

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

© Елена Александровна Дементьева, Ольга Петровна Гурина,
Александр Евгеньевич Блинов, Ольга Николаевна Варламова,
Георгий Александрович Блинов, Арина Александровна Степанова

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет.
194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., 2

Контактная информация: Елена Александровна Дементьева — младший научный сотрудник НИЦ, лаборатории медико-социальных проблем в педиатрии. E-mail: zorra2@yandex.ru

Резюме. Развитие атопического дерматита у детей раннего возраста обусловлено генетической предрасположенностью, заболеваниями матери во время беременности, а также воздействием неблагоприятных экологических факторов. В основе патологического процесса гиперчувствительности лежит формирование дисбаланса между субпопуляциями лимфоцитов. Обследовано 39 детей в возрасте от 3 месяцев до 1 года. Иммунофенотипирование лимфоцитов проводилось методом проточной цитофлуориметрии по безотмывочной технологии. Для дифференцировки лимфоцитов при атопическом дерматите у детей раннего возраста характерно наличие отличительных особенностей в каждой из возрастных групп. Своевременная диагностика субпопуляционного состава лимфоцитов позволит провести патогенетически обоснованную иммунокоррекцию для снижения риска возникновения сопутствующей патологии, а также повышения эффективности базовой терапии.

Ключевые слова: субпопуляции лимфоцитов, атопический дерматит, иммунный ответ.

THE DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF SUBPOPULATION COMPOSITION OF LYMPHOCYTES IN ATOPIC DERMATITIS IN CHILDREN OF EARLY AGE

© Elena A. Dementieva, Olga P. Gurin, Alexander E. Blinov, Olga E. Varlamova,
George A. Blinov, Arina A. Stepanova

Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 194100, Russia, Saint-Petersburg, Litovskaya str., 2

Contact Information: Elena Dementieva — Junior research fellow, NIC, laboratory of medico-social problems in Pediatrics. E-mail: zorra2@yandex.ru

Abstract. The development of atopic dermatitis in young children is due to genetic predisposition, diseases of the mother during pregnancy, as well as the impact of adverse environmental factors. At the heart of the pathological process of hypersensitivity is the formation of an imbalance between subpopulations of lymphocytes. 39 children aged from 3 months to 1 year were examined. Immunophenotyping of lymphocytes was carried out by the method of flow cytofluorometry using a non-washing technology. For the differentiation of lymphocytes in atopic dermatitis in young children is characterized by the presence of distinctive features in each of the age groups. Timely diagnosis of subpopulation composition of lymphocytes will allow pathogenetically justified immunocorrection to reduce the risk of concomitant pathology, as well as improve the effectiveness of basic therapy.

Key words: lymphocyte subpopulations, atopic dermatitis, immune response.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие атопического дерматита у детей раннего возраста обусловлено генетической предрасположенностью, заболеваниями матери во время беременности, а также воздействием неблагоприятных экологических факторов [1–4].

Главным событием в развитии иммунного ответа является презентация антигена. Происходит взаимодействие между Т-клеточным рецептором (TCR) лимфоцита и комплексом «молекула МНС — антиген» на антиген-презентирующей клетке (АПК). МНС I класса выполняют функцию рецепторов для CD8⁺-лимфоцитов (цитотоксических Т-клеток), а молекулы МНС II — для CD4⁺-лимфоцитов (Т-хелперов) [5–7].

При атопической аллергической реакции повышается активность Т-хелперов II класса, которые синтезируют цитокины (ИЛ-4, ИЛ-13, ИЛ-5), стимулирующие продукцию IgE и IgG₄ В-лимфоцитами. Реагиновые антитела индуцируют активность и пролиферацию эозинофилов, увеличивая экспрессию МНС II класса, служат фактором роста тучных клеток. Тучные клетки опосредуют раннюю фазу аллергического ответа путем выброса медиаторов аллергии и триптазы, которая активирует специфические рецепторы на эндотелиальных и эпителиальных клетках. Активация этих рецепторов запускает каскад реакций, повышающих экспрессию молекул адгезии, вызывающих хемотаксис эозинофилов, которые в свою очередь запускают позднюю фазу аллергического ответа и участвуют в поддержании воспалительной реакции в тканях [6–8].

