

Wpływ kolonizacji skóry *Staphylococcus aureus* na wewnątrzkomórkową ekspresję cytokin w limfocytach T CD3⁺ krwi obwodowej u dzieci z wypryskiem atopowym

Influence of *Staphylococcus aureus* skin colonization on intracellular cytokine expression in peripheral blood CD3⁺ T cells in children with atopic eczema/dermatitis syndrome

EDYTA MACHURA^{1/}, BOGDAN MAZUR^{2/}, AUGUSTYN FOLWACZNY^{1/}, KRYSZYNA KARCZEWSKA^{1/}, EWA GOLEMIEC^{1/}, JOLANTA KAUFMAN^{2/}

^{1/} Klinika Gastroenterologii Alergologii i Zaburzeń Rozwoju Wiek Dziecięcego w Zabrzu Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

^{2/} Klinika Endokrynologii i Patofizjologii w Zabrzu Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

Streszczenie

Wprowadzenie. Wyprysk atopowy (WA) jest przewlekłą dermatozą zapalną, która często wyprzedza objawy astmy lub alergicznego nieżyty nosa. Wprawdzie w patogenie WA uznaje się kluczową rolę cytokin o profilu Th2, to są również dowody na udział INF- γ w przewlekłych zmianach skórnych. Wiadomo, że kolonizacja skóry *S.aureus* pogarsza przebieg kliniczny i wywołuje szereg zjawisk immunologicznych.

Cel pracy. Ocena populacji limfocytów T CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺ oraz wewnątrzkomórkowej ekspresji cytokin: IL-2, IL-4, INF- γ , TNF- α w limfocytach T CD3⁺ krwi obwodowej u dzieci z WA w zależności od kolonizacji skóry *S.aureus*.

Materiał i metody. Badanie przeprowadzono u 15 dzieci z WA, w tym u 6 dzieci (średnia wieku: 11,2 \pm 1,7) z kolonizacją skóry *S.aureus* (*S.aureus*⁺) i u 9 dzieci (średnia wieku: 12,3 \pm 0,97) bez obecności bakterii w wymazach ze skóry (*S.aureus*⁻). Grupę kontrolną stanowiło 7 dzieci zdrowych (średnia wieku: 11,5 \pm 1,3). Populacje limfocytów oraz wewnątrzkomórkową ekspresję cytokin po stymulacji PMA+ jonomycyną oznaczano metodą cytometrii przepływową.

Wyniki. Pomiędzy dziećmi z WA bez kolonizacji skóry gronkowcem (*S.aureus*⁻) i zdrowymi nie stwierdzono różnic w populacji limfocytów i produkcji cytokin. Dzieci z WA i kolonizacją skóry (*S.aureus*⁺) miały istotnie niższy odsetek limfocytów T CD4⁺ w krwi obwodowej ($p < 0,01$) oraz wyższą ekspresję TNF- α w limfocytach T CD3⁺ ($p < 0,03$). Stwierdzono ujemną korelację pomiędzy czasem trwania choroby a liczbą limfocytów T CD3⁺ (R: -0,58; $p < 0,02$) oraz ekspresją INF- γ (R: -0,67; $p < 0,006$) i IL-2 (R: -0,75; $p < 0,001$) w limfocytach T CD3⁺.

Wnioski. Obniżenie odsetka limfocytów T CD4⁺ w krwi obwodowej oraz wzrost produkcji TNF- α przez limfocyty T CD3⁺ stwierdzony u części dzieci z WA wynika ze współistnienia WA i kolonizacji skóry *S.aureus*.

Słowa kluczowe: WA, populacje limfocytów, cytokiny

Summary

Introduction. Atopic eczema (AE) is a chronic inflammatory skin disorder which often leads to asthma or allergic rhinitis. Although Th2 cytokines are recognised to play a key role in the pathogenesis of AE, also INF- γ contributes to chronic skin lesions. It is known that the extent of *S.aureus* skin colonisation correlates with AE disease activity and contributes to changes in the immunological profile.

Aim of the study. Determine the percentage of peripheral blood CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺ T cells as well as intracellular production of IL-2, IL-4, INF- γ and TNF- α by peripheral blood CD3⁺ T cells from AE children with respect to the degree of *S.aureus* skin colonisation.

Material and methods. The study involved 15 children, including 6 (average age 11,2 \pm 1,7) with *S.aureus* skin colonization (*S.aureus*⁺), and 9 (average age 12,3 \pm 0,97) without bacteria on skin (*S.aureus*⁻). The control group consisted of 7 healthy children with the same age average, i.e. 11,5 \pm 1,3. T cell subsets and intracellular cytokine production after p-methoxyamphetamine (PMA)+ionomycin stimulation were measured by flow cytometry.

Results. There was no difference in lymphocyte subsets and cytokine expression between AE children without bacteria on the skin (*S.aureus*⁻) and healthy controls. There was a significant decrease in the percentage of CD4⁺ ($p < 0,01$) and an increase in the percentage of CD3⁺ T cells producing TNF- α ($p < 0,03$) upon in vitro stimulation with PMA and ionomycin in children with skin colonization (*S.aureus*⁺). The duration of AE was inversely correlated both with absolute number of CD3⁺ (R: -0,58, $p < 0,02$), and the percentage of CD3⁺ T cells producing INF- γ (R: -0,67; $p < 0,006$) and IL-2 (R: -0,75; $p < 0,001$).

