

## Содержание дендритных клеток и цитокинов в коже при атопическом дерматите

Денисов А.А., Климов В.В., Логвинов С.В., Загрешенко Д.С., Осихов И.А.

### Dendritic cells and cytokines in skin in atopic dermatitis

Denisov A.A., Klimov V.V., Logvinov S.V., Zagreshenko D.S., Osikhov I.A.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Денисов А.А., Климов В.В., Логвинов С.В. и др.

Исследованы кожные биоптаты и бесклеточные фракции экссудата кожного окна у 40 больных атопическим дерматитом. Определялись CD1a<sup>+</sup>-клетки Лангерганса и их отростки и концентрации интерлейкинов-4, -10, -17 и интерферона-γ в динамике патологического процесса. Показано повышение числа дендритных отростков клеток Лангерганса в средней трети эпидермиса, концентраций интерлейкинов-4 и -10 и снижение интерферона-γ в кожных экссудатах.

**Ключевые слова:** атопический дерматит, дендритные клетки, клетки Лангерганса, цитокины, кожное окно.

To study CD1a<sup>+</sup> Langerhans cells and their extensions in epidermis and values of IL-4, IL-10, IL-17 and IFN-γ in cell-free skin exudate there have been examined 40 patients of atopic dermatitis depending on phase pathological process. There have been found an increase in both CD1a<sup>+</sup> dendritic extensions in medium layer of the epidermis and IL-4 and IL-10 in skin exudates. IFN-γ exudate's value has been decreased.

**Key words:** atopic dermatitis, dendritic cells, Langerhans cells, cytokines, skin window.

УДК 616.5-002-056.3-097:611.018.83:577.112

## Введение

В патогенезе атопического дерматита (АтД) одно из центральных мест принадлежит иммунопатологическим нарушениям. В современной литературе накоплено немало данных о механизмах иммунного ответа на уровне целого организма, однако с развитием новых концепций в иммунологии большое значение придается состоянию местного иммунитета кожи. Аллергическое воспаление в коже является сложным и многообразным процессом, включающим большой набор клеток и цитокинов.

Способностью индуцировать аллергическое воспаление в коже обладают дендритные клетки эпидермиса. Они являются основными антигенпрезентирующими клетками, от которых зависит дифференцировка наивных Т-лимфоцитов. Существующий объем информации относительно наличия и распределения дендритных клеток в эпидермисе у больных атопическим дерматитом в разные периоды заболевания довольно ограничен, поэтому целесообразно более детальное изучение этих аспектов при данной патоло-

гии. В коже основными антигенпрезентирующими клетками являются клетки Лангерганса (КЛ). КЛ — это уникальная субпопуляция дендритных клеток, расположенных в эпидермисе. Протоспецифическим маркером данных клеток является молекула CD1a, которая в большом количестве экспрессируется на поверхности клеточной мембраны КЛ и их отростков, функцией которых является презентация небелковых (липидных) антигенов.

В последнее время в литературе уделяется много внимания цитокиновой составляющей аллергического воспалительного процесса. Иммунопатогенез АтД обусловлен нарушением дифференцировки Th0-лимфоцитов [6]. Воспалительный процесс в коже начинается, поддерживается и заканчивается при непосредственном участии цитокинов [4]. В патогенезе АтД в разное или в одно и то же время принимают участие цитокины с противоположным действием, которые продуцируют антагонистические популяции, — Т-хелперы (Т-helper — Th) типа 1 и 2. Развитие иммунного ответа по клеточному или гуморальному типу в разные фазы течения болезни тоже определяет

действие цитокинов [6]. Открытые сравнительно недавно новые субпопуляции Т-хелперов, в частности Th17- и Th22-лимфоциты, заставляют пересмотреть устоявшиеся взгляды на механизмы развития АтД [8]. Важность детального изучения патогенетического потенциала определенных цитокинов в развитии данного заболевания создает предпосылки для более точного понимания тех биологических механизмов, которые лежат в основе патологического процесса [4, 6]. Это является важным фактором для последующего развития более эффективных методов контроля заболевания, разработки новых подходов к диагностике и может оказаться концептуальной основой для новых направлений в противовоспалительной терапии [4].

