

- evaluation of cell-based indirect immunofluorescence. *Autoimmun. Rev.* 2012; 11: 713–6.
25. Voigt J., Krause C., Rohwäder E., Saschenbrecker S., Hahn M., Danckwardt M. et al. Automated indirect immunofluorescence evaluation of antinuclear autoantibodies on HEp-2 cells. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012: 651058. doi: 10.1155/2012/651058.
26. Bonroy C., Verfaillie C., Smith V., Persijn L., De Witte E., De Keyser F., Devreese K. Automated indirect immunofluorescence antinuclear antibody analysis is a standardized alternative for visual microscope interpretation. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51(9): 1771-9. doi: 10.1515/cclm-2013-0016.
27. Roggenbuck D., Hiemann R., Schierack P., Reinhold D., Conrad K. Digital immunofluorescence enables automated detection of antinuclear antibody endpoint titers avoiding serial dilution. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2014; 52(2): e9–e11. doi: 10.1515/cclm-2013-0543.

Поступила 16.01.14

Received 16.01.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.514-092:612.017.1]-036.12-078.33

Ащина Л.А., Баранова Н.И., Коженкова С.В.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОКИНОВОЙ ПРОДУКЦИИ В СЫВОРОТКЕ И ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ АУТОИММУННОЙ КРАПИВНИЦЕЙ

ГБОУ ДПО «Пензенский институт усовершенствования врачей» Минздрава России, 440060, г. Пенза, Россия

Провели анализ уровня интерлейкина (IL)-4, IL-10, IL-17, IL-18 и интерферона (IFN) γ в сыворотке и в спонтанной и индуцированной продукции клетками иммунной системы методом *ex vivo* у 100 больных хронической аутоиммунной крапивницей (ХАК) и 30 здоровых лиц. У больных ХАК выявили повышение спонтанной продукции IL-4, спонтанной и индуцированной продукции IL-17 и IFN γ , снижение спонтанной и индуцированной продукции IL-18, что указывает на одновременную активацию Th1-, Th2- и Th17-популяции T-лимфоцитов. При изучении уровня цитокинов в сыворотке крови выявили только снижение уровня IL-4 у больных ХАК по сравнению с таковым у здоровых лиц. Уровень других изучаемых цитокинов достоверно не различался, что доказывает малую информативность определения содержания цитокинов в сыворотке крови и преимущество использования метода *ex vivo* с определением уровня цитокинов в цельной крови.

Ключевые слова: хроническая аутоиммунная крапивница; цитокины; спонтанная продукция; индуцированная продукция; метод *ex vivo*.

Aschina L.A., Baranova N.I., Kojenkova S.V.

THE COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF CYTOKINE PRODUCTION IN SERUM AND WHOLE BLOOD IN PATIENTS WITH CHRONIC AUTOIMMUNE NETTLE RASH

The Pensa institute of post-graduate medical education of Minzdrav of Russia, 440060 Pensa, Russia

The sampling of 100 patients with chronic autoimmune nettle rash and control group of 30 healthy donors was analyzed for identification of level of interleukin (IL)-4, IL-10, IL-17, IL-18 and γ -interferon (IFN) in serum of patients. The same sampling was examined using method *ex vivo* for spontaneous and induced production by cells of immune system. In patients with chronic autoimmune nettle rash increasing of spontaneous production of IL-4 and spontaneous and induced production of IL-17 and IFN was identified. The decreasing of spontaneous and induced production of IL-18 was detected too. These occurrences indicate to simultaneous activation of Th1, Th2 and Th17-population of T-lymphocytes. The analysis of level of cytokines in blood serum established only decreasing of level of IL-4 in patients with chronic autoimmune nettle rash as compared with healthy individuals. The level of other analyzed cytokines had no reliable differences that demonstrate both low informativeness of detection of content of cytokines in blood serum and advantage of application of method *ex vivo* with detection of level of cytokines in whole blood.

Key words: chronic autoimmune nettle rash; cytokines; spontaneous production; induced production; method *ex vivo*.

