

Динамика активности некоторых компонентов комплемента при лечении atopического дерматита у детей

С. С. Андина¹, А. М. Бичучер¹, Н. В. Гора¹, Л. В. Козлов¹, О. В. Логунов¹,
О. А. Башкина², О. В. Рубальский², В. А. Алешкин¹

Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского¹,
Астраханская государственная медицинская академия²

Разработаны иммуноферментные методы определения функциональной активности компонентов С3, С9 и С1 ингибитора системы комплемента для решения диагностических и прогностических задач при лечении больных. Исследованы активности этих компонентов, а также активности и количества С1 ингибитора в сыворотках крови детей в возрасте от 6 месяцев до 18 лет, больных atopическим дерматитом, до и после лечения для выяснения участия системы комплемента в патогенезе этого заболевания. Разработанные методы иммуноферментного анализа для определения функциональной активности компонентов системы комплемента показали высокую чувствительность и надежность. У детей с atopическим дерматитом активность компонента С9, участвующего в мембранной атаке комплемента была существенно ниже нормы, что указывает на участие компонентов мембраноатакующего комплекса в осуществлении некротических процессов в области кожных поражений. Снижена была также активность компонента С3 ключевого компонента каскада активации, участвующего в процессах воспаления. До и в ходе лечения больных удельная активность С1 ингибитора была повышена, что свидетельствовало о повышенном биосинтезе этого белка, являющегося белком острой фазы. Прослеживаются позитивные сдвиги в сторону нормализации статуса комплемента после лечения. Полученные в работе данные указывают на участие системы комплемента в патологическом процессе при atopическом дерматите у детей.

Ключевые слова: система комплемента, компонент С3, компонент С9, С1 ингибитор, atopический дерматит

Dynamics of Activity of Some Components of Complement in Treatment of Atopic Dermatitis in Children

S. S. Andina¹, A. M. Bichucher¹, N. V. Gora¹, L. V. Kozlov¹, O. V. Logunov¹,
O. A. Bashkina², O. V. Rubalsky², V. A. Aleshkin¹

Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G.N. Gabrichevsky¹
Astrahan State Medical Academy²

The article describes immunoassay methods of determining the functional activity of the components C3 and C9 and C1 inhibitor for diagnostic and prognostic purposes in the treatment of patients. The activity of these components, as well as the activity and the amount of C1 inhibitor in the blood serum of children aged 6 months to 18 years suffering from atopical dermatitis have been analyzed before and after treatment to determine the involvement of the complement system in the pathogenesis of this disease. The developed methods of enzyme immunoassay for determination of the functional components of the complement system have shown high sensitivity and reliability. The activity of C9 component involved in the membrane attack of the complement was significantly below normal in children with atopical dermatitis. That indicates the involvement of membrane attack complex components in the skin necrotic processes. Component C3 activity is also reduced. C3 is the key component of the activation cascade involved in the inflammatory processes. Specific activity of C1 inhibitor increased before and during the treatment, indicating an increased biosynthesis of this acute phase protein. Positive tendency towards the normalization of the status of complement after treatment has been observed. Data obtained in this study indicate the involvement of complement system in the pathological process of atopical dermatitis in children.

Key words: system of complement, component C3, component C9, C1 inhibitor, atopical dermatitis

Контактная информация: Козлов Леонид Васильевич — главный научный сотрудник ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского, профессор, доктор биологических наук; 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10; 452-38-01, lvkozlov@mail.ru.

УДК 616.5-08

Два важных патогномоничных фактора atopического дерматита: воспаление и кожные проявления не могут не отражаться на состоянии системы комплемента, а динамика изменения статуса комплемента может характеризовать этапы выздоровления больного в ходе терапии. Однако имеющиеся на сегодняшний день данные о количественных изменениях компонентов комплемента в сыворотках крови больных atopическим дерматитом часто противоречивы и, кроме того, относятся в большинстве случаев лишь к количественной характеристике, но не к определению изменений функциональной активности компонентов комплемента.

Исходя из этого были разработаны новые иммуноферментные методы определения функциональной активности компонентов С3, С9 и С1 ингибитора. Такой выбор обусловлен тем, что активность компонента С3 и его потребление в ходе патологического процесса характеризует реакцию воспаления, что хорошо известно; удельная активность С1 ингибитора, как нами было показано ранее [1], является маркером острофазного состояния больного, а компонент С9 является ключевым белком мембраноатакующего комплекса и обязан участвовать в процессах некроза и апоптоза.

В литературе имеются противоречивые сведения о содержании компонента С3 и С1 ингибитора в сы-

воротке крови больных атопическим дерматитом. Было обнаружено значительное повышение содержания этих белков [2, 3]. Снижение активности С3 показано в работах [4, 5]. Никаких изменений активности С1 ингибитора не было обнаружено в работе [6]. Что касается компонента С9, то его количество у больных с аллергическими заболеваниями кожи часто имело повышенный уровень [7].