Conclusions. A decrease in the percentage of CD4⁺ T cells and increased intracellular production of TNF- α by peripheral blood CD3⁺ T cells in a subgroup of children with AE may result from AE and the coexisting *Staphylococcus aureus* skin infection.

Key words: AE, lymphocyte subsets, cytokines

Wyprysk atopowy (WA) to przewlekła choroba zapalna skóry z towarzyszącym wybitnym świądem, typową morfologią i lokalizacją zmian skórnych. Zwykle zaczyna się w okresie dziecięcym i często wyprzedza objawy astmy lub alergicznego nieżytu nosa [1]. O ile rozpoznanie WA w oparciu o kryteria Hanifina i Rajki nie sprawia zwykle trudności, to złożona patogeneza choroby budzi wiele wątpliwości [2,3]. U około 80% pacjentów z WA stwierdza się obecność swoistych IgE dla alergenów inhalacyjnych lub pokarmowych [3]. Chociaż wyłączenie znaczenie alergii/atopii w WA jest kontrowersyjne, to immunologiczne mechanizmy leżące u podstaw WA są podobne jak w innych chorobach alergicznych [4,5]. Wśród wielu nieprawidłowości immunologicznych stwierdzanych u chorych z WA istotne znaczenie przypisuje się wysokiemu stężeniu IgE i eozynofili, które odzwierciedlają wzmożoną ekspresję cytokin o profilu Th2, tj. interleukiny (IL)-4, IL-5, IL-13 uwalnianych przede wszystkim przez limfocyty T CD4⁺. Fenotyp WA, podobnie jak innych chorób atopowych, zależy od predyspozycji genetycznej, na którą nakładają się wpływy wielu czynników środowiskowych [6,7].

Wiadomo, że pacjenci z WA są podatni na wirusowe, bakteryjne i grzybicze infekcje skóry. Wśród nich szczególną rolę przypisuje się *Staphylococcus aureus*, który kolonizuje skórę od 64 do 90% pacjentów z WA [8,9,10]. Udowodniono, że kolonizacja *S.aureus* zaostrza przebieg WA, a liczba koloni koreluje ze stopniem ciężkości choroby [8]. Skłonność do zakażeń gronkowcowych skóry chorych z WA wiąże się z zaburzeniami wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej. Nieprawidłowy skład lipidów warstwy rogowej, alkaliczne pH skóry, niskie stężenia IgA w wydzielinie gruczołów potowych oraz niedobór peptydów antibakteryjnych – katelicydyny i β -defensyny, stwierdzany u chorych z WA, sprzyjają kolonizacji skóry przez *S.aureus* oraz znacznie utrudniają jego eliminację [11,12,13]. Obecnie wiadomo, że *S.aureus* jest źródłem prozapalnych białek, tj. alfa-toksyny, proteiny A oraz posiada receptory o dużym powinowactwie do białek macierzy pozakomórkowej – kolagenu (*Cna-collagen-binding protein*), fibrynogenu (*CLf-clumping factor*) i fibronektyny (*Fnbp-fibronectin-binding protein*) [14]. Dodatkowo cytokiny, które w WA występują w zwiększonej ilości, tj. IL-4 i IL-13, poprzez wzrost ekspresji fibronektyny i fibrynogenu wzmagają adhezję gronkowców do zmienionej zapalnie skóry. *S.aureus* jest również źródłem immunomodulujących toksyn, jak: SEB A B C (*staphylococcal enterotoxin A, B, C*) i TSST-1 (*toxic shock syndrome toxin*) [15]. Toksyny te wykazują właściwości superantygenów, przez co aktywują wiele klonów komórkowych, w tym limfocyty i makrofagi oraz zwiększają uwalnianie szeregu cytokin [16], opóźniają apoptozę eozynofili [17], a także, jak wykazały niedawno opublikowane badania, wpływają na funkcje komórek T regulacyjnych o fenotypie – CD4⁺CD25⁺ [18]. Warto nadmienić, że *S.aureus* indukuje syntezę specyficznych IgE, któ-

rych stężenie koreluje ze stopniem ciężkości WA. Z kolei wysokie stężenie IgE, poprzez hamujący wpływ na adhezję neutrofilów i fagocytozę, sprzyja przewlekłej kolonizacji *S.aureus* [19]. Wykazano również, że niedobór p/ciał w klasie IgG2 przeciwko enterotoksynom gronkowcowym pogarsza przebieg kliniczny choroby [20].

Celem pracy była ocena subpopulacji limfocytów T: CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ oraz CD3⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺ oraz wewnątrzkomórkowej ekspresji cytokin: IL-2, IL-4, INF- γ , TNF- α w limfocytach T CD3⁺ krwi obwodowej u dzieci z WA, u których stwierdzono obfity wzrost kolonii *Staphylococcus aureus* w wymazie ze zmian skórnych.

MATERIAŁ I METODY

Pacjenci

Do badania włączono 15 dzieci, które spełniały kryteria WA wg Hanifina i Rajki [21]. Czas trwania choroby wahał się 2,7-16,5 lat (średnia 12,08 \pm 1,5). Stopień ciężkości choroby oceniany wg skali SCORAD [22].