Повышение относительного уровня $\gamma\delta$ -Т-клеток характерно для атопического дерматита в детском возрасте [9]. $\gamma\delta$ -Т-клетки способны усиливать иммунный ответ, производя большие количества γ -интерферона, TNF- β и хемокины, имеют эффекторную (цитотоксическую) активность. Они способны распознавать непептидные антигены, независимо от МНС [10].

НК-лимфоциты способны распознавать и лизировать чужеродные клетки при первичном контакте без предварительной сенсибилизации, даже в отсутствии воспалительных сигналов. Взаимодействие с антигенными структурами происходит за счет рецепторов, распознающих молекулы МНС I класса. Кроме того, НК-клетки, согласно данным, полученным на экспериментальных моделях, являются ранним источником γ -интерферона в месте иммунного ответа. Жизнеспособность натуральных килле-

ров позволяет участвовать им в многократном лизисе клеток-мишеней, благодаря экспрессии на их поверхности альфа-цепей CD8. Соединение CD8a цепей в гомодимер индуцирует быстрое повышение концентрации внутриклеточного кальция, что защищает клетки от апоптоза. Апоптоз НК-лимфоцитов инициируется при связывании CD8 с растворимой формой МНС I класса [9, 11, 12].

НКТ-лимфоциты — это истинные Т-клетки, фенотипически имеющие TCR $\alpha\beta$, CD3, но также на их поверхности отмечаются рецептор NK1.1, характерный для НК-клеток. Т-клеточный рецептор НКТ-лимфоцитов распознает липидные/гликолипидные антигены, представляемые АПК в комплексе с молекулой CD1d. Активация НКТ-клеток сопровождается быстрой секрецией большого количества Th1 и Th2 цитокинов ИЛ-2, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-17, ИЛ-31, TNF- α и GM-CSF [9, 12, 13].

Таким образом, в основе патологического процесса гиперчувствительности лежит формирование дисбаланса между субпопуляциями лимфоцитов.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение особенностей дифференцировки лимфоцитов при атопическом дерматите у детей до 1 года.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 39 детей в возрасте от 3 месяцев до 1 года. Первая группа — пациенты в возрасте 3–5 месяцев (13 детей), вторая группа — пациенты в возрасте 6–9 месяцев (11 детей), третья группа — пациенты в возрасте 10 месяцев — 1 год (15 детей). Иммунофенотипирование лимфоцитов проводилось методом проточной цитофлуориметрии (EPICS XL-MCL, Beckman Coulter, США) по безотмывочной технологии. Для оценки распределения лимфоцитов по различным популяциям клетки окрашивались трехцветными комбинациями моноклональных антител, конъюгированных с флуоресцентными красителями FITC/PE/PC5: CD45/CD3/CD19, CD45/CD3/CD4, CD45/CD3/CD8, CD45/CD3/CD(16+56), CD45/CD3/HLA-DR, CD45/CD3/CD25 (Beckman Coulter, США). Популяции клеток выделялись при помощи гетерогенного гейтирования. Абсолютные значения лимфоцитов подсчитывались с использованием референсных частиц. Статистическая обработка полученных результатов — программа Microsoft Excel.

