

## Локальный иммунный ответ у больных тяжелым атопическим дерматитом и Т-клеточной лимфомой кожи

Д.Д. Ниязов<sup>1</sup>, Е.С. Феденко<sup>1</sup>, М.Н. Болдырева<sup>1</sup>, А.М. Ковригина<sup>2</sup>, Д.Ю. Трофимов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ « ГНЦ Институт Иммунологии» ФМБА России, Москва

<sup>2</sup> ФГБНУ "Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина", Москва

## Local immune response in severe atopic dermatitis and cutaneous T-cell lymphoma patients

D.D. Niyazov<sup>1</sup>, E.S. Fedenko<sup>1</sup>, M.N. Boldyreva<sup>1</sup>, A.M. Kovrigina<sup>2</sup>, D.Yu. Trofimov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Immunology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow

### Аннотация

Цель исследования: изучить уровень экспрессии генов цитокинов в коже больных тяжелым атопическим дерматитом (АтД), Т-клеточной лимфомой кожи (ТКЛК) и здоровых доноров.

Материалы и методы. В исследование включено 20 больных тяжелым АтД, 20 больных ТКЛК и 20 здоровых доноров. Материалом для иммунологического исследования служили образцы кожных биоптатов. Экспрессию генов цитокинов IL1B, IL2, IL2r, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL10, IL 12A, IL12B, IL15 (общий), IL15 (изоформа), IL17A, IL18, IL23, IL28, IL29, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1, FOXP3 определяли в коже больных тяжелым АтД, больных ТКЛК и здоровых доноров методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «Real time».

Результаты. В коже больных ТКЛК выявлено достоверное увеличение экспрессии генов IL10, IL15, IFN $\gamma$ , а также повышение уровня IL8 по сравнению с больными АтД. Вместе с тем уровень экспрессии гена IL18 в коже оказался ниже у больных ТКЛК по сравнению с больными АтД. В биоптатах кожи больных АтД выявлено достоверное увеличение значений уровня экспрессии генов IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12B, IL-29, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1, а у больных ТКЛК - достоверное увеличение уровня экспрессии IL-2r, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IFN $\gamma$  по сравнению со здоровыми донорами. Установлено определенное сходство показателей экспрессии в коже больных тяжелым АтД и ТКЛК, характеризующиеся повышением уровня экспрессии генов IL-6, IL-8, IL-10, IFN $\gamma$  в сравнении со здоровыми донорами. Повышение уровня экспрессии генов IL-2r, IL-15 в коже больных ТКЛК и повышение генов IL-5, IL-12b, IL-29, TNF $\gamma$ , TGF $\beta$ 1 у больных тяжелым АтД по сравнению с группой контроля, позволяет судить о разном характере цитокинового дисбаланса.

### Ключевые слова

Атопический дерматит, Т-клеточная лимфома кожи, иммунный ответ, гены цитокинов, биопсия кожи.

### Summary

The purpose. To investigate expression of cytokines genes parameters in skin in severe atopic dermatitis (AD) and cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) patients comparing with healthy donors.

Materials and methods. 20 severe AD patients, 20 CTCL patients and 20 healthy donors were included in the study. Skin samples were used as material for immunological study. Interleukins -( IL)1B, IL2, IL2r, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL10, IL 12A, IL12B, IL15 (total), IL15 , IL17A, IL18, IL23, IL28, IL29, Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), transforming growth factor beta 1 (TGF $\beta$ 1), forkhead box P3 (FOXP3) gene expression was defined in the skin of severe AD patients, CTCL patients and healthy donors by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results. Studying of skin samples from CTCL patients has shown statistically significant increase of cytokines genes IL8, IL10, IL15, IFN $\gamma$  expression and decrease of IL18 gene expression in comparison with skin samples from severe AD patients. Obtained expression cytokines genes parameters in skin of severe AD and CTCL patients had a certain similarities consisting of increased IL-6, IL-8, IL-10, IFN $\gamma$ . Substantial differences were shown in skin of patients in comparison with healthy donors: increased IL-5, IL-12B, IL-29, TNF, TGF $\beta$ 1 genes expression in AD patients and increased IL-2r, IL-15 genes expression in CTCL patients. At the same time increased expression of IL-8, IL-10, IL-15, IFN $\gamma$  genes in CTCL patients in comparison with AD patients was established.

### Keywords

Atopic dermatitis, cutaneous T-cell lymphoma, immune response, cytokine gene expression, skin biopsy.

## Введение

Атопический дерматит – одно из самых часто встречающихся аллергических заболеваний, распространенность которого колеблется в широких пределах, достигая довольно высоких цифр. В течение последних лет отмечается прогрессирующий рост заболеваемости АтД, а также появление тяжелых форм, торпидных к проводимой терапии. В особенно тяжелых случаях АтД может трансформироваться в кожную форму лимфомы, что требует пересмотра подходов к лечению. В свою очередь, злокачественные Т-клеточные лимфомы кожи представляют наиболее сложную и в то же время наименее изученную проблему современной медицины, относятся к тяжелым пролиферативным заболеваниям и характеризуются пролиферацией и накоплением аффиных к коже неопластических лимфоцитов. ТКЛК может являться как самостоятельным заболеванием, так и возникать в результате трансформации из различных доброкачественных дерматозов, таких как АтД, параспориоз, актинический ретикулоид и др. Как правило, ранняя диагностика ТКЛК затруднена и осуществляется на поздних стадиях [1, 2]. В литературе описаны случаи трансформации тяжелого АтД в синдром Сезари, в особенности после системной иммуносупрессивной терапии [3, 4]. До сих пор остается открытым вопрос о частоте трансформации АтД в ТКЛК, а также не изучены иммунологические маркеры, характеризующие этот процесс. Как АтД, так и ТКЛК, сопровождаются глубокой иммунной дисфункцией. АтД характеризуется дисбалансом Th1 и Th2-лимфоцитов, повышением дегрануляции тучных клеток и антигенпрезентирующей активности клеток Лангерганса [5]. Опыт изучения роли цитокинов при аллергических заболеваниях свидетельствует о том, что одним из основных патогенетических механизмов этой патологии является нарушение регуляции синтеза IgE на уровне продукции IL-4, что было положено в основу концепции о дисбалансе продукции цитокинов Th1- и Th2-лимфоцитами при аллергических заболеваниях. Наряду с этим, в настоящее время стало известно, что цитокины также способны активно влиять на формирование и течение аллергии. К таким цитокинам прежде всего относятся члены семейства IL-10 – IL-19, IL-20, IL-21, IL-24, IL-26; семейства IL-17 – IL-17A, IL-17F, IL-17C; субсемейства – IL-28A, IL-28B, IL-29, источниками продукции которых являются не только лимфоциты, но и другие иммунокомпетентные клетки [6].

