

Produkcja cytokin typu Th1 i Th2 przez aktywowane jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC_s) u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry – związek ze stanem klinicznym i kolonizacją skóry przez *Staphylococcus aureus*

Th1 and Th2 types cytokine production by the activated peripheral blood mononuclear cells (PBMC_s) from atopic dermatitis patients – relationship to the clinical parameters and Staphylococcus aureus skin colonization

ANNA KĘDZIERSKA¹, MONIKA KAPIŃSKA-MROWIECKA²,
MARZENA CZUBAK-MACUGOWSKA², JOLANTA KASZUBA-ZWOIŃSKA³,
JULIUSZ PRYJMA^{1,4}

¹Zakład Mikrobiologii Klinicznej Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii Instytutu Pediatrii Collegium Medicum w Krakowie, kierownik Zakładu prof. dr hab. med. Juliusz Pryjma; ²Oddział Dermatologii Szpitala Specjalistycznego im. S. Żeromskiego w Krakowie, ordynator Oddziału dr n. med. Monika Kapińska-Mrowiecka; ³Zakład Patofizjologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, kierownik Zakładu prof. dr hab. med. Piotr Thor; ⁴Zakład Immunologii Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, kierownik Zakładu prof. dr hab. med. Juliusz Pryjma

Abstract

*Recent studies have shown that local up-regulation of Th2 cytokines and handicap of IFN- γ and TNF- α production under inflammatory conditions increase susceptibility of AD skin to microorganism. The aim of this study was to determine whether different density of *S. aureus* colonizing two different sites (lesional and non-lesional skin areas), and clinical condition of AD patients have any impact on Th1 and Th2 cytokine profiles. Cell culture supernatants of peripheral blood mononuclear cells from AD patients and control group were collected following SEB stimulation. The number of bacteria was determined by colony forming unit method. IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5, and IL-10 was evaluated using*

Streszczenie

*Wykazano, że konsekwencją zwiększonej podatności skóry atopowej na zakażenia jest obniżona produkcja IFN- γ i TNF- α przy równocześnie wysokim poziomie cytokin Th2 w skórze. Zbadano produkcję cytokin Th1 i Th2 przez PBMC_s po aktywacji SEB od chorych z AZS różniących się gęstością kolonizacji skóry zmienionej i niezmienionej przez *S. aureus* i stanem klinicznego zaawansowania (SCORAD index). Liczbę bakterii kolonizujących skórę określano metodą colony forming unit. Produkcję cytokin w supernatantach z hodowli limfocytów T oznaczono metodą ELISA i przy pomocy zestawu Cytometric Bead Array Kits. Chorych oceniano pod względem wieku, płci, stopnia ciężkości AZS*

Adres do korespondencji: dr n. med. Monika Kapińska-Mrowiecka, Oddział Dermatologii, Szpital Specjalistyczny im. S. Żeromskiego, os. Na Skarpie 67, 31-913 Kraków.

specific ELISA and Human Th1/Th2 Cytokine Cytometric Bead Array. The patients were characterized by age, sex, severity scoring of AD, and serum eosinophil cationic protein. Twenty three (62.2%) among 37 of AD patients were positive for *S. aureus* cultured from both sites of the skin. SEB-stimulated PBMC_s from patients with high density of *S. aureus* on involved ($\log > 7.14$) and uninvolved ($\log > 5.48$) skin had significantly reduced amount of IFN- γ and TNF- α production than normal non-AD individuals ($P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively). Although the production of IFN- γ and TNF- α by AD patients was significantly lower than healthy controls, the production of IL-4 and IL-5 was not increased in SEB-stimulated cultures. The severity scores, but not the density of *S. aureus*, negatively correlated to IFN- γ production ($P < 0.01$). *S. aureus* skin colonization in AD patients although correlated to the severity of symptoms have an impact on patient's T-cell responsiveness to SEB.

Key words: atopic dermatitis, cytokine, T-cells, staphylococcal colonization, *S. aureus*, superantigen.

i poziomu eozynofilowego białka kationowego w surowicy. Obecność *S. aureus* na skórze atopowo zmienionej i niezmięnionej wykazano u 23 atopików (62,2%) spośród 37 badanych. Chorych z wysoką kolonizacją skóry zmienionej ($\log > 7,14$) i niezmięnionej ($\log > 5,48$) charakteryzowała znamienne obniżona produkcja IFN- γ ($P < 0,001$) i TNF- α ($P < 0,05$) w porównaniu do osób bez cech atopii. Pomimo iż produkcja IFN- γ i TNF- α u pacjentów z AZS była istotnie niższa w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych, nie wykazano zwiększonej produkcji IL-4 i IL-5 przez limfocyty T krwi obwodowej, stymulowane SEB. Pomimo wykazanej ujemnej korelacji między wartościami SCORAD index a produkcją IFN- γ ($P < 0,01$) sugeruje się, że gęstość kolonizacji gronkowcem w obrębie skóry zmienionej i niezmięnionej u chorych na AZS ma wpływ na odpowiedź limfocytów T aktywowanych przez SEB.

Słowa kluczowe: atopowe zapalenie skóry, cytokiny, limfocyty T, *S. aureus*, kolonizacja gronkowcem, superantygen.

(PDiA 2004; XXI, 4: 180–189)

Wprowadzenie

Atopowe zapalenie skóry (AZS) jest przewlekłą i nawrotową dermatozą zapalną, której towarzyszy wybitny świąd i charakterystyczny obraz zmian skórnych. W badaniach nad tym schorzeniem wskazywano na kluczową rolę limfocytów T CD4⁺ w nasileniu alergicznego stanu zapalnego skóry, a szczególnie na brak równowagi pomiędzy subpopulacjami limfocytów Th 1 i Th 2 [1, 2]. Charakterystyczna dla AZS jest przewaga funkcjonalna subpopulacji limfocytów Th2 CD4⁺ w ostrym okresie choroby. Zwiększona jest nie tylko produkcja cytokin promujących rozwój zapalenia alergicznego i nasilających wytwarzanie IgE, ale także ekspresja receptorów dla IL-4 i IL-5 na komórkach w ognisku chorobowym [3]. Zmiany profilu produkowanych cytokin w AZS zostały wykazane zarówno w odniesieniu do komórek krwi obwodowej [4–6], jak i lokalnie naciekających skórę [7].

