

На правах рукописи

Загрешенко Денис Сергеевич

СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В ЭКССУДАТАХ «КОЖНОГО ОКНА»
И СОСТАВ КЛЕТОЧНОГО ИНФИЛЬТРАТА В БИОПТАТАХ КОЖИ
БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2010

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор Климов Владимир Васильевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Кожевников Владимир Сергеевич

доктор медицинских наук, профессор Куделя Любовь Михайловна

Ведущая организация:

ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет им. Н.И. Пирогова Росздрава

Защита состоится «___» _____ 2010 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 при Учреждении РАМН НИИ Клинической Иммунологии СО РАМН по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИ Клинической Иммунологии СО РАМН.

Автореферат разослан «___» _____ 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Кудаева Ольга Тимофеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

На сегодняшний день одним из наиболее распространенных хронических рецидивирующих заболеваний кожи является атопический дерматит (АтД).

В патогенезе данного заболевания одно из центральных мест отводится иммунологическим 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. Данные клетки являются основными антигенпрезентирующими клетками, от которых зависит дифференцировка наивных Т-лимфоцитов. Существующий объем информации относительно наличия и распределения дендритных клеток в эпидермисе у больных АтД в разные периоды заболевания довольно ограничен, поэтому целесообразно более детальное изучение этих аспектов при данной патологии. В последнее время в литературе уделяется много внимания цитокиновой составляющей аллергического воспалительного процесса. Воспалительный процесс в коже начинается, поддерживается и заканчивается при непосредственном участии цитокинов. В патогенезе АтД принимают участие цитокины, которые продуцируются антагонистическими субпопуляциями Т-лимфоцитов.

Для ключевых цитокинов основных регуляторных субпопуляций Т-клеток характерны короткодистантные (аутокринные, паракринные) действия на клетки-мишени [Фрейдлин И.С., 2001; Симбирцев А.С., 2004; Маянский А.Н., 2005], что определяет актуальность исследования их на уровне шокового органа (в коже).

Цель исследования: исследовать локальное содержание цитокинов в экссудатах «кожного окна» и оценить состав клеточного инфильтрата в биоптатах кожи при атопическом дерматите.

Задачи исследования:

1. Определение содержания IL-4, IL-10, IL-17 и IFN- γ в экссудатах «кожного окна» при atopическом дерматите в динамике патологического процесса и оценка баланса регуляторных субпопуляций на основе исследования локальной продукции их ключевых цитокинов.
2. Оценка количества, распределения и «отросчатости» CD1a- и S-100-положительных дендритных клеток на разных уровнях эпидермиса при atopическом дерматите.
3. Изучение количественного содержания лимфоцитов, макрофагов, фибробластов и тучных клеток в биопсийном материале кожи, взятом с разных участков кожи, включая очаги лихенификации, при atopическом дерматите.
4. Определение наличия и степени выраженности отечных и фиброзных изменений в биоптатах кожи взятых с разных очагов, включая участки лихенификации при atopическом дерматите.

Научная новизна.

Впервые получены результаты исследования ключевых цитокинов основных адаптивных иммунорегуляторных субпопуляций лимфоцитов при АтД на локальном уровне (в экссудатах «кожного окна»). Получены новые данные о том, что при atopическом дерматите на уровне кожи отмечается дисбаланс в системе ключевых цитокинов Th1, Th2, Th17 и Tr1-лимфоцитов.

Показано, что в период обострения atopического дерматита в экссудатах «кожного окна» наблюдается увеличение содержания IL-4 и IL-10 и снижение уровня IL-17. В период ремиссии данного заболевания наблюдается снижение уровней IL-4 и IL-10 и повышение содержания IL-17. В отношении IFN- γ отмечено выраженное уменьшение локальной продукции данного цитокина как в период обострения, так и в период ремиссии АтД.

Научную новизну имеют полученные данные о распределении CD1a- и S-100-положительных дендритных клеток на разных уровнях эпидермиса, а также дана характеристика «отросчатости» этих клеток, как критерий повышения их функциональной активности, что может иметь значение при исследовании «эпикутанной» сенсibilизации при atopическом дерматите. Анализ полученных результатов исследования свидетельствует о том, что клетки

Лангерганса располагаются прежде всего в средней трети эпидермиса, как у здоровых лиц, так и у больных атопическим дерматитом, независимо от периода болезни. Отличительной особенностью кожи больных АтД от здоровой является заметное повышение количества данных клеток и их отростков в средней трети эпидермиса.

Теоретическая и практическая значимость.

Полученные новые сведения о локальном содержании цитокинов у больных атопическим дерматитом в экссудатах «кожного окна» дополняют информацию об участии IL-4, IL-10, IL-17 и IFN- γ в развитии данной патологии в зависимости от распространенности патологического процесса на коже в разные периоды заболевания и поддержания минимальной воспалительной активности в коже в период ремиссии.

Теоретическое значение имеют полученные данные о количестве и характере распределения клеток Лангерганса и их отростков в верхней, средней и нижней трети эпидермиса у больных атопическим дерматитом, поскольку это расширяет представления об участии данных клеток в поддержании минимальной воспалительной активности кожи, формировании ее ремоделирования и оценке интенсивности эпикутанной сенсibilизации.