U wszystkich dzieci pobierano wymazy ze skóry z 3 okolic ciała. Grupę I stanowiło 6 dzieci (średni wiek w latach: 11,2 \pm 1,7, SCORAD – 54,5) z rozległymi zmianami wysiękowymi, licznymi nadżerkami i świeżymi zadrapaniami oraz obfitym wzrostem kolonii *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*⁺) w posiewie ze zmian skórnych. Grupę II stanowiło 9 dzieci (średni wiek w latach: 12,3 \pm 0,97, SCORAD – 46,6) bez kolonizacji skóry *S.aureus* (*S.aureus*⁻), u których dominowały zmiany grudkowo-wypryskowe z tendencją do lichenizacji skóry oraz ślady po starych zadrapaniach. U żadnego z badanych dzieci nie stosowano kortykosteroidoterapii systemowej ani też miejscowo kortykosteroidów o silnym działaniu co najmniej przez 4 tygodnie. Grupę kontrolną stanowiło 7 dzieci zdrowych z ujemnym wywiadem w kierunku chorób atopowych oraz ujemnymi punktowymi testami skórnymi z alergenami roztoczy, pyłków i pleśni (średni wiek w latach: 11,5 \pm 1,3). Wszystkie badane dzieci z grupy A i B stosowały miejscowo obojętne emolienty oraz kortykosteroidy o słabym działaniu (0,5-1% hydrokortison). Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Śląskiej Akademii Medycznej

Subpopulacje limfocytów T

Do oceny subpopulacji limfocytów T zastosowano standardowe techniki dla immunofluorescencyjnego znakowania komórek zgodnie z wymogami podanymi przez producenta. Pełną krew żylną inkubowano przez 30 minut z odpowiednimi przeciwciałami monoklonalnymi, a następnie przez 10 minut z płynem lizującym FACSLysis (Becton Dickinson) w celu usunięcia erytrocytów. Po dwukrotnym przepłukaniu w buforze PBS, znakowane komórki wprowadzono do cytofluorometru przepływowego (Becton Dickinson), rejestrując 10000 komórek w każdej

próbce. Próbkę kontrolną stanowiła zawiesina Ig1+Ig2 mysich immunoglobulin odpowiednio wyznakowanych. Analizę uzyskanych parametrów morfologicznych i fluorescencji przeprowadzono z użyciem programu CellQuest.

Wewnątrzkomórkowa ekspresja cytokin

Ekspresję cytokin w limfocytach CD3⁺ przed i po stymulacji octanem myrystianianu forbolu (PMA) i jonomycyną przeprowadzono metodą cytometrii przepływową zgodnie z przyjętą procedurą [23]. Krew obwodową pobierano w ilości 2ml na heparynę i rozcieńczano w stosunku 1:1 płynem hodowlanym RPMI1640. Rozcieńczoną krew rozdzielano do dwóch próbek, do pierwszej (kontroli) dodawano 10 ul monensyny (2,5μM; Sigma), do drugiej – 10 ul monensyny, 20 ul jonomycyny (1μl/ml) oraz 20μl PMA (25ng/ml; Sigma). Krew inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 h. Po inkubacji krew rozdzielano do próbek zawierających przeciwciała monoklonalne CD3 FITC PerCP (Becton Dickinson) i ponownie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut. W celu permeabilizacji błony komórkowej po inkubacji do wszystkich komórek dodano 100 μl Reagentu A (Intra Prep DAKO) i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji dwukrotnie przepłukiwano PBS i dodawano przeciwciała anty-CD69, IL-2, IL-4, INF-γ i TNF-α (PE-Becton Dickinson) oraz 100μl Reagentu B i ponownie inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji przepłukiwano dwukrotnie w PBS i zawieszono w 0,5 ml Cell Wash. Znakowane komórki wprowadzono następnie do cytometru przepływowego FACS Scan (Becton Dickinson), rejestrując 10 000 przepływających komórek. Analizę parametrów morfologicznych i fluorescencji badanych komórek przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego Cell Quest (Becton Dickinson)

Analiza statystyczna

Porównanie wartości średnich w badanych grupach dokonano za pomocą nieparametrycznego testu U Mann'a-

Whitney'a. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią i błąd standardowy (SE), przyjmując wartość $p < 0,05$ za istotną statystycznie. Korelację wybranych parametrów przeprowadzono za pomocą testu korelacji rang Spearmana.

