

Оценка интенсивности зуда с помощью визуально-аналоговых шкал у больных atopическим дерматитом на фоне терапии ингибиторами кальциневрина

В.В. Чикин¹, В.А. Смольяникова², Д.В. Прошутинская¹, М.А. Нефедова¹

¹ ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России 107076, г. Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6

² ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Цель. Оценить влияние наружной терапии больных atopическим дерматитом 0,1% мазью такролимуса на интенсивность зуда и уровень экспрессии в коже белков факторов роста, определяющих выраженность иннервации кожи.

Материал и методы. 15 больным atopическим дерматитом проводили наружное лечение 0,1% мазью такролимуса. Для оценки тяжести клинических проявлений рассчитывали индекс SCORAD. Интенсивность зуда определяли с использованием визуальной аналоговой шкалы. Экспрессию в коже фактора роста нервов, амфирегулина, семафорина-3А и маркера нервных волокон белка PGP9.5 исследовали методом непрямой иммунофлуоресценции.

Результаты. В эпидермисе больных обнаружены повышенный уровень экспрессии фактора роста нервов и сниженный уровень экспрессии семафорина-3А, были увеличены количество, средняя длина и интенсивность свечения PGP9.5⁺-нервных волокон. После проведенной терапии уменьшились степень тяжести заболевания и интенсивность зуда, в эпидермисе снизился уровень экспрессии фактора роста нервов и повысился уровень экспрессии семафорина-3А, уменьшились средняя длина и интенсивность свечения PGP9.5⁺-нервных волокон. Выявлены положительные корреляционные связи между интенсивностью зуда и уровнем экспрессии фактора роста нервов, количеством и средней длиной PGP9.5⁺-нервных волокон в эпидермисе, а также отрицательная корреляционная связь между интенсивностью зуда и уровнем экспрессии семафорина-3А в эпидермисе.

Заключение. Наружная терапия 0,1% мазью такролимуса способствует уменьшению интенсивности зуда у больных atopическим дерматитом, что связано со снижением под влиянием терапии выраженности иннервации эпидермиса, уменьшением уровня экспрессии в эпидермисе фактора роста нервов и повышением уровня экспрессии семафорина-3А.

Ключевые слова: **атопический дерматит, зуд, такролимус, фактор роста нервов, семафорин-3А, PGP9.5⁺-нервные волокна эпидермиса.**

Контактная информация: diana.dika@mail.ru. Вестник дерматологии и венерологии 2016; (3): 46—55.

Assessing the itching intensity using visual analogue scales in atopic dermatitis patients against the background of a therapy with calcineurin inhibitors

V.V. Chikin¹, V.A. Smolyannikova², D.V. Proshutinskaya¹, M.A. Nefedova¹

¹ State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation Korolenko str., 3, bldg 6, Moscow, 107076, Russia

² I. M. Sechenov First Moscow State Medical University Trubetskaya str., 8, bldg 2, Moscow, 119991, Russia

Goal. To assess the effect of topical treatment of atopic dermatitis patients with the 0.1% Tacrolimus ointment on the itching intensity and skin expression level of growth factor proteins affecting the intensity of cutaneous innervation.

Materials and methods. Fifteen patients suffering from atopic dermatitis underwent treatment with the 0.1% Tacrolimus ointment. The SCORAD index was calculated to assess the severity of clinical manifestations. The itching intensity was assessed using a visual analogue scale. The skin expression of nerve growth factors, amphiregulin, semaphorin 3A and PGP9.5 protein (a nerve fiber marker) was assessed by the indirect immunofluorescence method.

Results. An increased expression of the nerve growth factor and reduced semaphorin 3A expression levels were noted in the patients' epidermis; there was an increase in the quantity, mean length and fluorescence intensity of PGP9.5⁺ nerve fibers. As a result of the treatment, the disease severity and itching intensity were reduced, the nerve growth factor expression level was reduced while semaphorin 3A expression level increased in the epidermis, and the mean length and fluorescence intensity of PGP9.5⁺ nerve fibers was also reduced. A positive correlation among the itching intensity and nerve growth factor expression level, quantity and mean length of PGP9.5⁺ nerve fibers in the epidermis was revealed, and negative correlation between the itching intensity and semaphorin 3A expression level in the epidermis was established.

Conclusion. Topical treatment with the 0.1% Tacrolimus ointment reduces the itching intensity in atopic dermatitis patients, which is related to the therapy-mediated reduction in the epidermis innervation level, decreased expression of epidermal nerve growth factor and increased semaphorin 3A expression level.

Key words: atopic dermatitis, itching, Tacrolimus, nerve growth factor, semaphorin 3A, PGP9.5⁺ nerve fibers in the epidermis.

■ Атопический дерматит (АД) — хроническое воспалительное заболевание кожи, сопровождающееся интенсивным зудом, с характерной локализацией и морфологической картиной высыпаний в зависимости от возраста. В настоящее время зуд рассматривается как один из главных диагностических критериев АД [1].

Развитие воспаления при АД обусловлено преимущественно клеточными иммунными реакциями с активацией Th2-лимфоцитов, продуцирующих интерлейкин (ИЛ)-4, -5, -13 [2—4]. В то же время в длительно существующих очагах АД выявлена повышенная продукция Т-лимфоцитами интерферона- γ (ИФН- γ) и фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), что свидетельствует о заинтересованности и Th1-лимфоцитов [5, 6].

Терапия больных АД направлена на подавление патологических иммунных реакций в коже. К эффективным препаратам с иммуносупрессивным действием, применяемым в наружной терапии АД, относится такролимус [7—9]. Механизм действия такролимуса основан на ингибировании синтеза цитокинов, инициирующих воспаление [10]. В цитоплазме клетки такролимус связывается с внутриклеточным рецептором макрофилином-12 (синоним: FK506-связывающий белок) и образует комплекс, ингибирующий активность белка кальциневрина, представляющего собой фермент кальций-зависимую фосфатазу [11, 12]. Снижение фосфатазной активности кальциневрина обуславливает нарушение дефосфорилирования фактора транскрипции активированных лимфоцитов NF-AT, что препятствует его перемещению в ядро клетки и приводит к прекращению транскрипции генов, кодирующих провоспалительные цитокины [13]. Это приводит к снижению продукции Т-лимфоцитами ИЛ-2, -3, -4, -5, ИФН- γ , ФНО- α [10, 14].

По данным авторов, наружная терапия больных АД с применением мази такролимуса приводит к уменьшению площади очагов поражения кожи, регрессу эритемы, отека, эксфолиаций, шелушения, лихенификации [15—24]. Описано быстрое исчезновение зуда у больных АД во время наружной терапии 0,1% мазью такролимуса [25—27].