Материалы и методы исследования

Мы использовали 96-луночные плоскодонные микропанели с повышенной сорбционной емкостью (Биомедикал, Россия), Твин-20 (Sigma, США), пероксидазу хрена (Диаэм, Россия), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (Medac, Германия), козы поликлональные IgG антитела к компоненту С3 человека (Sigma, США), козы поликлональные IgG антитела к компоненту С9 человека (Sigma, США), аптечный препарат тромбина, аптечный препарат дерината, набор для определения С1 ингибитора (ООО Цитокин, Санкт-Петербург).

Объектом исследования являлись дети в возрасте с 6 месяцев до 18 лет, больные атопическим дерматитом, проходившие обследование в отделении аллергологии ГУЗ «Областная детская клиническая больница им. Н. Н. Силищевой» г. Астрахани. Было проведено полное клинико-лабораторное обследование соответственно стандартам диагностики атопического дерматита с неосложненным течением заболевания и при наличии вторичного инфицирования у 98 детей в возрасте от 6 мес. до 7 лет. Лечение среднетяжелого атопического дерматита, как при наличии, так и при отсутствии вторичной инфекции, проводилось соответственно стандарту [8] с использованием антибиотиков: линкомицина, сумамеда, рулида, мази тридерм и антигистаминного препарата тавегила, согласно инструкциям по применению и в соответствии с возрастом больного.

Определение количества С1 ингибитора проводили с помощью набора (ООО Цитокин, Санкт-Петербург).

Определение функциональной активности С1 ингибитора. Растворяют препарат тромбина в 0,05 М натрий-карбонатном буфере, рН 9,5, с конечной концентрацией 15–50 мкг/мл и вносят по 100 мкл раствора в каждую лунку плоскодонного полистиролового 96-луночного планшета. Закрывают крышкой и оставляют на ночь при 4°C. Три раза отмывают планшет вероналовым буферным раствором, рН 7,4, содержащим 0,15 М NaCl, 0,15 мМ Ca²⁺ и 0,5 мМ Mg²⁺ (VBS²⁺), по 200 мкл в каждую лунку, затем планшет осушают путем вытряхивания остатка жидкости. В каждую лунку планшета вносят по 100 мкл

VBS²⁺. В лунки планшета каждого ряда вносят по 100 мкл раствора, содержащего определяемый С1 ингибитор в VBS²⁺, в виде прогрессивных двукратных разведений. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, трехкратной отмывки фосфатным буфером, рН 7,4, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05% Твин-20, и осушения планшета в каждую лунку вносят по 100 мкл конъюгата пероксидазы с антителами против С1-ингибитора человека в том же буфере в подобранном разведении. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, пятикратной отмывки с детергентом и осушения планшета в каждую лунку вносят по 100 мкл субстратного буфера (3,3',5,5'-тетраметилбензидин в 15 мл цитратно-фосфатного буфера, рН 5,0, и 50 мкл 3% перекиси водорода). После 15–30 мин инкубации в темноте реакцию останавливают внесением в каждую лунку 50 мкл 14% серной кислоты. Результаты реакции учитывают с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом измерением светопоглощения при 450 нм. Количество компонента С1 ингибитора рассчитывают по стандартной кривой.

Определение функциональной активности компонента С3. Растворяют аптечный препарат дерината в вероналовом буферном растворе, рН 7,4, содержащем 0,15 М NaCl, 0,15 мМ Ca²⁺ и 0,5 мМ Mg²⁺, в концентрациях 10–150 мкг/мл и вносят по 100 мкл раствора в каждую лунку плоскодонной полистироловой 96-луночной микропанели. Закрывают крышкой и оставляют на ночь при 4°C. Содержимое лунок выливают, отмывают планшет тем же буфером, затем осушают путем вытряхивания остатка жидкости. В лунки планшета вносят по 100 мкл раствора VBS²⁺, содержащего 10 мкл реагента R3 (сыворотки крови человека, лишенной активности компонента С3), и анализируемую пробу, содержащую компонент С3 с неизвестной активностью. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, двукратной отмывки фосфатным буфером, рН 7,4, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05% Твин-20, (ЗФР-Т) и осушения планшета в каждую лунку вносят по 100 мкл конъюгата пероксидазы с антителами против компонента С3 человека в том же буфере в подобранном разведении. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°C, отмывки ЗФР-Т и осушения планшета в каждую лунку вносят по 100 мкл субстратного буфера с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин в 15 мл цитратно-фосфатного буфера, рН 5,0, и 50 мкл 3% перекиси водорода). После 5–10 мин инкубации в темноте реакцию останавливают внесением в каждую лунку 50 мкл 14% серной кислоты. Результаты реакции учитывают с помощью спектро-

Таблица 1. Активность компонентов С3 и С9 в сыворотках 67 детей с atopическим дерматитом до и после лечения

С3, мг/мл, до лечения	0,80 ± 0,44	Норма 1,20
С3, мг/мл, после лечения	0,87 ± 0,39	
С9, мкг/мл, до лечения	24,0 ± 11,5	Норма 61,1
С9, мкг/мл, после лечения	25,0 ± 15,5	

фотометра с вертикальным лучом измерением светопоглощения при 450 нм. Функциональную активность препарата С2 рассчитывают по стандартной кривой.