При иммунопатологических процессах, которые лежат в основе лимфопролиферативных

заболеваний, таких как ТКЛК, происходит дисбаланс в сторону продукции цитокинов, обладающих противовоспалительным и пропролиферативным действием (ИЛ-1, отвечающий за дифференцировку лимфоцитов; ИЛ-2 – фактор Т-клеточного роста; ИЛ-4 и ИЛ-5, усиливающие приток в очаги поражения эозинофилов и их активацию и др.). Одновременно при развитии злокачественной лимфопролиферации в коже имеет место угнетение активности клеток противоопухолевой защиты: натуральных киллеров, цитотоксических лимфоцитов, дендритных клеток, в частности клеток Лангерганса, а также цитокинов – ингибиторов опухолевого роста (ИЛ-7, ИЛ-15 и др.) [7].

Особенностям системного иммунного ответа при АтД и ТКЛК посвящено много исследований, тогда как локальный иммунный ответ в органе-мишени – коже изучен недостаточно: на сегодняшний день в мире проведены лишь единичные исследования по изучению роли регуляторных клеток, а также их генов, экспрессии генов цитокинов в коже в развитии этих заболеваний [8,9].

В связи с вышеизложенным изучение иммунного ответа в коже при тяжелом течении АтД и ТКЛК, а также определение возможных маркеров трансформации тяжелых форм АтД в ТКЛК является актуальной задачей современной медицины, так как с одной стороны, такие данные могут пролить свет на особенности патогенеза развития этих заболеваний, а с другой стороны, определить терапевтические подходы с целью ранней профилактики развития ТКЛК у больных АтД [10].

### Цель исследования

Изучить уровень экспрессии генов цитокинов для характеристики иммунного ответа в коже больных тяжелым АтД и ТКЛК и определить их диагностическую значимость в сравнении с показателями у здоровых доноров.

### Материалы и методы

Материалом для данного исследования являлась группа из 20 больных АтД тяжелого течения, в возрасте от 18 лет до 35 лет и 20 пациентов, страдающих злокачественной Т-клеточной лимфомой кожи, возраст больных варьировал в диапазоне от 37 до 74 лет. Диагноз АтД был установлен согласно критериям J.M. Hanifin и G. Rajka, модифицированным отечественными авторами и отраженным в Российском национальном согласительном документе по АтД, а также критериям, соответствующим МКБ-10 [10]. Для оценки степени тяжести АтД для отдельных участков

кожи применяли исследовательскую глобальную оценку - Investigators' Global Assessment (IGA) по 5- балльной шкале, где:

0 – чистая кожа (нет признаков воспаления)

1 – почти чистая кожа (едва определяемая эритема, едва определяемые признаки инфильтрации/образование папул)

2 – легкий АтД (слабая эритема, слабая инфильтрация/ слабо выраженные папулы)

3 – среднетяжелый АтД (умеренная эритема, умеренная инфильтрация/ умеренно выраженные папулы)

4 – тяжелый АтД (сильная эритема, тяжелая инфильтрация/сильно выраженные папулы)

5 – очень тяжелый АтД (сильная эритема, тяжелая инфильтрация/сильно выраженные папулы с выделениями/образование корочек).

Группу контроля составили 20 практически здоровых лиц без признаков атопии, из них 14 женщин и 6 мужчин, в возрасте от 19 лет до 32 лет.

Всем пациентам проведено клиническое, аллергологическое, иммунологическое обследование. На момент исследования больные АтД и ТКЛК не получали ни системных глюкокортикоидов (ГКС), ни топических кортикоидов (ТГКС), а также была исключена противоопухолевая терапия. Взятие биопсийного материала производилось лоскутным методом из очагов поражения кожи и методом пункционной биопсии для верификации диагноза и для дальнейшего изучения локального иммунного ответа. Для верификации диагноза использовались гистологическое и иммуногистохимическое исследования. Взятие биопсии проводилось до начала системной или наружной ГКС терапии у больных АтД и до начала противоопухолевой и иммуномодулирующей терапии у больных ТКЛК. Гистологический метод применялся для установления диагноза АтД и ТКЛК. Биоптат пораженной кожи фиксировали в 10% растворе забуференного формалина, затем заливали в парафин по обычной методике, серийные срезы толщиной 3 мкм депарафинировали по стандартной схеме, затем окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимический (иммуноферментный) метод использовался как дополнительный для идентификации нозологической формы ТКЛК. Фиксацию проводили в 10% растворе нейтрального забуференного формалина (рН 7,2-7,4) не более суток. Каждый биоптат заливали в отдельный парафиновый блок с последующим изготовлением серийных срезов (не менее 6 срезов с каждого блока). Нанесенные на предметные стекла со специальным адгезивным