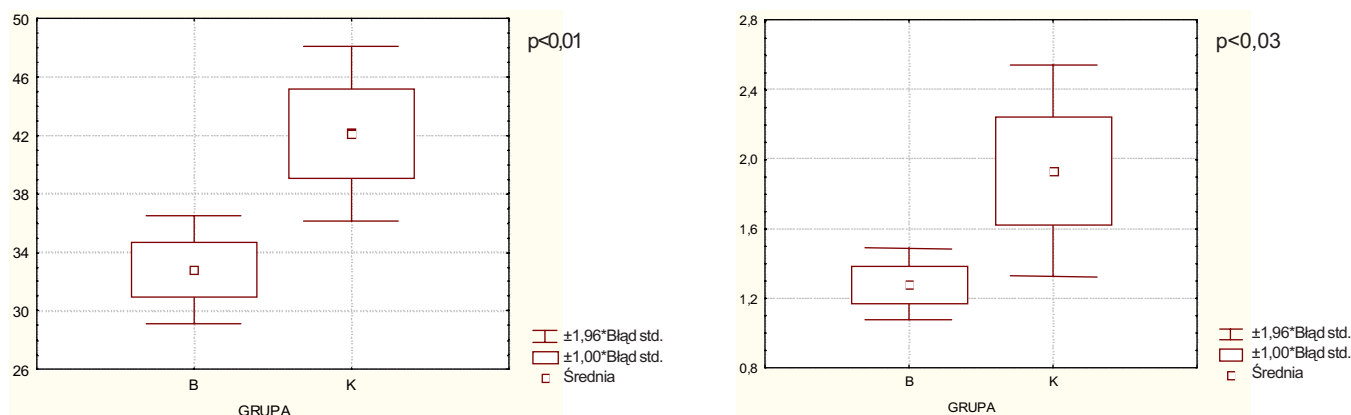
WYNIKI

Całkowite stężenie IgE a eozynofilia

U dzieci z WA i kolonizacją skóry *S.aureus* (WA *S.aureus*⁺) stężenie IgE było istotnie wyższe niż u dzieci zdrowych; $p < 0,007$ (WA *S.aureus*⁺: 2000±987 UI/ml, dzieci zdrowe: 68,7±138 UI/ml). Również u dzieci z WA, u których nie stwierdzono obecności bakterii w wymazach ze skóry (WA *S.aureus*⁻), stężenie IgE (722,1±369 UI/ml) było wyższe w porównaniu do wartości stwierdzanych u dzieci zdrowych; $p < 0,03$. Odsetek eozynofilów u dzieci z WA *S.aureus*⁺ był istotnie wyższy niż u dzieci zdrowych; $p < 0,009$ (WA *S.aureus*⁺: 11,8±4,1%, dzieci zdrowe: 2,1±0,9%). Także w grupie dzieci z WA *S.aureus*⁻ odsetek eozynofilów (8,7±2,2%) był wyższy niż w grupie kontrolnej; $p < 0,006$. Eozynofilia bezwzględna u dzieci z WA *S.aureus*⁺ była istotnie wyższa niż u zdrowych; $p < 0,008$ (WA *S.aureus*⁺: 394,6±74,4 μl, dzieci zdrowe: 120±15,8 μl). U dzieci z WA *S.aureus*⁻ eozynofilia (357±27,7 μl) także była wyższa niż w grupie kontrolnej; $p < 0,001$.

Subpopulacje limfocytów T

U dzieci z WA *S.aureus*⁺ odsetek limfocytów T CD4⁺ był istotnie niższy niż u dzieci z grupy kontrolnej; $p < 0,01$ (WA *S.aureus*: 32,8±1,8%, dzieci zdrowe: 42,1±3,0%). Liczba bezwzględna CD4⁺ w tej grupie dzieci nie różniła się od wartości stwierdzonej u zdrowych dzieci (1419,5±38,3 v/s 998,73±130). Stosunek CD4/CD8 u dzieci z WA *S.aureus*⁺ był niższy niż u zdrowych; $p < 0,03$ (WA *S.aureus*⁺: 1,2±0,1, dzieci zdrowe: 1,9±0,31) (ryc. 1). U dzieci z WA *S.aureus*⁺ odsetki i bezwzględne liczby pozostałych subpopulacji limfocytów nie różniły się istotnie od wartości uzyskanych u dzieci zdrowych (WA *S.aureus*⁺: CD3⁺: 62,8±1,7% (2873,6±839), CD8⁺: 26,1±1,61%



B – grupa badana – dzieci WA *S.aureus*⁺ K – grupa kontrolna – dzieci zdrowe

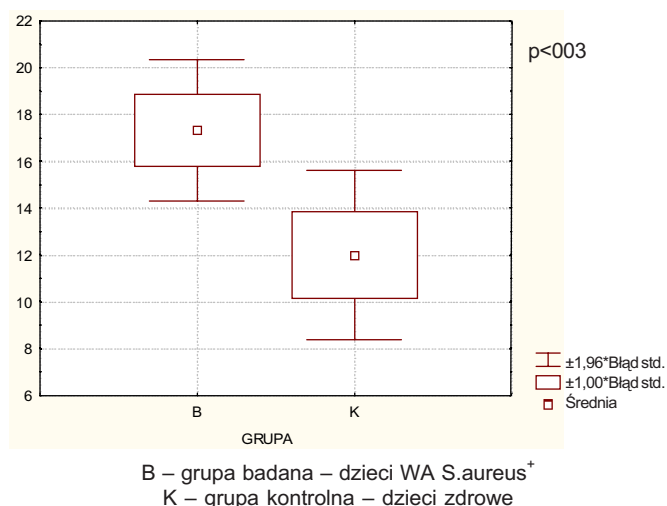
Ryc. 1. Porównanie odsetka komórek CD4⁺ i wskaźnika CD4⁺/CD8⁺ w krwi obwodowej w badanych grupach. Test U Mann'a-Whitney'a

(1251,2±479), CD3⁺CD25⁺: 4,6±0,8% (116 ±26,2), CD4⁺CD25⁺: 4,5±0,8% (58,7±12,7), dzieci zdrowe: CD3⁺:65,5±2,9% (1568,2±203,1), CD8⁺22±2% (568,8±87,3), CD3⁺CD25⁺:7,1±0,76% (109±13,8), CD4⁺CD25⁺: 6,7±9,9% (65±28), CD4/CD8:1,9±0,31).

U dzieci z grupy II – WA *S.aureus*⁻ uzyskano następujące wartości odsetkowe (liczby bezwzględne) subpopulacji limfocytów: CD3⁺: 63±3,2% (1392,3±127), CD4⁺: 39±1,8% (865±78,1), CD8⁺: 25,3±1,6% (562±52,3), CD3⁺CD25⁺: 6,0±0,52% (83,8±11,3), CD4⁺CD25⁺: 5,4±0,55% (47,2±6,9), CD4/CD8: 1,5±0,17. Wartości te nie różniły się od wartości obserwowanych u dzieci zdrowych. Pomiędzy grupami: I – dzieci WA *S.aureus*⁺ i II – dzieci WA *S.aureus*⁻ nie wykazano różnic statystycznych odnośnie odsetka i liczby limfocytów badanych subpopulacji.

Wewnątrzkomórkowa ekspresja cytokin

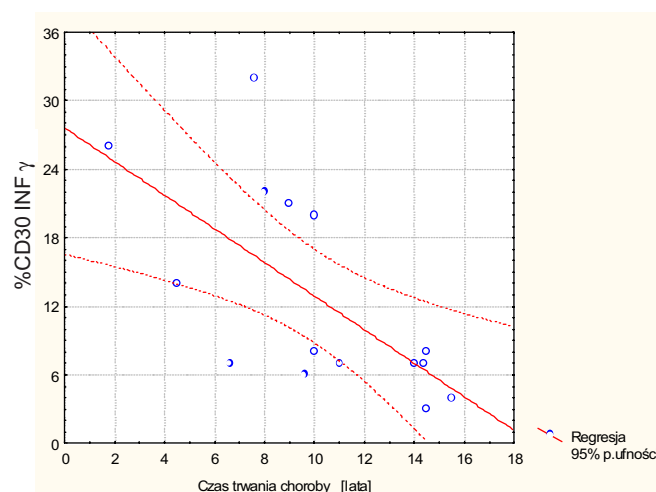
Odsetek limfocytów CD3⁺IL-2⁺ był wyższy u dzieci grupie I, tzn. WA *S.aureus*⁺ (15,1±2,5%), ale różnica nie była istotna statystycznie w stosunku do dzieci WA *S.aureus*⁻ (9,8±1,6%) i dzieci zdrowych (11,4±2,5%). Odsetek CD3⁺IL-4⁺ u dzieci z WA *S.aureus*⁺ (8±2,0%) także był nieco wyższy niż u dzieci z WA *S.aureus*⁻ (6,8±0,88%) oraz u dzieci zdrowych (6,5±0,3%), ale różnice były nieistotne. Ekspresja INF-γ w limfocytach CD3⁺ była również wyższa u dzieci z WA *S.aureus*⁺ (17,0±4,61%) niż u dzieci z WA *S.aureus*⁻ (10,0±2,1%) i grupie kontrolnej (11,7±3,06%), ale różnice pomiędzy grupami były nieistotne. Odsetek limfocytów CD3⁺TNF-α⁺ u dzieci z WA *S.aureus*⁺ (17,3±3,0%) był istotnie wyższy zarówno w porównaniu do dzieci zdrowych (12±1,85%); p<0,03, jak i porównaniu do dzieci z WA *S.aureus*⁻ (12,6±0,55%); p<0,04 (ryc. 2). Produkcja cytokin u dzieci z grupy II (WA *S.aureus*⁻) nie różniła się znacząco od produkcji cytokin u dzieci zdrowych.



Ryc. 2. Porównanie wewnątrzkomórkowej ekspresji TNF-α w stymulowanych in vitro (PMA+jonomycyna) limfocytach CD3⁺ (CD3⁺ TNF-α⁺) w badanych grupach. Test U Mann'a-Whitney'a

Wpływ czasu trwania choroby i SCORAD na analizowane parametry

Czas trwania WA był odwrotnie skorelowany z wewnątrzkomórkową ekspresją INF-γ (R:-0,67; p<0,006) (ryc. 3), IL-2 (R:-0,75; p<0,001) w limfocytach T CD3⁺, bezwzględną liczbą limfocytów (R:-5,4; p<0,03) oraz limfocytów T CD3⁺ (R:-0,58; p<0,02). Ponadto stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy czasem trwania choroby a odsetkiem limfocytów CD3⁺CD25⁺ (R:0,75; p<0,001), CD4⁺CD25⁺ (R:0,74; p<0,001). Z kolei wartość SCORAD była dodatnio skorelowana z całkowitym stężeniem IgE (R:0,67; p<0,005), a odwrotnie z wartością odsetkową limfocytów CD3⁺ (R:-0,53, p<0,03).



Ryc. 3. Wykres zależności odsetka limfocytów CD3⁺INF-γ⁺ od czasu trwania WA. Korelacja rang Spearmanna (R=-0,67; p<0,006)

DYSKUSJA

Wiele badań potwierdza szczególną rolę aktywnych limfocytów T CD4⁺ w patogenezie WA. Udowodniono, że aktywne limfocyty T pamięci-CD4⁺CD45RO⁺, wykazujące ekspresję cząsteczki CLA (*cutaneous lymphocyte antigen*), dominują w zmianach zapalnych skóry u chorych z WA oraz obecne są w skórze pozornie wglądającej na zdrową [24]. W wielu badaniach wykazano również, że limfocyty T CD4⁺CD45RO⁺CLA⁺ u chorych z WA występują w zwiększonej proporcji w krwi obwodowej w porównaniu do osób z astmą i zdrowych [25].

W obecnym badaniu analizowaliśmy populacje limfocytów T oraz produkcję cytokin w limfocytach T CD3⁺ krwi obwodowej u dzieci z WA w zależności od kolonizacji skóry *S.aureus*. Odsetki i liczby bezwzględne limfocytów T CD3⁺, CD4⁺ i CD8⁺ u dzieci z WA bez obecności *S.aureus* w skórze i w grupie dzieci zdrowych nie różniły się istotnie. Z kolei u dzieci z kolonizacją skóry *S.aureus* odsetek limfocytów CD4⁺ oraz stosunek CD4/CD8 były istotnie niższe niż u dzieci zdrowych. W tej grupie dzieci również wartości odsetkowe i liczby bezwzględne

limfocytów CD8⁺ były wyższe w porównaniu do wartości u zdrowych dzieci, ale różnice nie były istotne statystycznie. Obserwowana tendencja do wyższych wartości limfocytów T CD8⁺ u dzieci z WA, zwłaszcza w przypadku kolonizacji skóry *S.aureus*, może świadczyć o ich udziale w patogenezie choroby. Badania ostatnich lat wykazały, że rola limfocytów T CD8⁺ w alergii nie ogranicza się do funkcji supresorowych, jak początkowo sądzono. Wiadomo, że wśród limfocytów T CD8⁺ można wyróżnić limfocyty Tc1 i Tc2, które uwalniają cytokiny o profilu podobnym do Th1 i Th2 [26]. Wykazano, że spontaniczne uwalnianie IL-4 i IL-13 oraz w wyniku aktywacji poliklonalnej i alergenowej limfocytów T CD8⁺ u chorych z WA jest porównywalne, a nawet większe niż z limfocytów T CD4⁺ [27]. Warto również dodać, że w części badań przeprowadzonych u dorosłych z WA wykazano istotne obniżenie odsetka limfocytów CD4⁺ [28] oraz subpopulacji CD4⁺CD45RO⁺ [29]. Można przypuszczać, że obniżenie limfocytów CD4⁺, które stwierdziliśmy w grupie dzieci z obecnością *S.aureus* w skórze, może być spowodowane migracją komórek z krwi obwodowej do zmienionej zapalnie skóry. Jak wiadomo, enterotoksyny gronkowcowe zwiększają na limfocytach ekspresję cząsteczki CLA pełniącej rolę receptora zasiedlającego skórę [15].

Odsetek i bezwzględna liczba limfocytów T CD3⁺ i CD4⁺ wykazujących ekspresję cząsteczki CD25, odpowiadającą podjednostce α łańcucha receptora dla IL-2, były podobne w badanych grupach. Obecnie wiadomo, że część limfocytów o fenotypie CD4⁺CD25⁺ wykazuje właściwości supresyjne i obok limfocytów Th3 i Thr1 zaliczana jest do tzw. limfocytów T regulatorowych (Treg) [30]. Komórki CD4⁺CD25⁺ zostały po raz pierwszy opisane przez Sakaguchi i wsp jako niewielka (około 10%) frakcja limfocytów CD4⁺, która odgrywa istotną rolę w hamowaniu autoreaktywnych limfocytów T i zapobieganiu autoagresji oraz ma istotne znaczenie w podtrzymywaniu tolerancji własnych antygenów na obwodzie [31]. Znaczenia komórek regulatorowych CD4⁺CD25⁺ w alergii jest obecnie przedmiotem szeregu badań. Mechanizm działania komórek regulatorowych CD4⁺ CD25⁺ w chorobach alergicznych nie do końca jest jasny, ale rozważa się wpływ bezpośredniego kontaktu komórkowego z udziałem cząsteczek kostymulujących (CTLA-4, PD-1) oraz IL-10 i TGF- β (cytokiny wydzielane przez tzw. indukowane limfocyty CD4⁺CD25⁺) na wygaszanie odpowiedzi immunologicznej. Wykazano, że funkcja i liczba limfocytów CD4⁺CD25⁺ w krwi obwodowej u większości chorych z astmą jest porównywalna do wartości stwierdzanych u zdrowych, ale u chorych z alergicznym nieżytem nosa w sezonie pylenia obserwowano wzrost ich liczby, któremu towarzyszyło obniżenie funkcji supresyjnych [32]. Z kolei we krwi obwodowej dorosłych z WA stwierdzono, że limfocyty CD4⁺CD25⁺ występują w zwiększonej proporcji, ale

w obecności superantygenów gronkowcowych dochodzi do utraty ich właściwości immunosupresyjnych [17].

Dzięki badaniom bioptatów skóry u ludzi oraz w modelu zwierzęcym wiadomo, że w rozwoju zmian zapalnych skóry w WA uczestniczą cytokiny o profilu Th1 i Th2. I tak w fazie ostrej WA obecne są nacieki z limfocytów T oraz wzmożona jest ekspresja cytokin o profilu Th2 tj. IL-4, IL-5, IL-13, podczas gdy w fazie przewlekłej dominuje ekspresja INF- γ oraz pojawiają się nacieki z eozynofików i makrofagów [33,34,35]. W pracy stwierdziliśmy, że dzieci ze zmianami ostrymi i obecnością gronkowca w skórze miały znamienne wyższą ekspresję TNF- α w limfocytach T CD3⁺ niż dzieci zdrowe. Również ekspresja IL-2, IL-4 i INF- γ były wyższe w tej grupie dzieci niż u zdrowych, ale nieistotnie statystycznie. W większości badań wykazano, że w fazie ostrej w przebiegu WA komórki mononuklearne krwi obwodowej (PMBC) uwalniają większe ilości IL-4 i IL-13 w wyniku stymulacji alergenowej i poliklonalnej niż u dzieci z fazą przewlekłą WA o zdrowych [36,37,38,39]. Istotny wzrost produkcji TNF- α w limfocytach T CD4⁺ u dorosłych ze zmianami ostrymi w przebiegu WA wykazali również Antúnez C i wsp. [40]. Również u dzieci z WA i alergią na mleko uwalnianie TNF- α z PMBC pod wpływem kazeiny było wyższe niż u dzieci bez alergii na mleko krowie [41]. Różnice w uwalnianiu TNF- α z limfocytów T CD3⁺ pomiędzy dziećmi z WA i kolonizacją skóry *S.aureus* a dziećmi zdrowymi i dziećmi WA bez obecności bakterii, które stwierdziliśmy w naszym badaniu, mogą świadczyć o udziale tej cytokiny w patogenezie WA. TNF- α jest niespecyficzną prozapalną cytokiną uwalnianą przede wszystkim przez makrofagi, keratynocyty, mastocyty oraz limfocyty. W przeciwieństwie do TNF- β , który jest uwalniany przez limfocyty Th1, TNF- α produkowany jest zarówno przez limfocyty Th1 i Th2.