Таблица 1

Уровень субпопуляций лимфоцитов у детей раннего возраста с атопическим дерматитом

Субпопуляции лимфоцитов	3–5 месяцев		6–9 месяцев		10 месяцев — 1 год	
	Относительное содержание (min — max)	Абсолютное количество (min — max)	Относительное содержание (min — max)	Абсолютное количество (min — max)	Относительное содержание (min — max)	Абсолютное количество (min — max)
В-лимфоциты CD19+	15,96–30,5	624–3027	7–32,7	504–2246	9,1–48,4	61–5914
Т-лимфоциты CD3+	55,7–75,71	2031–6465	62,15–82,5	1797–8775	45,1–89,57	1333–5509
Т-хелперы CD3+CD4+	37,1–62,7	1279–4232	31–54,7	914–6079	20,7–55,4	936–3364
Т-цитотоксич. CD3+CD8+	8,49–20,4	247–2196	14,81–25,95	439–2366	10,88–40,1	323–2530
Активированные NK-клетки CD8+CD3-CD(16+56)+	0,68–3,9	22–420	0,37–4,29	11–639	0,2–5,57	6–311
NK-лимфоциты CD3-CD(16+56)+	1,7–12,6	53–1357	3,3–13,46	106–1410	1,7–28,49	50–858
NKT-клетки CD3+CD(16+56)+	0,1–5,51	4–155	0,1–2,42	4–198	0,2–4,83	8–143
Активированные Т-лимфоциты CD3+HLA-DR+	0,1–2,07	4–61	0,2–2,18	8–285	0,1–2,92	10–175
Активированные Т-лимфоциты CD3+CD25+	0,15–7,3	9–292	0,4–4,69	15–386	0,97–5,9	33–358
γδ-Т-клетки	0,18–5,59	6–249	0,01–11,16	0–331	1,48–10,6	44–582

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изменения субпопуляционного состава лимфоцитов у детей до года имеет отличительные особенности в каждой из возрастных групп (табл. 1, 2).

Обращает на себя внимание большой разброс показателей, что может быть обусловлено индивидуальным реагированием на развитие заболевания, сопутствующей патологией, различными стадиями патологического процесса.

Для дифференцировки лимфоцитов у детей первой группы характерно развитие абсолютной Т-лимфопении, за счет снижения абсолютного количества Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, активированных Т-клеток с маркерами активации HLA-DR, CD25. Иммунорегуляторный индекс (ИРИ) повышен у 53,8% детей первой группы.

У пациентов второй группы отмечается абсолютная В- и Т-клеточная лимфопения. Выявлено снижение абсолютного уровня Т-хелперов, Т-цитотоксических, активированных CD3+HLA-DR+. ИРИ снижен в 27,3% случаев, повышен — в 45,5%.

У детей третьей группы диагностированы относительная и абсолютная В-лимфопения, снижение относительного и абсолютного количества активированных NK-лимфоцитов, относительного и абсолютного уровня клеток CD3+HLA-DR+, относительной концентрации активированных CD25+ Т-лимфоцитов. ИРИ среди детей третьей группы снижен у 60%, повышен — у 26,6%.

Для всех групп обследованных детей характерно повышение абсолютного уровня защищающих слизистые оболочки γδ-Т-лимфоцитов, что согласуется с литературными данными об активности данной субпопуляции при атопическом дерматите в детском возрасте (табл. 3).

Снижение концентрации Т-лимфоцитов, натуральных киллеров, ИРИ обуславливают «открытость» организма для вирусной инфекции. Повышение уровня натуральных киллеров, NKT-лимфоцитов, активированных CD8+NK-клеток, как правило, характеризует вторичную вирусную инфекцию. Активированные Т-лимфоциты с маркером активации CD25 повышаются в ответ на острый воспалительный процесс в организме, с маркером

Таблица 2

Среднее количество лимфоцитов в различные возрастные периоды у детей первого года жизни с атопическим дерматитом

