

## Показатели уровня цитокинов у больных онихомикозами

В.Ю. Васенова, Ю.С. Бутов

Российский государственный медицинский университет, Москва

## The indexes of the level of cytokinins in the patients with onychomycosis

V.Y. Vasenova, Y.S. Butov

Medical University of Russia, Moscow

### Аннотация

Был исследован уровень LL-37, TGF- $\alpha$  и VEGF в сыворотке и смывах, полученных с ногтевого ложа после удаления ногтевой пластинки и экспрессия генов, контролирующих различные звенья иммунитета в биоптате из ногтевого ложа у 30 больных онихомикозом. Показано снижение уровня LL-37, TGF- $\alpha$  и VEGF в смывах, указывающее на угнетающее воздействие токсинов грибов, компенсаторное повышение количества TGF- $\alpha$  и VEGF в сыворотке. Отмечено снижение уровня провоспалительных и повышение противовоспалительных цитокинов, говорящее о длительно протекающем хроническом инфекционном процессе.

### Ключевые слова

Онихомикоз, цитокины, экспрессия генов

### Summary

The levels of LL37, TGF- $\alpha$  and VEGF in serum and in nail washouts after nail removing, and also expression of genes, which control different parts of immune reactions in biopate from nail bed were studied from 30 patients with onychomycosis. There were shown decreasing levels of LL37, TGF- $\alpha$  and VEGF in washouts, that points to depression action of fungi toxins, and higher expression of TGF- $\alpha$  and VEGF in serum also were found. Low level of inflammatory cytokines and high level of anti-inflammatory cytokines tell about long-term chronic infectious process.

### Keywords

Onychomycosis, cytokines, expression of genes

Проблеме онихомикозов уделяется пристальное внимание в связи с высокой распространенностью и нередко развитием осложнений токсико-аллергического характера. Поэтому несомненный интерес представляют сведения, характеризующие уровень цитокинов у этих больных и их роль в формировании воспалительной реакции и неспецифического иммунитета.

Цитокинами принято называть обширное семейство биологически активных пептидов, обладающих гормоноподобными свойствами, обеспечивающих взаимодействие клеток иммунной, нервной и эндокринной систем. Основными клетками-продуцентами цитокинов являются моноциты, макрофаги и Т-лимфоциты [2].

Основная биологическая функция цитокинов - регуляция иммунного ответа на всех этапах его развития. В целом вся эта большая

группа эндогенных регуляторов обеспечивает самые разнообразные процессы, включая пролиферацию и дифференцировку предшественников функционально активных иммунокомпетентных клеток, хемотаксис, изменение экспрессии антигенов и различных маркеров, переключение синтеза иммуноглобулинов, индукцию цитотоксичности у макрофагов, формирование очага воспаления.

Являясь медиаторами иммунной и воспалительной реакций, цитокины обладают аутокринной, паракринной и эндокринной активностью. В первую очередь они регулируют формирование типичного воспаления в виде отека, боли, гиперемии.

К цитокинам относят интерфероны, колониестимулирующие факторы, хемокины, фактор некроза опухоли, а также интерлейкины.

Известно, что IL-1 существует в виде двух полипептидов - $\alpha$  и - $\beta$ . При этом  $\beta$ -компонент играет более важную роль в формировании воспалительной реакции в ответ на бактериальную интервенцию или тканевые повреждения, вызванные экзогенными факторами. Фактор некроза опухоли (TNF) обеспечивает продукцию белков острой фазы, подавляет опухолевый рост клеток, активирует свертывающую систему крови и хемотаксис моноцитов. Интерферон  $\gamma$  является мощным активатором макрофагов и антагонистом IL-4 –экспрессирует CD-23 и синтез IgE [1].

Показано, что защита организма от инфекционных агентов, (бактерий, вирусов, гельминтов, грибов) обеспечивается гуморальным и клеточным звеном иммунитета с избирательным использованием внеклеточных или внутриклеточных механизмов [14].

Одним из основных фунгицидных механизмов является система оксида азота макрофагов. Клетки профессиональных макрофагов располагают высокоактивной «индуцибельной» синтазой оксида азота (iNOS). Индукция этого фермента происходит под влиянием IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , угнетение – под влиянием IL-4, IL-10. Деятельность оксида азота заключается в подавлении многих ферментных систем гриба и макроорганизма, нарушает гликолиз и дыхательные цепи, взаимодействует с протеинкиназами, расстраивает метаболизм фосфатов и транспортные системы. В итоге это ведет к цитостатическим и губительным для клеток эффектам.