Первоначально противовоспалительное действие такролимуса связывали с его противовоспалительным эффектом [28, 29]. Показано, что после топической терапии такролимусом в коже больных АД снижалась выраженность инфильтрации дермы Т- и В-лимфоцитами, эозинофилами [30]. Уменьшение выраженности лимфоцитарного инфильтрата дермы сопровождалось соответственно снижением продукции ИЛ-2, -3, -4, -5, -10, -13, ИФН- γ и ФНО- α [30—33].

Однако в настоящее время предполагается, что противовоспалительный эффект такролимуса обусловлен его прямым действием на пруритоцептивные нервные окончания в эпидермисе больных [27]. Известно, что у больных АД увеличена выраженность иннервации

кожи вследствие повышения количества нервных волокон в эпидермисе, что приводит к снижению порога восприятия зуда и повышению его интенсивности [34, 35]. Выраженность иннервации кожи определяется балансом между продукцией в коже веществ, способствующих росту нервных волокон, и веществ, тормозящих этот процесс [36]. Росту нервных волокон способствуют фактор роста нервов, который относится к нейротрофинам, и эпидермальный фактор роста амфирегулин [37—39].

Рост нервных волокон, вызванный фактором роста нервов, значительно усиливается в присутствии высоких концентраций ИЛ-1 β [40]. Продукция фактора роста нервов происходит в кератиноцитах и значительно повышается в присутствии ФНО- α . Th2-цитокины ИЛ-4 и ИЛ-13 повышают экспрессию рецепторов фактора роста нервов Trk-A на кератиноцитах, что приводит к усилению их пролиферации [41]. Амфирегулин также продуцируется кератиноцитами, и его выработке способствует ФНО- α [42]. Результаты экспериментов с трансгенными мышами показали способность амфирегулина усиливать выраженность воспалительной реакции [43—46]. Показано, что амфирегулин вызывал продукцию фибробластами провоспалительного цитокина ИЛ-8 и фактора роста сосудистого эндотелия VEGF [47].

Антагонистом фактора роста нервов и амфирегулина является фактор редукции нервов семафорин-3А, который участвует в процессах уменьшения выраженности иннервации, отклоняя конус роста нерва [48, 49]. В коже семафорин-3А продуцируется кератиноцитами [50, 51]. В экспериментах с мышами было показано, что в присутствии ФНО- α и Th2-цитокина ИЛ-4 уровень продукции семафорина-3А значительно снижался, что приводило к повышению выраженности иннервации эпидермиса [52].

Целью настоящей работы было оценить влияние наружной терапии больных АД 0,1% мазью такролимуса на интенсивность зуда и уровень экспрессии в коже белков факторов роста, определяющих выраженность иннервации кожи.

Материал и методы

Под наблюдением находились 15 больных АД: 7 женщин и 8 мужчин в возрасте от 18 лет до 41 года (средний возраст $30,1 \pm 8,7$ года). Диагноз АД был подтвержден морфологическими исследованиями. У всех пациентов до начала лечения получали биоптаты кожи в зоне высыпаний. Степень тяжести заболевания определяли с помощью индекса SCORAD: более 40 баллов — тяжелая степень АД, от 20 до 40 баллов — средняя степень тяжести. Интенсивность зуда определялась большими с помощью визуальной аналоговой шкалы (от 0 до 10 баллов) [29]: отсутствие зуда — 0 баллов, слабый зуд — 1—3 балла, умеренный — 4—7 балла, выраженный — 8—10 баллов.

Для лечения у всех больных применяли 0,1% мазь такролимуса наружно на очаги поражения кожи 2 раза в сутки в течение 4 нед.

Экспрессию в коже фактора роста нервов, амфирегулина, семафорина-3А и маркера нервных волокон белка PGP9.5 определяли методом непрямой иммунофлюоресценции. Исследования проводили на криостатных срезах по ранее разработанному протоколу [53].

Для количественного определения уровня экспрессии фактора роста нервов, амфирегулина, семафорина-3А и белка PGP9.5 использовали метод конфокальной микроскопии *ex vivo*. Готовые препараты изучали с использованием системы анализа изображений, включающей конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Olympus IX81S1F-S (Германия) *ex vivo* (объективы $\times 200$ и $\times 600$), оснащенный фотомикрографической системой, и персональный компьютер с программным обеспечением Olympus Fluoview Ver. 1.7b, с помощью которого проводили оценку количественных параметров экспрессии исследуемых белков как средних показателей интенсивности свечения по заданному каналу. Интенсивность свечения выражали в условных единицах (усл. ед.).

Белок PGP9.5 продуцируется преимущественно в нервной ткани и считается достаточно специфическим маркером нервных волокон [54—58]. Он находится в цитоплазме нейронов в высокой концентрации, отличается равномерным расположением внутри нейрона практически на всем его протяжении, вплоть до самых тонких отростков аксонов [59]. Определение экспрессии белка PGP9.5 было использовано для установления количества, средней длины и средней интенсивности свечения PGP⁺-нервных волокон в эпидермисе, на границе эпидермиса и дермы, а также в дерме. Исследовали по 3 поля зрения для каждого биоптата.

Через 4 нед. терапии проведено повторное обследование больных с определением индекса SCORAD, интенсивности зуда, уровня экспрессии фактора роста нервов, амфирегулина, семафорина-3А в коже.

Контрольную группу составили 25 здоровых лиц, сопоставимых по возрасту и полу с группой больных АД.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Statistica 10. Для сравнения показателей в группах использовали критерий Манна — Уитни. Для сравнения показателей, полученных при обследовании больных до и после лечения, применяли критерий Уилкоксона. Данные представляли в виде $M \pm \sigma$. Наличие корреляционных связей выявляли с помощью рангового коэффициента корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты

Под наблюдением находились 15 больных АД: 7 женщин и 8 мужчин в возрасте от 18 лет до 41 года (средний возраст $30,1 \pm 8,7$ года) с длительностью заболевания от 2 до 40 лет (в среднем $9,9 \pm 10,0$ года).

У 11 (73,3%) больных диагностирована тяжелая степень АД, у 4 (26,7%) — средней тяжести. Величина индекса SCORAD у больных АД варьировала от 28,4 до 79,7, составляя в среднем $47,0 \pm 14,0$ балла. Интенсивность зуда у 6 (40,0%) больных была выраженной, у 7 (46,7%) — умеренной, у 2 (13,3%) — слабой. Интенсивность зуда составляла от 2 до 10 баллов, в среднем $6,9 \pm 2,3$ балла. При морфологическом исследовании биоптатов кожи из очагов поражения в верхней части дермы были выявлены умеренно выраженные очагово-сливающиеся лимфогистиоцитарные инфильтраты.