Цель работы — оценить количество, распределение и «отростчатость» CD1a-положительных дендритных клеток на разных уровнях эпидермиса и определить профиль цитокинов в бесклеточной фракции экссудатов кожного окна при атопическом дерматите.

## Материал и методы

Обследовано 40 человек (мужчины и женщины) в возрасте от 18 до 45 лет, находившихся под наблюдением в дневном стационаре аллергологического отделения межвузовской больницы и Центре иммунопатологии г. Томска. Диагноз «атопический дерматит» устанавливался на основании данных анамнеза, клинической картины, кожного аллергологического тестирования, содержания иммуноглобулина Е. Степень тяжести заболевания определялась с учетом SCORAD. Все пациенты предварительно дали письменное согласие на участие в проводимом исследовании.

Для исследования было отобрано 10 практически здоровых доноров-добровольцев в возрасте 17—24 лет. В момент обследования доноры были клинически здоровы, без хронических заболеваний, в течение 1 мес у них были исключены острые респираторные заболевания, вакцинации и назначение иммуностимулирующих препаратов. Они не имели отягощенного семейного, аллергологического и иммунологического анамнеза. При проведении аллергологического тестирования у лиц, вошедших в контрольную группу, не выявлено сенсибилизации к бытовым, эпидермальным, пыльцевым и пищевым аллергенам. Здоровые лица при включении в исследование подписали информированное согласие.

Проводилось двухкратное исследование пациентов с АтД: в период обострения и в период ремиссии. Из исследования исключались больные с острыми инфекционными заболеваниями и обострением сопутствующих хронических заболеваний, наличием паразитарной инвазии на момент исследования. Кроме того, критериями исключения являлись также назначение иммуностимулирующих препаратов, вакцинация, терапия антибиотиками, цитостатиками.

Материалом для исследования служили бесклеточная фракция экссудатов кожного окна и биопсийный материал. Исследование по выявлению в срезах кожи клеточных элементов, экспрессирующих CD1a<sup>+</sup>, иммуногистохимическим методом проводилось на базе НИИ онкологии СО РАМН (г. Томск) в лаборатории патологической анатомии. Иммуногистохимическое исследование осуществлялось непрямым иммуноферментным методом по стандартной методике. Использовались антитела: CD1a (Novocastra, мышинные). Оценка результатов: на 0,1 мм длины эпидермиса подсчитывалось отдельно количество КЛ и их отростков в нижней, средней и верхней трети эпидермиса с помощью светооптического микроскопа при увеличении 400.

Для оценки содержания цитокинов в работе использовался метод кожного окна по J. Rebusk в модификации В.В. Климова, Т.В. Кошовкиной, В.К. Раткина и А.А. Денисова [5].

В экссудате кожного окна определялись цитокины локального действия — интерферон- $\gamma$  (interferon — IFN), интерлейкины (interleukin — IL) -4, -10 и -17. Выбор данных цитокинов связан с тем, что IFN- $\gamma$  является ключевым цитокином для Th1, а IL-4 — для Th2 [1, 4]. IL-17 — это ключевой цитокин сравнительно недавно открытой субпопуляции Th17 [8]. IL-10 является главным цитокином Th1, субпопуляции, ответственной за регенерацию тканей и развитие рубцовой ткани [1]. Определение цитокинов проводилось с помощью иммуноферментного анализа. Использовались тест-системы фирмы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью пакета статистических программ SPSS. Для представления количественных данных, не подчиняющихся нормальному закону распределения, использовались описательные статистики: медиана *Me*, 1-й квартиль (25%)  $Q_1$  и 3-й квартиль

(75%)  $Q_3$ . Для всех имеющихся выборок данных применялись непараметрические критерии Краскала—Уоллиса и Манна—Уитни. Различие двух сравниваемых величин считалось достоверным при  $p > 0,95$ , если вероятность их тождества оказывалась меньше 5%. Анализ взаимосвязей проводился с помощью коэффициента корреляции Спирмена [2].