W ostatnim czasie ukazały się prace podkreślające także znaczącą rolę cytokin Th2 w zwiększaniu podatności skóry chorych na AZS na czynniki infekcyjne [7, 8]. Najwięcej uwagi poświęcono kolonizacji zmian skórnych przez szczepy z gatunku *Staphylococcus aureus* i jej znaczeniu w patogenezie choroby [9]. U chorych na AZS gronkowce występują w 75–100% w obrębie zmian skórnych [10], a w 30–50% w obrębie skóry niezmięnionej [11]. Szczepy z gatunku *S. aureus* podtrzymują alergiczny stan zapalny skóry w AZS, wydzielając egzotoksyny o aktywności superantygenów [12]. Superantygeny, w tym gronkowcowa enterotoksyna typu B (SEB), aktywują limfocyty T do produkcji licznych cytokin, w tym czynnika martwicy nowotworów (TNF), interleukiny 2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-6 oraz interferonu-gamma (IFN- γ), które

mogą nasilać stan zapalny skóry atopowej [13, 14]. Lin i wsp. [15], stosując barwienie cytoplazmatyczne wykazali, że limfocyty T CD4⁺ pacjentów chorych na AZS w hodowlach aktywowanych SEB, w przeciwieństwie do zdrowych dawców, produkowały znamienne więcej IL-4 niż IFN- γ . Campbell i wsp. [16] wykazali, że znamienne obniżony odsetek limfocytów T CD2⁺ produkujących IFN- γ , jak i zredukowana wewnątrzkomórkowa synteza tej cytokiny po stymulacji SEB i zabitym szczepem gronkowca, korelowała ze stopniem nasilenia objawów klinicznych u dzieci chorych na AZS. Badania te potwierdziły wcześniejsze obserwacje Byrona i wsp. [17], którzy donieśli, że jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC_s) chorych w ostrej fazie klinicznego zaawansowania uwalniają w modelu *in vitro* mniej IFN- γ po aktywacji nieswoistym stymulatorem – fitohemaglutyniną (PHA), w porównaniu do stężeń tej cytokiny w grupie osób bez cech atopii.

W ostatnich badaniach Nomura i wsp. [7] oraz Ong i wsp. [8] wykazali, że konsekwencją obniżonej produkcji IFN- γ i TNF- α w skórze jest zwiększona podatność skóry chorych na AZS na infekcje *S. aureus* przy równoczesnym wzroście produkcji IL-4 i IL-13. W badaniach własnych [18] potwierdzono wcześniejsze obserwacje [19, 20], że gęstość kolonizacji skóry zmienionej przez *S. aureus* znamienne koreluje z nasileniem objawów klinicznych wyrażonych wartością SCORAD.

Cel pracy

W tym kontekście interesująca wydawała się ocena produkcji cytokin Th1 i Th2 przez PBMC_s u chorych

Tab. 1. Charakterystyka kliniczna chorych z atopowym zapaleniem skóry

	Ogółem (N=37)		Kobiety (N=20)		Mężczyźni (n=17)	
	średnia ^{a)}	zakres	średnia	zakres	średnia	zakres
wiek, lata	20,3	6–62	17,2	6–41	22,9	9–62
czas trwania AZS (lata)	14,1	2–30	12,4	3,5–30	15,5	2–30
SCORAD <i>index</i>	50,2	21–84	49,8	21–84	50,6	24–73
IgE (kU/l) ^{b)}	1 896,1	2,5–26 256	2 369,7	2,5–26 256	1 493,6	21,1–10 244
ECP (μg/l) ^{c)}	35,7	2,44–93,5	42,7	6,11–93,5	29,7	2,44–75,3

^{a)}Nie wykazano różnic statystycznie znamiennej pomiędzy kobietami a mężczyznami: wiek: $P=0,14$; czas trwania AZS: $P=0,34$; SCORAD *index*: $P=0,88$; IgE: $P=0,57$; ECP: $P=0,15$; ^{b)}całkowite stężenie IgE w surowicy krwi; ^{c)}ECP – eozynofilne białko kationowe

na AZS różniących się między sobą gęstością kolonizacji przez *S. aureus* w obrębie skóry zmienionej i niezmięnionej oraz stanem klinicznym, jak również ocena tych parametrów u osób bez cech atopii. Przeprowadzono także analizę korelacji pomiędzy liczbą bakterii w obrębie zmian skórnych a parametrami zaawansowania klinicznego AZS (SCORAD *index*, IgE, ECP).

Materiał i metody

Pacjenci i grupa kontrolna

Badania przeprowadzono w grupie 37 chorych na atopowe zapalenie skóry (AZS) (20 kobiet i 17 mężczyzn) w wieku 6–62 lat (średnia $20,3 \pm 1,9$) leczonych na Oddziale Dermatologii i Poradni Dermatologiczno-Alergologicznej Szpitala Specjalistycznego im. S. Żeromskiego w Krakowie. Charakterystykę kliniczną pacjentów przedstawiono w tab. 1. Rozpoznanie atopowego zapalenia skóry ustalano na podstawie kryteriów Hanifina i Rajki [21]. Do badań włączano chorych z wieloletnim przebiegiem AZS w okresie zaostrzenia choroby. U wszystkich chorych oceniano stan kliniczny metodą SCORAD [22]. Miejscowe objawy skórne oceniano na podstawie obecności rumienia, obrzęku, przeczyszczeń, lichenizacji oraz suchości skóry w skali 0–3 w odniesieniu do każdego z objawów. Świąd i zaburzenia snu określano na podstawie skali subiektywnej oceny pacjenta 0–10 [23]. Chorzy w ciągu 2 tyg. poprzedzających badanie nie byli leczeni miejscowymi, doustnymi ani parenteralnymi preparatami kortykosteroidowymi, antybiotykami, ani poddawani immunoterapii. U 27% pacjentów całkowite stężenie IgE w surowicy było niższe niż 100 kU/l (śr. = $30,3 \pm 5,6$ kU/l), u pozostałych 73% wynosiło średnio $2 587,2 \pm 1 009$ kU/l. Badaniem kolonizacji skóry zmienionej i niezmięnionej przez *S. aureus* objęto wszystkich chorych na AZS. Ocenę odpowiedzi PBMC_s na aktywację określonymi stymulatorami/mitogenami przeprowadzono ogółem u 42 osób, w tym u 29 chorych na AZS i u 13 osób bez cech atopii. Próbkę krwi

żylną pobrano od 18 pacjentów z lekkim lub średnim stanem klinicznego zaawansowania (SCORAD; 21–59; śr. = $42,7 \pm 2,1$) i od 11 chorych będących w ciężkim stanie klinicznym (SCORAD; 60–84; śr. = $67,9 \pm 2,0$).

Badanym tłumaczono cel i przebieg badań. Od każdego chorego uzyskano pisemną zgodę na udział w badaniach.

Grupę kontrolną stanowiło 13 osób (8 kobiet i 5 mężczyzn) z ujemnym wywiadem w kierunku chorób atopowych. Średni wiek w tej grupie wynosił $39,4 \pm 2,4$. W badanej grupie kontrolnej wartość średnia całkowitego stężenia IgE w surowicy krwi wynosiła $42,6 \pm 8,3$ kU/l i u żadnej z osób nie przekroczyła 100 kU/l.

