

Н.А. Шестакова, В.С. Кожевников

ВЛИЯНИЕ ИММУНОТЕРАПИИ АКТИВИРОВАННЫМИ Т-ЛИМФОЦИТАМИ НА ПАРАМЕТРЫ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА БОЛЬНЫХ РАЗНЫМИ ФОРМАМИ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (Красноярск)
НИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)

В статье приведены результаты терапии активированными аутологичными Т-лимфоцитами больных atopическим дерматитом. Показана безопасность и высокая клиническая эффективность такого подхода в лечении пациентов, как с аллергической, так и с неаллергической формой заболевания. При аллергической форме отмечалась более быстрая положительная динамика, но эффективность терапии в оппозитной группе была выше. Воздействие на клеточное звено иммунной системы при разных формах заболевания также различалось. При аллергической форме наблюдалось повышение числа CD8⁺-клеток, при неаллергической — CD8⁺CD25⁺-клеток и изменения гиперчувствительности замедленного типа.

Ключевые слова: atopический дерматит, регуляторные клетки, Т-клеточная вакцинация, антиэрготипический ответ

EFFECT OF IMMUNOTHERAPY ACTIVATED T-LYMPHOCYTES ON CELLULAR IMMUNITY IN DIFFERENT FORMS OF ATOPIC DERMATITIS

N.A. Shestakova, V.S. Kozhevnikov

Research Institute of Medical Problems of the North SB RAMS, Krasnoyarsk
Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk

The article describes the results of therapy with autologous activated T-lymphocytes in patients with atopic dermatitis. Has been shown high clinical efficacy and safety of this therapy in the treatment of patients with both allergic and nonallergic form of the disease. In the allergic form observed more rapid positive changes, but in the opposite form of the efficiency was higher. Influence on cellular immunity in different forms differed. If the allergic form there was an increase of CD8⁺ T-cells, in the nonallergic form — increased CD8⁺CD25⁺ T-cells and changes in delayed-type hypersensitivity.

Key words: atopic dermatitis, T-cell vaccination, regulatory cells, antiertgotypic response

В последние десятилетия во многих странах мира отмечается тенденция к увеличению заболеваемости atopическим дерматитом. Распространенность этой патологии по данным разных авторов составляет 10–20 % населения [4]. Atopический дерматит является многофакторным, генетически детерминированным заболеванием, основу которого составляют иммунологические механизмы, опосредованные IgE- и не IgE-аллергическими реакциями (ЕААСI, 2006). В зависимости от общего уровня IgE сыворотки крови различают аллергическую и неаллергическую форму atopического дерматита [12]. Недостаточная эффективность стандартных методов лечения является основанием для поиска новых подходов к терапии данного заболевания.

После получения данных о том, что регуляторные клетки подавляют симптомы аллергических заболеваний за счет снижения активности алерген-специфических эффекторных клеток, подавления продукции IgE и повышения уровня IgG4 и IgA, а также о снижении активности этих клеток у больных с алергопатологией [9, 13, 14], возникла идея восстановления функции регуляторных клеток у таких пациентов. Исследователями были охарактеризованы различные группы регуляторных клеток, среди которых выделяли как антиидиотипические, распознающие клоносцифические детерминанты, так и антиэрготипические клетки,

распознающие маркеры активации (так называемые эрготопы), например, молекулу CD25 [4]. Эти данные позволяют предполагать изменения активности регуляторных клеток в результате индукции антиэрготипического ответа, что даст возможность скорректировать дисбаланс с преобладанием Th2-клеток, характерный для atopических заболеваний, и уменьшить клинические проявления алергии.