покрытием парафиновые срезы нагревали в течение 30 сек до температуры, превышающей температуру плавления парафина, выдерживали в термостате при 37°C 24 часа, затем погружали в ксилол для растворения парафина, проводили по батарее спиртов. После депарафинизации срезы переносили в дистиллированную воду, затем – в ТРИС - или фосфатный буфер (рН-7,4-7,6). Для подавления эндогенной пероксидазной активности клеток срезы в течение 10 мин. обрабатывали 3% раствором  $H_2O_2$ , после чего стекла отмывали в ТРИС- или фосфатном буфере. Далее проводили демаскировку антигенов при нагревании в водяной бане (t 98°C), (рН -6,0 Target Retrieval solution, DAKO или рН-9,0 динатриевой соли этилендиаминтетраацетата -ЭДТА); при использовании антител к ТCR( $\beta$ F1) срезы обрабатывали протеиназой К в течение 30 мин при 37°C, после чего стекла также промывали в ТРИС-буфере. Затем на срезы наносили первичные антитела, с которыми их инкубировали при 37°C в течение 30-60 мин., после чего срезы тщательно промывали в нескольких порциях буфера. Далее срезы докрашивали гематоксилином Майера и дифференцировали в щелочном растворе до получения голубого окрашивания. По стандартной методике стекла обезвоживали и заключали в специальную среду под покровное стекло для последующего гистологического исследования. Выявление пероксидазной активности осуществляли с помощью DAB+ (Dako). Для визуализации использовали высокочувствительную полимерную систему детекции BioGenex. Иммуногистохимическое исследование проводилось с использованием антител к линейно ограниченым и дифференцировочным антигенам.

Пункционную биопсию производили в асептических условиях с помощью одноразового пробойника (StumppMedizintechnikGmbH, Германия) диаметром 3 мм под местной анестезией 2 %-м раствором лидокаина гидрохлорида. Биопсийный материал брали у больных тяжелым АтД и ТКЛК из очагов поражения. Из 20 исследуемых здоровых доноров, у 5 была произведена одновременная пункционная биопсия с 3 различных по локализации участков кожи (задняя поверхность шеи, сгибательные поверхности локтевых или коленных сгибов, наружная поверхность плеча) для выявления возможных различий экспрессии генов цитокинов на различных участках кожи. При оценке экспрессии генов цитокинов статистически значимых различий между показателями в биоптатах кожи шеи, сгибательных поверхностей конечностей, наружной поверх-

ности плеча выявлено не было. В дальнейшем 15 здоровым донорам пункционную биопсию кожи проводили только с одного участка кожи - наружной поверхности плеча.

Уровень экспрессии генов цитокинов в коже здоровых доноров, больных АтД и ТКЛК по количеству мРНК соответствующих генов определяли методом ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, от англ. Reverse transcription polymerase chain reaction) в режиме реального времени. Для выделения РНК из клеток кожи использовали твердотельный термостат "Термит" производства компании «ДНК-Технология» (Россия). Для постановки обратной транскрипции использовали твердотельный термостат «Гном» производства компании «ДНК-Технология» (Россия). Постановку полимеразной цепной реакции в реальном времени проводили на детектирующем термоциклере «ДТ-96» «ДНК-Технология» (Россия). Учет результатов реакции осуществлялся автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором. В биологических образцах, содержащих мРНК исследуемого цитокина, программа прибора фиксировала положительный результат и определяла значение индикаторного цикла (Cp) [11].

Количественный уровень исследуемых мРНК генов цитокинов выражали в относительных единицах, вычисленных по формуле:

$$\frac{[\text{исследуемый IL}]}{[\text{HPRT1}]} = E(\text{HPRT1}) * \text{Cp1} / E(\text{IL}) * \text{Cp2} \quad (\text{формула 1}),$$

где E-эффективность амплификации,

Cp1 - значение индикаторного цикла в образце для нормировочного гена HPRT1 (фермент гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза),

Cp2 - значение индикаторного цикла в образце исследуемого цитокина.

Впервые проведена оценка экспрессии генов следующих цитокинов :IL 1B, IL2, IL2r, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12A, IL12B, IL15 (суммарный), IL15, IL17A, IL18, IL23, IL28, IL29, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1, FOXP3 в коже здоровых доноров, больных АтД тяжелого течения и больных ТКЛК.

Результаты исследования обработаны и сравнены статистически с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. Проводили вычисление медианы и интерквартильного размаха (Me [Q1;Q3]), среднего арифметического значения соответствующего параметра и стандартного отклонения (M $\pm$ Sd), двухсторонний критерий Фишера. Группы сравнивали с использованием непараметрического критерия Уилкоксона (для парных сравнений

показателей внутри групп), U-критерия Манна – Уитни (для сравнения показателей между двумя независимыми группами) с использованием электронных таблиц «Microsoft Exel» и пакета прикладных программ «Statistica for Windows» v.6.0, StatSoft Inc. (США). Различия считали достоверными при p<0,05.

## Результаты

Клиническая и аллергологическая характеристика групп больных АтД и ТКЛК, включенных в исследование

В группу больных тяжелым АтД вошло 20 человек. Среди них было 13 женщин (65%) и 7 (35%) мужчин в возрасте от 18 до 35 лет. В момент включения в исследование у всех отмечалось обострение АтД: поражение кожи носило распространенный характер с преимущественной локализацией по всему телу, по типу эритродермии, явлениями экссудации, инфильтрации, выраженной сухости, шелушения кожи, с наличием упорного зуда, усиливающегося в ночное время суток.