Системы производных кислорода и азота работают во взаимодействии, причем их компоненты могут взаимно подавлять и потенцировать эффекты друг друга [18]. Обе системы для наибольшей активности требуют наличия железа Fe<sup>++</sup>(19). Дрожжеподобные грибы также нуждаются в железе для роста и, таким образом, помимо прямого фунгицидного действия окислительные системы оказывают и фунгистатическое, опосредованное через дефицит железа. Кроме того, доступ железа в клетки снижается под действием IFN- $\gamma$  за счет снижения экспрессии рецептора к трансферрину.

Было показано, что взаимодействие *T. rubrum* с макрофагами приводит к образованию TNF- $\alpha$  и IL-10, но не влияет на выработку IL-12 и окиси азота [9]

Предположительно основным компонентом врожденного иммунного ответа в коже являются антимикробные пептиды, в частности ка-

телицидин (LL-37). В иммунном ответе он регулирует антибактериальную активность, способен стимулировать продукцию хемокинов [7]. LL-37 вырабатывается эпителиоцитами кожи, желудочно-кишечного тракта, дыхательных путей, обладая широким спектром антимикробной активности [10,13]. Однако, очевидно, что эти пептиды не только действуют как эндогенные антибиотики но также и регулируют воспалительные и иммунные ответы [12].

Антимикробные пептиды играют роль в восприимчивости пациентов с хроническими кожными заболеваниями (псориаз, красная волчанка, контактный дерматит) к присоединению вторичной инфекции. Увеличенная экспрессия антимикробных пептидов при псориазе коррелирует с низким процентом бактериального инфицирования этих пациентов. При контактном дерматите такой зависимости не наблюдается. Высокий уровень кателицидина обнаруживается в пораженной коже и играет большую роль в эпителизации ран. После травмы кожного покрова факторы роста стимулируют регенерацию ткани и вызывают экспрессию кателицидинов и дефензинов в кератиноцитах [8].

В заживлении ран не менее важную роль играет VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) [5].

TGF- $\alpha$  – группа ангиогенных полипептидов, стимулирующих рост эндотелиальных клеток, пролиферацию фибробластов и ангиогенез сосудов. В нормальной неповрежденной коже уровень TGF- $\alpha$  незначителен, но при травматизации он возрастает [11]. TGF- $\alpha$  увеличивает продукцию IL-8 и бета-дефензинов и активизирует функцию эпителиоцитов. [17].

Таким образом, в формировании различных патологических процессов в коже и других органах важное участие принимают интерлейкины, определяющие степень выраженности заболевания и прогрессивность его течения.

В приведенных работах уровень цитокинов и характеристика иммунного статуса осуществлялась на основании исследований данных параметров в сыворотке крови и смывах у больных.

На сегодняшний день практически нет работ, посвященных изучению местного иммунитета в области грибкового поражения ногтевого ложа. Хотя именно локальность поражения при этой патологии говорит о важной роли специфических и неспецифических местных факторов противогрибкового иммунитета,

блокирующих или тормозящих распространение инфекционного процесса. В связи с этим мы оценили уровень LL-37 и TGF- $\alpha$ , VEGF в сыворотке и смывах, полученных с ногтевого ложа после удаления ногтевой пластинки у 30 больных онихомикозом. Также была исследована экспрессия генов, контролирующих различные звенья иммунитета в биоптате из ногтевого ложа с использованием метода обратной полимеразной цепной реакции (RT-PCR).

В таблице 1 представлены данные уровня LL-37, TGF- $\alpha$  и VEGF до и после лечения в сыворотке и в смывах с ногтевого ложа.

До лечения уровень LL-37 был достоверно ниже нормы, после проведенной терапии его значения приблизились к нормальным, в смывах же отмечалось выраженное снижение количества кателицидина.