Практическая ценность работы заключается в том, что измерение локальных концентраций IL-4, IL-10, IL-17 и IFN- γ в экссудатах «кожного окна» простым иммуноферментным методом позволяет диагностировать минимальную воспалительную активность кожи в периоде ремиссии атопического дерматита, что служит терапевтическим критерием назначения топического противовоспалительного лечения. Исследование новых параметров ремоделирования кожи может способствовать разработке новых подходов к иммунореабилитации больных с АтД. Результаты исследования внедрены в педагогический процесс на кафедре иммунологии и аллергологии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава при обучении студентов, а также при подготовке клинических ординаторов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При атопическом дерматите на уровне «шокового органа» (кожа) наблюдается дисбаланс ключевых цитокинов иммунорегуляторных

субпопуляций при этом регистрируется сдвиг соотношения Th1/Th2-лимфоцитов в сторону Th2, что поддерживает атопическое воспаление. С другой стороны наблюдается компенсаторное повышение функциональной активности Tr1-лимфоцитов.

2. При атопическом дерматите отмечается обогащение кожи CD1a+ и S-100+ клетками Лангерганса, лимфоцитами и макрофагами, особенно в очагах ее лихенификации. Наряду с превалированием функциональной активности Th2-лимфоцитов это может служить основой поддержания минимального атопического воспаления кожи в период ремиссии болезни по сравнению со здоровыми лицами.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из введения, пяти глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Библиографический указатель включает 190 источников, из них отечественных - 87, иностранных - 103. Работа иллюстрирована 12 таблицами и 5 рисунками.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на: VIII Международном конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке», Томск, 2007 г.; Межрегиональной научно-практической конференции «Дни иммунологии в Сибири», Омск, 2007 г.; 13th International Congress of Immunology, Бразилия, Рио-де-Жанейро, 2007 г.; Национальной конференции «Аллергология и клиническая иммунология – междисциплинарные проблемы», Москва, 2008 г.; Межрегиональной научно-практической конференции «Дни иммунологии в Сибири», Томск, 2008 г.; Заседание проблемной комиссии «Клиническая иммунологии и инфекционные болезни», Томск, 2009 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 2 - в журналах, рекомендованных ВАК РФ (Сибирский вестник психиатрии и наркологии, Бюллетень сибирской медицины).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Было обследовано 97 человек с атопическим дерматитом в возрасте от 18 до 45 лет, находившихся под наблюдением в аллергологическом отделении Межвузовской больницы и Центре иммунопатологии г. Томска.

Для исследования было отобрано 20 практически здоровых доноров-добровольцев в возрасте 17-24 лет. Здоровые лица и пациенты перед включением в исследование подписали информированное согласие.

Клиническая характеристика пациентов с атопическим дерматитом

Всего было обследовано 97 пациентов с атопическим дерматитом. Средний возраст больных составил 22 года, из них 63 женщины (65%) и 34 мужчины (35%). Диагностика АД включала тщательный сбор жалоб, анамнеза заболевания и анамнеза жизни, клиническую картину заболевания, кожные аллергопробы и сывороточный уровень IgE.

Распространенность кожного процесса оценивалась по площади поражения кожных покровов. У 42 пациентов патологический процесс носил ограниченно-локализованный характер, у 22 – распространенный, у 5 – диффузный характер.

В рамках нашего исследования в периоде обострения АД наблюдалось 69 пациентов, а в периоде ремиссии данного заболевания - 45 больных. При наступлении ремиссии регистрировались все три её типа: стойкая ремиссия – 4 пациента, полная - 19 пациентов и неполная ремиссия - 22 человека.

Иммунологические, гистологические и гистохимические исследования

Материалом для исследования служили бесклеточная фракция экссудатов «кожного окна» и биопсийный материал.

В работе использовался метод «кожного окна» по J. Rebeck и J. Crowley [Фримель Г., 1987] в модификации В.В. Климова. В экссудатах «кожного окна» определялись цитокины, для которых характерны короткодистантные варианты аутокринного и паракринного действия на клетки-мишени – IFN- γ , IL-4, IL-10 и IL-17. Для определения продукции данных цитокинов были использованы наборы для иммуноферментного анализа (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия). Постановку ИФА проводили в соответствии с методическими рекомендациями производителя.

Для проведения гистологического и иммуногистохимического исследований в качестве материала использовались биоптаты кожи, взятые у больных АД и у здоровых лиц.

Для выявления гистологических изменений в дерме проводили окраску срезов следующими гистологическими и гистохимическими методиками:

Окрашивание гематоксилином и эозином - для подсчета количества фибробластов, макрофагов и лимфоцитов (в 10 случайных полях зрения) и оценки отежных изменений в дерме [Меркулов Г.А., 1969].

Окрашивание гематоксилином и пикрофуксином по Ван-Гизону – для выявления коллагеновых волокон [Меркулов Г.А., 1969].

Окрашивание толуидиновым синим по Хессу и Холландеру - для выявления метахроматических гранул в цитоплазме тучных клеток [Пирс Э, 1962].

Гистологические исследования проводились на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии ГОУ ВПО Сибирского государственного медицинского университета (заведующий – профессор Логвинов С.В.).