У всех пациентов для лечения наружно применяли такролимус в форме 0,1% мази 2 раза в сутки в течение 4 нед. После терапии у всех больных было отмечено улучшение состояния кожи. Индекс SCORAD после лечения варьировал от 2,4 до 38,5 балла. После лечения отмечалось его статистически значимое уменьшение с $47,0 \pm 14,0$ до $12,9 \pm 10,0$ балла ($p < 0,05$). Интенсивность зуда после терапии также статистически значимо уменьшилась — с $6,9 \pm 2,3$ до $1,7 \pm 1,8$ балла ($p < 0,05$). После лечения зуд отсутствовал у 6 (40,0%) больных, жалобы на слабый зуд предъявляли 8 (53,3%) больных, на умеренный зуд — 1 (6,7%) больной. Морфологическое исследование биоптатов кожи из очагов поражения показало, что выраженность лимфогистиоцитарного инфильтрата в дерме больных после лечения значительно уменьшилась.

Лечение всеми больными переносилось хорошо. Из нежелательных явлений у 3 (20,0%) больных отмечалось незначительно выраженное ощущение жжения в месте нанесения препарата, разрешавшееся самопроизвольно в течение нескольких дней после начала лечения.

Исследования экспрессии белков факторов роста в коже методом непрямой иммунофлюоресценции были проведены у всех 15 больных АД. Экспрессия фактора роста нервов была обнаружена в цитоплазме кератиноцитов, в эпителиоцитах наружного и внутреннего эпителиального влагалища волосяных фолликулов, а также в эпителиальных клетках потовых желез (рис. 1). Экспрессия семафорина-3А наблюдалась в цитоплазме кератиноцитов преимущественно в базальном и супрабазальных слоях эпидермиса (рис. 2). Экспрессия амфирегулина была выявлена в цитоплазме кератиноцитов эпидермиса, в эпителиоцитах наружного и внутреннего эпителиального влагалища волосяных фолликулов, а также в эпителиальных клетках потовых желез.

Уровень экспрессии фактора роста нервов, амфирегулина и семафорина-3А был количественно определен в эпидермисе (табл. 1).

Обнаружен более высокий уровень экспрессии фактора роста нервов в эпидермисе больных АД — на 40,7% по сравнению с контрольной группой ($p = 0,003$). Уровень экспрессии семафорина-3А в эпи-

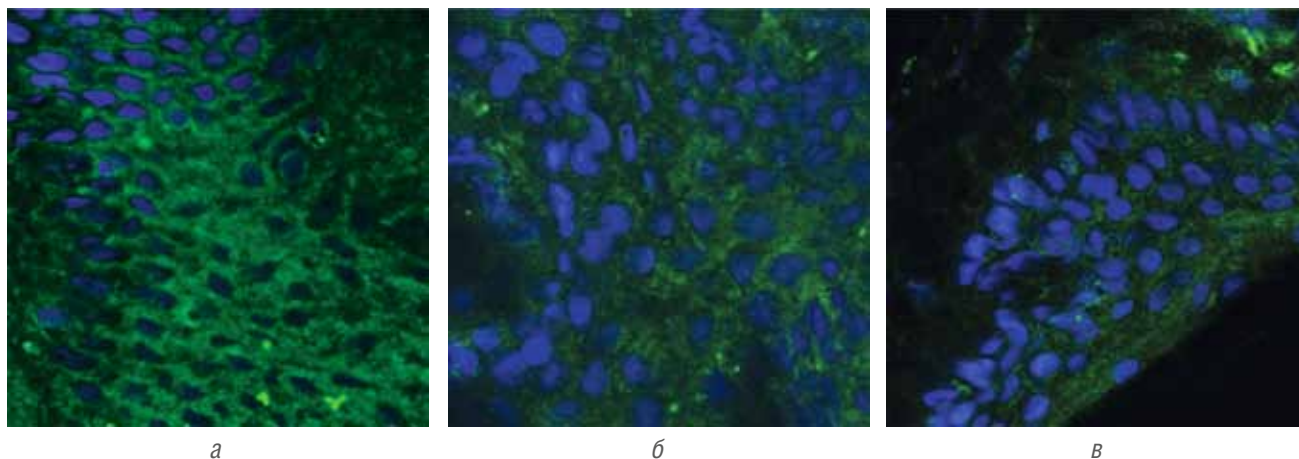


Рис. 1. Экспрессия фактора роста нервов (зеленое свечение) в эпидермисе у больного АД до (а) и после (б) наружной терапии 0,1% мазью такролимуса. $\times 600$. Здесь и на рис. 2 и 3: в — у здорового человека. Непрямая иммунофлюоресценция

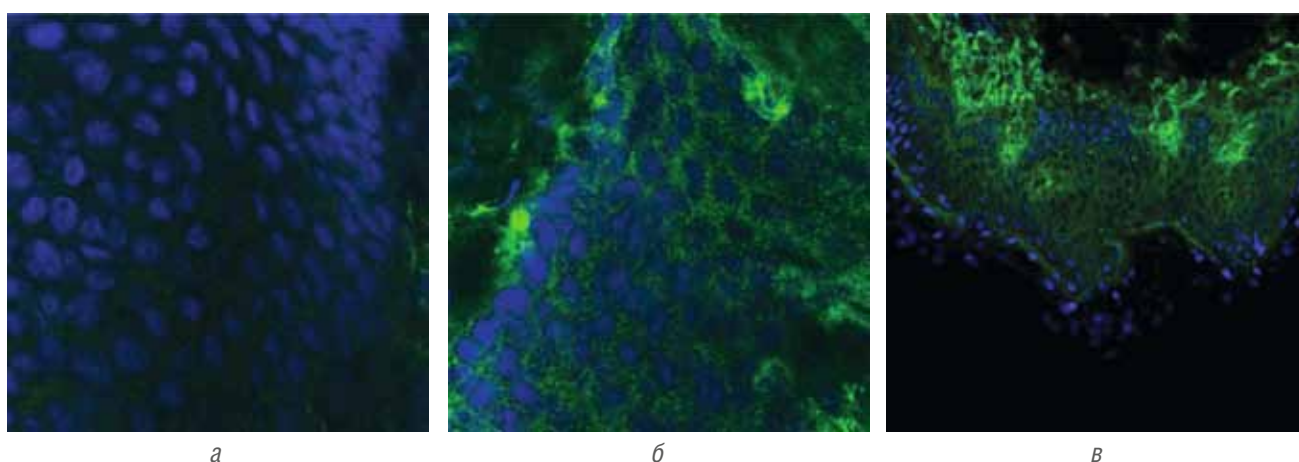


Рис. 2. Экспрессия семафорина-3А (зеленое свечение) в эпидермисе у больного АД до (а) и после (б) наружной терапии 0,1% мазью такролимуса. $\times 600$

Таблица 1 Уровень экспрессии белков факторов роста в коже больных АД (в усл. ед.; $M \pm \sigma$)

| Показатель | Контрольная группа ($n = 25$) | Больные АД ($n = 15$) | |
|---------------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------|
| | | до лечения | после лечения |
| Фактор роста нервов | $485,5 \pm 109,2$ | $683,1 \pm 183,9^*$ | $547,5 \pm 189,9^{**}$ |
| Семафорин-3А | $178,3 \pm 75,3$ | $114,1 \pm 38,6^*$ | $163,3 \pm 33,0^{**}$ |

Примечание. Здесь и в табл. 2: статистически значимые различия: * — между группой больных и контрольной группой; ** — в группе больных до и после лечения.