Pomiaru całkowitego stężenia IgE w surowicy dokonywano przy pomocy komercyjnego zestawu diagnostycznego UniCAP Total IgE fluoroenzymeimmunoassay (Pharmacia Diagnostic) wg zaleceń producenta. Zakres oznaczalności zastosowanych pomiarów dla próbek nierozcieńczonych wynosił 2–5 000 kU/l. Stężenie eozynofilowego białka kationowego (ECP) w surowicy mierzono z wykorzystaniem zestawu UniCAP ECP fluoroenzymeimmunoassay kits (Pharmacia&Upjohn) zgodnie z zaleceniami producenta. Dolna granica oznaczalności pomiarów wynosiła $<0,5$ μg/l. Do czasu wykonania pomiaru surowicę przechowywano w temp. -70°C .

Izolacja komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej

PBMC_s izolowano z 10 ml heparynizowanej krwi żylną w gradiencie gęstości. Krew rozcieńczano zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (PBS), nawarstwiano na Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) i wirowano przez 30 min w $400 \times g$ w temp. 20°C . Komórki płukano w medium RPMI-1640, a następnie do dalszej analizy zawieszano w podłożu hodowlanym RPMI-1640 zawierającym 2 mM L-glutaminę i 10% płodową surowicę cielęcą, FCS (Gibco, Grand Island, N.Y.).

Hodowle komórkowe

Hodowle komórkowe prowadzono na 96-dółkowych płytkach hodowlanych (NUNC), w atmosferze wzbogaconej w CO₂ (5%), w temp. 37°C. W każdym dołku umieszczano 0,2 ml zawiesiny PBMC_s o gęstości 1,0x10⁶/ml i dodawano różne aktywatory. Stosowano enterotoksynę gronkowcową typu B (SEB, superantymogen) o stężeniu końcowym 0,1 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA), fitohemaglutyninę (PHA, mitogen) o stężeniu końcowym 2,5 µg/ml (Sigma) oraz mitogen szkarłatki (PWM) w rozcieńczeniu 1:100. Do próbek kontrolnych nie dodawano żadnego stymulatora. Hodowle prowadzono przez 24–96 godz. celem oznaczenia produkcji cytokin zgodnie z doniesieniami Yoshino i wsp. [6].

Produkcja cytokin

Pomiaru poziomu IFN-γ dokonywano po 96 godz. w supernatantach z hodowli PBMC_s stymulowanych SEB i PHA metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przy użyciu komercyjnego zestawu OptEIA Human IFN-γ Set kits (Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), wg zaleceń producenta. Dolna granica czułości pomiarów wynosiła do 10 pg/ml. W supernatantach pochodzących z 48-godz. hodowli PBMC_s aktywowanych SEB oznaczano IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 i TNF-α przy pomocy zestawu Human Th1/Th2 Cytokine Cytometric Bead Array kits (Dickinson Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), wg procedury podanej przez producenta. Próbkę analizowano w cytometrze przepływowym FACScan (Becton Dickinson) w programie BD CellQuest Software. Wyniki ilościowego pomiaru oznaczanych cytokin analizowano w programie BD CBA Analysis Software. Krzywa standardowa dla każdej cytokiny mieściła się w zakresie stężeń 20–5 000 pg/ml.

Jakościowa i ilościowa ocena kolonizacji skóry przez *S. aureus*

Materiał do badań bakteriologicznych pobierano zmodyfikowaną metodą Williamsona i Kligmana [24] co najmniej z 4 różnych obszarów skóry zmienionej (najczęściej z okolic zgięć łokciowych, dołów podkolanowych, grzbietowych powierzchni dłoni) oraz 2 obszarów skóry niezmienionej (okolica międzyłopatkowa i łędźwiowa), które będąc trudno dostępnymi dla chorego, stwarzają małe prawdopodobieństwo przeniesienia bakterii ze zmian skórnych. Na powierzchni skóry umieszczano jałowe szklane cylinderki o średnicy 2,5 cm i wstrzykiwano do nich 2,0 ml jałowy 0,9% roztwór soli fizjologicznej. Skórę pocierano następnie szklaną bagietką, a płyn aspirowano.

W celu ilościowej oceny *S. aureus* w popłuczynach uzyskiwanych ze skóry zmienionej i niezmienionej próbki posiewano w kolejnych dziesiętnych rozcieńczeniach na płytki z podłożem agarowym, z dodatkiem 5% krwi

baraniej (Oxoid, Hampshire, UK). Hodowle inkubowano przez 24 godz. w temp. 37°C. Gęstość kolonizacji skórnej określano liczbą *colony forming unit* (cfu), co pozwoliło na określenie liczby żywych bakterii w przeliczeniu na 1 cm² badanej powierzchni skóry. Uzyskane wartości analizowano po przekształceniu log₁₀.

Identyfikację bakterii przeprowadzono przy pomocy standardowych technik laboratoryjnych na podstawie morfologii kolonii, testów na obecność koagulazy, czynnika zlepiającego *clumping factor* i potwierdzano w teście Slidex Staph kit (BioMerieux SA, Marcy-l'Etoile, France).

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano przy pomocy programu Statistica 5,0 for Windows 95. W przypadku analizy zmian ilościowych flory bakteryjnej skóry zastosowano przekształcenie logarytmiczne dziesiętne danych. Dla wszystkich danych empirycznych wyznaczano wartości średniej arytmetycznej oraz błąd standardowy średnich rozpatrywanych cech (±SE). Do weryfikacji hipotez o równości średnich arytmetycznych zastosowano test *t-Studenta* dla zmiennych niezależnych. Analizę korelacji prowadzono przy pomocy testów korelacji Pearsona i Spearmana w zależności od normalności rozkładu i oczekiwanego charakteru zależności. Poziom znamienności ustalono na P=0,05.

Wyniki

Analiza związku intensywności kolonizacji bakteryjnej i stanu klinicznego

Badanie materiału uzyskanego z wyplukiwania skóry (patrz Materiał i metody) wykazało obecność *S. aureus* u 91,9% chorych, w obrębie zmian skórnych oraz u 62,2%, zarówno w obrębie skóry chorobowo zmienionej, jak i niezmienionej. Wykazano także statystycznie istotną różnicę (P<0,05) pomiędzy skórą zmienioną chorobowo i skórą niezmienioną w zakresie średniej gęstości bakterii na 1 cm² (tab. 2.). Nie zaobserwowano natomiast znamiennych różnic w częstości występowania *S. aureus* na skórze zmienionej i niezmienionej, między osobami dorosłymi a dziećmi (tab. 3.).