Исследования по выявлению в срезах кожи клеточных элементов, экспрессирующих CD1a+ и S-100+, методом иммуногистохимии проводилось на базе НИИ онкологии СО РАМН в лаборатории патологической анатомии (руководитель – профессор Перельмутер В.М.). Иммуногистохимическое исследование проводилось непрямой иммуноферментным методом по стандартной методике [Эллиниди В.Н. и др., 2000]. Использовались антитела: CD1a («Novocastra», мышинные) и S-100 («DAKO» поликлональные).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью статистических программ «SPSS». Для всех имеющихся выборок данных применялись непараметрические критерии Краскал-Уолиса и Манна – Уитни. Анализ качественных данных проводился с помощью критерия χ^2 . Анализ взаимосвязей проводился с помощью коэффициента корреляции Спирмена [Гланц С., 1999; Наследов А., 2008].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цитокины «кожного окна» у больных атопическим дерматитом и у здоровых лиц

Большинство цитокинов обладают короткодистантным механизмом действия на клетки-мишени [Симбирцев А.С., 2004; Фрейдлин И.С., 2001; Fradelizi D., 2002]. Соответственно, изучение их на системном уровне является

малоперспективным, что определяет актуальность их изучения на локальном уровне – в коже. В связи с отсутствием сведений о содержании IL-4, IL-10, IL-17 и IFN- γ на уровне шокового органа при данной патологии, целесообразным является изучение данных цитокинов в экссудатах «кожного окна».

Содержание IL-4, IL-10, IL-17 и IFN- γ в экссудатах «кожного окна» у пациентов с АтД в зависимости от распространенности воспалительного процесса в коже, представлено в таблице 1.

Из данных, приведенных в таблице 1 видно, что содержание IL-4 в период обострения АтД в зависимости от распространенности патологического процесса на коже, имело тенденцию к увеличению. При ограниченно-локализованной форме АтД уровень IL-4 составил 0,7 (0,4-1,0) пг/мл и достоверно не отличался от аналогичного показателя в контрольной выборке. Концентрация IL-4 достигала максимальных значений при диффузной форме АтД – 1,4 (1,03-1,59) пг/мл. В период неполной ремиссии АтД уровень IL-4 достоверно превышал аналогичный показатель в контрольной группе и составил 1,0 (0,9-1,3) пг/мл. В периоды полной и стойкой ремиссии АтД уровень IL-4 снижался до величин контрольной группы.

Уровень IL-10 при АтД, повторял динамику IL-4, повышаясь в период обострения и снижаясь в период ремиссии.

В зависимости от распространенности патологического процесса на коже содержание данного цитокина в период обострения АтД имело тенденцию к увеличению. При ограниченно-локализованной форме АтД, в период обострения, уровень IL-10 составил 21,5 (16,5-42,5) пг/мл, а при диффузной форме АтД - 49,5 (24,87-64) пг/мл. В период неполной и полной ремиссии АтД концентрация IL-10 достоверно превышала аналогичный показатель в контрольной группе. В период стойкой ремиссии основного заболевания уровень IL-10 снижался до величин контрольной выборки.

Содержание IL-17 в период обострения АтД, в зависимости от распространенности патологического процесса на коже, имело тенденцию к снижению. При ограниченно-локализованной форме АтД уровень IL-17 составил 19 (11,5-29) пг/мл.

Таблица 1

Содержание IL-4, IL-10, IL-17 и IFN- γ в эксудатах «кожного окна» при атопическом дерматите и у здоровых лиц,

Me (Q1-Q3)

Группа	IL-4 (пг/мл)	IL-10 (пг/мл)	IL-17 (пг/мл)	IFN- γ (пг/мл)
Атопический дерматит	Контрольная группа	n=10 0,5 (0,45-0,7)	n=10 7 (3,5-13,5)	n=8 26 (18,25-40,25)
	Обострение, Ограниченно-локализованная форма	n=25 0,7 (0,4-1,0)	n=18 21,5 (16,5-42,5) p1	n=15 19 (11,5-29)
	Обострение, Распространенная форма	n=18 0,95 (0,67-1,05) p1	n=11 27 (15-58) p1	n=8 12,5 (11-13) p1
	Обострение, Диффузная форма	n=5 1,4 (1,03-1,59) p1, p2	n=4 49,5 (24,87-64) p1	n=4 8 (4,25-8,75) p1, p2, p3
	Стойкая ремиссия	n=4 0,65 (0,52-0,85) p4	n=4 10,5 (9,25-23) p4	n=4 24 (13,5-41,25)
	Полная ремиссия	n=15 0,6 (0,5-0,8) p4	n=9 27 (20-38) p1, p5	n=9 28 (14,5-29,5)
	Неполная ремиссия	n=15 1,0 (0,9-1,3) p1	n=8 37,5 (30,5-47,5) p1, p5, p6	n=7 15 (8-29) p1
				n=10 46 (39-51,75)
				n=22 38 (31-59)
				n=14 36 (28,75-53,75)
			n=4 31,5 (15-51)	
			n=4 25,5 (22-44)	
			n=12 32,5 (14-45,5)	
			n=19 31 (16,25-35,5)	

Примечания: Me – медиана, Q1 – первый квартиль, Q3 – третий квартиль; p1 – достоверность различий в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$); p2 – достоверность различий в сравнении с ограниченно-локализованной формой АгД ($p < 0,05$); p3 – достоверность различий в сравнении с распространенной формой АгД ($p < 0,05$); p4 – достоверность различий в сравнении с диффузной формой АгД ($p < 0,05$); p5 – достоверность различий в сравнении со стойкой ремиссией ($p < 0,05$); p6 – достоверность различий в сравнении с полной ремиссией ($p < 0,05$).

