурів з дерматитом ($38,1 \pm 7,95$ щодо $42,3 \pm 9,5$; $P < 0,05$). Одночасно виявлена тенденція до незначного зниження числа Т-супресорів (СД8) ($28,6 \pm 9,0$ і $30,8 \pm 8,0$; $P < 0,05$). Кількість недиференційованих лімфоцитів (СД56) у щурів з алергічним дерматитом значно перевищувало аналогічні значення у тварин групи

Таблиця 1. Показники Т-клітинної ланки імунного стану периферичної крові (%) у щурів з алергічним дерматитом

Показники, %	Інтактні щури (n=10)	Щури з алергічним дерматитом (n=20)
Загальна кількість Т-лімфоцитів (СД3)	62,4±5,0	55,0±9,3*
Т-хелпери (СД4)	42,3±9,5	38,1±7,95*
Т-супресори (СД8)	30,8±8,0	28,6±9,0*
«Нульові» недиференцовані лімфоцити (СД56)	19,3±8,0	24,5±9,3*
Відношення Т-хелперів до Т-супресорів (СД4/СД8)	1,4±0,1	1,32±0,4

Примітка. Тут і в табл. 2 *P <0,05 у порівнянні з контролем.

контролю (24,5±9,3 щодо 19,3±8,0; P<0,05). Підвищення цього показника свідчило про напруженість імунітету у щурів з алергічним дерматитом.

Дослідження гуморальних факторів імунного статусу у тварин з дерматитом також виявило деякі відхилення в порівнянні з інтактними щурами (табл. 2). Кількість В-лімфоцитів мала тенденцію до збільшення (26,4±7,1 відносно 24,2±6,8; P>0,05). Важливе значення в оцінці гуморального імунітету має співвідношення популяцій у загальному пулі В-лімфоцитів. Нами встановлена дизімуноглобулінемія: зниження вмісту IgM і IgG та підвищення IgA. Вміст IgA сироватки крові у щурів з дерматитом складав 1,92±1,10 г/л щодо 1,4±0,25 г/л у інтактних тварин. Таке підвищення вмісту IgA на фоні зниження показників Т-ланки імунітету, скоріш всього, є компенсаторним та відображає поліклональну активацію В-системи імунітету.

Крім цього, нами відмічено збільшення

кількості ЦІК (67,0±16,6 щодо 41,3±16,7; P<0,05), що підтверджувало пряму їх причетність до розвитку запального процесу у шкірі тварин з дерматитом. Типовою для останніх була тенденція до зниження показників Т-клітинної ланки імунітету. Зниження кількості Т-лімфоцитів та їх субпопуляцій свідчило про недостатність клітинної ланки імунітету та зменшення резистентності організму до інфекції. В-лімфоцити (СД19) у 60 % щурів з дерматитом мали тенденцію до підвищення.

Коефіцієнт кореляції між рівнем активованих лімфоцитів (маркерів апоптозу клітин) і лімфоцитами периферичної крові у щурів з алергічним дерматитом був таким:

Загальна кількість Т-лімфоцитів (СД3)	0,3
Т-хелпери (СД4)	0,12
Т-супресори (СД8)	0,26
Загальна кількість В-клітин (СД19)	-0,09
«Нульові» недиференційовані лімфоцити (СД56)	0,46

Слід відмітити слабку кореляційну залежність між лімфоцитами крові та кількістю

Таблиця 2. Показники гуморальної ланки імунітету і циркулюючих імунних комплексів у периферичній крові щурів з алергічним дерматитом

Показники	Інтактний контроль (n=10)	Щури з алергічним дерматитом (n=20)
Загальна кількість В-клітин (СД19)	24,2±6,8	26,4±7,1
Циркулюючі імунні комплекси Імуноглобуліни класу, г/л	41,3±16,7	67,0±16,6*
А	1,4±0,25	1,92±1,10*
М	1,3±1,5	0,98±0,1
Г	13,2±1,05	10,4±1,04
Е	35,1±1,7	37,2±1,8

Таблиця 3. Індексна оцінка клітинного імунітету у щурів з алергічним дерматитом з різним вмістом імуноглобуліну (Ig) класу E (n=10)

Показники	Група з IgE > 100 МО/мл	Група з IgE < 100 МО/мл
CD3/CD19	2,4	2,3
CD3/CD4	1,4	2,7
CD3/CD8	2,7	2,1
CD4/CD8	1,9	0,9
Σ	8,4	8,0

CD95 – маркера апоптозу у щурів з дерматитом, що може бути пояснено включенням різних механізмів апоптозу і підтверджує існування думки про відсутність єдиних механізмів його запуску при розвитку захворювань різних нозологічних груп [17].