TNF- α uwalniany jest w początkowej fazie odpowiedzi immunologicznej i indukuje uwalnianie innych cytokin [5]. Poprzez zwiększenie ekspresji cząsteczek adhezyjnych, m.in. selektyny E, będącej ligandem dla CLA, na śródbłonku postkapilarnych żyłek zwiększa napływ aktywnych limfocytów T do zmienionej zapalnie skóry, przez co wpływa na rozwój zmian zapalnych w skórze [42].

W pracy analizowaliśmy również zależność czasu trwania choroby oraz stopnia ciężkości choroby ocenianego punktowo wg SCORAD od analizowanych parametrów. Stwierdziliśmy, że im dłuższy czas trwania choroby, tym niższa liczba limfocytów T CD3⁺ i wewnątrzkomórkowa ekspresja INF- γ . Można przypuszczać, że spadek wraz z wiekiem limfocytów CD3⁺ i INF- γ może zwiększać wrażliwość chorych z WA na infekcje wirusowe i sprzyjać kolonizacji skóry przez bakterie. Wprawdzie dzieci z WA miały nieco niższe wartości limfocytów T CD4⁺CD25⁺ niż dzieci zdrowe, co jest sprzeczne z obserwacjami u dorosłych z WA, ale wraz z czasem trwa-

nia choroby obserwowano wzrost wartości odsetkowej tych komórek.

W interpretacji tych wyników trzeba uwzględnić fakt, że subpopulacja limfocytów T CD4⁺CD25⁺ obejmuje nie tylko limfocyty pełniące funkcje regulatorowe, ale również pulę aktywnych limfocytów CD4⁺ wykazujących ekspresję receptora dla IL-2 (dla supresorowych limfocytów T CD4⁺CD25⁺ bardziej swoistym markerem jest czynnik transkrypcyjny foxp 3, który nie ulega ekspresji w aktywnych limfocytach). Badania wykazały również, że odsetek komórek CD4⁺CD25⁺ u zdrowych dorosłych wzrasta wraz z wiekiem [43].

Stwierdziliśmy również, że stopień ciężkości choroby był skorelowany surowiczym stężeniem IgE (im wyższy SCORAD, tym wyższe stężenie całkowitej IgE). Ponieważ w niniejszej pracy nie oceniono ilości kolonii *S. aureus*, nie było możliwe przeprowadzenie oceny wpływu stopnia kolonizacji skóry przez *S. aureus* na przebieg kliniczny choroby.

Wyniki naszych badań wskazują, że współistnienie WA i kolonizacji skóry przez *S. aureus* ma wpływ na populację limfocytów i wewnątrzkomórkową ekspresję cytokin w limfocytach T CD3⁺ krwi obwodowej oraz możliwy udział TNF- α patogenezie WA.