## Результаты

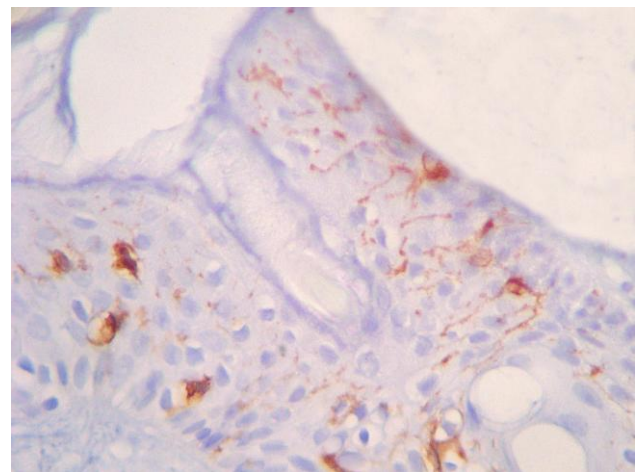
При иммуногистохимическом выявлении CD1a экспрессирующие КЛ в эпидермисе и сосочковом слое дермы имеют окрашенные в коричневый цвет тело и отростки. Округлой или вытянутой формы ядро не окрашено. Тело клеток имеет полигональную форму, при локализации в базальном и нижней части шиповатого слоя оно, как правило, крупнее, чем в верхней части шиповатого слоя эпидермиса. Отростки неравномерной толщины ветвятся, располагаются между эпителиоцитами и следуют на значительное расстояние, пронизывая базальный, шиповатый и зернистый слои эпидермиса. Некоторые отростки оканчиваются утолщениями на границе с роговым слоем. Описываемое строение клетки имеют как в нормальной коже, так и при АтД (рисунок). В последнем случае заметно возрастает не только содержание КЛ в эпидермисе и сосочковом слое дермы, но увеличивается степень ветвления клеточных отростков. При АтД КЛ по форме тела, отростков, их ветвлению в значительной степени напоминают микроглию мозга.

Содержание CD1a-положительных клеток и их отростков в разных частях эпидермиса у больных АтД и у здоровых лиц представлено в табл. 1.

Как видно из табл. 1, число CD1a<sup>+</sup> КЛ у здоровых лиц в верхней трети эпидермиса достоверно не отличалось от количества данных клеток в биопта-

тах кожи, взятых в периоды обострения и ремиссии АтД.

Число CD1a<sup>+</sup> дендритных отростков в верхней трети эпидермиса было наибольшим в биоптатах кожи, взятых в период обострения АтД, в сравнении с аналогичными показателями в контрольной выборке и в период ремиссии АтД. Однако выявленные различия не имели статистически достоверного характера в сравниваемых группах.



Участок кожи верхней трети сгибательной поверхности предплечья больного АтД. Клетки Лангерганса в эпидермисе темного цвета. Иммуногистохимическая реакция на CD1a-антиген. Ув. 400

Количество CD1a<sup>+</sup> КЛ в средней трети эпидермиса не имело статистически значимых различий в сравниваемых группах. В контрольной группе их число составило 1,0 (0,3—1,58) клетки. В период обострения АтД количество КЛ составило 0,75 (0,53—1,52), в период ремиссии АтД — 2,0 (0,97—3,75).

Таблица 1

Количество CD1a-положительных клеток Лангерганса и их отростков в разных частях эпидермиса у больных atopическим дерматитом и здоровых лиц,  $Me (Q_1—Q_3)$

Группа	Клетки Лангерганса				Дендритные отростки			
	Верхняя треть эпидермиса	Средняя треть эпидермиса	Нижняя треть эпидермиса	Общее количество клеток	Верхняя треть эпидермиса	Средняя треть эпидермиса	Нижняя треть эпидермиса	Общее количество отростков
Контрольная группа	0 (0—0,31)	1,0 (0,3—1,58)	0 (0—0,2)	1,0 (0,55—1,91)	0,5 (0—1,35)	1,5 (0,4—2,75)	0,7 (0—0,91)	3,2 (1,35—3,81)
Больные с atopическим дерматитом, период обострения (19 человек)	0,33 (0—1,41)	0,75 (0,53—1,52)	0,90* ** (0,1—1,37)	2,0 (0,8—4,13)	2,53 (0,31—6,25)	2,87 (1,38—6,15)	2,50 (0,16—4,75)	6,70 (3,2—14,15)
Больные с atopическим дерматитом,	0	2,0	0	3,25	0	4,6*	0	6,5*