дермисе больных был статистически ниже, чем в контрольной группе (на 36,0%; $p = 0,02$). Уровень экспрессии амфигулина у больных не отличался от показателя в контрольной группе. После терапии уровень экспрессии фактора роста нервов уменьшился на 19,8%, а уровень экспрессии семафорина-3А увеличился на 43,1%. Различия уровня экспрессии фактора роста нервов и семафорина-3А в эпидермисе больных до и после лечения были статистически значимы ($p = 0,01$; $p = 0,002$ соответственно; см. табл. 1). Уровень экспрессии амфигулина в эпидермисе больных после терапии не подвергался значимой динамике.

Экспрессия белка PGP9.5 наблюдалась на нервных волокнах, присутствующих рядом с потовыми железами, в составе сосудисто-нервных пучков, между гладкомышечными пучками мышцы, поднимающей

волос, и в нервных стволиках, расположенных в дерме. Кроме того, тонкие PGP9.5⁺-нервные волокна располагались в сосочковом слое дермы. У всех больных тонкие PGP9.5⁺-нервные волокна обнаруживались также в эпидермисе (рис. 3).

Обнаружено, что в эпидермисе больных до лечения было достоверно повышено количество PGP9.5⁺-нервных волокон по сравнению с контрольной группой (в 6 раз; $p < 0,001$; табл. 2).

Средняя длина PGP9.5⁺-нервных волокон в эпидермисе больных также была статистически значимо больше (в 2,3 раза), чем в контрольной группе ($p = 0,03$). В эпидермисе больных была также выявлена более высокая средняя интенсивность свечения PGP9.5⁺-нервных волокон — в 1,9 раза по сравнению с контрольной группой ($p = 0,01$).

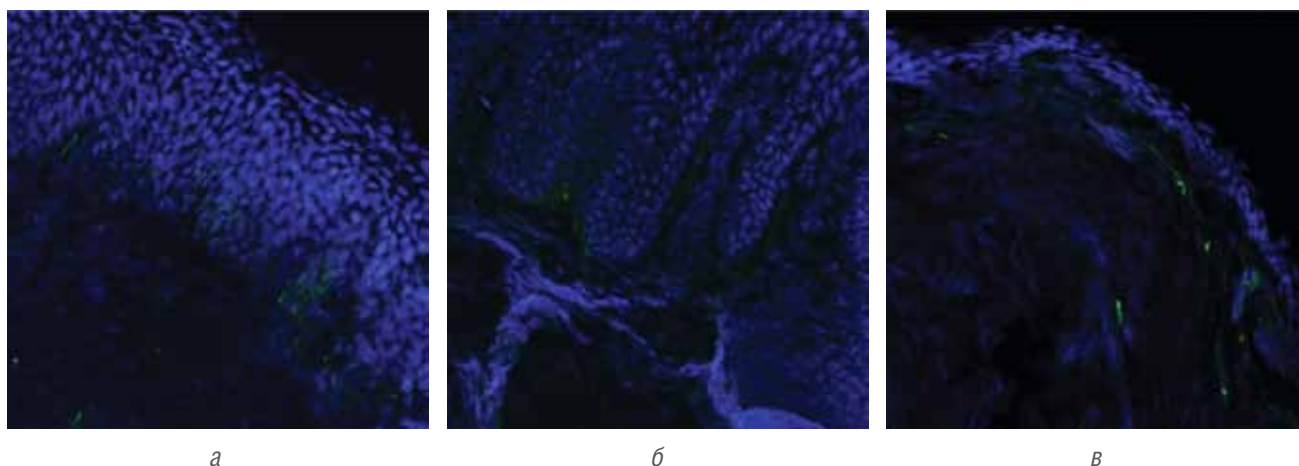


Рис. 3. Нервные волокна (зеленое свечение) в эпидермисе и дерме у больного АД до (а) и после (б) наружной терапии 0,1% мазью такролимуса соответственно. $\times 200$

Таблица 2 Показатели иннервации кожи у больных АД ($M \pm \sigma$)

| Показатель | Контрольная группа ($n = 25$) | Больные АД ($n = 15$) | |
|---|------------------------------------|----------------------------|----------------------|
| | | до лечения | после лечения |
| Количество нервных волокон в эпидермисе | $1,0 \pm 1,8$ | $6,0 \pm 3,4^*$ | $5,5 \pm 4,5^*$ |
| Средняя длина нервных волокон в эпидермисе, нм | $9,1 \pm 14,3$ | $20,9 \pm 8,8^*$ | $17,1 \pm 8,8^{**}$ |
| Средняя интенсивность свечения нервных волокон, усл. ед.: | в эпидермисе | $548,1 \pm 696,0$ | $1033 \pm 361,2^*$ |
| | на границе эпидермиса и дермы | $1146 \pm 515,4$ | $1181 \pm 265,6$ |
| | в дерме | $1267 \pm 267,4$ | $1249 \pm 146,6$ |
| | | | $954 \pm 289,6^{**}$ |

Через 4 нед. наружной терапии 0,1% мазью такролимуса средняя интенсивность свечения PGP9.5⁺-нервных волокон в эпидермисе больных уменьшилась на 27,6% ($p = 0,009$), на границе эпидермиса и дермы — на 20,1% ($p = 0,047$), в дерме — на 23,6% ($p = 0,002$). После лечения достоверно уменьшилась средняя длина PGP9.5⁺-нервных волокон в эпидермисе больных АД — на 18,2% ($p = 0,041$).

Корреляционный анализ показателей у больных АД выявил наличие сильной положительной корреляционной связи между индексом SCORAD и интенсивностью зуда ($r = 0,872$; $p = 0,000$).