Tab. 2. Kolonizacja atopowych zmian skórnych i skóry niezmienionej przez szczepy *S. aureus*

<i>S. aureus</i>	Skóra zmieniona		Skóra niezmieniona	
	N (%)	log ₁₀ (±SE) ^{a)}	N (%)	log ₁₀ (±SE) ^{a)}
+	34 (91,9)	6,53 (±0,30)*	23 (62,2)	5,59 (±0,33)
-	3 (8,1)	-	14 (37,8)	-

^{a)} średnia gęstość bakterii/1 cm² skóry

* P<0,05 versus log₁₀ gęstości *S. aureus* w obrębie skóry niezmienionej

(+) – kolonizacja skóry przez *S. aureus*; (-) – brak kolonizacji

Tab. 3. Analiza występowania szczepów *S. aureus* izolowanych ze zmian skórnych i skóry niezmienionej od chorych na AZS z uwzględnieniem wieku badanych

<i>S. aureus</i>				
SZM ^{a)}	SNZ ^{b)}	dorośli	dzieci	ogółem
-	-	2	1	3
-	+	0	0	0
+	-	7	5	12
+	+	12	10	22
ogółem		21	16	37

^{a)}SZM = skóra zmieniona; ^{b)}SNZ = skóra niezmieniona;
(+) – kolonizacja skóry przez *S. aureus*; (-) – brak kolonizacji

Ocena średniej, wyjściowej gęstości kolonizacji (infekcji) w obrębie skóry zmienionej i niezmienionej przez *S. aureus* u każdego pacjenta umożliwiła wyodrębnienie trzech grup chorych. Jako kryterium podziału przyjęto różny stopień nasilenia kolonizacji gronkowcem w miejscach, z których pobierano materiał (grupy I i II) lub jej brak (grupa III). Podstawową charakterystykę chorych i różnice między analizowanymi grupami przedstawiono w tab. 4. Wyniki analizy korelacji pomiędzy gęstością *S. aureus* (log10) w obrębie skóry zmienionej i niezmienionej a stop-

niem zaawansowania klinicznego (SCORAD *index*) przedstawiono w tab. 5. Wartość współczynnika korelacji R w teście korelacji Spearmana wynosiła dla skóry zmienionej chorobowo 0,74; $p < 0,001$, a dla skóry niezmienionej 0,46; $p = 0,03$, a zatem dodatnią korelację między gęstością kolonizacji bakteryjnej skóry (log10) a SCORAD *index* wykazano również w odniesieniu do skóry chorobowo niezmienionej (tab. 5.).

Produkcja cytokin o profilu Th1 przez limfocyty T krwi obwodowej po stymulacji SEB, PHA lub PWM

Produkcja IFN- γ w supernatantach z hodowli PBMC_s stymulowanych SEB była znamiennej niższa u 29 chorych na AZS – niezależnie od wyjściowej intensywności kolonizacji bakteryjnej skóry zmienionej i miejsc niezmienionych oraz stanu klinicznego – w porównaniu do stężeń tej cytokiny w grupie osób zdrowych. Limfocyty T krwi obwodowej, stymulowane fitohemaglutyniną (PHA), produkowały znamiennej mniej IFN- γ jedynie u chorych z wysoką gęstością *S. aureus* w skórze zmienionej. Po stymulacji PBMC_s mitogenem szkarłatki (PWM) nie wykazano znamienych różnic dla stężeń interferonu między chorymi na AZS a grupą kontrolną (ryc. 1a., tab. 6.). Wykazana ponadto statystycznie znamiennej obniżona, w porównaniu do kontroli, produkcja TNF- α u chorych na AZS

Tab. 4. Wartości średnie wybranych parametrów klinicznych w zależności od gęstości bakterii (log10) w obrębie skóry zmienionej i niezmienionej

Parametry	Skóra zmieniona			Skóra niezmieniona			<i>p</i> < I:II	<i>p</i> < I:III	<i>p</i> < II:III
	I ^{a)} śr. \pm SE	II ^{b)} śr. \pm SE	<i>p</i> < I:II	I ^{a)} śr. \pm SE	II ^{b)} śr. \pm SE	III ^{c)} śr. \pm SE			
N ^{d)}	16	21		11	12	14			
log10 cfu	4,72 \pm 0,36	7,64 \pm 0,15	0,001	4,19 \pm 0,21	6,88 \pm 0,26	-	0,001	-	-
SCORAD <i>index</i>	39,8 \pm 2,8	58,0 \pm 2,8	0,001	52,5 \pm 3,1	62,3 \pm 3,5	38,0 \pm 3,1	0,05	0,001	0,001
IgE (kU/l)	1 399 \pm 695	2 369 \pm 1 293	>0,05	2 551,6 \pm 999,3	3 001 \pm 2 133	374 \pm 110	>0,05	0,02	0,03
ECP (μ g/l)	23,4 \pm 5,0	45,0 \pm 6,4	0,01	39,3 \pm 7,6	39,9 \pm 9,5	28,9 \pm 6,7	>0,05	>0,05	>0,05

^{a)}I – chorzy z niską liczbą bakterii; ^{b)}II – chorzy z wysoką gęstością *S. aureus*; ^{c)}III – chorzy bez kolonizacji gronkowcem; ^{d)}N = liczba badanych

Tab. 5. Korelacja pomiędzy gęstością *S. aureus* (log10) w obrębie skóry zmienionej i niezmienionej a określonymi parametrami klinicznymi

Korelacja z:	SCORAD		ECP		IGE		IFN- γ	
	R ^{a)}	P=	R	P=	R	P=	R	P=
log skóry zmienionej	0,74	<0,001	0,36	0,03	0,15	>0,05	-0,25	>0,05
log skóry niezmienionej	0,46	0,03	0,10	>0,05	-0,04	>0,05	-0,46	0,04

^{a)}R = współczynnik korelacji w teście korelacji Spearmana

Tab. 6. Produkcja cytokin w supernatantach z hodowli PBMC_s izolowanych od chorych na AZS w różnym stanie klinicznego zaawansowania i od osób bez cech atopii

SCORAD index	21–84 (±SE) n=29	21–59 (±SE) n=18	60–84 (±SE) n=11	Kontrola (±SE) N=28
IFN-γ (ng/ml)	Produkcja cytokin Th1			
bez stymulacji (kontrola)	0,18±0,05	0,25±0,08	0,07±0,02	0,19±0,05
SEB ^{a)}	86,3±9,6***	93,8±13,1***	73,7±12,9***	191,8±21,0
PHA ^{b)}	9,7±2,7**	11,1±3,8	6,7±1,8	34,2±8,8
PWM ^{c)}	44,4±5,4	41,2±6,1	51,2±10,8	58,7±10,5
IL-2 (pg/ml)	2 848,1±320	3 144,9±362	1 897,2±372#	2 905,4±337
TNF-α (pg/ml)	1 467,2±190*	1 367,9±242*	1 620,7±312	2 270,9±348
	Produkcja cytokin Th2 (pg/ml)			
IL-4	48,0±5,7	45,6±6,4	52,0±11,1	40,8±7,5
IL-5	135,6±19,7	145,2±28,9	120,8±23,7	127,0±19,7
IL-10	1 733,4±308	1 614,0±354	1 902,5±567,7	927,3±145

^aSEB = gronkowcowa enterotoksyna typu B; ^bPHA = fitohemaglutynina; ^cPWM= mitogen szkarłatki
*P<0,05; ** P<0,01, ***P<0,001 versus kontrola; #P<0,05 versus niski SCORAD

(1 467,2±2 270,9±348 pg/ml; P<0,05) dotyczyła w szczególności pacjentów z gęstością kolonizacji *S. aureus* w zakresie log 7,14–8,41 w obrębie skóry zmienionej i log 5,48–7,97 w obrębie skóry niezmienionej. U chorych na AZS z wysokim SCORAD index (zakres 60–84) produkcja TNF-α nie różniła się znamienne w porównaniu z grupą kontrolną (tab. 6.).