Минимальный уровень данного цитокина был отмечен при диффузной форме АтД - 8 (4,25-8,75) пг/мл. В период неполной ремиссии АтД концентрация IL-17 была значительно снижена, в сравнении с контрольной группой и составила 15 (8-29) пг/мл, но имеющиеся различия были недостоверными. В периоды полной и стойкой ремиссии основного заболевания содержание IL-17 в экссудатах «кожного окна» достигало уровня контрольных значений.

Содержание IFN- γ в кожных экссудатах в период обострения АтД в зависимости от распространенности патологического процесса на коже имело тенденцию к снижению. Однако в сравнении с контрольными величинами полученные различия не имели достоверного характера. В периоды неполной и полной ремиссии АтД уровень IFN- γ был значительно снижен и достоверно отличался от контрольных значений. Уровень цитокина в данные периоды заболевания составил 31 (16,25-35,5) пг/мл, 32,5 (14-45-5) пг/мл, соответственно. В период стойкой ремиссии АтД тенденция к снижению уровня IFN- γ сохранялась, но в сравнении с контрольными величинами достоверно не отличалась.

Известно, что патогенетическое значение в развитии данной патологии имеет соотношение оппозиционных пулов про- и противовоспалительных цитокинов. Поэтому, помимо определения ключевых цитокинов Th1, Th2, Th17 и Tr1 субпопуляций лимфоцитов в экссудатах «кожного окна», в работе были проанализированы коэффициенты соотношений цитокинов, которые определялись по формуле:

$$\frac{\text{IFN-}\gamma}{\text{IL-4}} = \frac{\text{медиана концентраций IFN-}\gamma}{\text{медиана концентраций IL-4}}$$

Индекс соотношения IFN- γ /IL-4 характеризует соотношение Th1 к Th2.

Аналогичным образом рассчитывались коэффициенты соотношений IFN- γ /IL-10 (характеризует соотношение Th1-субпопуляции к Tr1), IL-10/ IL-17 (характеризует соотношение субпопуляции Tr1 к субпопуляции Th17), IL-17/IL-4 (характеризует соотношение Th17-клеток и Th2) и IL-4/IL-10 (соотношение Th2 к Tr1)

Приведенные индексы рассчитывались для контрольной группы, периодов обострения и ремиссии АтД и представлены в таблице 2.

Таблица 2

Коэффициенты соотношений цитокинов в разные периоды заболевания АтД и в контрольной группе, Ме (Q1-Q3)

Группа	IFN- γ /IL-4	IFN- γ /IL-10	IL-10/ IL-17	IL-17/IL-4	IL-4/IL-10
Контрольная группа	54,3 (43,8-88,1) n=10	7,8 (5,3-13,9) n=10	0,2 (0,1-0,6) n=8	26,7 (17,6-34,7) n=8	0,13 (0,07-0,3) n=10
Больные с атопическим дерматитом, период обострения	51,7 (36,2-73,0) n=40	1,5* (0,7-3,3) n=33	1,6* (0,6-4,3) n=27	18,6 (10,0-45,9) n=27	0,03* (0,02-0,06) n=33
Больные с атопическим дерматитом, период ремиссии	56,7 (26,7-73,2) n=34	1,2* (0,5-2,8) n=21	0,7 (0,5-1,8) n=18	35 (22,9-123,3) n=19	0,03* (0,02-0,05) n=21

Ме – медиана, Q1 – 1-й квартиль, Q3 - 3-й квартиль

* - достоверность различий в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$)

Из результатов, приведенных в таблице 2 видно, что статистически достоверных различий по индексу соотношения IFN- γ /IL-4, в сравниваемых группах, выявлено не было.

В группе контроля величина коэффициента соотношения IFN- γ /IL-10 составила 7,8 (5,3-13,9). В периоды обострения и ремиссии данного заболевания наблюдалось 5-ти кратное снижение коэффициента соотношения IFN- γ /IL-10 в сравнении с контролем. Их значения в данные периоды заболевания составили 1,5 (0,7-3,3) и 1,2 (0,5-2,8) соответственно.

Индекс соотношения IL-10/IL-17 повышался в период обострения АтД и снижался в период ремиссии. В контрольной выборке значение данного коэффициента составило 0,2 (0,1-0,6), в период обострения АтД - 1,6 (0,6-4,3). В период ремиссии АтД этот индекс снижался в сравнении с периодом обострения, но превышал аналогичный показатель в контрольной группе в 3,5 раза. Величина коэффициента соотношения IL-10/IL-17 в период ремиссии АтД составляла 0,7 (0,5-1,8).

Показатель соотношения IL-17/IL-4 снижался в период обострения АтД и повышался в период ремиссии, в сравнении с группой контроля. Однако выявленные различия в сравниваемых группах были статистически недостоверны.

При atopических заболеваниях, IL-4 выступает в роли провоспалительного цитокина, но никак не противовоспалительного. Именно под действием этого цитокина происходит развитие иммунного ответа по Th2-пути, который характерен для atopических заболеваний. IL-10 является против-воспалительным цитокином, который в большей степени подавляет функциональную активность Th1-лимфоцитов и в меньшей степени Th2-клетки. Так как IL-4 и IL-10 являются при atopических заболеваниях своего рода антагонистическими цитокинами, то было интересным сравнить коэффициенты соотношений IL-4/IL-10 между группами.

В контрольной группе величина данного индекса составила 0,13 (0,07-0,3). Величина данного индекса в период обострения АтД составила 0,03 (0,02-0,06), в период ремиссии - 0,03 (0,02-0,05).