Успешная иммунизация, нацеленная на усиление природной антиэрготипической регуляторной сети, была проведена как на экспериментальных моделях [11], так и у человека при заболеваниях, при которых было показано снижение антиэрготипического ответа [5, 7, 15]. Однако ранее применялась иммунизация антиэрготипическими клетками, эрготопами, полноразмерными последовательностями ДНК, кодирующими эти молекулы или антиген-реактивными Т-клетками. Нами для индукции антиэрготипического ответа предложено применение поликлональной Т-клеточной вакцины, т.к. при atopическом дерматите выявить антигенную специфичность клеток, участвующих в патогенезе заболевания, у большинства пациентов не удается.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 29 больных atopическим дерматитом (10 мужчин и 19 женщин) в возрасте от 17 до 49 лет (средний возраст

23 ± 1,3 года), находящихся на лечении в аллергологическом отделении НИИКИ СО РАМН. В зависимости от уровня IgE пациенты были разделены на 2 группы. У больных первой группы уровень IgE находился в пределах нормативных значений, у второй — был повышен. С нормальным уровнем IgE (неаллергическая форма) наблюдалось 6 пациентов (21 %), с повышенным (аллергическая форма) — 23 (79 %). Длительность заболевания колебалась от 7 до 48 лет (средняя длительность заболевания 21 ± 1,3 года). Обследуемые больные характеризовались средней (19 человек — 66 %) и тяжелой степенью тяжести (10 человек — 34 %) заболевания. Значение индекса SCORAD исходно составляло 51 ± 4,2 балла, индекс качества жизни (DLQI) был 9,5 ± 1,5 баллов. Группы были сопоставимы по всем исследуемым параметрам.

Пациентам обеих групп после получения информированного согласия проводилась иммунотерапия активированными аутологичными Т-лимфоцитами. Протокол клинических исследований «Иммунотерапия с использованием аутологичных активированных Т-клеток в лечении больных атопическим дерматитом» утвержден на ученом совете НИИКИ СО РАМН №9 от 29.11.05. Клетки вводили подкожно с кратностью 1 раз в неделю — 4 инъекции, далее 1 раз в месяц, курс терапии состоял из 10 инъекций.

Оценка состояния пациентов в процессе лечения проводилась по клиническим и лабораторным показателям, оценивалось возникновение побочных реакций.

Иммуноцитометрию проводили с помощью проточного цитометра FACSCalibur (Becton Dickinson, USA). Для поверхностного маркирования иммунокомпетентных клеток и определения внутриклеточных цитокинов использовали моноклональные антитела производства Сорбент и МедБиоСпектр, Москва, Россия; BD Biosciences Pharmingen, USA.

Активность эффекторов гиперчувствительности замедленного типа оценивали разработанным в лаборатории иммунопатологии НИИКИ СО РАМН методом [2].

Активированные аутологичные Т-лимфоциты получали из мононуклеаров периферической крови, стимулированных антиCD3 антителами (НПЦ МедБиоСпектр) в присутствии IL-2 (ООО Биотех) согласно разработанному в лаборатории иммунопатологии НИИКИ СО РАМН протоколу [1].

Для статистических исследований использовали пакет программ «Statistica V. 6.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСЛЕДОВАНИЕ

После 10-дневного культивирования со стимуляторами мы исследовали активированные клетки. В полученной Т-клеточной вакцине, по сравнению с не стимулированными клетками, выявлялось увеличение числа CD8⁺ (с 30,19 ± 1,79 до 60,47 ± 2,72 % ($p < 0,001$)) и снижение CD4⁺-лимфоцитов (с 60,88 ± 1,75 до 34,07 ± 2,56 % ($p < 0,001$)), снижение «дважды отрицательных» Т-клеток (с 5,57 ± 0,93 до

2,35 ± 0,42 % ($p < 0,05$)). Определялось значительное увеличение экспрессии маркеров активации, CD25 и DR, на CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитах, более выраженное в субпопуляции CD8⁺-клеток. Так число CD4⁺CD25⁺-лимфоцитов увеличилось с 17,50 ± 1,48 до 34,67 ± 2,63 % ($p < 0,001$), CD4⁺DR⁺-с 5,69 ± 1,16 до 12,43 ± 2,63 % ($p < 0,001$), CD8⁺CD25⁺-с 2,15 ± 0,27 до 46,49 ± 3,27 % ($p < 0,001$), CD8⁺DR⁺-с 3,59 ± 0,45 до 20,92 ± 3,90 % ($p < 0,001$). Количество CD4⁺-клеток с высокой экспрессией молекулы CD25 снизилось с 2,99 ± 0,45 до 0,76 ± 0,33 % ($p < 0,05$). Таким образом, для индукции антиэрготипического ответа у больных атопическим дерматитом была получена Т-клеточная вакцина, состоящая из активированных CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов с преобладанием последних.