Введение. Одной из актуальных проблем современной алергологии является хроническая аутоиммунная крапивница (ХАК), доля которой в структуре хронической крапивницы (ХК) достигает 45% [1]. Эта форма ХК является наиболее сложной в плане тяжести течения заболевания, понимания патогенетических механизмов и лечения пациентов. Результаты исследований последних лет доказали роль интерлейкина (IL)-4, IL-10, IL-17, IL-18 и интерферона (IFN) γ в им-

мунологических механизмах развития ХАК [2–5]. Однако до настоящего времени уровень цитокинов при ХАК изучали только в сыворотке крови, данные по их содержанию в цельной крови, а именно в спонтанной и индуцированной продукции клетками иммунной системы в тесте *ex vivo* отсутствуют. Кроме того, в настоящее время доказано, что данный метод является перспективным при изучении продукции цитокинов и предусматривает работу с цельной кровью без выделения клеток, что приближает изучение цитокинов к условиям *in vivo* [6]. Данный тест позволяет определить как спонтанную, так и индуцированную продукцию цитокинов клетками иммунной системы. Изучение спонтанной продукции дает возможность оценить состояние клеток в организме обследуемого человека, а индуцированной – их потенци-

Для корреспонденции:

Ащина Людмила Андреевна, науч. сотр.

Адрес: 440060, Пенза, ул. Стасова, 8а

E-mail: pushino2008@yandex.ru

альную способность к синтезу цитокинов, что очень важно для оценки иммунологической реактивности. Известно, что уровень цитокинов в сыворотке крови отражает текущее состояние работы иммунной системы и развитие защитных реакций, т.е. синтез цитокинов клетками организма *in vivo*. Однако, поскольку образование и высвобождение этих высокоактивных молекул происходят кратковременно и из-за присутствия специфических и неспецифических факторов связывания в крови, цитокины не всегда можно обнаружить в системном кровотоке. Поэтому изучение их уровня только в сыворотке крови не в полной мере отражает истинное состояние системы цитокинов [7].

С этой целью провели сравнительный анализ уровня патогенетически значимых цитокинов в цельной крови по спонтанной и индуцированной продукции клетками иммунной системы методом *ex vivo* и в сыворотке крови у больных ХАК и здоровых лиц (контрольная группа).

Материалы и методы. Обследовали 100 больных ХАК в возрасте от 18 до 60 лет (средний возраст 41 ± 12 лет). Из них 20% мужчин и 80% женщин. Также обследовали 30 здоровых лиц (контроль) в возрасте от 23 до 56 лет (средний возраст 34 ± 9 лет). Из них 22% мужчин и 78% женщин. У всех пациентов, включенных в исследование, определяли уровень IL-4, IL-10, IL-17, IL-18 и IFN γ в сыворотке и цельной крови методом *ex vivo* [8]. Венозную гепаринизированную кровь разбавляли до концентрации 1:5 стерильной средой 199 с солями Хенкса и глутамином производства «ПанЭко» (Россия). Для постановки спонтанной продукции клеток к разбавленной крови добавляли стерильную среду 199, а для постановки индуцированной продукции – основной митоген – ФГА. Проводили инкубацию в течение 6 ч при 37°C, пробирки центрифугировали при 800 g в течение 5 мин, супернатант после отделения осадка замораживали и хранили при -20°C до проведения количественного анализа цитокинов. Концентрацию IL-4, IL-10, IL-17, IL-18 и IFN γ в исследуемых образцах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа наборами ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Для статистической обработки полученных результатов использовали пакет прикладных программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом 25–75-й процентиль. Для сравнения парных количественных значений использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Гипотезы рассматривали как статистически достоверные при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Определили уровень цитокинов в спонтанном и ФГА-индуцированном супернатантах цельной крови и сыворотке у больных ХАК и здоровых лиц и провели детальный анализ полученных результатов (см. таблицу). У больных ХАК по сравнению со здоровыми лицами выявили достоверно повышенный уровень спонтанной продукции IL-4 (0,55 (0,2–3,5) пг/мл против 0 (0–0) пг/мл; $p = 0,0001$). При этом уровень индуцированной продукции IL-4 у больных достоверно не отличался от показателей в контрольной группе ($p > 0,05$). При анализе уровня IL-4 в сыворотке крови у больных ХАК обнаружили, что данный показатель достоверно снижался в 12 раз (0,39 (0–0,71) пг/мл против 4,6 (0,21–5,0) пг/мл; $p = 0,00003$). Полученные данные по повышенной спонтанной продукции ИЛ-4 свидетельствуют об активации Th2-иммунного ответа у больных ХАК, что можно объяснить присутствием атопического механизма заболевания у некоторых из них. Однако в сыворотке крови уровень IL-4 у больных, напротив, был снижен по сравнению с таковым в контрольной группе, что не отражало истинную картину иммунологических нарушений и доказывало малую информативность изучения содержания цитокинов в сыворотке крови.