Определение функциональной активности компонента С9. Растворяют аптечный препарат дерината в вероналовом буферном растворе, рН 7,4, содержащем 0,15 М NaCl, 0,15 мМ Ca²⁺ и 0,5 мМ Mg²⁺, в концентрациях 10–100 мкг/мл и вносят по 100 мкл раствора в каждую лунку плоскодонной полистироловой 96-луночной микропанели. Закрывают крышкой и оставляют на ночь при 4°С. Содержимое лунок выливают, трижды отмывают планшет тем же буфером, затем осушают путем вытряхивания остатка жидкости. В лунки планшета ряда вносят по 100 мкл раствора VBS²⁺, содержащего препарат морской свинки в количествах, соответствующих 0,05 мкл сыворотки морской свинки, и анализируемую пробу, содержащую компонент С9 с неизвестной активностью. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°С, двукратной отмывки фосфатным буфером, рН 7,4, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05% Твин-20, и осушения планшета в каждую лунку вносят по 100 мкл конъюгата пероксидазы с антителами против компонента С9 человека в том же бу-

фере в подобранном разведении. После инкубации в термостате в течение 1 ч при 37°С, отмывки ЗФР-Т и осушения планшета в каждую лунку вносят по 100 мкл субстратного буфера с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин в 15 мл цитратно-фосфатного буфера, рН 5,0, и 50 мкл 3% перекиси водорода). После 5–10 мин инкубации в темноте реакцию останавливают внесением в каждую лунку 50 мкл 14% серной кислоты. Результаты реакции учитывают с помощью спектрофотометра с вертикальным лучом измерением светопоглощения при 450 нм. Функциональную активность препарата С9 рассчитывают по стандартной кривой.

Результаты и их обсуждение

В настоящее время доступны лишь методы определения количественного содержания отдельных компонентов системы комплемента человека. Для определения активности компонентов остается пользоваться лишь гемолитическими методами, имеющими много недостатков и неудобств применения. Между тем определение лишь количественного содержания компонентов малоинформативно. Основная задача, ставившаяся при разработке методов определения функциональной активности, была — использовать доступные реагенты для инициации процесса иммуноформентного определения. Так, для связывания активного С1 ингибитора вместо труднодоступного субкомпонента С1s применили аптечный препарат тромбина, а в качестве активатора классического пути при определении С3 и С9 вместо иммуноглобулинов использовали аптечный препарат деринат.

Определение активности компонентов С3, С9 и С1 инг в сыворотках крови детей, больных atopическим дерматитом до лечения и у тех же детей в ходе и после лечения, дало следующие результаты.

В отличие от литературных данных, приведенных выше, для С1 инг, мы наблюдали пониженные уровни количества и повышенные уровни активности, что отражалось на уровнях удельной активности этого белка и объяснялось более высокой скоростью оборота ингибитора, обусловленного повышенным биосинтезом в состоянии острой фазы больного. Динамика этих изменений, показанная на рис. 1, свидетельствует о снижении острофазности и нормализации состояния к концу лечения.

Проведены определения активностей компонентов С3 и С9 в сыворотках крови 67 больных детей. Содержание активного С3 в норме принято за 1,2 мг/мл в соответствии с литературными данными [9]. Для получения значений нормальной активности С9 было проведено ее определение в сыворотках крови

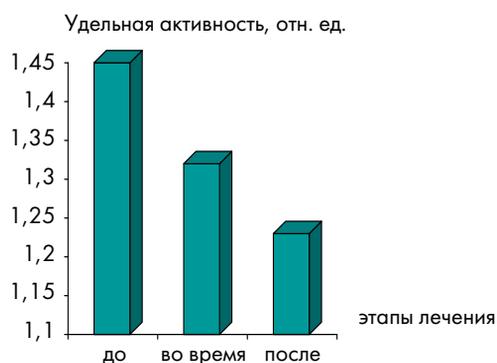
**Рисунок 1.** Изменение удельной активности С1 ингибитора (отношение активного белка к его суммарному количеству) (n = 98, p < 0,001)



Рисунок 2. Гистограмма распределения активности компонента С3 в сыворотках больных (67 детей) до и после лечения (содержание активного С3 в норме 1,2 мг/мл)