При проведении корреляционного анализа были 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 ($r = 0,971$, $p=0,049$); количеством S-100-положительных клеток в верхней и нижней трети эпидермиса и уровнем IL-10 в экссудатах «кожного окна» в период обострения АтД ($r = 0,757$, $p=0,037$ и $r = 0,898$, $p=0,05$, соответственно)

Локализация и количество клеток Лангерганса в эпидермисе при atopическом дерматите и у здоровых лиц

Клетки Лангерганса (КЛ) – это уникальная субпопуляция дендритных клеток, расположенных в эпидермисе. Они играют ключевую роль в инициации АтД. Именно от этих клеток зависит дифференцировка наивных Т-лимфоцитов в Th1 или Th2-клетки [Пашенков М.В., Пинегин Б.В., 2006; Amigorena S., 1999].

На поверхности КЛ отмечается выраженная экспрессия CD1a и S-100 молекул. Молекула CD1a в большом количестве экспрессируется на

поверхности клеточной мембраны КЛ и их отростков и является специфическим маркером данных клеток. Молекула S-100 также является одним из маркеров данных клеток. Это кислый Ca^{++} -связывающий белок, который определяется в цитоплазме клеток, а также вдоль всей длины их дендритных отростков [Hunger R.E., 2004; Nonaka D., 2003].

В период обострения АтД биоптаты кожи были взяты из очага воспалительного процесса, который представлял собой эритематозно-папулезный элемент. В период ремиссии биоптаты кожи были взяты из очагов лихенификации. Образцы кожи, взятые у здоровых людей, были использованы в качестве контрольной группы.

Количество CD1a+ и S-100+ КЛ и их отростков в разных частях эпидермиса у больных АтД и у здоровых лиц представлено в таблицах 3 и 4.

Как видно из таблицы 3 число CD1a+ КЛ у здоровых лиц в верхней трети эпидермиса достоверно не отличалось от количества данных клеток в биоптатах кожи, взятых в периоды обострения и ремиссии АтД.

Число CD1a+ 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.

Количество CD1a+ 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) клеток. В период обострения АтД, количество КЛ составило 0,75 (0,53-1,52). В период ремиссии АтД количество КЛ в средней трети эпидермиса составило 2,0 (0,97-3,75).

Количество CD1a+ 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) отростков.

Таблица 3

Количество CD1a положительных клеток Лангерганса и их отростков в разных частях эпидермиса у больных атопическим дерматитом и у здоровых лиц, Me (Q1-Q3)

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 (n=5)	0 (0-0,31)	1,0 (0,3-1,58)	0 (0-0,2)	1 (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 атопическим дерматитом, период обострения (n=5)	0,33 (0-1,41)	0,75 (0,53-1,52)	0,9 *** (0,1-1,37)	2 (0,8-4,13)	2,53 (0,31-6,25)	2,87 (1,38-6,15)	2,5 (0,16-4,75)	6,7 (3,2-14,15)
Больные с атопическим дерматитом, период ремиссии (n=8)	0 (0-0,2)	2,0 (0,97-3,75)	0 (0-0,2)	3,25 (1,17-4)	0 (0-2,27)	4,6 * (2,58-7,0)	0 (0-1,43)	6,5 * (3,55-8,85)

Примечания: Me – медиана, Q1 – 1-й квартиль, Q3 – 3-й квартиль, * - достоверность различий в сравнении с контролем (p<0,05); ** - достоверность различий в сравнении с ремиссией (p<0,05)

Таблица 4

Количество S-100 положительных клеток Лангерганса и их отростков в разных частях эпидермиса у больных атопическим дерматитом и у здоровых лиц, Me (Q1-Q3)

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 (n=5)	0 (0-0,6)	1,0 (0,5-1,3)	0 (0-0,25)	1,0 (0,5-2,15)	0 (0-5,1)	1,6 (0,5-3,7)	0,4 (0-1,25)	2 (0,85-9,7)
Больные с атопическим дерматитом, период обострения (n=5)	1,75 (0,075-2,5)	1,5 (0,88-2,75)	1,0 ** (0,57-2,12)	5,0 * (2,78-5,75)	2 (0,07-4,5)	3 (2,52-3,5)	2 (0,57-4,25)	9,5 (4,17-10)
Больные с атопическим дерматитом, период ремиссии (n=8)	0 (0-0,67)	3,1 * (1,2-4,67)	0 (0-0,24)	3,2 * (1,67-5,0)	0 (0-4,35)	4,35 (3,17-6,52)	0 (0-2,41)	6,35 (3,5-10,46)

Примечания: Me – медиана, Q1 – 1-й квартиль, Q3 – 3-й квартиль, * - достоверность различий в сравнении с контролем (p<0,05); ** - достоверность различий в сравнении с ремиссией (p<0,05)

Таблица 3

Количество CD1a положительных клеток Лангерганса и их отростков в разных частях эпидермиса у больных атопическим дерматитом и у здоровых лиц, Me (Q1-Q3)

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 (n=5)	0 (0-0,31)	1,0 (0,3-1,58)	0 (0-0,2)	1 (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 атопическим дерматитом, период обострения (n=5)	0,33 (0-1,41)	0,75 (0,53-1,52)	0,9 * ** (0,1-1,37)	2 (0,8-4,13)	2,53 (0,31-6,25)	2,87 (1,38-6,15)	2,5 (0,16-4,75)	6,7 (3,2-14,15)
Больные с атопическим дерматитом, период ремиссии (n=8)	0 (0-0,2)	2,0 (0,97-3,75)	0 (0-0,2)	3,25 (1,17-4)	0 (0-2,27)	4,6 * (2,58-7,0)	0 (0-1,43)	6,5 * (3,55-8,85)