период ремиссии (15 человек) | (0—0,2) (0,97—3,75) (0—0,2) (1,17—4) (0—2,27) (2,58—7,0) (0—1,43) (3,55—8,85)

\* Достоверность различий в сравнении с контролем ( $p < 0,05$ ).

\*\* Достоверность различий в сравнении с ремиссией ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2

Содержание IL-4, IL-10, IL-17 и IFN- $\gamma$  в экссудатах кожного окна при atopическом дерматите и у здоровых лиц, пг/мл ( $Me (Q_1—Q_3)$ )

Группа	IL-4	IL-10	IL-17	IFN- $\gamma$
Контрольная группа	0,5 (0,45—0,7)	7 (3,5—13,5)	26 (18,25—40,25)	46 (39—51,75)
Больные с atopическим дерматитом, период обострения	35 человек	18 человек	15 человек	22 человек
	1,4 (1,03—1,59)*	21,5 (16,5—42,5)*	19 (11,5—29)	38 (31—59)
Больные с atopическим дерматитом, период ремиссии	15 человек	11 человек	11 человек	12 человек
	1,0 (0,9—1,3)*	27 (20—38)*	28 (14,5—29,5)	32,5 (14—45,5)*

\* Достоверность различий в сравнении с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

Количество CD1a<sup>+</sup> дендритных отростков в средней трети эпидермиса в период обострения АтД превышало аналогичный показатель в контрольной выборке в 2 раза. Однако выявленные различия не имели достоверного характера. В период ремиссии АтД отмечалось достоверное увеличение количества отростков в сравнении с аналогичным показателем в контрольной группе — 4,6 (2,58—7,0) отростка.

В нижней трети эпидермиса количество CD1a<sup>+</sup> КЛ повышалось в период обострения АтД и достоверно отличалось от аналогичных показателей в контрольной группе и в период ремиссии. Количество клеток в период обострения основного заболевания составило 0,9 (0,1—1,37). У здоровых лиц и в период ремиссии АтД число клеток составило 0 (0—0,2) в обеих группах.

Количество CD1a<sup>+</sup> дендритных отростков в нижней трети эпидермиса в сравниваемых группах достоверно не отличалось.

Общее количество CD1a<sup>+</sup> КЛ по всей толщине эпидермиса было наибольшим в период ремиссии АтД. В период обострения АтД также отмечалось увеличение количества КЛ в 2 раза в сравнении с контролем, однако выявленные различия были недостоверными.

Суммарное количество CD1a<sup>+</sup> отростков в биоптатах кожи, взятых в периоды обострения и ремиссии АтД, превышало аналогичный показатель в контрольной группе в 2 раза, однако достоверных различий в сравниваемых группах не выявлено.

Содержание IL-4, -10, -17 и IFN- $\gamma$  в бесклеточной фракции экссудатов кожного окна у пациентов с АтД в зависимости от распространенности воспалительного процесса в коже представлено в табл. 2.

В период обострения АтД отмечено достоверное по отношению к контрольной группе увеличение содержания IL-4 и -10 и тенденция к снижению IFN- $\gamma$ . В период ремиссии динамика сохранялась, при этом также наблюдалось статистически значимое снижение IFN- $\gamma$ . Достоверных различий в содержании исследованных цитокинов при обострении и ремиссии АтД не найдено.

При проведении корреляционного анализа выявлены положительные корреляционные связи между следующими показателями: количеством CD1a-положительных клеток в нижней трети эпидермиса и уровнем IL-10 в экссудатах кожного окна в период обострения АтД ( $r = 0,971$ ;  $p = 0,049$ ).