Piśmiennictwo

- Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet* 2003; 361: 151-60.
- Allam JP, Bieber T. A review of recent journal highlights focusing on atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 2003; 28: 577-578.
- Eigenmann PA. Clinical features and diagnostic criteria of atopic dermatitis in relation to age. *Pediatr Allergy Immunol* 2001; 12 (suppl 14):69-74.
- Romagnani S. The role of lymphocytes in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 339-408.
- Borish LC, Steinke JW. Cytokines and chemokines *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 460-475.
- Romagnani S. Immunologic influences on allergy and the Th1/Th2 balance. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 395-400.
- Silny W, Czarnecka-Operacz M. Atopowe zapalenie skóry – udział limfocytów T i komórek Langerhansa w rozwoju zmian skórnych. *Alergia Astma Immunologia* 2000; 5: 15-20.
- Zollner TM, Wichelhaus TA, Hartung A i wsp. Colonization with superantigen-producing *Staphylococcus aureus* is associated with increased severity of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 994-1000.
- Ricci G, Patrizi A, Neri I i wsp. Frequency and clinical role of *Staphylococcus aureus* overinfection in Atopic dermatitis in children. *Pediatric Dermatol* 2003; 20: 389-392.
- Hoeger PH. Antimicrobial susceptibility of skin-colonizing *S. aureus* strains in children with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15: 474-477.
- Imayama S, Shimozono, Hoashi M i wsp. Reduced secretion of IgA to skin surface of patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunology* 1994; 94: 195-200.
- Roll A, Cozzio A, Fischer B, Schmid-Grendelmeier P. Microbial colonization and dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4: 373-378.
- Skov L, Olsen JV, Giormo R i wsp. Application of staphylococcal enterotoxin B on normal and atopic skin induces up-regulation of T cells by a superantigen-mediated mechanism. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 820-826.
- Cho S-H, Strickland I, Boguniewicz M, Leung DYM. Fibronectin and fibrynogen contribute to the enhanced binding of *Staphylococcus aureus* to atopic skin. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 269-274.
- Strickland I, Hauk PJ, Trumble AE i wsp. Evidence for superantigen involvement in skin homing of T cells in Atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 249-253.
- Lehmann HS, Heaton T, Mallon D, Holt PG. Staphylococcal enterotoxin B-mediated stimulation of interleukin-1 potential aetiologic factor in eczema in infants. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 135: 306-312.
- Wedi B, Wieczorek D, Stünkel T i wsp. Staphylococcal exotoxins exert proinflammatory effects through inhibition of eosinophils apoptosis, increased surface antigen expression (CD11b, CD45, CD54, and CD69), and enhanced cytokine-activated oxidative burst, thereby triggering allergic inflammatory reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 477-83.
- Ou LS, Goleva E, Hall C, Leung DY. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 756-763.
- Guzik TJ, Bzowska M, Kasprówicz A i wsp. Persistent skin colonization with *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: relationship to clinical and immunological parameters. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 448-455.
- Mrabet-Dahbi S, Breuer, Klotz M i wsp. Deficiency in immunoglobulin G2 antibody against staphylococcal enterotoxin C1 defines a subgroup of patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 274-281.
- Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1980; 92: 44-7.
- Severity Scoring of Atopic dermatitis. Consensus Report of the European Task Force on Atopic dermatitis. The SCORAD Index. *Dermatology* 1999; 186: 23-31.
- Ferry B, Antrobus P, Huzicka I i wsp. Intracellular cytokine expression in whole blood preparations from normals and patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 1997; 110: 410-417.
- Akdis CA, Akdis M, Simon HU, Blaser K. Regulation of allergic inflammation by skin-homing T cells in allergic eczema. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118: 140-144.
- Teraki Y, Hotta T, Shiohara T. Increased circulating skin-homing cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA)⁺ type 2 cytokine producing cells, and decreased CLA⁺ type 1 cytokine-producing cells in atopic dermatitis. *B J Dermatol* 2000; 143: 373-78.
- Sato A, Tsuji K, Yamamura M i wsp. Increased Type 2 cytokine expression by both CD4⁺ CD45RO⁺T cells and CD8⁺CD45RO⁺T cells in blood circulation is associated with high serum IgE but not with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 1079-1084.

27. Akdis M, Simon H-U, Weigl L i wsp. Skin homing (cutaneous lymphocyte – associated antigen-positive) CD8⁺T cells respond to superantigen and contribute to eosinophilia and IgE production in atopic dermatitis. *J. Immunol* 1999; 163: 466-475.
28. Aleksza M, Irinyi B, Lukács A i wsp. Increased frequency of intracellular interleukin (IL)-13 and IL-10, but not IL-4 expressing CD4⁺ and CD8⁺ peripheral T cells of patients with atopic dermatitis. *B J Dermatol* 2002; 147: 1135-1141.
29. Matsuyama T, Urano K, Ohkido M i wsp. The quantitative and qualitative defect of CD4⁺ CD45RO⁺ memory – type T cells are involved in the abnormality of Th1 immunity in atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 687-694.
30. Umetsu DT, Akbari OA, De Kruffy RH. Regulatory T cells control the development allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunology* 2003; 112: 480-487.
31. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000; 101: 455-458.
32. Ling EM, Smith T, Nguyen XD i wsp. Relation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell suppression of allergen driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; 363: 608-615.
33. Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Schöpf E i wsp. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* 1998; 19: 359-61.
34. Jeong C-W, Ahn K-S, Rhno N-K i wsp. Differential in vivo cytokine mRNA expression in lesional skin of intrinsic vs. extrinsic atopic dermatitis patients using semiquantitative RT-PCR. *Clin. Exp Allergy* 2003; 33: 1717-24.
35. Chen L, Martinez, Overbergh L i wsp. Early up-regulation of Th2 cytokines and late surge of Th1 cytokines in an atopic dermatitis model. *Clin Exp Immunol* 2004; 138: 375-387.
36. Nakazawa M, Sugi N, Kawaguchi H i wsp. Predominance of type 2 cytokine-producing CD⁺ and CD8⁺ cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 673-82.
37. La Grutta S, Richiusa P, Pizzolanti G i wsp. CD4⁺ IL-13⁺ cells in peripheral blood well correlates with the severity of atopic dermatitis in children. *Allergy* 2005; 60: 391-395.
38. Teraki Y, Hotta T, Shiohara T. Increased circulating skin-homing cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA)⁺ type 2 cytokine producing cells, and decreased CLA⁺ type1 cytokine-producing cells in atopic dermatitis. *B J Dermatol* 2000; 143: 373-378.
39. Källström E, Roscher I, Andreasson A i wsp. Decreased frequency of intracellular INF- γ producing T cells in whole blood preparations from patients with atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 2002; 11: 556-563.
40. Antúnez C, Torres M J, Mayorga C i wsp. Different cytokine production and activation marker profiles in circulating cutaneous-lymphocyte-associated antigen⁺ T cells from patients with acute or chronic atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 559-566.
41. Bordignon V, Sinagra LJ, Trento E i wsp. Antigen specific response in pediatric patients with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2005; 16: 113-200.
42. De Vries IJM, Langeveld-Wildschut EG, van Reijnsen FC i wsp. Adhesion molecule expression on skin endothelia in atopic dermatitis: Effects of TNF- α and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 461-468.
43. Gregg R, Smith CM, Clark FJ i wsp. The number of human peripheral blood CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Med* 2005; 140: 540-546.