Примечания: Me – медиана, Q1 – 1-й квартиль, Q3 – 3-й квартиль; * - достоверность различий в сравнении с контролем (p<0,05); ** - достоверность различий в сравнении с ремиссией (p<0,05)

Таблица 4

Количество S-100 положительных клеток Лангерганса и их отростков в разных частях эпидермиса у больных атопическим дерматитом и у здоровых лиц, Me (Q1-Q3)

Группа	Клетки Лангерганса			Дендритные отростки				Общее количество отростков
	Верхняя треть эпидермиса	Средняя треть эпидермиса	Нижняя треть эпидермиса	Общее количество клеток	Верхняя треть эпидермиса	Средняя треть эпидермиса	Нижняя треть эпидермиса	
Контрольная группа (n=5)	0 (0-0,6)	1,0 (0,5-1,3)	0 (0-0,25)	1,0 (0,5-2,15)	0 (0-5,1)	1,6 (0,5-3,7)	0,4 (0-1,25)	2 (0,85-9,7)
Больные с атопическим дерматитом, период обострения (n=5)	1,75 (0,075-2,5)	1,5 (0,88-2,75)	1,0 *** (0,57-2,12)	5,0 * (2,78-5,75)	2 (0,07-4,5)	3 (2,52-3,5)	2 (0,57-4,25)	9,5 (4,17-10)
Больные с атопическим дерматитом, период ремиссии (n=8)	0 (0-0,67)	3,1 * (1,2-4,67)	0 (0-0,24)	3,2 * (1,67-5,0)	0 (0-4,35)	4,35 (3,17-6,52)	0 (0-2,41)	6,35 (3,5-10,46)

Примечания: Me – медиана, Q1 – 1-й квартиль, Q3 – 3-й квартиль; * - достоверность различий в сравнении с контролем (p<0,05); ** - достоверность различий в сравнении с ремиссией (p<0,05)

В нижней трети эпидермиса количество CD1a+ КЛ повышалось в период обострения АтД и достоверно отличалось от аналогичных показателей в контрольной группе и периода 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+ дендритных отростков в нижней трети эпидермиса в сравниваемых группах достоверно не отличалось.

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

Суммарное количество CD1a+ 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 было не выявлено.

Анализируя результаты, приведенные в таблице 4, можно отметить постоянную тенденцию расположения S-100+ КЛ прежде всего в средней трети эпидермиса, как у здоровых лиц, так и у больных АтД, независимо от периода болезни. Отличительной особенностью кожи при АтД является заметное повышение количества данных клеток и их отростков в средней трети эпидермиса. С другой стороны, количество КЛ и дендритных отростков минимально в верхней и нижней третях эпидермиса в образцах кожи, взятых у здоровых лиц и у больных АтД в период ремиссии.

Общее количество S-100+ КЛ у больных АтД в период обострения достоверно превышало аналогичный показатель в контрольной выборке. В период обострения АтД их количество составило 5,0 (2,78-5,75) клеток, у здоровых лиц – 1,0 (0,5-2,15). В период ремиссии АтД общее количество S-100+ КЛ также достоверно превышало аналогичный показатель в контрольной группе и составило 3,2 (1,67-5,0) клеток.

Общее количество S-100+ дендритных отростков у больных АтД в разные периоды заболевания превышало аналогичный показатель в группе контроля,

но выявленные различия не имели достоверного характера в сравниваемых группах.

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 атопической болезни [Amigorena S., 1999, Kidd C., 2003, Leung D-Y.M., 2000].

Гистологическая оценка состояния кожи у больных атопическим дерматитом

Все пациенты в зависимости от места взятия биоптата кожи были разделены на 3 группы. В I группу вошли больные АтД, у которых образцы кожи были взяты из очага воспалительного процесса, которые носили характер папулезно-эритематозных элементов. Во II группе больных АтД биоптат кожи был взят в период обострения с макроскопически неизмененного участка кожи. В III группу вошли пациенты, у которых биоптат кожи был взят в период ремиссии основного заболевания из лихенифицированных участков. Образцы кожи, взятые у практически здоровых лиц, были использованы в качестве контрольной группы.

Количество фибробластов, лимфоцитов, макрофагов и тучных клеток в биоптатах кожи, взятых у больных АтД в периоды обострения и ремиссии с разных участков кожных покровов представлено в таблице 5.

Из результатов, приведенных в таблице 5 видно, что в I и II группах больных АтД количество фибробластов достоверно превышало аналогичный показатель в контрольной группе. Число фибробластов в I группе больных составило 140 (125-210), во II группе – 150 (120-160) клеток. Аналогичный показатель в контрольной выборке составил 100 (87,5-120) фибробластов. В III группе больных АтД количество данных клеток достоверно не отличалось от аналогичного показателя в контрольной выборке.