## Обсуждение

Увеличение количества КЛ, а также их отростков в разные периоды заболевания, вероятно, свидетельствует о том, что данная субпопуляция дендритных клеток эпидермиса при АтД является ответственной за инициацию и хронизацию иммунологических реакций в коже. Это соответствует современной концепции о минимальной воспалительной реакции, которая поддерживается в период ремиссии любой atopической болезни.

Наблюдающаяся тенденция к снижению уровня IFN- $\gamma$  в период обострения и одновременное повышение уровней IL-4 и -10 в экссудате кожного окна в этот же период может свидетельствовать о том, что происходит подавление функциональной активности Th1-клеток на фоне повышения функциональной активности Th2 и Tr1. В анализируемой литературе разные авторы объясняют данную ситуацию тем, что изначально Th1- и Th2-субпопуляции лимфоцитов находятся в реципрокных отношениях, и, продуцируя

противоположные по эффекту цитокины, каждая из субпопуляций подавляет дифференцировку полярной группы, тем самым снижая продукцию альтернативных цитокинов [1, 4, 6]. Кроме того, к торможению продукции провоспалительных цитокинов, к которым относится IFN- $\gamma$ , способен IL-10, являющийся ключевым цитокином супрессорных Tr1. IL-10, подавляя образование Th1 и провоспалительных цитокинов, сдвигает баланс Th1/Th2 в сторону Th2 [4].

IL-17, как и IFN- $\gamma$ , имел тенденцию к снижению в период обострения, а в ремиссию — к восстановлению до значений контрольной группы. Известно, что этот цитокин принимает участие в развитии аутоиммунных воспалительных процессов инфекционного генеза [7, 8]. Его содержание повышается при псориазе, ревматоидном артрите и аллергическом контактном дерматите [7]. В данном исследовании снижение уровня IL-17 в период обострения АтД может быть связано с влиянием цитокинов Th2-клеток и Tr1-лимфоцитов.

### Заключение

Резюмируя вышеизложенное, следует заключить, что сложный, но тонко регулируемый воспалительный

процесс при АтД сопряжен с наличием разных популяций иммунокомпетентных клеток в коже и большого набора цитокинов, нередко противоположных по механизму действия.

### Литература

1. Бурместер Г.-Р., Пецутто А. Наглядная иммунология. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. 320 с.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
3. Иммунологические методы / под ред. Г. Фримеля. М.: Медицина, 1987. 472 с.
4. Маянский А.Н. Лекции по иммунологии. 2-е изд. Н. Новгород: Изд-во НГМА, 2005. 272 с.
5. Пат. 1534395 РФ. Способ диагностики аллергического диатеза / Климов В.В., Кошовкина Т.В., Раткин В.К., Денисов А.А.
6. Система цитокинов: теоретические и клинические аспекты / под ред. В.А. Козлова, С.В. Сенникова. Новосибирск: Наука, 2004. 324 с.
7. Astrid J. Van Beelen. IL-17 and Immune Pathology in the Skin // Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2007. V. 7, № 5. P. 374—381.
8. Toda M., Donald Y.M., Leung D.Y.M. et al. Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions // J. of Allergy and Clinical Immunology. 2003. V. 111. Issue 4. P. 875—881

Поступила в редакцию 08.04.2010 г.

Утверждена к печати 28.09.2010 г.

### Сведения об авторах

**А.А. Денисов** — канд. мед. наук, доцент кафедры иммунологии и аллергологии СибГМУ (г. Томск).

**В.В. Климов** — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой иммунологии и аллергологии СибГМУ (г. Томск).

**С.В. Логвинов** — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии СибГМУ (г. Томск).

**Д.С. Загрешенко** — аспирант кафедры иммунологии и аллергологии СибГМУ (г. Томск).

**И.А. Осихов** — студент МБФ, член НСК кафедры иммунологии и аллергологии СибГМУ (г. Томск).

### Для корреспонденции

Логвинов Сергей Валентинович, e-mail: s\_logvinov@mail.ru