У всех 20 пациентов АтД, включенных в исследование, было отмечено тяжелое течение заболевания, медиана и квартили индекса SCORAD составили – 78,6 [Q1=59,7; Q3=85,2]. Индекс IGA составил – 4,7 [Q1=4,3; Q3=4,8]. При сборе аллергологического анамнеза установлено, что большинство пациентов страдало АтД с раннего детского возраста, с длительностью заболевания от 18 до 35 лет. Дебют заболевания отмечен у 14 пациентов (70%) – до 1 года, у 5 пациентов (25%) – от 2 до 5 лет. Только у 1 пациента (5%) симптомы АтД впервые возникли в возрасте от 7 до 10 лет. Средняя частота рецидивов АтД в год составляла - 8,2 $\pm$ 2,6 раз. Длительность обострений колебалась от 7 до 21 дня. На основании данных аллергологического обследования проведена оценка спектра сенсibilизации к различным группам аллергенов у обследованных больных. Сенсibilизация к бытовым аллергенам выявлена у 20 человек (100%) с клиническими проявлениями в виде обострения АтД у всех больных, аллергического ринита у 20 больных и бронхиальной астмы у 9 человек, сенсibilизация к эпидермальным аллергенам установлена у 17 (85%). В 90% (18 человек) случаев выявлена клинически значимая сенсibilизация к пыльцевым аллергенам, проявлявшаяся в виде сезонной бронхиальной астмы, аллергического ринита, аллергического конъюнктивита. У 14 пациентов (70 %) был выявлен поливалентный спектр сенсibilизации. Таким образом, аллергический ринит выявлен у 20 человек (100%), atopическая бронхиальная астма у 9 пациентов



(45%). У всех пациентов отмечался высокий уровень сывороточного IgE: 2056 МЕ/мл [1300;5000] при норме до 130 МЕ/мл.

Группа пациентов с установленным диагнозом ТКЛК включала 20 больных, из них мужчин было 9 (45%), женщин 11 (55%). Возраст пациентов варьировал от 37 до 74 лет (средний возраст  $46.8 \pm 4,9$  лет). В момент включения в исследование у всех больных был верифицирован диагноз ТКЛК. Диагноз заболевания в каждом случае устанавливался на основании анамнеза, клинической картины, результата иммуногистохимического исследования. Среди 20 больных ТКЛК доля грибовидного микоза составила 85% (17 больных), синдрома Сезари (СС) – 10% (2 больных), первичная кожная Т-клеточная CD8+ лимфома, неуточненная установлена у 1 больного (5%). Клиническая картина и анамнез всех больных имели схожие симптомы: поздний дебют заболевания, упорный зуд кожи, не исчезающий при приеме антигистаминных препаратов, вариабельность кожных высыпаний, отсутствие эффекта

от противовоспалительной и десенсибилизирующей терапии.

Было установлено, что у 7 пациентов ТКЛК отягощен аллергологический анамнез. Выявлена сенсibilизация к бытовым аллергенам у 6 человек (30%), к эпидермальным у 4 человек (20%). У 4 пациентов (20%) отмечена сенсibilизация к пыльцевым аллергенам. Пищевой аллергии у больных ТКЛК отмечено не было, 1 пациент страдал бронхиальной астмой, 6 - аллергическим риноконъюнктивитом. Уровень сывороточного IgE в группе составлял 800 МЕ/мл [350;2000].

Сравнительная характеристика групп больных тяжелым АтД и ТКЛК, включенных в исследование представлена в табл. 1.

Группу контроля составили 20 практически здоровых лиц без признаков атопии, из них 14 женщин и 6 мужчин, в возрасте от 19 до 32 лет, средний возраст и стандартное отклонение ( $M \pm Sd$ )-22,2 (4,3) лет. При аллергологическом обследовании ни у одного из доноров атопии выявлено не было.

**Таблица 1. Клиническая и аллергологическая характеристика больных тяжелым АтД и ТКЛК**

Показатель	Группа больных тяжелым АтД (n=20)	Группа больных ТКЛК (n=20)
Возраст, М (sd)	28,4 (5,1)	50,6 (6,1)
Мужской	7 (35%)	9 (45%)
Женский	13(65%)	11(55%)
Длительность (годы), Ме [Q1; Q3]	18 [Q1=17; Q3=35]	24 [Q1=4; Q3=35]
Индекс IGA, Ме [Q1; Q3]	4,7 [Q1=4,3; Q3=4,8]	
Индекс SCORAD, Ме [Q1; Q3]	78,6 [Q1=59,7; Q3=85,2]	
Уровень IgE общ., МЕ/мл, Ме [Q1; Q3]	2056 [Q1=1300; Q3=5000]	8 0 0 М Е / м л [Q1=350; Q3=2000]
Число эозинофилов в периферической крови, %, Ме [Q1; Q3]	12,6 [Q1=7,8; Q3=15,7]	7,3 % [Q1=2.4; Q3=9.1]
Аллергический ринит (число пациентов)	20 (100%)	6 (30%)
Бронхиальная астма (число пациентов)	9 (45%)	1(5%)
Сенсibilизация к бытовым аллергенам (число пациентов)	20 (100%)	6 (30%)
Сенсibilизация к эпидермальным аллергенам (число пациентов)	17 (85%)	4 (20%)
Сенсibilизация к пыльцевым аллергенам (число пациентов)	18 (90%)	4 (20%)
Латентная сенсibilизация к пыльцевым аллергенам (число пациентов)	6 (30%)	4 (20%)
Сенсibilизация к пищевым аллергенам (число пациентов)	11 (55%)	0
Поливалентная сенсibilизация (число пациентов)	14 (70%)	0

**Сравнительная характеристика экспрессии генов цитокинов в биоптатах кожи больных АтД, ТКЛК и здоровых доноров**

При оценке уровня экспрессии генов цитокинов статистически значимых различий между показателями в биоптатах кожи шеи, сгибательных поверхностей конечностей, наружной поверхности плеча у 5 здоровых доноров выявлено не было. В биоптатах кожи больных АтД выявлено увеличение значений уровня экспрессии генов IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12B, IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ 1, а у больных ТКЛК достоверное увеличение уровня экспрессии IL2r, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IFN $\gamma$  по сравнению со здоровыми донорами.

Статистически значимые показатели уровня экспрессии генов цитокинов в коже больных АтД, ТКЛК и здоровых доноров представлены в табл. 2.

Сравнительная характеристика уровня экспрессии генов цитокинов в коже представлена в табл. 3.

По сравнению с больными АтД в коже больных ТКЛК выявлено достоверное увеличение экспрессии генов цитокинов IL-10 (рисунок 1), IL-15 (рисунок 2), IFN $\gamma$  (рисунок 3), а также IL-8 (рисунок 4), известного как хемотаксический фактор Т-клеток и фактор, активирующий нейтрофилы.

IL-10 описан в 1989г. как ингибитор активности Th1. Он вырабатывается Th2-клетками, а также моноцитами и цитотоксическими Т-клетками. Основным эффектом IL-10 заключается в подавлении синтеза цитокинов Th1-клетками (т.е. он обладает действием, противоположным влиянию интерферона гамма) и в снижении активности макрофагов, в том числе продукции воспалительных цитокинов. IL-10 подавляет экспрессию молекул МНС II класса, пролиферацию Т-клеток,

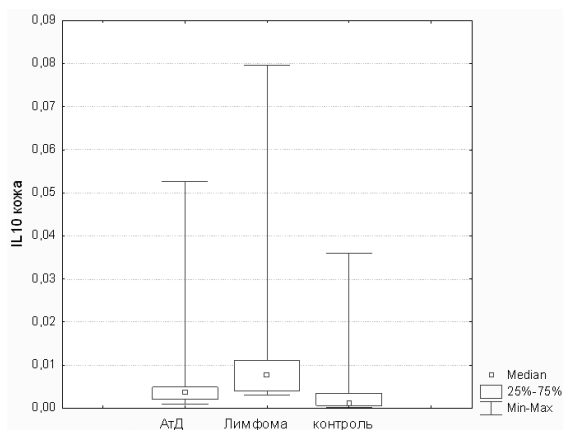
**Таблица 2. Уровни экспрессии генов цитокинов в коже больных Т-клеточной лимфомой кожи, атопическим дерматитом и здоровых доноров**

гены	Лимфома кожи		Атопический дерматит		Группа контроля	
	М	m	М	m	М	m
IL1B	0,195551	0,373006	0,103409*	0,148031	0,274001	0,267501
IL2r	0,029409	0,026555	0,014489	0,016473	0,00762***	0,009763
IL5	0,003182	0,004576	0,00269**	0,005234	0,000963	0,001807
IL6	0,002792	0,003057	0,00101**	0,002276	0,00036***	0,001138
IL8	0,327247*	0,539694	0,23192**	0,665263	0,18471***	0,6543
IL10	0,12987*	0,019283	0,00804**	0,012548	0,00359***	0,007725
IL12B	0,009986	0,012947	0,01144**	0,025251	0,003101	0,005489
IL15	0,153341*	0,091861	0,092858	0,067284	0,13647***	0,305747
IL18	1,708722*	1,2117237	3,855392	3,427784	2,347989	1,611894
IL29	0,000498	0,336812	0,00570**	0,022577	0,000062	0,000174
IFNG	0,116686*	0,336812	0,021579	0,041514	0,00816***	0,026277
TNF	0,107662	0,082902	0,11162**	0,088676	0,156723	0,234388
TGF $\beta$ 1	1,53051	1,53051	1,168906	1,168906	1,138627	0,267501

Примечания. В относительных единицах представлены: М-среднее, m-стандартное отклонение; \* различия достоверны при сравнении экспрессии генов цитокинов больных ТКЛК с показателями больных АтД в в тесте Манна-Уитни при  $p < 0,05$ ; \*\* различия достоверны при сравнении экспрессии генов цитокинов больных АтД с показателями доноров в тесте Манна-Уитни при  $p < 0,05$ ; \*\*\* различия достоверны при сравнении экспрессии генов цитокинов больных ТКЛК с показателями доноров в в тесте Манна-Уитни при  $p < 0,05$

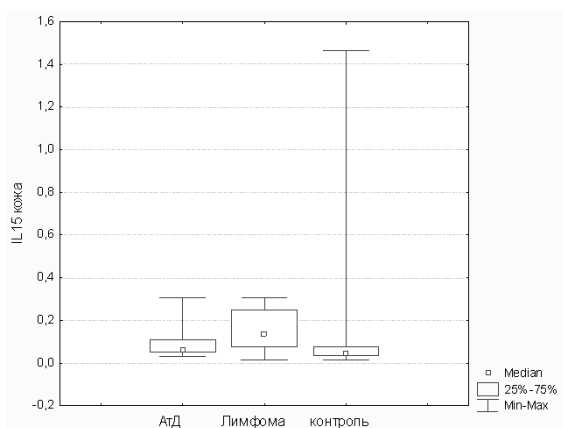
**Таблица 3. Уровни экспрессии генов цитокинов в биоптатах кожи**