Обнаружена положительная корреляционная связь между индексом SCORAD и уровнем экспрессии в эпидермисе фактора роста нервов ($r = 0,568$; $p = 0,027$), отрицательная корреляционная связь между индексом SCORAD и уровнем экспрессии в эпидермисе семафорина-3А ($r = -0,597$; $p = 0,019$). Корреляций между индексом SCORAD и уровнем экспрессии амфигулина в эпидермисе не обнаружено.

Выявлена положительная корреляционная связь интенсивности зуда с уровнем экспрессии в эпидермисе фактора роста нервов ($r = 0,756$; $p = 0,001$). Установлена отрицательная корреляционная связь между интенсивностью зуда и уровнем экспрессии в эпидермисе фактора редукции нервов семафорина-3А ($r = -0,716$; $p = 0,002$). Корреляций между интенсивностью зуда и уровнем экспрессии амфигулина в эпидермисе не обнаружено.

Установлена положительная корреляционная связь между интенсивностью зуда и количеством PGP9.5⁺-нервных волокон в эпидермисе ($r = 0,611$; $p = 0,015$); длиной PGP9.5⁺-нервных волокон в эпидермисе ($r = 0,883$; $p = 0,000$) и средней интенсивностью свечения PGP9.5⁺-нервных волокон в эпидермисе ($r = 0,756$; $p = 0,001$).

Выявлена положительная корреляционная связь между уровнем экспрессии фактора роста нервов в эпидермисе и количеством ($r = 0,575$; $p = 0,025$), средней длиной ($r = 0,711$; $p = 0,003$) и средней интенсивностью свечения PGP9.5⁺-нервных волокон ($r = 0,532$; $p = 0,041$). Отрицательная корреляционная связь обнаружена между уровнем экспрессии в эпидермисе семафорина-3А и количеством ($r = -0,564$; $p = 0,028$), средней длиной ($r = -0,589$; $p = 0,021$), средней интенсивностью свечения PGP9.5⁺-нервных волокон в эпидермисе ($r = -0,589$; $p = 0,021$).

Обсуждение

Установлено, что наружная терапия больных АД 0,1% мазью такролимуса приводит не только к снижению тяжести поражения кожи, но и к уменьшению интенсивности зуда. М. Tomiyama и К. Takatori указывают, что интенсивность зуда у больных АД связана с выраженностью иннервации эпидермиса [35]. Выявленные нами у больных повышенные показатели

количества, средней длины и средней интенсивности свечения PGP9.5⁺-нервных волокон в эпидермисе подтверждают данные о значительной выраженности иннервации эпидермиса при АД.

В литературе имеются данные о различном влиянии такролимуса на нервную ткань. Развитие после перорального приема такролимуса периферической полинейропатии, проявлявшейся парестезиями и ощущением жжения, свидетельствует о его нейротоксическом действии [60—62]. В то же время в экспериментах были выявлены нейропротективные и нейротрофные свойства такролимуса, который повышал скорость регенерации нервной ткани *in vitro* и *in vivo* [63—69]. Считается, что развитие нейротрофного эффекта такролимуса не связано с ингибированием кальциневрина [69—71]. R. Price и соавт. (2003) отмечают, что такролимус не оказывает влияния на рост нервных волокон, но усиливает нейротрофное действие фактора роста нервов [70]. Показано, что такролимус способствует восстановлению поврежденных периферических нервов, действуя синергично с фактором роста нервов [66, 70, 72, 73].

Однако нами не был выявлен нейротрофный эффект такролимуса, и после терапии 0,1% мазью такролимуса у больных АД вместе со снижением интенсивности зуда показатели иннервации эпидермиса — средняя длина и средняя интенсивность свечения PGP9.5⁺-нервных волокон — также уменьшились. Отсутствие нейротрофного эффекта после наружной терапии может быть связано со снижением уровня экспрессии фактора роста нервов, в присутствии которого проявляется нейротрофный эффект такролимуса.

Известно, что фактор роста нервов усиливает пролиферацию Т-лимфоцитов, способствует выделению тучными клетками ИЛ-3, -4, -10, ФНО- α , ИФН- γ , в связи с чем он оказывает провоспалительное действие [74—77]. Поэтому выявленное нами снижение экспрессии фактора роста нервов в эпидермисе больных АД может способствовать подавлению воспалительной реакции за счет уменьшения выраженности лимфоцитарной инфильтрации дермы и снижения продукции воспалительных цитокинов.

Кроме того, после терапии в эпидермисе больных АД повысился уровень экспрессии семафорина-3А, действие которого приводит к уменьшению выраженности иннервации [48]. Показано, что семафорин-3А способствует также уменьшению толщины эпидермиса и явлений акантоза, выраженности воспалительного инфильтрата, включающего CD4-Т-лимфоциты, эозинофилы и тучные клетки, снижению продукции ИЛ-4 клетками инфильтрата [78, 79]. В связи с этим выявленное после лечения повышение уровня экспрессии семафорина-3А в эпидермисе может способствовать подавлению воспалительной реакции в коже.

Нами было также обнаружено, что выявленная у больных АД повышенная средняя интенсивность свечения PGP9.5⁺-нервных волокон в эпидермисе уменьшилась после терапии 0,1% мазью такролимуса. Белок PGP9.5 представляет собой фермент убиквитин-С-терминальную гидролазу-1L, которая участвует в регуляции деятельности системы убиквитин-протеасом, играющей ключевую роль в контроле клеточного цикла [80–82]. Убиквитин-С-терминальная гидролаза-1L усиливает действие циклинзависимых киназ — основных ферментов, регулирующих процессы клеточного цикла и деления клеток, вследствие чего она способствует повышению пролиферации клеток [83]. Поэтому повышенный у больных АД показатель средней интенсивности свечения PGP9.5⁺-нервных волокон в эпидермисе может быть следствием активизации их роста.

Показано, что недостаток или снижение функции убиквитин-С-терминальной гидролазы-1L (белка PGP9.5) приводит к дегенеративным изменениям нейронов [84, 85]. Предполагается, что с уровнем экспрессии этого белка может быть связана ожидаемая продолжительность жизни нейрона, а наступающее в условиях недостатка убиквитин-С-терминальной гидролазы-1L (белка PGP9.5) снижение функции протеасом может привести к гибели нейрона [86, 87]. Поэтому выявленное нами уменьшение среднего свечения PGP9.5⁺-нервных волокон может ассоциироваться с развитием в них дегенеративных процессов, приводящих к уменьшению выраженности иннервации.