Субпопуляции лимфоцитов	3–5 месяцев		6–9 месяцев		10 месяцев — 1 год	
	Среднее $\pm$ среднее отклонение % клеток	Среднее $\pm$ среднее отклонение $\times 10^9$ кл/л	Среднее $\pm$ среднее отклонение % клеток	Среднее $\pm$ среднее отклонение $\times 10^9$ кл/л	Среднее $\pm$ среднее отклонение % клеток	Среднее $\pm$ среднее отклонение $\times 10^9$ кл/л
В-лимфоциты CD19+	25,1 $\pm$ 4,3	1189 $\pm$ 533	20,9 $\pm$ 6,4	1018,9 $\pm$ 493,3	23,1 $\pm$ 10,5	1397,9 $\pm$ 843,3
Т-лимфоциты CD3+	66,5 $\pm$ 6	3066,7 $\pm$ 1243	70,6 $\pm$ 5,9	3935,5 $\pm$ 2317,6	65,8 $\pm$ 10,04	3555 $\pm$ 1608,3
Т-хелперы CD3+CD4+	49 $\pm$ 7,7	2213 $\pm$ 846,5	47,1 $\pm$ 5,6	2633,8 $\pm$ 1552,5	39,3 $\pm$ 8,3	2062,9 $\pm$ 884,9
Т-цитотоксич. CD3+CD8+	14,5 $\pm$ 2,5	711 $\pm$ 354,5	21 $\pm$ 3,7	1202,8 $\pm$ 730,3	21,7 $\pm$ 5,2	1239,3 $\pm$ 641,2
Активированные NK-клетки CD8+CD3-D(16+56)+	1,9 $\pm$ 1,1	105,2 $\pm$ 82,3	2 $\pm$ 1,3	170 $\pm$ 152,4	2,2 $\pm$ 1,4	116,7 $\pm$ 80
NK-лимфоциты CD3-CD(16+56)+	5,3 $\pm$ 3	316,2 $\pm$ 229,4	6,6 $\pm$ 2,2	414,4 $\pm$ 327,3	8,5 $\pm$ 3,9	423,3 $\pm$ 272,6
NKT-клетки CD3+CD(16+56)+	0,8 $\pm$ 0,7	33,1 $\pm$ 31,2	0,9 $\pm$ 0,8	45,7 $\pm$ 42,9	1,044 $\pm$ 0,64	49,2 $\pm$ 30,5
Активированные Т-лимфоциты CD3+HLA-DR+	0,8 $\pm$ 0,5	31,6 $\pm$ 15,9	1,2 $\pm$ 0,6	67,5 $\pm$ 45,1	1,4 $\pm$ 0,9	58,6 $\pm$ 29
Активированные Т-лимфоциты CD3+CD25+	3,6 $\pm$ 1,7	156,5 $\pm$ 95,8	2,9 $\pm$ 1,2	151,4 $\pm$ 87,6	2,4 $\pm$ 0,8	133,8 $\pm$ 71,3
$\gamma\delta$ -Т-клетки	3,04 $\pm$ 1,16	134,8 $\pm$ 65,8	3,9 $\pm$ 2,5	173,8 $\pm$ 88,2	4,8 $\pm$ 1,9	266 $\pm$ 142,9

Таблица 3

Изменения субпопуляционного состава лимфоцитов у детей раннего возраста с атопическим дерматитом