Клеточный инфильтрат биоптатов кожи у больных атопическим дерматитом и у здоровых лиц, Me (Q1-Q3)

Исследуемые группы	Фибробласты	Лимфоциты	Макрофаги	Тучные клетки
Контроль, n=10	100 (87,5-120)	25 (17,5-32,5)	15 (5-20)	20 (12-25)
I группа, n=5	140 * (125-210)	40 (25-125)	20 (15-60)	28 (26-37)
II группа, n=10	150 * (120-160)	40 * (32,5-135)	30 * (20-50)	21 (17-25)
III группа, n=5	110 (85-140)	90 * (70-270)	40 * (35-70)	24 (19-27)

Примечания: Me – Медиана, Q1 – первый квартиль, Q3 – третий квартиль;

* - достоверность различий в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$)

Количество лимфоцитов в I группе больных АтД составило 40 (25-125), что значительно превышало аналогичный показатель в контрольной выборке, где их количество составило 25 (17,5-32,5). Однако полученные результаты не имели достоверного характера различий. Во II группе пациентов отмечалось достоверное увеличение количества лимфоцитов в образцах кожи, в сравнении с контрольной величиной. В данной группе больных число клеток составило 40 (32,5-135). В III группе больных количество лимфоцитов составило 90 (70-270) клеток. Статистически значимые различия были выявлены в сравнении с контрольными величинами.

Количество макрофагов в образцах кожи I группы больных АтД составило 20 (15-60) клеток, в контрольной группе - 15 (5-20) клеток. Достоверных различий в сравниваемых группах не выявлено. Во II группе больных АтД количество макрофагов достоверно превышало аналогичный показатель у здоровых лиц и составило 30 (20-50) клеток. В III группе больных АтД, количество данных клеток составило 40 (35-70).

Достоверных различий в количестве тучных клеток у больных АтД, в разные периоды заболевания, в сравнении с контрольной группой выявлено не было.

Помимо оценки клеточного инфильтрата в образцах кожи, проводилась оценка наличия отека дермы и фиброзных изменений. Наличие отека дермы у больных АтД в разные периоды заболевания представлено в таблице 6.

Наличие отечных и фиброзных изменений в дерме у больных
атопическим дерматитом в сравнении с группой контроля

Изменения в дерме			Исследуемая группа			
			Контроль (n=10)	I группа (n=10)	II группа (n=22)	III группа (n=22)
Отечные изменения в дерме	Не выявлены	абс. %	10 100%	-	6 27,3%	12 54,5%
	Выявлены	абс. %	-	10 * 100%	16 * 72,7%	10 * 45,5%
Фиброзные изменения в дерме	Не выявлены	абс. %	10 100%	8 80%	10 45,4%	14 63,6%
	Выявлены	абс. %	-	2 20%	12 * 54,6%	8 * 36,4%

Примечания: * - достоверность различий в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$)

Как видно из таблицы 6, в срезах кожи, взятых у здоровых лиц, отечных изменений в дерме выявлено не было. В биоптатах кожи I группы больных отечные изменения в дерме разной степени выраженности наблюдались в 100% случаях. Из них, в 20% случаях (2 чел.) наблюдались слабо выраженные отечные изменения; в 40% случаях (4 чел.) в дерме были выявлены умеренно выраженные изменения, в оставшихся 40% случаях (4 чел.) характер отечных изменений в дерме был сильно выражен. В сравнении с контрольной группой были выявлены достоверные различия ($p < 0,05$).

В образцах кожи II группы больных отечные изменения были выявлены в 72,7% случаях. Сильно выраженный отек был выявлен в 9,1% случаев (2 чел.); умеренно выраженные отечные изменения были обнаружены в 27,3% исследуемых случаях (6 чел.), а слабовыраженные – в 36,3% случаях (8 чел.). В 27,3% случаях (6 чел.) отечные изменения в дерме не были выявлены. При проведении статистической обработки результатов были выявлены достоверные различия в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$).

В III группе больных АД, в большинстве случаев (54,5%), не было выявлено отечных изменений. В 36,4% случаев (8 чел.) отечные изменения в образцах кожи были слабо выражены, а в 9,1% случаев (2 чел.) были выявлены умеренно выраженные изменения в дерме. В сравнении с группой контроля были выявлены достоверные различия ($p < 0,05$).

Наличие фиброзных изменений у больных АДД представлено в таблице 6.

В образцах кожи здоровых лиц, в 100% исследуемых случаях, фиброзных изменений не было выявлено.

В I группе больных в 80% случаев (8 чел.) фиброзных изменений не обнаружено, в остальных 20% случаев (2 чел.) выявлены слабо выраженные фиброзные изменения в дерме. В сравнении с контрольной группой достоверных различий не выявлено ($p > 0,05$).

В образцах кожи II группы больных АДД, в 45,4% случаев (10 чел.) не было выявлено фиброзных изменений, в 27,3% случаев (6 чел.) фиброзные изменения носили слабо выраженный характер, в остальных 27,3% (6 чел.) были выявлены умеренно выраженные фиброзные изменения в дерме. При проведении статистической обработки были выявлены достоверные различия в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$).

В III группе больных, в 63,6% изучаемых случаев (14 чел.), не было выявлено фиброзных изменений. В 18,2% случаев (4 чел.) фиброзные изменения в дерме носили слабо выраженный характер; умеренно выраженные изменения были выявлены в 18,2% случаев (4 чел.).

ВЫВОДЫ

1. В периоде обострения атопического дерматита наблюдаются высокие локальные уровни IL-4 и IL-10 и низкий IL-17. В период ремиссии этот дисбаланс сохраняется по отношению к IL-4 и IL-10, при этом наблюдается снижение содержания IFN- γ . Это свидетельствует о сдвиге соотношения Th1/Th2 в сторону Th2-лимфоцитов, что поддерживает атопическое воспаление как в период обострения данного заболевания, так и в период ремиссии. Снижение уровня IL-17 предполагает ослабление защитной функции кожи при атопическом дерматите.