Produkcja IL-2 w supernatantach – pochodzących z hodowli limfocytów T krwi obwodowej chorych na AZS – nie różniła się znamienne od stężeń w grupie kontrolnej. Różnice znamienne statystycznie wykazano pomiędzy chorymi na AZS – z nasiloną kolonizacją bakteryjną, niezależnie od jej lokalizacji, i wysokim klinicznym współczynnikiem SCORAD – a pacjentami, u których liczba bakterii w obrębie skóry zmienionej (log 3,57–6,99) i niezmienionej (log 3,13–5,02) była niska (P<0,05 i P<0,01, ryc. 1a.).

Związek pomiędzy stanem zaawansowania klinicznego a produkcją IFN-γ

PBMC_s izolowane od chorych z AZS charakteryzowała obniżona zdolność do produkcji IFN-γ *in vitro* w następstwie stymulacji SEB i PHA w porównaniu do osób bez atopii. Wykazano statystycznie znamienne ujemną korelację między zmniejszoną produkcją interferonu a zaawansowaniem klinicznym AZS w okresie zaostrzenia wyrażonym jako SCORAD index (ryc. 2. i ryc. 3.). U chorych na AZS, wykazujących kolonizację *S. aureus* jedynie w obrębie skóry zmienionej, nie stwierdzono statystycznie istotnej korelacji pomiędzy produkcją TNF-γ a ilością

bakterii. Natomiast u chorych na AZS, u których kolonizacja (infekcja) gronkowcem występowała równolegle na skórze atopowo zmienionej i niezmienionej (R=-0,46; P=0,04) wykazano dodatnią korelację między produkcją IFN-γ a ilością bakterii kolonizujących skórę (tab. 5.).

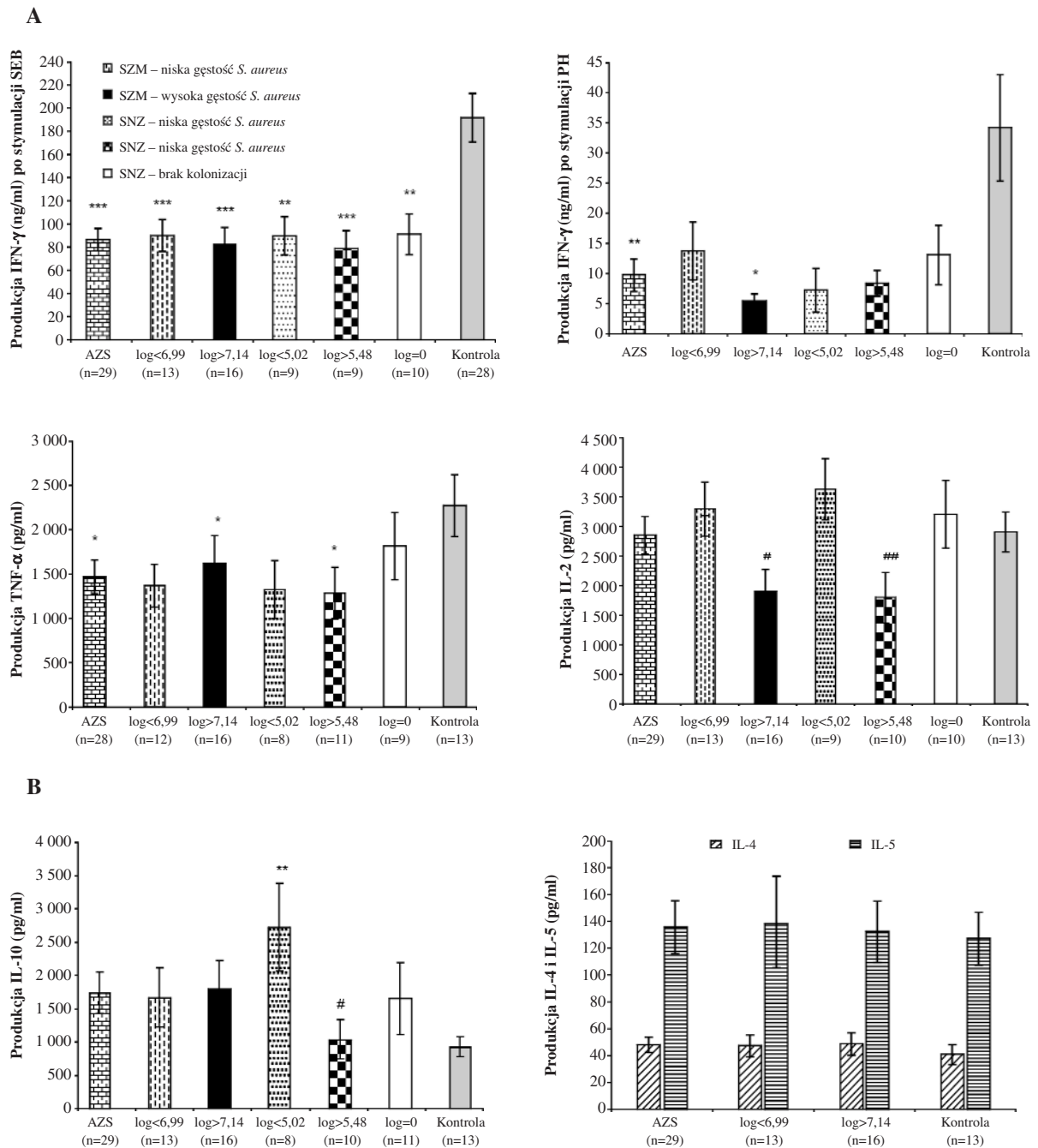
Produkcja cytokin Th2 przez PBMC_s po stymulacji SEB

Produkcja IL-4, IL-5 i IL-10 nie różniła się znamienne u chorych na AZS, w porównaniu do osób z grupy kontrolnej. Wyjątek stanowiło znamienne podwyższone stężenie IL-10 u 8 pacjentów z niską gęstością kolonizacji bakteryjnej skóry niezmienionej w porównaniu z grupą kontrolną (2 719±661 pg/ml vs 927±145 pg/ml; P<0,01) oraz z chorymi na AZS (n=10) z nasiloną kolonizacją gronkowcem w obrębie skóry zmienionej i niezmienionej (2 719±661 pg/ml vs 1 040±295 pg/ml; P<0,05).

Wykazano ponadto, że produkcja IL-5 w hodowlach PBMC_s izolowanych od chorych na AZS znamienne korelowała ze stężeniem eozynofilowego białka kationowego uwalnianego z eozynofiliów (R=0,52; P<0,01; ryc. 3.). Nie wykazano natomiast statystycznie znamiennej korelacji pomiędzy produkcją IL-4 a poziomem całkowitego IgE w surowicy (R=0,29; P>0,05).

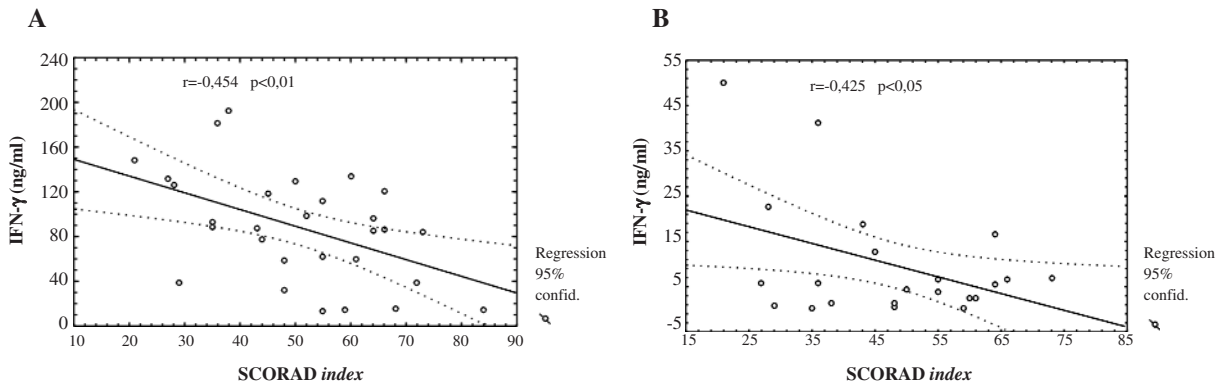
Wnioski

1. Obecność i intensywność kolonizacji skóry chorych na AZS przez *S. aureus* ma związek z nasileniem objawów chorobowych.



Ryc. 1. Produkcja cytokin Th1 i Th2 przez PBMC_s u chorych z różną gęstością kolonizacji przez *S. aureus* skóry zmienionej i niezmienionej oraz w kontroli

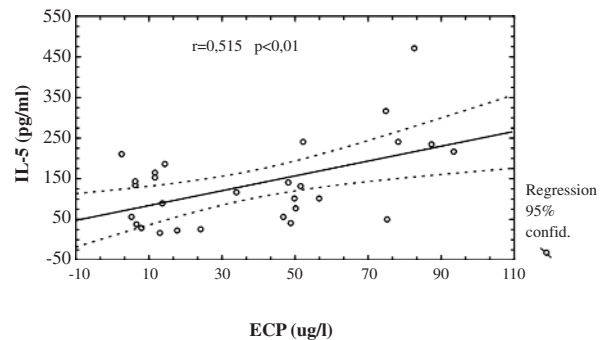
Produkcję IFN-γ oznaczono w supernatantach z 96-godzinnej hodowli PBMC_s stymulowanych SEB i PHA, jak opisano w sekcji *Materiał i metody*. Pozostałe cytokiny (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 i TNF-α) oznaczono w 48-godzinnych hodowlach limfocytów T stymulowanych SEB. Histogramy przedstawiają średnie wartości stężeń (±SE) cytokin Th1 (A) i Th2 (B) w hodowlach PBMC_s od chorych na AZS z odpowiednio niską gęstością kolonizacji przez *S. aureus* skóry zmienionej (SZM; log 3,57–6,99) i niezmienionej (SNZ; log 3,13–5,02); wysoką gęstością SZM (log 7,14–8,41) i SNZ (log 5,48–7,97); brakiem kolonizacji bakteryjnej w obrębie skóry niezmienionej oraz w grupie kontrolnej. Kolonizację skóry przez *S. aureus* wyrażano jako log₁₀ liczby żywych bakterii/cm². *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 w porównaniu do grupy kontrolnej oraz #P<0,05, ##P<0,01 w porównaniu do chorych z niską kolonizacją bakteryjną w obrębie skóry zmienionej i bez zmian (*test t-Studenta*)



Ryc. 2. Ujemna korelacja pomiędzy stanem klinicznego zaawansowania chorych atopowych a produkcją IFN- γ przez PBMC_s po stymulacji SEB (A) i PHA (B)

Stan kliniczny wyrażano wartością SCORAD *index*, produkcję IFN- γ w supernatantach z hodowli PBMC_s mierzono metodą immunoenzymatyczną (ELISA), jak opisano w rozdziale *Material i metody* (analiza korelacji Spearmana, $P < 0,01$ i $P < 0,05$ odpowiednio po stymulacji SEB i PHA)

2. Gęstość kolonizacji w obrębie skóry zmienionej i niezmienionej chorobowo ma wpływ na odpowiedź limfocytów T aktywowanych SEB.
3. Statystycznie znamiennej obniżonej korelacji pomiędzy zmniejszoną produkcją IFN- γ a zaawansowaniem klinicznym AZS w okresie zaostrzenia objawów AZS wskazuje, że obserwowana zależność odzwierciedla przede wszystkim status kliniczny chorych na AZS.



Ryc. 3. Dodatnia korelacja pomiędzy produkcją IL-5 a stężeniem eozynofilowego białka kationowego (ECP) w surowicy chorych na AZS (analiza korelacji Pearsona, $r = 0,515$, $P < 0,01$)

Dyskusja

Badania klonów limfocytów T u chorych na AZS wskazują, iż pobudzenie subpopulacji limfocytów T pomocniczych (Th) prowadzi do wytwarzania cytokin mających istotny udział w patogenezie AZS [25]. Wg niektórych autorów egzotoksyny gronkowcowe, obok ich działania jako superantygeny, mogą w przypadku chorych na AZS pełnić także rolę alergenów [26]. Nasze badania pozwoliły wykazać, że w okresie zaostrzenia choroby kolonizacja (infekcja) zmian skórnych miała miejsce u 92% chorych z AZS, jednak nie była ona jednorodna. U części z nich wykazano wysoką kolonizację bakteryjną we wszystkich lub tylko w niektórych lokalizacjach zmian skórnych (67%), u pozostałych była ona niska we wszystkich miejscach zapalnie zmienionych (33%). Potwierdzono również wcześniejsze obserwacje, że ilość drobnoustrojów izolowana z cm² skóry zmienionej i niezmienionej koreluje z zaawansowaniem objawów klinicznych wyrażonym wartością SCORAD [18, 19].

Podjęte badania zmierzały do ustalenia, na ile różnice w gęstości kolonizacji bakteryjnej pomiędzy chorymi na AZS różnią pacjentów pod względem produkcji cytokin Th1 i Th2 przez limfocyty T krwi obwodowej *in vitro* po ich stymulacji superantygenem (SEB) lub mitogenami (PHA, PWM). Zważywszy, że szczep *S. aureus*

izolowane ze skóry chorych na AZS w ok. 60% wytwarzają superantygen(y) [9, 19], zastosowanie SEB jako swoistego aktywatora stanowi właściwy układ do badania PBMC_s. Obserwacjami po raz pierwszy objęto nie tylko chorych, u których kolonizacja gronkowcem występowała w obrębie skóry zmienionej, ale również grupę pacjentów z równoległą kolonizacją skóry niezmienionej (miejsc kontrolnych). Nasze badania wykazały, że nasilenie stanu klinicznego pacjentów z AZS koreluje ze znamiennej obniżoną produkcją IFN- γ w porównaniu do osób zdrowych. Wprawdzie zbliżoną obserwację poczynili już Campbell i wsp. [16] oraz Byron i wsp. [17], ale w niniejszej pracy udało się wykazać tę zależność nie tylko po stymulacji PBMC_s *in vitro* SEB, lecz również po aktywacji nieswoistym stymulatorem – fitohemaglutyniną. Statystycznie znamiennej obniżoną pro-

dukcja interferonu u chorych na AZS występowała niezależnie od intensywności kolonizacji przez *S. aureus* skóry zmienionej i niezmienionej oraz w grupie 10 chorych, u których nie wykazano obecności bakterii w miejscach atopowo zmienionych. Obserwacja ta potwierdza tezę, iż upośledzenie syntezy IFN- γ jest jedną z przyczyn zaburzonej odporności na obecny na skórze szczep gronkowca, co prowadzi do kolonizacji skóry przez tę bakterię [7, 8, 27]. Ostatnio Nomura i wsp. [7] stwierdzili obniżoną ekspresję genów dla czynników przeciwbakteryjnych w skórze, jako wynik lokalnej nadprodukcji cytokin Th2 (IL-4, IL-13) i obniżonego poziomu cytokin prozapalnych, jak TNF- α , IFN- γ i IL-1 β . Wykazany w układzie *in vitro* prawdopodobny mechanizm tego zjawiska polega na inhibicyjnym oddziaływaniu w skórze IL-4 i IL-13 na TNF- α i IFN- γ jako potencjalnych induktorów ludzkich β -defensyn, w tym HBD-3. Campbell i wsp. [16] twierdzą, że znamienne obniżenie produkcji IFN- γ u chorych na AZS jest wynikiem równoczesnego upośledzenia produkcji tej cytokiny przez pojedyncze komórki i całe populacje komórek, zdolnych do jej wytwarzania. Jednocześnie wykazaliśmy, że produkcja IFN- γ w 96-godzinnych hodowlach PBMC_s ujemnie koreluje z gęstością szczepów *S. aureus*, kolonizujących skórę niezmienioną w grupie 23 chorych na AZS, choć podobnych zależności nie stwierdzono w odniesieniu do intensywności kolonizacji w obrębie skóry zmienionej. Uzyskane przez autorów niniejszej pracy wyniki sugerują jednak, że obniżona produkcja IFN- γ odzwierciedla przede wszystkim status kliniczny chorych na AZS, chociaż gęstość kolonizacji *S. aureus* w obrębie skóry zmienionej i niezmienionej u chorych na AZS ma wpływ na odpowiedź limfocytów T, aktywowanych SEB.

Dalsze obserwacje pozwalają wykazać, w populacji badanych chorych, przesunięcie w kierunku profilu cytokinowego Th2, związane nie tylko z obniżoną produkcją IFN- γ , ale również TNF- α [25]. Znamienne niższą produkcję TNF- α u chorych z AZS, w porównaniu do osób bez atopii, wykazywali już Takahashi i wsp. [4]. W naszej grupie znamienne niska produkcja TNF- α dotyczyła pacjentów z wysoką kolonizacją bakteryjną, zarówno w obrębie skóry zmienionej, jak i niezmienionej. W przeciwieństwie do uprzednich analiz nie wykazaliśmy dodatniej znamiennej korelacji pomiędzy IFN- γ a TNF- α .

W badanej grupie chorych nie potwierdzono znamiennych różnic w produkcji IL-2 przez limfocyty T krwi obwodowej u chorych na AZS w porównaniu do kontroli. Wykazano jednak znamienne różnice w poziomie IL-2 między grupami z wysoką kolonizacją skóry zmienionej i niezmienionej oraz wysoką wartością indeksu SCORAD, a pacjentami z niską ilością bakterii i ze słabo nasilonymi zmianami klinicznymi. Obserwacje autorów pozostają zgodne z doniesieniem Kapp i wsp. [28], którzy

wykazali, że zdolność do produkcji IL-2 przez limfocyty izolowane z krwi obwodowej odwrotnie koreluje z klinicznym nasileniem atopowego zapalenia skóry. W tych samych badaniach wykazano znamienne wyższe poziomy receptora dla IL-2 (IL-2R) w surowicy pacjentów z AZS. Ostatnio Yoshino i wsp. [6] opisali u chorych z wysokim klinicznym SCORAD obniżoną reaktywność PBMC_s na SEB, tłumacząc ją zwiększoną apoptozą aktywowanych limfocytów T. König i wsp. [29] sugerują, że zahamowana proliferacja PBMC_s chorych na AZS spowodowana jest zahamowaną ekspresją IL-2 w stymulowanych przez SEB limfocytach T. W badaniach własnych [18] wykazano znamienne wyższy odsetek apoptotycznych limfocytów T aktywowanych SEB u pacjentów z wysoką kolonizacją bakteryjną i wysokim klinicznym SCORAD, przy równocześnie znamienne obniżonej produkcji IL-2.

W niniejszej pracy nie wykazano znamiennych różnic pomiędzy chorymi na AZS i grupą kontrolną pod względem produkcji cytokin o profilu Th2 (IL-4, IL-5) przez PBMC_s na odpowiedź na stymulację SEB. Podobne obserwacje poczynili uprzednio Aleksza i wsp. [30]. Yoshino i wsp. [6] wykazali, że PBMC_s od pacjentów z niską wartością indeksu SCORAD charakteryzowała znamienne niższą produkcją IL-4 w porównaniu z grupą kontrolną, podczas gdy u chorych z wysokim SCORAD poziom tej cytokiny nie różnił się od grupy kontrolnej. Ostatnie badania Heaton i wsp. [14] wskazują na rolę gronkowcowej enterotoksyny B w wybiórczej stymulacji produkcji IL-5 przez PBMC_s izolowanych od osób zarówno z objawami atopowego zapalenia skóry, jak i astmy atopowej. Wykazana przez nas znamienne dodatnia korelacja między produkcją IL-5 *in vitro* a stężeniem ECP w surowicy pacjentów atopowych promuje obserwacje Wedi i wsp. [31], że autokrynną produkcją IL-5 przez eozynofile wydłuża okres przeżycia tych komórek. W rzeczywistości wydzielanie cytokin przez zaktywowane przez SEB limfocyty T ściśle zależy od wzajemnych interakcji limfocyt T-monocyt, podobnie, jak wykazany udział innych niż limfocyty T CD4⁺ komórek w produkcji cytokin w hodowlach stymulowanych SEB [16, 25].

Piśmiennictwo

1. Akdis CA, Akdis M, Trautmann A, et al.: Immune regulation in atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol*, 2000, 12: 641-6.
2. Galli E, Cicconi R, Rossi P, et al.: Atopic dermatitis: molecular mechanism, clinical aspects and new therapeutical approaches. *Curr Mol Med* 2003, 3: 127-38.
3. Taha RA, Leung DYM, Boguniewicz M, et al.: IL-4 and IL-5 receptor mRNA expression in acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1997, 99: 331-8.
4. Takahashi T, Sasaki Y, Hama K, et al.: Production of IL-4, IL-2, IFN-gamma, and TNF-alpha by peripheral blood mononuclear cells of patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 1992, 3: 172-80.

5. Koning B, Neuber K, Koning W: Responsiveness of peripheral blood mononuclear cells from normal and atopic donors to microbial superantigens. *Int Arch Allergy Immunol* 1995, 106: 124-33.
6. Yoshino T, Asada H, Sano S, et al.: Impaired responses of peripheral blood mononuclear cells to staphylococcal superantigen in patients with severe atopic dermatitis: a role of T cell apoptosis. *J Invest Dermatol* 2000, 114: 281-8.
7. Nomura I, Goleva E, Howell MD, et al.: Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol* 2003, 171: 3262-9.
8. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, et al.: Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2002 347: 1151-60.
9. Leung DYM: Infection in atopic dermatitis. *Curr Opin Pediatr* 2003 15: 399-404.
10. Abeck D, Mempel M: *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis and its therapeutic implications. *Br J Dermatol* 1998, 139: 13-6.
11. Goh CL, Wong JS, Giam YC: Skin colonization of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis patients seen at the National Skin Centre, Singapore. *Int J Dermatol* 1997, 36: 653-7.
12. Kotzin BL, Leung DYM, Kappler J, et al.: Superantigens and human disease. *Adv Immunol* 1993, 54: 99-166.
13. Sperber K, Silverstein L, Brusco C, et al.: Cytokine secretion induced superantigens in peripheral blood mononuclear cells, lamina propria lymphocytes, and intraepithelial lymphocytes. *Clin Diag Lab Immunol* 1995, 2: 473-7.
14. Heaton T, Mallon D, Venaille T, et al.: Staphylococcal enterotoxin induced IL-5 stimulation as a cofactor in the pathogenesis of atopic disease: the hygiene hypothesis in reverse? *Allergy* 2003, 58: 252-6.
15. Lin YT, Wang CT, Hsu CT, et al.: Differential susceptibility to staphylococcal superantigen (SsAg)-induced apoptosis of CD4⁺ T cells from atopic dermatitis patients and healthy subjects: the inhibitory effect of IL-4 on SsAg-induced apoptosis. *J Immunol* 2003, 171: 1102-8.
16. Campbell DE, Fryga AS, Bol S, et al.: Intracellular interferon-gamma (IFN- γ) production in normal children and children with atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 1999, 115: 377-82.
17. Byron KA, Liberatos S, Varigos GA, et al.: Interferon-gamma production in atopic dermatitis: a role for prostaglandins? *Int Arch Allergy Immunol* 1992, 99: 50-5.
18. Kędzińska A, Kaszuba-Zwoińska J, Kapińska-Mrowiecka M, et al.: SEB-induced T-cells apoptosis in atopic patients – correlation to the clinical status and skin colonization with *Staphylococcus aureus*. *Arch Immun Ther Exp*, 2004 (w druku).
19. Capoluongo E, Giglio A, Lavieri MM, et al.: Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus* strains isolated in subjects with atopic dermatitis. Higher prevalence of exfoliative B toxin production in lesional strains and correlation between the markers of disease intensity and colonization density. *J Dermatol Sci* 2001, 26: 145-55.
20. Adamek-Guzik T, Guzik T, Czerniawska-Mysik G i wsp.: Wpływ leczenia atopowego zapalenia skóry na stopień kolonizacji przez *Staphylococcus aureus*. *Przegl Lek* 2002, 58: 1029-33.
21. Hanifin JM., Rajka G: Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol (Suppl)* 1980, 92: 44-7.
22. European Task Force on Atopic Dermatitis: Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus report. *Dermatology* 1993, 186: 23-31.
23. Hanifin JM: Standardized grading of subjects for clinical research studies in atopic dermatitis: workshop report. *Acta Dermato Venereol (Suppl)* 1989, 144: 28-30.
24. Williamson P, Kligman A: A new method for the quantitative investigation of cutaneous bacteria. *J Invest Dermatol* 1965, 45: 498-503.
25. Akdis M, Trautmann A, Klunker S, et al.: Cytokine network and dysregulated apoptosis in atopic dermatitis. *Acta Odontol Scand* 2001, 59: 178-82.
26. Zollner TM, Wichelhaus TA, Hartung A, et al.: Colonization with superantigen-producing *Staphylococcus aureus* is associated with increased severity of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2000, 30: 994-1000.
27. Campbell DE, Kemp AS. Cell mediated immunity to *Staphylococcus aureus* in Childhood atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1997, 99: 263-9.
28. Kapp A, Neuner P, Kurtmann J, et al.: Production of interleukin-2 by mononuclear cells in vitro in patients with atopic dermatitis and psoriasis – comparison with serum interleukin 2 receptor levels. *Acta Derm Venereol* 1991, 71: 403-6.
29. Koning B, Neuber K, Koning W: Responsiveness of peripheral blood mononuclear cells from normal and atopic donors to microbial superantigens. *Int Arch Allergy Immunol* 1995, 106: 124-33.
30. Aleksza M, Lukacs A, Antal-Szalmas P., et al.: 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. *Br J Dermatol*, 2002, 147: 1135-41.
31. Wedi B, Raap U, Lewrick H, et al.: Delayed eosinophil programmed cell death in vitro: A common feature of inhalant allergy and extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1997, 100: 536-43.