Субпопуляции лимфоцитов		Дети (3 месяца — 1 год) (% случаев)					
		3–5 мес.		6–9 мес.		10 мес–1 г	
		↑	↓	↑	↓	↑	↓
В-лимфоциты CD19+	%	—	—	—	18,2	13,3	33,3
	$\times 10^9$ кл/л	7,7	15,4	—	36,4	6,6	20
Т-лимфоциты CD3+	%	7,7	—	27,3	—	20	13,6
	$\times 10^9$ кл/л	—	53,8	27,3	36,4	6,6	6,6
Т-хелперы CD3+CD4+	%	7,7	—	—	9,1	6,6	6,6
	$\times 10^9$ кл/л	—	23,1	18,2	18,2	—	6,6
Т-цитотокс. CD3+CD8+	%	—	7,7	9,1	—	13,3	6,6
	$\times 10^9$ кл/л	7,7	38,5	18,2	27,3	13,3	6,6
NK-лимфоциты CD3–CD(16+56)+	%	—	7,7	—	—	6,6	13,3
	$\times 10^9$ кл/л	7,7	15,4	18,2	—	—	20
NKT-клетки CD3+CD(16+56)+	%	—	—	—	—	—	—
	$\times 10^9$ кл/л	—	—	—	—	—	—
Активир. Т-лимфоциты CD3+HLA-DR+	%	—	69,2	—	54,5	—	73,3
	$\times 10^9$ кл/л	—	100	—	72,7	—	93,3
Активированные Т-лимфоциты CD3+CD25+	%	15,4	7,7	—	18,2	—	13,3
	$\times 10^9$ кл/л	7,7	23,1	9,1	9,1	6,6	6,6
$\gamma\delta$ -Т-клетки	%	—	30,8	9,1	18,2	20	6,6
	$\times 10^9$ кл/л	53,8	15,4	63,6	9,1	80	—
ИРИ		53,8	7,7	45,5	27,3	26,6	60

активации HLA-DR — в ответ на хроническую воспалительную патологию.

ВЫВОДЫ

1. Изменения в дифференцировке лимфоцитов относительно возрастной нормы у детей раннего возраста при atopическом дерматите обуславливают незащищенность от сопутствующей инфекционной патологии.
2. Для дифференцировки лимфоцитов при atopическом дерматите у детей раннего возраста характерно наличие отличительных особенностей в каждой из возрастных групп.
3. Своевременная диагностика субпопуляционного состава лимфоцитов позволит провести патогенетически обоснованную иммунокоррекцию для снижения риска возникновения сопутствующей патологии, а также повышения эффективности базовой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гурина О.П., Дементьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н., Тимохина В.И. Особенности иммунного реагирования при atopии у детей. Педиатр. 2014; Т. 5(4): 95–103.
2. Гурина О.П., Дементьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н. Сенсибилизация к пищевым и ингаляционным аллергенам у детей с atopическими заболеваниями. В сборнике: Пищевая непереносимость у детей. Современные аспекты диагностики, лечения, профилактики и диетотерапии. Сборник трудов. 2018: 202–210.
3. Гурина О.П., Дементьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н. Изучение субпопуляционного состава лимфоцитов при atopическом дерматите у детей. Сборник IX научно-практической конференции «Воронцовские чтения — 2016»; СПб.: 53–54.
4. Намазова-Баранова Л.С., Алексеева А.А., Алтунин В.В. и др. Аллергия у детей: от теории — к практике. М., 2011.
5. Мазурин А.В., Воронцов И.М. Пропедевтика детских болезней. М., 1985.
6. Новик Г.А. Механизмы аллергических реакций и методы аллергообследования в клинической практике (диагностика и дифференциальный диагноз). Учебно-методическое пособие. СПб.: Издание ГПМА; 2004.
7. Федоскова Т.Г., Ильина Н.И. Аллергические заболевания в клинической практике. В помощь практическому врачу Российский Аллергологический Журнал. 2004; № 2 (приложение).

8. Гурина О.П., Дементьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н., Тимохина В.И. Особенности дифференцировки лимфоцитов при реагиновой аллергии у детей. Медицинская иммунология. 2015; Т. 17(4): 378.
9. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. Челябинск; 2008.
10. Lambert C., Genin C. CD3 bright lymphocyte population reveal gamma-delta T cells. Cytometry B Clinical Cytometry. 2004; 61(1): 45–53.
11. Inngjerdingen M., Damaj B., Maghazachi A.A. Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. Blood. 2001; 97: 367–375.
12. Дементьева Е.А., Гурина О.П. Иммунологические изменения, сопровождающие развитие экспериментального неопластического процесса. Педиатр. 2015; Т. 6(2): 96–108.
13. Пичугина Л.В. Изменение фенотипа лимфоцитов при некоторых патологиях (обзор литературы). М.; 2006.

REFERENCES

1. Gurina O.P., Dement'yeva Ye.A., Blinov A. Ye., Varlamova O.N., Timokhina V.I. Osobennosti immunnogo reagirovaniya pri atopii u detey. [Features of the immune response in children with atopy]. Pediatr. 2014; Т. 5(4): 95–103. (in Russian).
2. Gurina O.P., Dement'yeva Ye.A., Blinov A. Ye., Varlamova O.N. Sensibilizatsiya k pishchevym i ingalyatsionnym allergenam u detey s atopicheskimi zabolovaniami. [Sensitization to food and inhalation allergens in children with atopical diseases]. V sbornike: Pishchevaya neperenosimost' u detey. Sovremennyye aspekty diagnostiki, lecheniya, profilaktiki i diyetoterapii. Sbornik trudov. 2018: 202–210. (in Russian).
3. Gurina O.P., Dement'yeva Ye.A., Blinov A. Ye., Varlamova O.N. Izucheniye subpopulyatsionnogo sostava limfotsitov pri atopicheskom dermatite u detey. [The study of the subpopulation composition of lymphocytes in children with atopical dermatitis]. Sbornik IX nauchno-prakticheskoy konferentsii «Vorontsovskiy chteniye — 2016»; SPb.: 53–54. (in Russian).
4. Namazova-Baranova L.S., Alekseeva A.A., Altunin V.V. i dr. Allergiya u detej: ot teorii — k praktike. [Allergy in children: from theory to practice]. M., 2011.
5. Mazurin A.V., Voroncov I.M. Propedevtika detskikh boleznej. [Propedeutics of children's diseases]. M., 1985.
6. Novik G.A. Mekhanizmy allergicheskikh reaktsiy i metody allergoobsledovaniya v klinicheskoy praktike (diagnostika i differentsial'nyy diagnoz). [Mechanisms of allergic reactions and methods of allergic examination in clinical practice (diagnosis and differential diagnosis)]. Uchebno-metodicheskoye posobiye. SPb.: Izdaniye GPMA; 2004. (in Russian).

7. Fedoskova T.G., Il'ina N.I. Allergicheskiye zabolevaniya v klinicheskoy praktike. [Allergic diseases in clinical practice]. V pomoshch' prakticheskomu vrachu Rossiyskiy Allergologicheskiy Zhurnal. 2004; № 2(prilozheniye). (in Russian).
8. Gurina O.P., Dement'yeva Ye.A., Blinov A. Ye., Varlamova O.N., Timokhina V.I. Osobennosti differentsirovki limfotsitov pri reaginovoy allergii u detey. [Features of lymphocyte differentiation in reaginovy allergies in children]. Meditsinskaya immunologiya. 2015; T.17(4): 378. (in Russian).
9. Khaydukov S.V., Zurochka A.V. Voprosy sovremennoy protochnoy tsitometrii. [Issues of modern flow cytometry]. Klinicheskoy primeneniye. Chelyabinsk; 2008. (in Russian).
10. Lambert C., Genin C. CD3 bright lymphocyte population reveal gamma-delta T cells. Cytometry B Clinical Cytometry. 2004; 61(1): 45–53.
11. Inngjerdingen M., Damaj B., Maghazachi A.A. Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. Blood. 2001; 97: 367–375.
12. Dement'yeva Ye.A., Gurina O.P. Immunologicheskiye izmeneniya, soprovozhdayushchiye razvitiye eksperimental'nogo neoplasticheskogo protsessa. [Immunological changes accompanying the development of an experimental neoplastic process]. Pediatr. 2015; T. 6(2): 96–108. (in Russian).
13. Pichugina L.V. Izmeneniye fenotipa limfotsitov pri nekotorykh patologiyakh. [Changes in the lymphocyte phenotype in certain pathologies] (obzor literatury). M.; 2006. (in Russian).