По имеющимся литературным данным уровень LL-37 повышается при воспалении, при наличии различных инфекционных агентов, в том числе и грибковых. Наши исследования показали, что при онихомикозах уровень LL-37 снижается. Гистопатоморфологические исследования показали, что при длительно существующем онихомикозе воспалительная реакция в тканях ногтевого ложа практически разрешается. LL-37 синтезируется гранулоцитами, а в биоптатах отсутствует лимфоцитарная инфильтрация и, соответственно, признаки воспаления. Этим объясняется низкий уровень кателицидина в смывах. Изначально низкий уровень LL-37 в сыворотке крови связан с отсутствием непосредственного контакта с грибковой инфекцией, сконцентрированной в ногтевой пластинке и ногтевом ложе.

Содержание TGF- $\alpha$  в сыворотке пациентов до удаления ногтевых пластинок оказалось до-

стоверно ( $p < 0,001$ ) выше относительно контроля. После лечения уровень TGF- $\alpha$  снижался, но не достигал нормальных значений. При этом в смывах TGF- $\alpha$  был в 2 раза ниже нормы и определялся только у 25% больных.

Уместно предположить, что грибы блокировали действие TGF- $\alpha$ -рецепторов в ногтевом ложе, в результате чего уровень TGF- $\beta$  снижался. В результате нарушался ангиогенез и пролиферация фибробластов. Эти данные коррелируют с результатами патоморфологического исследования, при которых выявлено значительное уменьшение количества фибробластов. Обращает на себя внимание уменьшение количества нормальных сосудов, большое число склерозированных при почти полном отсутствии роста новых капилляров. Повышение же уровня TGF- $\beta$  в сыворотке, вероятно, является компенсаторным в ответ на снижение его в зоне поражения.

У пациентов уровень VEGF в сыворотке до и после лечения был в 3 раза выше нормы, а в смывах – почти в 2 раза ниже.

Уровень VEGF в сыворотке до и после лечения был ниже нормы, что по нашему мнению связано с отсутствием системного процесса – грибы находятся в ногте и ногтевом ложе. В смывах же он повышен в ответ на местную грибковую инвазию. Количество TGF- $\alpha$  и VEGF в сыворотке, наоборот, было повышено, а в смывах снижено. По нашему мнению, токсины грибов угнетающе действуют на сосудистые факторы в ногтевом ложе, а повышение их в периферической крови является компенсаторным. Это подтверждается и нарушениями микроциркуляции, выявленными при гистологическом исследовании.

Экспрессию генов цитокинов оценивали у 19 пациентов (13 женщин и 6 мужчин). Мате-

**Таблица 1**  
**Уровень LL-37 до, после лечения и в смывах с ногтевого ложа**

| Динамика<br>Исследуемый параметр | До лечения          | После лечения      | Смывы            |
|----------------------------------|---------------------|--------------------|------------------|
| LL-37 ng/ml                      | 0,67 $\pm$ 0,14*    | 0,98 $\pm$ 0,18    | 0,22 $\pm$ 0,07* |
| контроль                         | 1,2 $\pm$ 0,35      | 1,2 $\pm$ 0,35     | 1,2 $\pm$ 0,35   |
| TGF- $\alpha$ ng/ml              | 5,56 $\pm$ 1,67*    | 2,7 $\pm$ 0,89*    | 0,32 $\pm$ 0,16* |
| контроль                         | 0,62 $\pm$ 0,2      | 0,62 $\pm$ 0,2     | 0,62 $\pm$ 0,2   |
| VEGF ng/ml                       | 141,04 $\pm$ 19,38* | 126,4 $\pm$ 31,78* | 33,3 $\pm$ 6,6*  |
| контроль                         | 54,44 $\pm$ 18,1    | 54,44 $\pm$ 18,1   | 54,44 $\pm$ 18,1 |

\* -  $p < 0,001$

риалом для исследования являлись биоптаты ногтевого ложа, взятые после удаления ногтевой пластинки.

Данные об экспрессии генов цитокинов и NO-синтазы в тканях ногтевого ложа у больных онихомикозами представлены в таблице 2.