Заключение

Таким образом, такролимус в форме 0,1% мази является эффективным средством терапии больных АД, способным уменьшать интенсивность зуда. Наблюдавшееся у больных снижение интенсивности зуда может быть связано с уменьшением выраженности иннервации эпидермиса, характеризующимся уменьшением средней длины и средней интенсивности свечения PGP9.5⁺-нервных волокон. Выявленная положительная корреляционная связь интенсивности зуда у больных АД с количеством, средней длиной и средней интенсивностью свечения PGP9.5⁺-нервных волокон подтверждает значение выраженности иннервации эпидермиса в развитии зуда. Снижению выраженности иннервации эпидермиса и уменьшению интенсивности зуда могли способствовать снижение уровня экспрессии в эпидермисе фактора роста нервов и повышение уровня экспрессии семафорина-3А. Это подтверждают выявленные положительные корреляционные связи уровня экспрессии в эпидермисе больных АД фактора роста нервов с интенсивностью зуда и показателями иннервации эпидермиса — количеством, средней длиной и средней интенсивностью свечения PGP9.5⁺-нервных волокон, а также обнаруженные отрицательные корреляционные связи уровня экспрессии в эпидермисе семафорина-3А с интенсивностью зуда, а также с количеством, средней длиной и средней интенсивностью свечения PGP9.5⁺-нервных волокон в эпидермисе. ■

Литература

- Metz M., Wahn U., Gieler U. et al. Chronic pruritus associated with dermatologic disease in infancy and childhood: Update from an interdisciplinary group of dermatologists and pediatricians. *Pediatr Allergy Immunol* 2013; 24: 527—539.
- Nedoszytko B., Sokołowska-Wojdyło M., Ruckermann-Dziurdzinska K. et al. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. *Postepy Dermatol Alergol* 2014; 31 (2): 84—91.
- Brandt E.B., Sivaprasad U. Th2 cytokines and atopic dermatitis. *J Clin Cell Immunol* 2011; 2 (3): pii: 110.
- Rahman S., Collins M., Williams C.M., Ma H.L. The pathology and immunology of atopic dermatitis. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2011; 10 (6): 486—496.
- Grewe M., Gyufko K., Schopf E., Krutmann J. Lesional expression of interferon-gamma in atopic eczema. *Lancet* 1994; 343: 25—26.
- Trautmann A., Akdis M., Kleemann D. et al. T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J Clin Invest* 2000; 106: 25—35.
- Breuer K., Werfel T., Kapp A. Safety and efficacy of topical calcineurin inhibitors in the treatment of childhood atopic dermatitis. *Am J Clin Dermatol* 2005; 6: 65—77.
- El-Batawy M.M., Bosseila M.A., Mashaly H.M., Hafez V.S. Topical calcineurin inhibitors in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *J Dermatol Sci* 2009; 54: 76—87.
- Ashcroft D.M., Dimmock P., Garside R. et al. Efficacy and tolerability of topical pimecrolimus and tacrolimus in the treatment of atopic dermatitis: meta-analysis of randomized controlled trials. *BMJ* 2005; 330 (7490): 516.
- Gutfreund K., Bienias W., Szewczyk A., Kaszuba A. Topical calcineurin inhibitors in dermatology. Part I: properties, method and effectiveness of drug use. *Postep Derm Allergol* 2013; 3: 165—169.
- Ho S., Clipstone N., Timmermann L. et al. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 80 (3 Pt 2): S40—45.
- Schreiber S.L., Crabtree G.R. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 1992; 13 (4): 136—142.
- Liu J., Farmer J.D. Jr, Lane W.S. et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP506 complexes. *Cell* 1991; 66: 807—815.
- Nghiem P., Pearson G., Langley R.G. Tacrolimus and pimecrolimus: from clever prokaryotes to inhibiting calcineurin and treating atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46: 228—241.
- Proshutinskaya D.V., Butareva M.M., Inoyatova L.A. New potential of the treatment of atopic dermatitis in children and adults. *Vestn Dermatol Venerol* 2013; (3): 78—82. [Прошутинская Д.В., Бутарева М.М., Иноятова Л.А. Новые возможности терапии атопического дерматита у детей и взрослых. *Вестн дерматол венерол* 2013; (3): 78—82.]
- Sokolovsky E.V., Monahov K.V., Aksеноva O.I. Efficiency and tolerability of 0,1% tacrolimus ointment in the treatment of patients with moderate atopic dermatitis. Effect of the medication on the skin microcirculation. *Vestn Dermatol Venerol* 2012; (4): 85—89. [Соколовский Е.В., Монахов К.В., Аксенова О.И. Эффективность и переносимость 0,1% мази такролимуса при лечении больных атопическим дерматитом средней тяжести. Влияние препарата на микроциркуляцию в коже. *Вестн дерматол венерол* 2012; (4): 85—89.]