В процессе клеточной терапии возникновение побочных реакций при обеих формах заболевания было отмечено с одинаковой частотой. У 5 пациентов наблюдались местные побочные реакции в виде гиперемии, припухлости, болезненности, образования волдыря, у 11 больных — системные, в виде обострения основного заболевания, кратковременного субфебрилитета или астенического синдрома. Эти реакции быстро купировались назначением антигистаминных препаратов и, при необходимости, топических глюкокортикостероидов.

Сравнение эффективности вакцинации активированными аутологичными Т-клетками при обеих формах заболевания показало, что эффективность терапии у пациентов с неаллергической формой была выше, чем в оппозитной группе. Так у больных с неаллергической формой атопического дерматита в 100 % случаев отмечен положительный эффект от лечения, характеризующийся уменьшением клинических симптомов заболевания более, чем на 50 %. При аллергической форме положительный клинический эффект наблюдался также в большем проценте случаев, более 78 %, однако у 2 пациентов положительная клиническая динамика отсутствовала (табл. 1). При этом достоверное уменьшение симптомов заболевания при неаллергической форме атопического дерматита отмечено только через 6 месяцев терапии. В то время как при аллергической форме уже через месяц от начала введения клеток индекс SCORAD уменьшился в 3,5 раза, качество жизни улучшилось вдвое (рис. 1).

Таблица 1
Клиническая эффективность Т-клеточной вакцинации при аллергической и неаллергической форме атопического дерматита

Клиническая эффективность	формы АД	
	аллергическая (n = 23)	неаллергическая (n = 6)
Более 85 %	11 пациентов (47,83 %)	4 пациента (66,7 %)
50–85 %	7 пациентов (30,43 %)	2 пациента (33,3 %)
Менее 50 %	3 пациента (13,04 %)	–
Отсутствует	2 пациента (8,7 %)	–

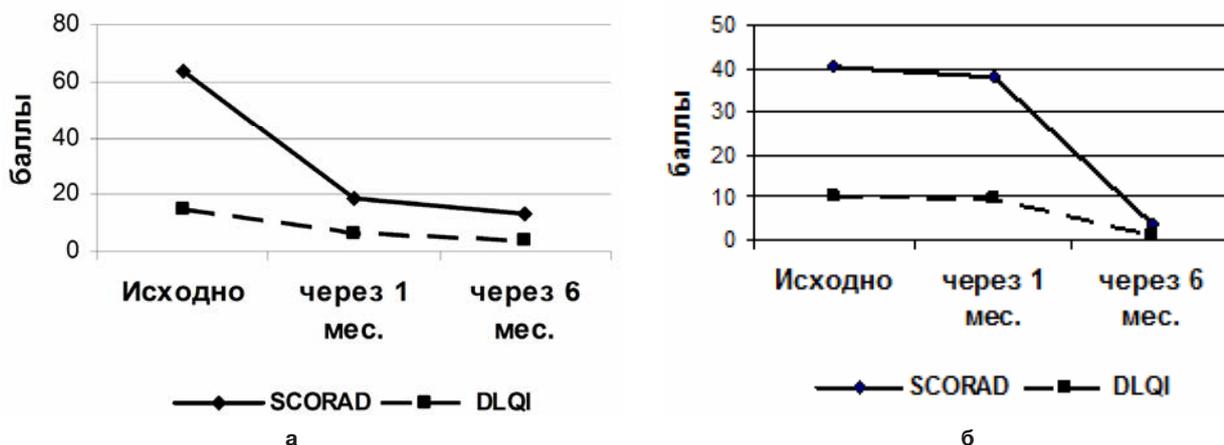


Рис. 1. Динамика индексов SCORAD и DLQI у пациентов с аллергической (а; n = 23) и неаллергической (б; n = 6) формой атопического дерматита в процессе терапии активированными аутологичными Т-лимфоцитами.