2. Соотношения IL-4/IL-10 и IFN- γ /IL-10 достоверно снижаются как в период обострения, так и в период ремиссии атопического дерматита, в сравнении с контролем. Это свидетельствует о компенсаторном повышении функциональной активности Tr1 при атопическом дерматите в сравнении со здоровыми лицами.

3. Количество CD1a+ и S-100+ клеток Лангерганса увеличивается в период обострения болезни в нижней трети эпидермиса. В период ремиссии наблюдается повышение общей «отросчатости» CD1a+ клеток и количества S-

100+ клеток в средней трети эпидермиса. Это является отражением восполняемости дендритных клеток в разных третях эпидермиса в зависимости от активности воспалительного процесса, как реакция на сохраняющееся минимальное аллергическое воспаление кожи.

4. Регистрируется увеличение количества лимфоцитов и макрофагов как в период обострения, так и при ремиссии атопического дерматита, особенно в очагах лихенификации кожи. Количество фибробластов повышается только в период обострения заболевания, как отражение потенциала этих клеток для последующих процессов ремоделирования кожи.

5. Отёк и фиброзные изменения в дерме с разной степенью выраженности наблюдаются как в остром периоде, так и при ремиссии атопического дерматита, включая очаги лихенизации, как отражение минимальной воспалительной активности и ремоделирования кожи.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Иммуноферментное определение локальных уровней цитокинов в «кожном окне» при атопическом дерматите является доступным методом определения воспалительной активности в коже (дерме), что может служить терапевтическим критерием для обоснования атопического противовоспалительного лечения болезни в период ремиссии.

2. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование кожных биоптатов может быть полезным для разработки новых терапевтических подходов для реабилитации пациентов с ремоделированием кожи в исходе атопического дерматита.

Список работ опубликованных по теме диссертации

1. Денисов А.А., Климов В.В., Загрешенко Д.С., Чурина Е.Г., Шаропина А.В. Клиническая оценка содержания киллерных клеток и $\gamma\delta$ T-клеток при атопическом дерматите / Сб. трудов XII Всероссийской научно-технической конференции «Энергетика: экология, надёжность, безопасность» – Томск, 2006. – С. 8-9.

2. Загрешенко Д.С. Ключевые цитокины профиля Th1 и Th2 в кожном экссудате при атопическом дерматите / Сб. трудов VIII Международного конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». – Томск, 2007. – С. 54-55.

3. Klimov V.V., Denisov A.A., Zagreshenko D.S. Th1, Th2 and Th3 Activity in Sera and Skin Exudates in Atopic Dermatitis / Immunorio 2007. 13th International Congress of Immunology. - Rio de Janeiro, 2007. – P.139.
4. Денисов А.А., Климов В.В., Загрешенко Д.С., Шаропина А.В. Экспрессия костимулирующих молекул CD28 и CTLA-4 на лимфоцитах и содержание ИЛ-4 и ИФН- γ в крови в ходе аллергенспецифической иммунотерапии при atopическом дерматите / Омский научный вестник. – 2007, Прил. 2, №3 (61). – С. 184-185.
5. Загрешенко Д.С., Денисов А.А., Климов В.В., Кошовкина Т.И. Содержание ИЛ-4 и ИФН- γ в крови и кожном эксудате при atopическом дерматите / Омский научный вестник. – 2007. – Прил. 2, №3 (61). – С. 187-188.
6. Денисов А.А., Климов В.В., Кошовкина Т.В., Загрешенко Д.С., Зиннатова Е.В. Иммунологический контроль в ходе аллергенспецифической иммунотерапии при atopическом дерматите / Российский Аллергологический Журнал. – 2008. – Прил. 1, №1. – С. 83-84.
7. Саликова Т.И., Климов В.В., Денисов А.А., Загрешенко Д.С., Фирсова Е.К. Ключевые цитокины T α 1 и T α 2 в крови и кожном эксудате при atopическом дерматите / Российский Аллергологический Журнал. – 2008. – Прил. 1, №1. – С. 253-254.
8. Денисов А.А., Логвинов С.В., Климов В.В., Загрешенко Д.С., Саликова Т.И. Морфологические и цитокиновые критерии становления ремиссии при atopическом дерматите / Морфология. – 2008, Т. 134, №5. – С. 66.
9. Загрешенко Д.С., Климов В.В., Денисов А.А., Кошкарова Н.С., Саликова Т.И. Цитокины «кожного окна» и параметры SCORAD при atopическом дерматите / Сибирский медицинский журнал. – 2008, Т. 23, №3 (1). – С. 95-96.
10. Загрешенко Д.С., Климов В.В., Денисов А.А., Саликова Т.И., Фирсова Е.К. Цитокины «кожного окна» при atopическом дерматите / Бюллетень сибирской медицины. – 2009. - №3. – С. 32-36.
11. Денисов А.А., Загрешенко Д.С., Климов В.В., Саликова Т.И., Фирсова Е.К. Содержание цитокинов в кожных эксудатах при atopическом дерматите как психосоматическом заболевании / Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2009. - №5 (56). – С. 67-69.

Тираж 100 экз.
Отпечатано в ООО «Позитив-НБ»
634050 г. Томск, пр. Ленина 34а