17. Belousova T.A., Paramonov A.A., Goryachkina M.V. Naruzhnaya terapiya atopicheskogo dermatita: fokus na takrolimus. Poliklinika 2014; 4: 98—102. [Белуцова Т.А., Парамонов А.А., Горячкина М.В. Наружная терапия atopического дерматита: фокус на такролимус. Поликлиника 2014; 4: 98—102.]
18. Samtsov A.V., Sukharev A.V., Patrushev A.V. Treatment of atopic dermatitis: advantages of using tacrolimus compared to topical glucocorticosteroids. Effective Pharmacotherapy. Dermatovenerology and Dermatocosmetology. 2014; 19. (2): 4—10. [Самцов А.В., Сухарев А.В., Патрушев А.В. Лечение atopического дерматита: преимущества такролимуса перед топическими глюкокортикостероидами. Эффективная фармакотерапия. Дерматовенерология и косметология 2014; 19 (2): 4—10.]
19. Kochergin N.G. Tacrolimus in dermatological practice. Effective Pharmacotherapy. Dermatovenerology and Dermatocosmetology 2013; 25 (2): 30—33. [Кочергин Н.Г. Такролимус в практике врача-дерматолога. Эффективная фармакотерапия. Дерматовенерология и косметология 2013; 25 (2): 30—33.]
20. Samtsov A.V., Sukharev A.V., Patrushev A.V., Bondar O.I. Clinical efficacy, safety and tolerance of 0.1% Tacrolimus ointment in the treatment of atopic dermatitis in the moderate and severe forms. Vestn Dermatol Venerol 2012; (2): 71—77. [Самцов А.В., Сухарев А.В., Патрушев А.А., Бондарь О.И. Клиническая эффективность, безопасность и переносимость 0,1% мази такролимуса при лечении atopического дерматита средней и тяжелой степени тяжести. Вестн дерматол венерол 2012; (2): 71—77.]
21. Bakulev A.L., Kravchenya S.S. Efficacy of the topical therapy with Tacrolimus in case of atopic dermatitis in adults. Vestn Dermatol Venerol 2012; (5): 106—111. [Бакулев А.Л., Кравченко С.С. Эффективность топической терапии такролимусом при atopическом дерматите у взрослых. Вестн дерматол венерол 2012; (5): 106—111.]
22. Hanifin J.M., Ling M.R., Langley R. et al. Tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in adult patients: part I, efficacy. J Am Acad Dermatol 2001; 44 (1 Suppl): S28—38.
23. Paller A., Eichenfield L.F., Leung D.Y. et al. A 12-week study of tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in pediatric patients. J Am Acad Dermatol 2001; 44 (1 Suppl): S47—57.
24. Reitamo S., Rustin M., Harper J. et al. A 4-year follow-up study of atopic dermatitis therapy with 0.1% tacrolimus ointment in children and adult patients. Br J Dermatol 2008; 159: 942—951.
25. Boguniewicz M., Fiedler V.C., Raimer S. et al. A randomized, vehicle-controlled trial of tacrolimus ointment for treatment of atopic dermatitis in children: pediatric tacrolimus study group. J Allergy Clin Immunol 1998; 102: 637—644.
26. Nakagawa H., Etoh T., Ishibashi Y. et al. Tacrolimus ointment for atopic dermatitis. Lancet. 1994; 344 (8926): 883.
27. Pereira U., Boulais N., Lebonvallet N. et al. Mechanisms of the sensory effects of tacrolimus on the skin. Br J Dermatol 2010; 163 (1): 70—77.
28. Stander S., Luger T. Antipruritische Wirkung von Pimecrolimus und Tacrolimus. Hautarzt 2003; 54: 413—417.
29. Ring J., Alomar A., Bieber T. et al. Guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis). Part I. J Eur Acad Dermatol Venereol 2012; 26: 1045—1060.
30. Simon D., Vassina E., Yousefi S. et al. Reduced dermal infiltration of cytokine-expressing inflammatory cells in atopic dermatitis after short-term topical tacrolimus treatment. J Allergy Clin Immunol 2004; 114: 887—895.
31. Reynolds N.J., Al-Daraji W.I. Calcineurin-inhibitors and sirolimus: mechanisms of action and application in dermatology. Clin Exp Dermatol 2002; 27: 555—561.
32. Caproni M., Torchia D., Antiga E. et al. The comparative effects of tacrolimus and hydrocortisone in adult atopic dermatitis: an immunohistochemical study. Br J Dermatol 2007; 156: 312—319.
33. Park C.W., Lee B.H., Han H.J. et al. Tacrolimus decreases the expression of eotaxin, CCR3, RANTES and interleukin-5 in atopic dermatitis. Br J Dermatol 2005; 152: 1173—1181.
34. Tominaga M., Tengara S., Kamo A., et al. Psoralen ultraviolet A therapy alters epidermal Sema3A and NGF levels and modulates epidermal innervation in atopic dermatitis. J Dermatol Sci 2009; 55: 40—46.
35. Tominaga M., Takamori K. Itch and nerve fibers with special reference to atopic dermatitis: Therapeutic implications. J Dermatol 2014; 41: 205—212.
36. Tominaga M., Takamori K. An update on peripheral mechanisms and treatments of itch. Biol Pharm Bull 2013; 36 (8): 1241—1247.
37. Albers K.M., Wright D.E., Davis B.M. Overexpression of nerve growth factor in epidermis of transgenic mice causes hypertrophy of the peripheral nervous system. J Neurosci 1994; 14: 1422—1432.
38. Crowley C., Spencer S.D., Nishimura M.C. et al. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. Cell 1994; 76: 1001—1011.
39. Nilsson A., Kanje M. Amphiregulin acts as an autocrine survival factor for adult sensory neurons. Neuroreport 2005; 16: 213—218.
40. Kim H., Caspar T.W., Shah S.B., Hsieh A.H. Effects of proinflammatory cytokines on axonal outgrowth from adult rat lumbar dorsal root ganglia using a novel three-dimensional culture system. Spine J 2015; 15 (8): 1823—1831.
41. Matsumura S., Terao M., Murota H., Katayama I. Th2 cytokines enhance TrkA expression, upregulate proliferation, and downregulate differentiation of keratinocytes. J Dermatol Sci 2015; 78 (3): 215—223.
42. Takahashi H., Tsuji H., Hashimoto Y. et al. Cell proliferation and cytokine induction by TNF-alpha of psoriatic keratinocytes are different from normal keratinocytes in vitro. Indian J Dermatol 2009; 54 (3): 237—239.
43. Cook P.W., Piepkorn M., Clegg C.H. et al. Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces a psoriasis-like phenotype. J Clin Invest 1997; 100 (9): 2286—2294.
44. Cook P.W., Brown J.R., Cornell K.A., Pittelkow M.R. Suprabasal expression of human amphiregulin in the epidermis of transgenic mice induces a severe, early-onset, psoriasis-like skin pathology: expression of amphiregulin in the basal epidermis is also associated with synovitis. Exp Dermatol 2004; 13 (6): 347—356.
45. Pastore S., Mascia F., Mariani V., Girolomoni G. The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. J Invest Dermatol 2008; 128 (6): 1365—1374.
46. Berasain C., Avila M.A. Amphiregulin. Semin Cell Dev Biol 2014; 28: 31—41.
47. Yamane S., Ishida S., Hanamoto Y. et al. Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients. J Inflamm (Lond) 2008; 5: 5.
48. Dontchev V.D., Letourneau P.C. Nerve growth factor and semaphorin 3A signaling pathways interact in regulating sensory neuronal growth cone motility. J Neurosci 2002; 22 (15): 6659—6669.
49. Tominaga M., Kamo A., Tengara S. et al. In vitro model for penetration of sensory nerve fibres on a Matrigel basement membrane: implications for possible application to intractable pruritus. Br J Dermatol 2009; 161 (5): 1028—1037.
50. Taneda K., Tominaga M., Negi O. et al. Evaluation of epidermal nerve density and opioid receptor levels in psoriatic itch. Br J Dermatol 2011; 165 (2): 277—284.
51. Fujisawa H. Discovery of semaphoring receptors, neuropilin and plexin, and their functions in neural development. J Neurobiol 2004; 59: 24—33.
52. Sakai T., Takahashi D., Nikaido K. et al. Co-stimulation with interleukin-4 and tumor necrosis factor-alpha increases epidermal innervation accompanied by suppression of semaphorin 3A. J Dermatol Sci 2014; 76 (1): 69—71.
53. Katunina O.R., Chikin V.V., Znamenskaya L.F., Inoyatova L.A. Role of neuromediators in the development of skin irritation in patients with atopic dermatitis. Vestnik Dermatologii i Venerologii 2013; (5): 91—101. [Катунина О.Р., Чикин В.В., Знаменская Л.Ф., Иноятובה Л.А. Роль нейромедиаторов в развитии воспаления в коже больных atopическим дерматитом. Вестник дерматологии и венерологии 2013; (5): 91—101.]
54. Jackson P., Thomson V.M., Thompson R.J. A comparison of the evolutionary distribution of the two neuroendocrine markers, neurone-specific enolase and protein gene product 9.5. J Neurochem 1985; 45: 185—190.
55. Day I.N., Thompson R.J. Molecular cloning of cDNA coding for human PGP 9.5 protein. A novel cytoplasmic marker for neurones and neuroendocrine cells. FEBS Lett 1987; 210: 157—160.
56. Wilkinson K.D., Lee K.M., Deshpande S. et al. The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. Science 1989; 246: 670—673.