**Таблица 2**  
**Экспрессия генов цитокинов и NO-синтазы в тканях ногтевого ложа у больных онихомикозами**

| Гены          | Число больных с мРНК |      |
|---------------|----------------------|------|
|               | Абс.                 | %    |
| IL-6          | 9*                   | 47,4 |
| IL-1 $\beta$  | 5                    | 26,3 |
| TNF- $\alpha$ | 6                    | 31,6 |
| IL-8          | 8                    | 42,1 |
| INF- $\gamma$ | 3                    | 15,8 |
| IL-10         | 13                   | 68,4 |
| VEGF          | 8                    | 42,1 |
| iNOS          | 13                   | 68,4 |

\* - у 4 больных имелись лишь следовые количества мРНК

У пациентов с длительным периодом грибкового поражения ногтевого ложа, сопровождавшегося значительной деструкцией ткани в биоптате из пораженной зоны определяли наличие мРНК про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов, факторов роста сосудов и индуцибельной NO-синтазы.

Результаты, представленные в таблице, показывают, что у большинства пациентов в ногтевом ложе отсутствуют маркеры воспалительного процесса, обеспечивающие развитие специфического гуморального ответа. Из 19 пациентов только у 5 (26,3%) выявлена мРНК IL-1 $\beta$ . Еще у 5 (26,3%) имелся выраженный уровень мРНК IL-6, а у 4 только его следовые количества. Синтез IL-1 $\beta$  осуществляется как макрофагами, так и эпителиальными клетками в результате стимуляции продуктами микроорганизмов (включая липополисахариды). Этот цитокин является основным медиатором воспалительных реакций, запускающим иммунные процессы [4]. Кроме того, он является ко-фактором активации и пролиферации В-клеток. IL-1 $\beta$  действует синергично с IL-6 и является основным активатором синтеза последнего, обеспечивающего регуляцию конечного этапа дифференцировки В-клеток и

стимуляцию синтеза антител. Отсутствие или низкий уровень синтеза этих двух цитокинов возможно обусловлен длительно протекающим хроническим инфекционным процессом, сопровождающимся истощением некоторых звеньев иммунной системы.

У большинства пациентов (68,4%) отсутствовала продукция мРНК TNF- $\alpha$ , играющего важнейшую роль в развитии воспалительного процесса, обусловленного участием макрофагального звена иммунитета.

Только у 3 из 19 пациентов (15%) в биоптате из ногтевого ложа была выявлена мРНК INF- $\gamma$ . Он стимулирует врожденный клеточный иммунитет и специфический цитотоксический иммунитет, опосредованный Th1-лимфоцитами [6]. Отсутствие или низкий уровень синтеза INF- $\gamma$  свидетельствует о том, что Т-хелперы 1 типа, по-видимому, не играют значимой роли в формировании местного противогрибкового иммунитета. Это согласуется с данными других исследователей, показавших, что у пациентов с грибковым поражением ногтей снижена продукция INF- $\gamma$  в макрофагах периферической крови [15].

Подавление воспалительного процесса в зоне поражения, по-видимому, обеспечивается активным синтезом почти у всех пациентов IL-10, основной эффект которого связан с ингибированием активности Th1-клеток и снижением активности макрофагов, являющихся продуцентами провоспалительных цитокинов. Повышенный уровень синтеза IL-10 при грибковых заболеваниях был показан и в других работах [16].

Лишь у небольшой части исследованных нами пациентов (42,1%) активированы гены IL-8, обеспечивающего привлечение в зону воспаления моноцитов и полиморфно-ядерных лейкоцитов. Возможно, это объясняется разрушением сосудов и воздействием длительно находящихся в тканях ногтевого ложа грибов.

Почти у всех пациентов в биоптате выявлялась мРНК индуцибельной NO-синтазы. Этот фермент синтезируется только под действием противовоспалительных цитокинов. При этом сам оксид азота обладает прямым цитотоксическим действием на клетки бактерий и грибов, находящиеся в организме. Его действие осуществляется путем ингибирования жизненно важных групп ферментов, участвующих в цикле Кребса и синтезе ДНК [3].

Только у 1 пациента в биоптате выявляется мРНК сосудистого эндотелиального фактора

роста (VEGF) в значимых количествах, что говорит об отсутствии процесса восстановления структуры кровеносных сосудов.

Таким образом, полученные в работе данные по экспрессии генов цитокинов говорят о важной роли этих показателей для оценки характера развития грибкового поражения, особенности состояния местного иммунитета, что в дальнейшем после проведения дополнительных исследований может стать основой для подбора дифференцированного подхода к лечению заболевания и прогнозирования характера его течения.

### Выводы

1. Низкий уровень LL-37 в смывах с ногтевого ложа связан с отсутствием воспаления в очаге поражения.
2. Снижение уровня TGF- $\alpha$  и VEGF в смывах, по-видимому, связано с угнетающим воздействием токсинов грибов на рецепторы к этим цитокинам, а повышение в сыворотке

обусловлено компенсаторной реакцией на снижение их в зоне поражения.

3. У пациентов с онихомикозом в биоптатах обнаружены низкий уровень синтеза IL-6 и IL-1 $\beta$ , что возможно обусловлено длительно протекающим хроническим инфекционным процессом, сопровождающимся истощением некоторых звеньев иммунной системы.
4. Обнаружение INF- $\gamma$  только у 15% больных говорит о том, что Т-хелперы 1 типа не играют определяющей роли в формировании местного противогрибкового иммунитета.
5. Нахождение почти у всех пациентов iNOS свидетельствует об активизации цитотоксических механизмов воздействия в связи с наличием в тканях грибковой инфекции.
6. Активирование генов IL-8 коррелирует с деструкцией сосудов и воздействием длительно находящихся в тканях ногтевого ложа грибов, а практически полное отсутствие VEGF подтверждает этот вывод и говорит об отсутствии процесса дифференцировки и роста сосудов.

### Литература

1. Клиническая иммунология и аллергология. Под ред. Г. Лолора мл. Москва, 2000.
2. Клиническая иммунология. Под ред. Соколова Е.И. Медицина, 1998.
3. Малышев И.Ю., Монастырская Е.А., Смирин Б.В., Манухина Е.Б. Гипоксия и оксид азота. Вестн. Росс. Акад. Мед. Наук 2000; 9: 44-48.
4. Ярилин А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии. Иммунология 1997; 5: 7-14.
5. Allen H.H. Skin flaps for the gynaecologist. Eur J Gynaecol Oncol. 2004+ADs-25(1): 7-16.
6. Antachopoulos C., Roilides E. Cytokines and fungal infections. Br J Haematol. 2005 Jun; 129(5): 583-96.
7. Bowdish D.M., Davidson D.J., Hancock R.E. Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins. Curr Top Microbiol Immunol. 2006; 306: 27-66.
8. Braff M.H., Bardan A., Nizet V., Gallo R.L. Cutaneous Defense Mechanisms by Antimicrobial Peptides. Journal of Investigative Dermatology 2005; 125: 9-13.
9. Campos M.R.M., Russo M., Gomes E., Almeida S.R. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. Microbes and Infection 2005; 6: 1-8.
10. Durr U.H., Sudheendra U.S., Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. Biochim Biophys Acta 2006 Sep; 1758(9): 1408-25. Epub 2006 Apr 4.
11. Grellner W., Vieler S., Madea B. Transforming growth factors (TGF-alpha and TGF-beta1) in the determination of vitality and wound age: immunohistochemical study on human skin wounds. Forensic Sci Int. 2005; Oct 29; 153(2-3): 174-80.
12. Hiemstra P.S. Defensins and cathelicidins in inflammatory lung disease: beyond antimicrobial activity. Biochem Soc Trans. 2006; Apr; 34(Pt 2): 276-8.
13. Kagnoff M.F. Microbial-epithelial cell crosstalk during inflammation: the host response. Ann N Y Acad Sci. 2006; Aug; 1072: 313-20.
14. Kawakami K. Interleukin-18 and host defense against infectious pathogens. J-Immunother. 2002; Mar-Apr; 25 Suppl 1: S12-9.
15. Koga T, Shimizu A, Nakayama J. Interferon-gamma production in peripheral lymphocytes of patients with tinea pedis: comparison of patients with and without tinea unguium. Med Mycol. 2001; Feb; 39(1): 87-90.
16. Lilic D. New perspectives on the immunology of chronic mucocutaneous candidiasis. Curr Opin Infect Dis. 2002; Apr; 15(2): 143-7.
17. Miller L.S., Sorensen O.E., Liu P.T., Jalian H.R., Eshtiaghpour D., Behmanesh B.E., Chung W., Starner T.D., Kim J., Sieling P.A., Ganz T., Modlin R.L. TGF-alpha regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. J Immunol. 2005; May 15; 174(10): 6137-43.
18. Vazquez-Torres FA, Balish E. Macrophages in resistance to candidiasis. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997; 61; 2: 170-192.