КОЖА			
	ТКЛК-ДОНОРЫ	АТД-ДОНОРЫ	ТКЛК-АТД
Повышены	IL2r,6,8,10,15 IFN $\gamma$	IL-5,6,8,10,12b,29 IFN $\gamma$ TNF TGF $\beta$ 1	IL-8,10,15 IFN $\gamma$
Снижены	При ТКЛК не отмечено снижение экспрессии относительно доноров	IL-1B	IL-18



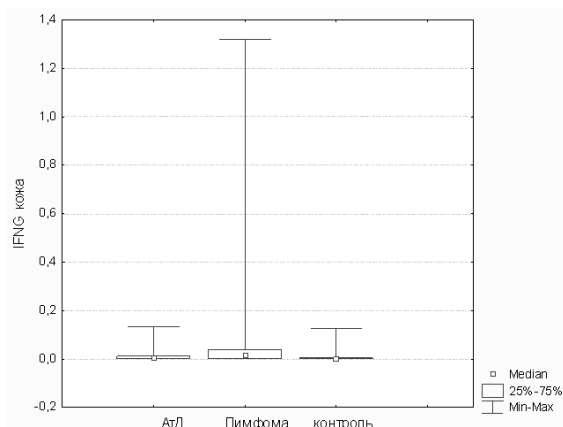
**Рис. 1. Сравнение уровня экспрессии IL-10 в коже у больных тяжелым АтД и ТКЛК по сравнению со здоровыми донорами**

По оси абсцисс 1-группа больных тяжелым АтД, 2- группа больных ТКЛК, 3- здоровые доноры  
По оси ординат значение уровня экспрессии IL-10 в относительных единицах.



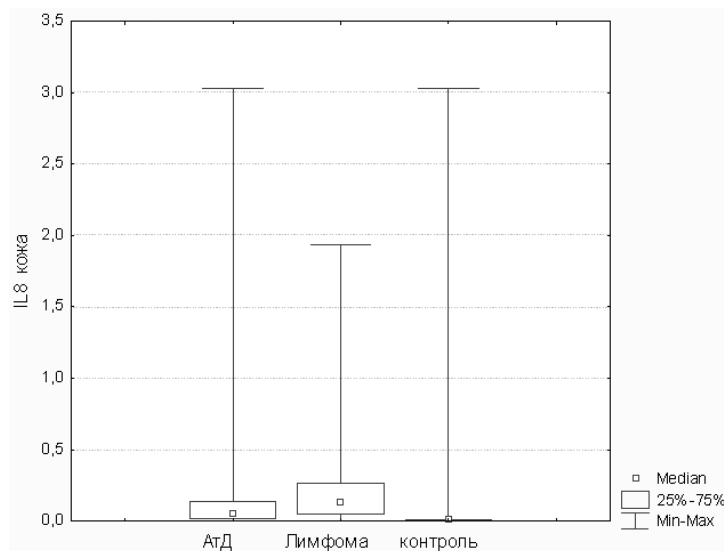
**Рис. 2. Сравнение уровня экспрессии IL-15 в коже у больных тяжелым АтД и ТКЛК по сравнению со здоровыми донорами**

По оси абсцисс 1-группа больных тяжелым АтД, 2- группа больных ТКЛК, 3- здоровые доноры  
По оси ординат значение уровня экспрессии IL-15 в относительных единицах



**Рис. 3. Сравнение уровня экспрессии IFN $\gamma$  в коже у больных тяжелым АтД и ТКЛК по сравнению со здоровыми донорами**

По оси абсцисс 1- группа больных тяжелым АтД, 2- группа больных ТКЛК, 3- здоровые доноры  
По оси ординат значение уровня экспрессии IFN $\gamma$  в относительных единицах.



**Рис. 4. Сравнение уровня экспрессии IL-8 в коже у больных тяжелым АтД и ТКЛК по сравнению со здоровыми донорами**

Примечания. По оси абсцисс группы сравнения. По оси ординат значение уровня экспрессии IL-8 в относительных единицах. Представлены медиана, межквартильный и общий размах показателей.

вызванную митогенами, а также развитие гиперчувствительности замедленного типа. В то же время IL-10 выступает в качестве кофактора IL-2 и IL-7 в отношении пролиферации тимоцитов, служит синергистом IL-4, усиливает пролиферацию В-клеток, защищает их от апоптоза, повышает синтез IgM и IgA. Таким образом, IL-10 служит важнейшим регулятором иммунного ответа, подавляющим активность макрофагов и Th1-клеток и вследствие этого цитотоксический ответ организма, а также обеспечивает реализацию некоторых биологических эффектов Th2-клеток, что способствует развитию гуморальной составляющей иммунного ответа, обуславливая аллергическую реактивность организма.

IL-15 был открыт недавно как интерлейкин Т (IL-Т), продуцируемый линией Т-клеток Т-клеточного лейкоза взрослого человека (HuT-102), способный стимулировать пролиферацию Т-клеток. Высокоаффинные рецепторы (IL-15R) были выявлены на различных клетках, включая Т-, В- и NK-клетки, а также клетки нелимфоидного ряда. Показано, что IL-15R стимулирует рост активированных периферических Т-клеток, NK-клеток, лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TILs). Также выявлено, что IL-15 является хемо-аттрактантом для Т-лимфоцитов человека и индуцирует активность ЛАК-клеток (лимфокин активированных киллеров), NK-клеток и образование цитолитических эффекторных клеток. В зарубежных исследованиях определена активность IL-15 в очагах поражения при ТКЛК, причем

степень его активности постепенно повышалась по мере прогрессирования болезни [13,14].

IFN $\gamma$  занимает в семействе интерферонов особое место: его противовирусная активность выражена слабо, однако он обладает сильным иммунорегуляторным действием и занимает одно из центральных мест в регуляции адаптивного иммунного ответа. IFN $\gamma$  синтезируют преимущественно лимфоидные клетки. Поскольку IFN $\gamma$  является основным продуктом Th1 клеток, все факторы, направляющие дифференцировку Т-хелперов по пути Th1, прямо или косвенно способствуют экспрессии гена IFN $\gamma$  [15].

Стоит отметить выраженное влияние активности IL-8 в коже больных ТКЛК, являющегося хемотаксическим фактором Т-клеток, по сравнению с больными АтД. IL-8 обладает выраженными противовоспалительными свойствами, вызывая экспрессию молекул межклеточной адгезии и усиливая прилипание нейтрофилов к эндотелиальным клеткам и субэндотелиальным матричным белкам, обеспечивая приток пула злокачественных Т-лимфоцитов к очагам поражения. Также IL-8 является маркером роста пула злокачественных лимфоцитов, что говорит о важной роли этого цитокина в иммунопатогенезе ТКЛК [12].

Таким образом, полученные данные об уровне экспрессии генов IL-8 и IL-15 в изученных образцах кожи могут свидетельствовать о важности их роли в качестве предположительных маркеров трансформации тяжелого АтД в ТКЛК.



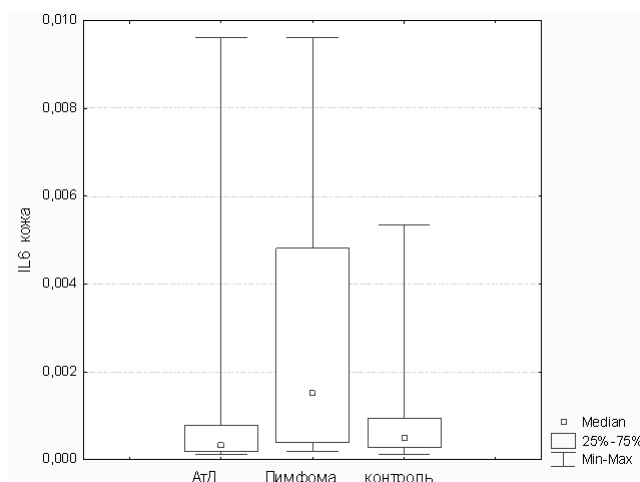
Вместе с тем уровень экспрессии гена IL-18 в коже оказался ниже у больных ТКЛК по сравнению с больными АтД. Также выявлена сильная статистическая тенденция в отношении различий по признаку увеличения уровня экспрессии гена IL-29 ( $p < 0,0668$ ) у больных ТКЛК, по сравнению с больными АтД.

Важную роль в развитии тяжелых форм АтД, а также, возможно, и лимфопролиферативных заболеваний, занимает IL-18 – не так давно обнаруженный цитокин, структурно подобный IL-1, оказывающий сильный эффект на активацию Т-клеток, первоначально названный IFN $\gamma$  - индуцирующий фактор (IGIF). IL-18 является новым цитокином, играющим важную роль в участии Т-хелперов 1 типа в иммунной реакции, в первую очередь, благодаря его способности индуцировать продукцию IFN $\gamma$  Т-клетками и NK-клетками. Активность зрелого IL-18 тесно связана с активностью IL-1. IL-18 индуцирует экспрессию генов TNF $\alpha$ , IL-1, Fas лиганда и различных хемокинов, а также дифференцировку Th1- или Th2-клеток в зависимости от цитокинового окружения и генетических предпосылок. Также, как и IL-1, IL-18 вовлечен в реакции и врожденного, и приобретенного иммунного ответа. Конститутивная экспрессия IL-18 определяется в различных клетках, включая макрофаги, кератиноциты и остеобласты. Было показано, что непротрансформированная форма IL-18 в основном продуцируется кератиноцитами человека. Подтверждено важное значение исследования IL-18 для клинических целей: IL-18 играет роль модулятора при опухолевых, ин-

фекционных, аутоиммунных и воспалительных заболеваниях. Усиленная биоактивность IL-18 вместе с сильным повышением уровня IL-18 в сыворотке наблюдается при онкогематологических заболеваниях и при сепсисе. Результаты зарубежных исследований показывают, что уровень сывороточного IL-18 коррелирует с тяжестью атопического дерматита по шкале SCORAD, а также с уровнем LDH и общего IgE. Авторы предполагают, что панели исследования этих биомаркеров позволят более точно оценивать тяжесть и прогноз развития АтД [16].

Также сходство между тяжелым АтД и ТКЛК отмечено и при изучении других показателей в коже больных: оно заключалось в повышении уровня экспрессии IL-6 (рис.5), IL-8 (рис. 4), IL-10 (рис.1), IFN $\gamma$  (рис.3) в сравнении со здоровыми донорами.

Цитокин IL-6 – это показатель иммунного ответа при заболеваниях, сопровождающихся воспалением, координирует иммунный и острофазный воспалительный ответы, а также онкогенез и гемопоэз. Синтез ИЛ-6 осуществляется как лимфоидными, так и нелимфоидными клетками (лимфоцитами, макрофагами, фибробластами, гепатоцитами, васкулярными, эндотелиальными, опухолевыми и другими). Основным источником ИЛ-6 являются макрофаги. Он продуцируется моноцитами и эндометриальными стромальными клетками. Его продукция стимулируется другими цитокинами: ИЛ-1, ИЛ-2, TNF  $\alpha$ , IFN  $\alpha$ , а также вирусами и липополисахаридами бактерий. Быстрое формирование реакции организма на внедрение чужеродных патогенов или при повреждении тканей позволя-



**Рис. 5. Сравнение уровня экспрессии IL-6 в коже у больных тяжелым АтД и ТКЛК по сравнению со здоровыми донорами**

Примечания. По оси абсцисс группы сравнения. По оси ординат значение уровня экспрессии IL-6 в относительных единицах. Представлены медиана, межквартильный и общий размах показателей.