При изучении спонтанной и индуцированной продукции IL-10 клетками иммунной системы, а также в сыворотке крови не выявили достоверно значимых различий между больными ХАК и здоровыми лицами ($p > 0,05$).

Отдельно следует отметить, что при исследовании со-

держания IL-17 у больных ХАК обнаружили значительные изменения, что выражалось в 10-кратном повышении уровня спонтанной продукции (56,15 (31,7–98,1) пг/мл против 5,4 (0–22) пг/мл; $p = 0,0007$) и 14-кратном повышении индуцированной (86,9 (55,95–112,6) пг/мл против 6,1 (0–23,5) пг/мл; $p = 0,00003$). Однако в сыворотке крови уровень IL-17 не был различен у больных ХАК и лиц контрольной группы. Известно, что IL-17 является провоспалительным цитокином и его уровень повышается при аутоиммунном процессе, что может указывать на участие данного цитокина в патогенетических механизмах ХАК [5].

Результаты оценки показателей спонтанной и индуцированной продукции IL-18 у больных ХАК показали статистически значимый более низкий уровень спонтанной продукции (38,5 (28–54,9) пг/мл против 80,4 (54–123) пг/мл; $p = 0,0009$). Аналогичные изменения получили по уровню индуцированной продукции IL-18 у больных ХАК, который был достоверно более низким (43,1 (23,8–53,9) пг/мл против 72,5 (52–97) пг/мл; $p = 0,01$). При сравнении уровня IL-18 в сыворотке крови у больных ХАК и лиц группы контроля не выявили статистически значимых различий ($p > 0,05$). Однако данный показатель у больных имел тенденцию к снижению (87,1 (61,4–198,2) пг/мл против 111 (60–121,3) пг/мл). Показано, что IL-18 может играть значимую роль в развитии аутоиммунных и аллергических заболеваний и выступать в качестве прямого фактора, высвобождающего гистамин. Но данные по его содержанию в цельной крови в доступной литературе отсутствуют, а результаты, полученные в сыворотке крови, свидетельствуют о том, что его уровень не различается у больных ХАК и здоровых лиц и изменяется только в зависимости от тяжести заболевания [9].

Результаты сравнительного анализа содержания IFN γ показали, что уровень спонтанной продукции данного цитокина клетками иммунной системы у больных ХАК был достоверно более высоким по сравнению с таковым у здоровых лиц (11,3 (0–33,6) пг/мл против 0 (0–0) пг/мл; $p = 0,0004$). При изучении индуцированной продукции IFN γ у больных выявили ее повышение до 198,6 (56,1–357,4) пг/мл по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе, в которой данный показатель составил 73 (57,6–105) пг/мл ($p =$

Содержание цитокинов в спонтанном и индуцированном супернатантах цельной крови и сыворотке у больных ХАК и здоровых лиц (LQ-UQ)

Показатель, пг/мл	Больные ХАК (n = 100)	Контроль (n = 30)
IL-4 сп.	0,55 (0,2–3,5)*	0 (0–0)
IL-4 инд.	1,2 (0,4–3,3)	1,0 (0,7–3,3)
IL-4 сыв.	0,39 (0–0,71)*	4,6 (0,21–5,0)
IL-10 сп.	8,1 (0–17,8)	11,3 (6,05–18,9)
IL-10 инд.	11,6 (3,5–24,8)	8,85 (0,7–21,25)
IL-10 сыв.	0 (0–3,0)	1,0 (0–3,4)
IL-17 сп.	56,15 (31,7–98,1)*	5,4 (0–22,0)
IL-17 инд.	86,9 (55,95–112,6)*	6,1 (0–23,5)
IL-17 сыв.	0 (0–0)	0 (0–1,0)
IL-18 сп.	38,5 (28,0–54,9)*	80,4 (54,0–123,0)
IL-18 инд.	43,1 (23,8–53,9)*	72,5 (52,0–97,0)
IL-18 сыв.	87,1 (61,4–198,2)	111,0 (60,0–121,3)
IFN γ сп.	11,3 (0–33,6)*	0 (0–0)
IFN γ инд.	198,6 (56,1–357,4)*	73,0 (57,6–105,0)
IFN γ сыв.	0 (0–5,5)	0 (0–7,0)