Для вивчення інтенсивності імунних реакцій на місцевому рівні 20 щурів з алергічним дерматитом були поділені на 2 підгрупи по 10 тварин у кожній: перша підгрупа зі значенням IgE > 100 МО/мл, друга – IgE < 100 МО/мл. Стан імунного статусу оцінювали за результатами дослідження клітинного і гуморального імунітету індексною оцінкою (табл. 3, 4).

Варто зазначити, що локальні показники клітинного імунітету (8,4) значно знижені відносно гуморальних індексних показників (10,7) у групі з IgE-позитивною відповіддю. У групі щурів з IgE-негативною відповіддю

такої різниці ми не спостерігали (індексна оцінка клітинних факторів – 8,0, гуморальних – 7,9).

Висока індексна оцінка гуморального імунітету свідчила, з нашої точки зору, про напруженість гуморальних імунних реакцій у щурів з алергічним дерматитом.

При підвищенні у периферичній крові вмісту загального IgE зменшувалося число CD95. Встановлено (P<0,05) зниження кількості CD95-клітин та рівня експресії на них Fas-рецептора (32,0±3,3 %) відносно значень у інтактних щурів (58,0±8,41 %). Можливо, це відображає процеси регуляції експресії Fas-рецептора з боку цитокинів, які продукуються Th2, що блокує передачу сигналів апоптозу в клітини, в тому числі і IgE-продукуючі, та викликає підтримання продукції IgE (табл.5).

Виявлена негативна кореляційна залежність у обох групах щурів між концентраціями

Таблиця 4. Індексна оцінка гуморального імунітету у щурів з алергічним дерматитом з різним вмістом імуноглобуліну класу E (IgE)

Показники	Група з IgE > 100	Група з IgE < 100
IgG/CD19	0,7	1,5
IgA/CD19	0,3	0,3
IgM/CD19	0,04	0,1
IgE/CD19	0,8	0,5
IgG/IgA	7,1	4,1
IgA/IgM	0,4	0,1
IgG/IgM	0	0,8
IgE/IgG	0,9	0,2
IgG/ЦІК	0,2	0,2
IgA/ЦІК	0,05	0,05
IgM/ЦІК	0	0
IgE/ЦІК	0,2	0,06
Σ	10,7	7,9

Таблиця 5. Коефіцієнт кореляції лімфоцитів периферичної крові і СД95 – маркера апоптозу у щурів з алергічним дерматитом залежно від вмісту загального імуноглобуліну класу Е (IgE)

Показники	СД95	
	IgE < 100 МО/мл	IgE > 100 МО/мл
СД3	0,19	0,53
СД4	-0,2	0,76
СД8	-0,28	0,44
СД19	0,46	0,42
СД56	0,38	0,80
IgE	-0,62	-0,9

СД95-маркера апоптозу і IgE може свідчити про участь системи апоптозу в регуляції продукції загального IgE [5, 18].

ВИСНОВКИ

1. У щурів з алергічним дерматитом найбільш активна гуморальна ланка імунітету.

2. Одною із ланок патогенезу алергічного дерматиту є підвищення вмісту ЦИК у крові та зниження Т-хелперів у загальній кількості Т-лімфоцитів.

3. Інформаційним показником з високим рівнем кореляцій є IgE, що підтверджує доцільність його визначення в плазмі крові при гострому дерматиті для характеристики лімфоцитів-маркерів апоптозу та прогнозу захворювання.

4. Негативна кореляційна залежність між концентраціями СД95 – маркера апоптозу і IgE в групі здорових і хворих тварин може свідчити про участь апоптозу в регуляції продукції загального IgE.

**А.И. Березнякова, В.Ф. Черемисина,
О.Д. Жемела**

ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У КРЫС С АЛЛЕРГИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

В работе изучены показатели системного и локального иммунитета у крыс с аллергическим дерматитом: иммуноглобулинов (Ig) класса А, Е, G, М; циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК); зрелых Т-лимфоцитов, хелперных, супресорных, В-лимфоцитов, недифференцированных лимфоцитов. Установлено, что у крыс с аллерги-

ческим дерматитом на локальном уровне наиболее активно гуморальное звено иммунитета. Одним из звеньев патогенеза этого заболевания является повышение содержания ЦИК в крови и снижение Т-хелперов в общем количестве Т-лимфоцитов. Определено, что информационным показателем с высоким уровнем корреляций является IgE, что подтверждает целесообразность его определения в плазме крови при остром дерматите для характеристики лимфоцитов-маркеров апоптоза и прогноза заболевания. Установленная отрицательная корреляционная зависимость между концентрациями СД95 – маркера апоптоза и IgE в группе здоровых и больных животных может свидетельствовать об участии системы апоптоза в регуляции продукции общего IgE.