ет причислить этот цитокин к ранним медиаторам воспаления. IL-6, ранее известный как BSF-2 (B-cell stimulating factor 2) или IFN  $\beta$ 2, не только влияет на переключение ответа с IgM на IgG, но является и важным фактором роста. Он играет центральную роль в росте опухолевых клеток при множественной миеломе, а также синтезируется опухолевым окружением при крупноклеточных лимфомах и его ингибирование может оказывать противоопухолевое действие [17].

Повышение уровня экспрессии разных цитокинов в коже больных ТКЛК (IL-2 $\gamma$ , IL-15) и у больных тяжелым АтД (IL-5, IL-12b, IL-29, TNF $\alpha$ , TGFB1) по сравнению с группой контроля, позволяет судить о разном характере цитокинового дисбаланса при этих заболеваниях.

Прослеживается значимость параметров экспрессии генов следующих цитокинов IL-2 $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12B, IL-15, IL29, TGFB, IFN $\gamma$  в коже,

которые являются маркерами хронического воспаления и преобладания Th1 ответа у больных с тяжелым течением АтД. По данным зарубежной и отечественной литературы известно, что на формирование Th1-ответа оказывает стимулирующее влияние IL-12, продуцируемого макрофагами, дендритными клетками и эозинофилами [18].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об определенном сходстве показателей экспрессии в коже больных тяжелым АтД и ТКЛК, характеризующимся повышением уровня экспрессии генов IL-6, IL-8, IL-10, IFN $\gamma$  в сравнении со здоровыми донорами.

Повышение уровня экспрессии генов IL-2 $\gamma$ , IL-15 в коже больных ТКЛК и повышение генов IL-5, IL-12b, IL-29, TNF $\alpha$ , TGFB1 у больных тяжелым АтД по сравнению с группой контроля, позволяет судить о разном характере цитокинового дисбаланса.

## Литература

1. Лезвинская Е.М., Овсянникова Г.В. Особенности диагностики различных нозологических форм злокачественных лимфом кожи. *Международный медицинский журнал*. 2009; 15 (1): 110-114.
2. Крылов Ю.В., Медведев М.Н., Малашенко С.В. и др. Иммуногистохимический метод в дифференциальной диагностике мелкоклеточных злокачественных опухолей. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2010; 3: 21-26.
3. Sokolowska M.W., Baranska W., Cegielska A. Atopic dermatitis like Pre-Sezary syndrome: Role of Immunosuppression. *Acta Derm Venereol*. 2011; 91: 574-577.
4. Arellano F.M., Arana A., Wentworth C.E. et al. Lymphoma among patients with atopic dermatitis and/or treated with topical immunosuppressants in the United Kingdom. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2009; 123(5): 1111-6.
5. Cooper K.D. Atopic Dermatitis: recent trends in pathogenesis and therapy. *J Invest Dermatol*. 2003; 102: 128-137.
6. Maintz L., Novak N. Getting and more complex: the pathophysiology of atopic eczema. *Eur. J. Dermatol*. 2007; 17: 267-283.
7. Кохан М.М. Особенности иммунологической реактивности и цитокинового профиля лимфоцитов периферической крови у больных с Т-клеточными злокачественными лимфомами кожи. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2002; 4:54-63
8. Hanafusa T., Matsui S., Murota H. et al. Increased frequency of skin-infiltrating FoxP3(+) regulatory T cells as a diagnostic indicator of severe atopic dermatitis from cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Exp Immunol*. 2013; 172: 507-12.
9. Meyer N., Mazereeuw-Hautier J., Launay F. et al. Cutaneous T cell lymphoma complicating severe atopic dermatitis. *Dermatology*. 2009; 218(2): 168-71.
10. Сергеев Ю.В., Иванов О.Л., Новиков Д.К., Караулов А.В., Сергеев А.Ю. Атопический дерматит: современная диагностика и лечение. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2001; 4: 39-63.
11. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семёнов П.А. и др. ПЦР в «реальном времени». - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009; 115.
12. Wismer JM, McKenzie RC, Sauder DN. Interleukin-8 immunoreactivity in epidermis of cutaneous T-cell lymphoma patients. *Lymphokine Cytokine Res*. 1998; 13(1):21-7.
13. Leroy S., Dubois S., Tenaud I. et al. Interleukin-15 expression in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome). *Br J Dermatol*. 2001; 144(5): 1016-23.
14. Asadullah K., Haeussler-Quade A., Gellrich S., et al. IL-15 and IL-16 overexpression in cutaneous T-cell lymphomas: stage-dependent increase in mycosis fungoides progression. *Exp Dermatol*. 2000; 9(4): 248-51.
15. Новиков Д. К., Новиков П.Д. Клиническая иммунопатология. М., Медлит. 2009, 441 с.
16. Trzeciak M., Gleń J., Bandurski T. et al. Relationship between serum levels of interleukin-18, IgE and disease severity in patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol*. 2011; 36: 728-732. doi: 10.1111/j.1365-2230.2011.04113.x.
17. Gilbert L.A., Hemann M.T. Context-specific roles for paracrine IL-6 in lymphomagenesis. *Genes Dev*. 2012; 26: 1758-1768. doi:10.1101/gad.197590.112
18. Grewe M., Bruijnzeel-Koomen C.A., Schopf E., et al. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today*. 1998; 19: 359-361.

## Сведения об авторах:

Ниязов Данияр Дамирович. 115478, Москва, Каширское шоссе, 24-2, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства E-mail: daniyarniyazov@yandex.ru

Поступила 15.12.2014 г.