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с показателями в группе контроля; сп. – спонтанная продукция, инд. – индуцированная; сыв. – в сыворотке крови.

0,028). В настоящее время доказана важная роль IFN γ в патогенезе аутоиммунных заболеваний, так как известно, что хронически высокий уровень данного цитокина способен запускать аутоиммунный процесс. Полученные нами результаты о повышенной спонтанной и индуцированной продукции IFN γ согласуются с данными литературы и могут указывать на ключевую роль данного цитокина в патогенезе ХАК [10].

Таким образом, выявленные изменения в системе цитокинов у больных при изучении их уровня в цельной крови методом *ex vivo* может свидетельствовать об одновременной активации Th1 (IFN γ)-, Th2 (IL-4)- и Th17 (IL-17)-популяций Т-лимфоцитов. Такая разбалансировка хелперных клонов Т-лимфоцитов характерна для аутоиммунных заболеваний [11].

С учетом полученных результатов, на наш взгляд, наиболее информативным является исследование уровня цитокинов в цельной крови методом *ex vivo* с определением спонтанной и индуцированной продукции клетками иммунной системы. Этот вывод сделан на основании результатов проведенного анализа уровня цитокинов в цельной крови и сыворотке, которые показали значительное повышение уровня IL-4, IL-17 и IFN γ в цельной крови, играющих ключевую роль в патогенезе ХАК, в то время как в сыворотке крови отметили достоверное снижение только уровня IL-4. Такие непоставимые данные могут быть связаны с тем, что уровень цитокинов в системном кровотоке даже у здоровых лиц может быть очень низким, и, возможно, данный метод является эффективным только при диагностике состояний, связанных с гиперпродукцией цитокинов [12].

Выводы. 1. Выявленные нарушения в системе цитокинов методом *ex vivo* у больных ХАК характеризовались повышением спонтанной продукции IL-4, спонтанной и индуцированной продукции IL-17 и IFN γ , а также снижением спонтанной и индуцированной продукции IL-18 клетками иммунной системы.

2. Установлено снижение уровня IL-4 в сыворотке крови у больных ХАК, уровень других изучаемых цитокинов достоверно не отличался от такового у здоровых лиц.

3. При изучении содержания цитокинов у больных ХАК наиболее диагностически значимым является его исследование в цельной крови методом *ex vivo*, а не в сыворотке крови.

ЛИТЕРАТУРА

- Goh C.L., Tan K.T. Chronic autoimmune urticaria: where we stand? *Indian J. Dermatol.* 2009; 54 (3): 269–74.
- Баранова Н.И., Орлова Е.А., Ашина Л.А., Коженкова С.В. Сравнительная характеристика цитокинового профиля у больных с аутоиммунной и инфекционной формами крапивницы. *Аллергология и иммунология.* 2012; 13 (1): 34.
- Ying S., Kikuchi Y., Meng Q., Kay A.B., Kaplan A.P. Th1/Th2 cytokines and inflammatory cells in skin biopsy specimens from patients with chronic idiopathic urticaria: comparison with the allergen-induced late-phase cutaneous reaction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 109 (4): 694–700.
- Jin C.Y., Wang D.L., Fang Z.D. 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. Chinese.* 2008; 28 (4): 358–60.
- Dos Santos J.C., Azor M.H., Nojima V.Y., Lourenço F.D., Prearo E., Maruta C.W. et al. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and imbalanced regulatory T-cell cytokines production in chronic urticarial. *Int. Immunopharmacol.* 2008; 8 (10): 1433–40.
- Рыжикова С.Л., Дружинина Ю.Г., Рябичева Т.Г., Вараксин Н.А. Стандартизация методики определения продукции цитокинов клетками крови *ex vivo*. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2011; 11: 49–53.
- Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. *Руководство по клинической иммунологии.* М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.
- Исаченко Е.Г., Виткина Т.И., Бердышев Е.В. *Способ прогнозирования развития аллергопатологии на доклиническом этапе. ПАТ. № 2192008 (РФ).* *Бюл.* 2002; 30: 10.
- Tedeschi A., Lorini M., Suli C., Asero R. Serum interleukin-18 in patients with chronic ordinary urticaria: association with disease activity. *Clin. Exp. Dermatol.* 2007; 32 (5): 568–70.
- Skurkovich S.V., Skurdovich B., Kelly J.A. Anticytokine therapy – new approach to the treatment of autoimmune and cytokine – disturbance diseases. *Medical Hypotheses.* 2002; 59 (6): 770–80.
- Тыртышная Г.В., Парахонский А.П. Взаимосвязь нарушений иммунной и эндокринной систем при аутоиммунной патологии. *Современные наукоемкие технологии.* 2007; 2: 80–1.
- Останин А.А., Черных Е.Р. Сравнительная оценка уровня 17 цитокинов в сыворотке и цельной крови здоровых доноров методом проточной флюорометрии. *Цитокины и воспаление.* 2005; 4 (2): 25–32.

REFERENCES

- Goh C.L., Tan K.T. Chronic autoimmune urticaria: where we stand? *Indian J. Dermatol.* 2009; 54 (3): 269–74.
- Baranova N.I., Orlova E.A., Ashchina L.A., Kozhenkova S.V. The comparative characteristics of cytokine profile in patients with autoimmune and infectious forms of urticaria. *Allergologiya i immunologiya.* 2012; 13 (1): 34. (in Russian)
- Ying S., Kikuchi Y., Meng Q., Kay A.B., Kaplan A.P. TH1/TH2 cytokines and inflammatory cells in skin biopsy specimens from patients with chronic idiopathic urticaria: comparison with the allergen-induced late-phase cutaneous reaction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 109 (4): 694–700.
- Jin C.Y., Wang D.L., Fang Z.D. 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. Chinese.* 2008; 28 (4): 358–60.
- Dos Santos J.C., Azor M.H., Nojima V.Y., Lourenço F.D., Prearo E., Maruta C.W. et al. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and imbalanced regulatory T-cell cytokines production in chronic urticarial. *Int. Immunopharmacol.* 2008; 8 (10): 1433–40.
- Ryzhikova S.L., Druzhinina Yu.G., Ryabicheva T.G., Varaksin N.A. The standardization of technique of detection of blood cells cytokine production *ex vivo*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2011; 11: 49–53. (in Russian)
- Khaitov R.M., Pinegin B.V., Yarilin A.A. *Manual of Clinical Immunology.* Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)
- Isachenko E.G., Vitkina T.I., Berdyshev E.V. *A tool for predicting development of allergy pathology at the preclinical stage. PAT. № 2192008 (RF).* *Byul.* 2002; 30: 10 p. (in Russian)
- Tedeschi A., Lorini M., Suli C., Asero R. Serum interleukin-18 in patients with chronic ordinary urticaria: association with disease activity. *Clin. Exp. Dermatol.* 2007; 32 (5): 568–70.
- Skurkovich S.V., Skurdovich B., Kelly J.A. Anticytokine therapy – new approach to the treatment of autoimmune and cytokine – disturbance diseases. *Medical Hypotheses.* 2002; 59 (6): 770–80.
- Tyrtyshnaya G.V., Parakhonskiy A.P. The relationship disorders of the immune and endocrine systems in the pathology of autoimmune. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii.* 2007; 2: 80–1. (in Russian).
- Ostanin A.A., Chernykh E.R. The comparative analysis of 17 cytokines level in serum and whole blood of healthy donors using the Bio-Plex protein assay system. *Tsitokiny i vospalenie.* 2005; 4 (2): 25–32. (in Russian)

Поступила 11.08.14
Received 11.08.14