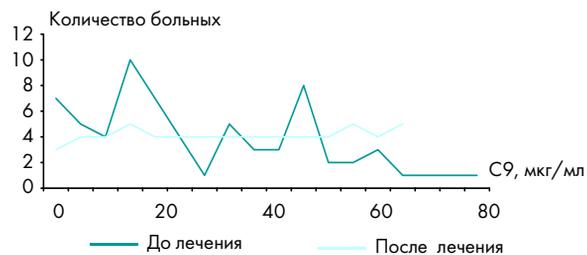


Рисунок 3. Гистограмма распределения активности компонента С9 в сыворотках больных (67 детей) до и после лечения

15 здоровых взрослых людей. Получено значение $61,1 \pm 21,5$ мкг/мл, что выше значений количественного содержания $44,5 \pm 10,6$ мкг/мл (29 человек) в работе [7].

Согласно полученным результатам активность обоих компонентов и до и после лечения была ниже нормы, что свидетельствовало о потреблении этих компонентов в ходе патологического процесса. Снижение активности компонента С3 характерно для процесса воспаления. Существенное снижение активности С9 может быть обусловлено участием в процессах некроза и апоптоза.

По данным таблицы 1, небольшое повышение активностей этих компонентов комплемента после лечения статистически не достоверно, однако характер гистограмм (рис. 2, 3) распределения активностей в сыворотках крови позволяет говорить о положительной динамике активностей.

Выводы

Разработаны новые удобные иммуноферментные методы определения функциональной активности компонентов С3, С9 и С1 ингибитора системы комплемента с использованием доступных аптечных препаратов тромбина для связывания С1 ингибитора и дерината для активации классического пути комплемента. Методы применены для характеристики состояния ключевых компонентов системы в сыворотках крови детей в возрасте от 6 месяцев до 18 лет, больных атопическим дерматитом, до и после лечения.

Показано, что у детей с атопическим дерматитом активность компонента С9 была существенно ниже нормы, что может свидетельствовать об участии компонентов мембраноатакующего комплекса в осуществлении некротических процессов в области кожных поражений. Снижена была также активность компонента С3, участвующего в процессах воспаления. До и в ходе лечения больных удельная активность С1 ингибитора была повыше-

на, что свидетельствовало об усилении биосинтеза этого белка острой фазы. Прослеживаются позитивные сдвиги в сторону нормализации статуса комплемента после лечения. Полученные в работе данные указывают на участие системы комплемента в патологическом процессе при атопическом дерматите у детей.

Литература:

1. Активность комплемента при коклюше / О.Н. Кулешина и др. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2013. — Т. 69. — № 2. — С. 46—51.
2. A. Kapp. Involvement of complement in psoriasis and atopic dermatitis — measurement of C3a and C5a, C3, C4 and C1 inactivator / A. Kapp, H. Wokalek, E. Schöpf // Arch. Dermatol. Res. — 1985. — V. 277. — № 5. — P. 359—361.
3. L. Lugović. Values of complement, T- and B-lymphocytes and immune complexes in patients with skin allergies / L. Lugović, J. Lipozencić // Acta Med. Croatica. — 1998. — V. 52. — № 4—5. — P. 203—208.
4. J. Ring. Plasma complement and histamine changes in atopic dermatitis. / J. Ring, T. Senter, R.C. Cornell, C.M. Arroyave, E.M. Tan // Br. J. Dermatol. — 1979. — V. 100. — № 5. — P. 521—530.
5. Ю.В. Сергеев. Атопический дерматит. 2. Состояние комплементарных блоков и патогенетическая роль анафилатоксинов С4а, С3а и С5а / Ю.В. Сергеев, Ю.П. Резников, Е.В. Лобанова, Н.С. Пименова // Вестн. дерматол. — 1989. — № 4. — С. 4—7.
6. K. Obtułowicz. Immunoglobulin E and complement in patients with contact allergy to nickel suffering from atopic and contact eczema / K. Obtułowicz, M. Kapusta, G. Antoszczyk, A. Obtułowicz // Przegl. Lek. — 2002. — V. 59. — № 6. — P. 427—429.
7. S. Kawachi-Takahashi. Determination of serum C9 level by immunodiffusion. Elevation in patients with infectious or allergic skin diseases / S. Kawachi-Takahashi, K. Tanaka, M. Takahashi, T. Kawashima, K. Shimada // Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. — 1975. — V. 48. — № 2. — P. 161—170.
8. Стандарт медицинской помощи больным атопическим дерматитом. Приказ № 432 от 30.05.2006 Минздравсоцразвития.
9. A.F. Hallett. Complement activation in Staphylococcus aureus bacteraemia / A.F. Hallett, R. Cooper // Clin. exp. Immunol. — 1980. — V. 40. — P. 306—311.