Разные патогенетические механизмы развития аллергической и неаллергической формы атопического дерматита обусловили и разное воздействие активированных аутологичных Т-лимфоцитов на клеточное звено иммунной системы.

При исследовании динамики экспрессии молекул CD25 и DR мы не выявили изменения этих показателей при аллергической форме. Все изменения относились к группе больных с неаллергической формой атопического дерматита. Выявленное снижение числа CD4⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов, начиная с третьей недели введения клеток и сохраняющееся весь период лечения у этих больных, вероятно, отражает повышение числа клеток в субпопуляции CD4⁺CD25⁺, заметное также с третьей недели лечения, однако достоверное повышение последних отмечено только через 5 месяцев терапии (табл. 2). Кроме того, показана прямая зависимость содержания CD4⁺CD25⁺ Т-клеток от содержания CD4⁺CD25^{bright}-клеток (через 2 недели (r = 0,83, p = 0,04) и 5 месяцев (r = 0,83, p = 0,04) терапии), что является подтверждением нарастания числа именно регуляторных клеток в результате вакцинации Т-клетками при этой форме заболевания. У больных с неаллергической формой атопического дерматита в процессе терапии уже через 2 недели после первой инъекции отмечено достоверное

увеличение числа CD8⁺CD25⁺-клеток, которое оставалось стабильно повышенным в течение всего лечения (табл. 2). Учитывая работы ряда исследователей, показавших, что вакцинация активированными аутологичными Т-клетками приводила к индукции как CD4⁺, так и CD8⁺ антиэрготипических регуляторных Т-клеток [5, 11, 15], было сделано предположение, что эти CD8⁺CD25⁺-клетки являются регуляторными. Функциональное сходство CD8⁺CD25⁺-клеток с CD4⁺CD25⁺-регуляторными клетками было выявлено работами L. Cosmi и V. Bienvu [3, 6].

Таким образом, мы предполагаем, что выраженная клиническая эффективность терапии аутологичными активированными Т-лимфоцитами у пациентов с неаллергической формой атопического дерматита обусловлена нарастанием числа CD4⁺- и CD8⁺-регуляторных клеток.

Также при неаллергической форме заболевания в результате клеточной терапии выявлено повышение активности лимфоцитов в продукции факторов ингибиции миграции, выражающееся в снижении индекса ингибиции миграции в реакции гиперчувствительности замедленного типа. Эти изменения наблюдались уже через месяц от начала терапии и сохранялись до конца лечения (рис. 2). Ранее индукция реакции гиперчувствительности

Таблица 2
Изменения экспрессии маркеров активации на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках в процессе Т-клеточной вакцинации при неаллергической форме атопического дерматита по сравнению с исходным уровнем (n = 6)

Показатели	До ТКВ	Через 1 нед.	Через 2 нед.	Через 3 нед.	Через 1 мес.	Через 2 мес.	Через 3 мес.	Через 4 мес.	Через 5 мес.	Через 6 мес.
CD4 ⁺ CD25 ⁺	48 ± 1,3	49,5 ± 5,66	38,2 ± 3,09 [†]	43,9 ± 4,28	37,4 ± 3,48 [†]	39 ± 2,62 [†]	34,3 ± 1,85 [†]	42,2 ± 2,61	35,8 ± 2,85 [†]	38 ± 3,41 [†]
CD4 ⁺ CD25 ⁺	14,9 ± 0,68	12 ± 1,87	18,2 ± 1,83	19,4 ± 1,89	19,5 ± 2,54	18,8 ± 1,61	20,1 ± 2,25	18,6 ± 2,31	21,3 ± 2,04 [*]	20,3 ± 2,44
CD4 ⁺ CD25 ^{br}	1,26 ± 0,37	1,87 ± 0,33	1,5 ± 0,25	1,77 ± 0,29	3,27 ± 0,72	2,56 ± 0,36	2,29 ± 0,25	2,34 ± 0,45	1,44 ± 0,39	1,4 ± 0,45
CD8 ⁺ CD25 ⁺	36 ± 0,65	34,8 ± 5,96	42,5 ± 4,16	32,3 ± 3,25	36,6 ± 3,92	39,1 ± 3,69	41,3 ± 4,25	36 ± 3,48	37,4 ± 3,65	37 ± 3,63
CD8 ⁺ CD25 ⁺	1,27 ± 0,07	3,68 ± 0,68	3,13 ± 0,39 [†]	3,01 ± 0,26	2,68 ± 0,57 [†]	2,03 ± 0,48 [†]	3,67 ± 0,61 [†]	2,34 ± 0,33 [†]	2,76 ± 0,43 [†]	3,09 ± 0,35 [†]

Примечание: [†] - p < 0,05.

в результате антиэрготипического ответа была показана в эксперименте [10].

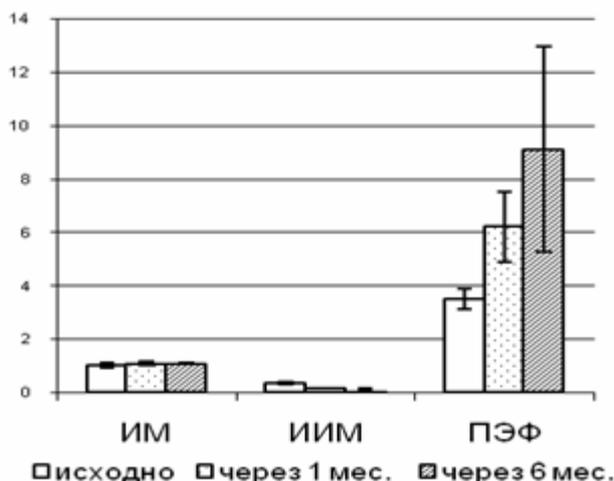


Рис. 2. Изменение реакции гиперчувствительности замедленного типа у больных с неаллергической формой атопического дерматита ($n=6$) в процессе Т-клеточной вакцинации, * - $p < 0,05$.

Изменения в реакции гиперчувствительности замедленного типа в совокупности с увеличением числа клеток, предположительно являющихся антиэрготипическими регуляторными клетками, при неаллергической форме атопического дерматита являются отражением эффекторных функций антиэрготипического ответа.

При аллергической форме заболевания отмечалось иное воздействие на клеточное звено иммунной системы. Было выявлено увеличение общего числа $CD8^+$ -лимфоцитов (с $23 \pm 1,24$ до $26 \pm 1,03$ % ($p < 0,05$)) через 6 месяцев терапии и, соответственно, снижение иммунорегуляторного индекса (с $1,8 \pm 0,14$ до $1,5 \pm 1,11$ ($p < 0,05$)). Мы предположили, что эти клетки являются цитолитическими, т. к. в литературе описано появление в ответ на иммунизацию активированными Т-лимфоцитами антиэрготипических $CD8^+$ -клеток, обладающих цитолитической активностью против активированных аутологичных $CD4^+$ -клеток [5]. Вероятно, эти $CD8^+$ -лимфоциты, ингибируя активированные $CD4^+$ -клетки, активно участвующие в патогенезе аллергической формы атопического дерматита, подавляли реакции гиперчувствительности I типа, играющие важную роль в иммунопатогенезе этой формы, и переключали цитокиновый профиль в сторону Th1-типа, чем и обусловили высокий клинический эффект.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при аллергической форме атопического дерматита положительная клиническая динамика от введения аутологичных активированных Т-клеток сопровождалась повышением числа $CD8^+$ -клеток, при неаллергической форме — нарастанием числа $CD8^+CD25^+$ Т-клеток и повышением активности лимфоцитов в продукции

факторов ингибиции миграции в реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Авторы выражают благодарность заведующей аллергологическим отделением клиники иммунопатологии В.М. Непомнящих и врачам Д.В. Деминой и М.И. Леоновой, а также научным сотрудникам лаборатории клинической иммунопатологии О.Ю. Корольковой, Н.В. Пронкиной и И.В. Шишковой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кожевников В.С., Баровская Н.А., Королькова О.Ю., Непомнящих В.М. и др. Способ лечения атопического дерматита: пат. 2340348 Рос. Федерация // патентообладатель ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН. — заявл. 04.04.2007; опублик. 610.12.2008. — Бюл. 34. — 1 с.
2. Лозовой В.П., Кожевников В.С. Методы оценки клеточных эффекторных функций гиперчувствительности замедленного типа: метод. рек. МЗ СССР. — М., 1990. — 11 с.
3. Bienvenu B., Martin B., Auffray C., Cordier C. et al. Peripheral $CD8^+CD25^+$ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity // J. Immunol. — 2005. — Vol. 175. — P. 246 — 253.
4. Cohen I.R., Quintana F.J., Mimran A. Tregs in T cell vaccination: exploring the regulation of regulation // J. Clin. Invest. — 2004. — Vol. 114. — P. 1227 — 1232.
5. Correale J., Rojany M., Weiner L.P. Human $CD8^+TCR\alpha/b^+$ and $TCR\gamma/d^+$ cells modulate autologous autoreactive neuroantigen-specific $CD4^+$ T-cells by different mechanisms // J. Neuroimmunol. — 1997. — Vol. 80. — P. 47-64.
6. Cosmi L., Liotta F., Lazzeri E., Francalanci M. et al. Human $CD8^+CD25^+$ thymocytes sharing phenotypic and functional features with $CD4^+CD25^+$ regulatory thymocytes // Blood. — 2003. — Vol. 102. — P. 4107 — 4114.
7. Huurman V.A., Decochez K., Mathieu C., Cohen I.R. et al. Therapy with the hsp60 peptide DiaPep277 in C-peptide positive type 1 diabetes patients // Diabetes Metab. Res. Rev. — 2007. — Vol. 23(4). — P. 269 — 275.
8. Leung D.Y.M., Boguniewicz M., Howell M.D., Nomura I. et al. New insights into atopic dermatitis // J. Clin. Invest. — 2004. — Vol. 113 (5). — P. 651 — 657.
9. Ling E.M., Smith T., Nguyen X.D., Pridgein C. et al. Relation of $CD4^+CD25^+$ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation in atopic status and expression of allergic disease // Lancet. — 2004. — Vol. 363. — P. 608 — 615.
10. Lohse A.W., Mor F., Karin N., Cohen I.R. Control of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cells responding to activated T cells // Science. — 1989. — Vol. 244. — P. 820 — 822.
11. Mimran A., Mor F., Carmi P., Quintana F.J. et al. DNA vaccination with $CD25$ protects rats from adjuvant arthritis and induces an anti-ergotypic response // J. Clin. Invest. — 2004. — Vol. 113. — P. 924 — 932.

12. Novak N., Bieber T., Leung D.Y.M. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis // J. Allergy Clin. Immunol. — 2003. — Vol. 112. — P. 128–139.

13. Robinson D.S., Larché M., Durham R. Treg and allergic disease // J. Clin. Invest. — 2004. — Vol. 114 (10). — P. 1389–1397.

14. Shi H.-Z., Qin X.-J. CD4+ CD25+ regulatory T lymphocytes in allergy and asthma // Allergy. — 2005. — Vol. 60. — P. 986–995.

15. Zang Y.C., Hong J., Rivera V.M., Killian J. et al. Preferential recognition of TCR hypervariable regions by human anti-idiotypic T cells induced by T cell vaccination // J. Immunol. — 2000. — Vol. 164. — P. 4011–4017.

Сведения об авторах

Шестакова Наталья Алексеевна – старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБУ Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера СО РАМН, врач аллерголог-иммунолог, кандидат медицинских наук (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г; тел.: 8 (391) 288-52-63; факс: 8 (391) 212-52-63; e-mail:)

Кожевников Владимир Сергеевич – заведующий лабораторией клинической иммунопатологии ФГБУ Научно-исследовательский институт клинической иммунологии СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14; тел.: 8 (383) 228-21-20; факс: 8 (383) 222-70-28)