Ключевые слова: аллергический дерматит, иммуноглобулины, циркулирующие иммунные комплексы.

**A.I. Bereznyakova, V.F. Cheremisina,
O.D. Jemela**

SYSTEMIC AND LOCAL IMMUNITY IN RATS WITH ATOPIC DERMATITIS

We studied indicators of systemic and local immunity in rats with allergic dermatitis (Ig A, E, G, M, CIC, CD3, CD4, CD8, SD19, SD56). In rats with allergic dermatitis on the local level, the most active is humoral immunity. One of the pathogenesis of atopic dermatitis is an increased content of circulating immune complexes in the blood and decreased T-helper in a total amount of T- lymphocytes. An informative index with a high level of correlation is the IgE level, confirming the advisability of its determination in blood plasma in acute dermatitis to characterize lymphocyte apoptosis markers and prognosis of the disease. An established negative correlation between the concentrations of SD95-marker of apoptosis and the IgE level in healthy and sick animals may point for involvement of apoptosis in the regulation of the total IgE.

Key words: allergic dermatitis, immunoglobulin, circulating immune complexes.

National University of Pharmacy, Kharkov

REFERENCES

1. Boychuk S, Mustafin I, Fassahov R, Mbainadzi L. Apoptosis of lymphocytes at atopic asthma. *Pulmonology*. 2003;5:38-44.
2. Vavilov A, Samsonov V, Dimant L. et al. Immunological researches of T-lymphocytes in the skin of patients with psoriasis. *J Dermatol*. 2000;4:4-5.
3. Zalkan P, Ievleva E. Effect of synthetic detergents on the reactivity skin of guinea pigs: actual problems of occupational dermatology. Moscow; 1965.
4. Ivanova Y, Nacharov Y, Reshetnicov T. Features of the immunological status of patients with perioral dermatitis during immunomodulatory therapy. *Herald New Medical Technol*. 2007;14(2):47-9.
5. Ischeykin K. A comparative study of performance of the immune system in children with atopic dermatitis and eczema. *Ukr J Dermatol, Venereol, Cosmetol*. 2009;2: 58-63.
6. Karaulov AV. *Clinical Immunology and Allergology*. Moscow: Med. Inform. Agency; 2002.
7. Katunina O. Immunomorphological characteristics of infiltrate in psoriasis. *J Dermatol and Venereol*. 2005;2:25-8.
8. Reznikov O, Solovyov A, Dobrelya N, Stefanov O. Biotic preclinical assessment and other scientific studies performed on animals: method. recommendations. *J Pharmacol and Pharmacy*. 2006;7:47-61.
9. Sylkov A, Kovalevskaya-Kucheryavenko T, Sennikov S. Cytokines in immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Цитокінес і Інфламмація*. 2012;13(1):5-10.
10. Frolov V, Peresadin N, Boitchenko P. Diagnostic and prognostic value of circulating immune complexes in patients. *Medical Business*. 1990;6:116-8.
11. Frolov V, Sotskaya Y. Circulating immune complexes and the phagocytic activity of monocytes in patients with chronic bronchitis at carrying out of differentiated immune correction. *Ukr Pulmonol Zh*. 2003;3:28-30.
12. Tsvetkov G, Mordovtsev V. *Patomorfology of the skin diseases: a guide for physicians*. Moscow; 2003.
13. Charlesworth E. Immunomodulation in dermatology lessons in the treatment of psoriasis. *Allergy Asthma Proc*. 2006;27(2):123-5.
14. Dabbs DJ. *Diagnostic immunohistochemistry*. London: Churchill Livingstone; 2006.
15. Kaditis A, Kalampouka E, Hatzinikolaou S. et al. Associations of tonsillar hypertrophy and snoring with history of wheezing in childhood. *Pediatric Pulmonol*. 2010;45(3):275-80.
16. Owen C. Immunoglobulin E: role in asthma and allergic disease: lessons from the clinic. *Pharmacol. Ther*. 2007;113:121-33.
17. Silvestri M., Pistorio A., Battistini E., Rossi G.A. IgE in childhood asthma: relevance of demographic characteristics and polysitisation [Internet] 2009 [cited 2010 July 22]. Available from: <http://adc.bmj.com/content/early/adc>.
18. Uabrijan L, Lipozenij J, Batinac T. et al. Growth CD4 and CD8 lymphocytes and macrophages in psoriasis. *Fcta Dermatovenerol*. 2009;17(3):162-5.

Нац. фармацевт. ун-т, Харків
E-mail: patology@ukrfa.kharkov.ua

Матеріал надійшов
до редакції 14.03.2014