57. Day I.N. Enolases and PGP9.5 as tissue-specific markers. *Biochem Soc Trans* 1992; 20: 637—642.
58. Day I.N., Thompson R.J. UCHL1 (PGP 9.5): neuronal biomarker and ubiquitin system protein. *Prog Neurobiol* 2010; 90: 327—362.
59. Wilson P.O., Barber P.C., Hamid Q.A. et al. The immunolocalization of protein gene product 9.5 using rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies. *Br J Exp Pathol* 1988; 69 (1): 91—104.
60. Wilson J.R., Conwit R.A., Eidelman B.H. et al. Sensorimotor neuropathy resembling CIDP in patients receiving FK506. *Muscle Nerve* 1994; 17: 528—532.
61. Bronster D.J., Yonover P., Stein J. et al. Demyelinating sensorimotor polyneuropathy after administration of FK506. *Transplantation* 1995; 59: 1066—1088.
62. Echaniz-Laguna A., Battaglia F., Ellero B. et al. Chronic ionflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy in patients with liver transplantation. *Muscle Nerve* 2004; 30: 501—504.
63. Hontanilla B., Auba C., Arcocha J., Gorria O. Nerve regeneration through nerve autografts and cold preserved allografts using tacrolimus (FK506) in a facial paralysis model: A topographical and neurophysiological study in monkeys. *Neurosurgery* 2006; 58: 768—779.
64. Lee M., Doolabh B., Mackinnon S.E., Jost S. FK 506 promotes functional recovery in crushed rat sciatic nerve. *Muscle Nerve* 2000; 23: 633—640.
65. Rustemeyer J., Krajacic A., Dicke U. Histomorphological and functional impacts of postoperative motor training in rats after allograft sciatic nerve transplantation under low-dose FK 506. *Muscle Nerve* 2009; 39: 480—488.
66. Jifeng H., Dezhong L., Qiongjiao Y. et al. Evaluation of PRGD/FK506/NGF conduits for peripheral nerve regeneration in rats. *Neurol India* 2010; 58: 384—391.
67. Gold B.G. FK506 and the role of immunophilins in nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 1997; 15 (3): 285—306.
68. Kano Y., Hiragami F., Kawamura K. et al. Immunosuppressant FK506 induces sustained activation of MAP kinase and promotes neurite outgrowth in PC12 mutant cells incapable of differentiating. *Cell Struct Funct* 2002; 27 (5): 393—398.
69. Tanaka K., Fujita N., Higashi Y., Ogawa N. Neuroprotective and antioxidant properties of FKBP-binding immunophilin ligands are independent of the FKBP12 pathway in human cells. *Neurosci Lett* 2002; 330: 147—150.
70. Price R.D., Yamaji T., Matsuoka N. FK506 potentiates NGF-induced neurite outgrowth via the Ras/Raf/MAP kinase pathway. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 825—829.
71. Klettner A., Baumgrass R., Zhang Y. et al. The neuroprotective actions of FK506 binding protein ligands: neuronal survival is triggered by de novo RNA synthesis, but is independent of inhibition of JNK and calcineurin. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 97 (1): 21—31.
72. Lyons W.E., George E.B., Dawson T.M. et al. Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3191—3195.
73. Chen G., Zhang Z., Wang S., Lv D. Combined treatment with FK506 and nerve growth factor for spinal cord injury in rats. 2013; 6: 868—872.
74. Bullock E.D., Johnson E.M. Jr. Nerve growth factor induces the expression of certain cytokine genes and bcl-2 in mast cells. Potential role in survival promotion. *J Biol Chem* 1996; 271 (44): 27500—27508.
75. Kawamoto K., Aoki J., Tanaka A. et al. Nerve growth factor activates mast cells through the collaborative interaction with lysophosphatidylserine expressed on the membrane surface of activated platelets. *J Immunol* 2002; 168 (12): 6412—6419.
76. Thorpe L.W., Perez-Polo J.R. The influence of nerve growth factor on the in vitro proliferative response of rat spleen lymphocytes. *J Neurosci Res* 1987; 18 (1): 134—139.
77. Otten U., Ehrhard P., Peck R. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86 (24): 10059—10063.
78. Yamaguchi J., Nakamura F., Aihara M. et al. Semaphorin3A alleviates skin lesions and scratching behavior in NC/Nga mice, an atopic dermatitis model. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2842—2849.
79. Negi O., Tominaga M., Tengara S. et al. Topically applied semaphorin 3A ointment inhibits scratching behavior and improves skin inflammation in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 2012; 66 (1): 37—43.
80. Liu Y., Fallon L., Lashuel H.A. et al. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 2002; 111 (2): 209—218.
81. Hershko A., Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425—479.
82. Wilkinson K.D. Roles of ubiquitinylation in proteolysis and cellular regulation. *Ann Rev Nutr* 1995; 15: 161—189.
83. Kabuta T., Mitsui T., Takahashi M. et al. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) acts as a novel potentiator of cyclin-dependent kinases to enhance cell proliferation independently of its hydrolase activity. *J Biol Chem* 2013; 288: 18: 1475—1478.
84. Proctor C.J., Tangeman P.J., Ardley H.C. Modeling the role of UCH-L1 on protein aggregation in age-related neurodegeneration. *PLoS ONE* 2010; 5 (10): e13175.
85. Setsuie R., Wada K. The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases. *Neurochem Int* 2007; 51 (2—4): 105—111.
86. Lombardino A.J., Li X.-C., Hertel M., Nottebohm F. Replaceable neurons and neurodegenerative disease share depressed UCHL1 levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 (22): 8036—8041.
87. Jara J.H., Frank D.D., Ozdinler P.H. Could dysregulation of UPS be a common underlying mechanism for cancer and neurodegeneration? Lessons from UCHL1. 2013; 67 (1): 45—53.

об авторах: ▶

В.В. Чикин — к.м.н., старший научный сотрудник отдела дерматологии ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

В.А. Смольяникова — д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

Д.В. Прошутинская — д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела дерматологии ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

М.А. Нефедова — врач-патологоанатом патоморфологической лаборатории ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье