

О роли профиброзных цитокинов в патогенезе локализованной склеродермии

В.А. Волнухин, Н.Л. Мурадян, О.Р. Катунина

On the role of pro-fibrous cytokines in the pathogenesis of localized scleroderma

V.A. VOLNUKHIN, N.L. MURADYAN, O.R. KATUNINA

об авторах:

В.А. Волнухин — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник отделения по разработке физиотерапевтических методов лечения, ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», Москва
 Н.Л. Мурадян — к.м.н., врач-дерматовенеролог отделения физиотерапии ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития РФ
 О.Р. Катунина — к.м.н., заведующая лабораторией патоморфологии ФГБУ «ГНЦДК» Минздравсоцразвития России, Москва

У 10 больных локализованной склеродермией и 10 здоровых добровольцев иммуногистохимическим методом исследовано содержание и распределение в коже трансформирующего фактора роста β_1 (TGF- β_1), рецептора I типа трансформирующего фактора роста β (TGF- β RI) и α -рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR- α), являющихся одними из ключевых медиаторов формирования фиброза. В дерме пораженной кожи больных обнаружено пониженное по сравнению с контрольной группой содержание TGF- β_1 + клеток ($p = 0,007$) и повышенное количество TGF- β RI+ ($p = 0,001$) и PDGFR- α + ($p < 0,001$) клеток. Пониженное количество TGF- β_1 в очагах поражения, по всей видимости, обусловлено уменьшением его продукции клетками, участвующими в иммунном воспалении. Повышенная экспрессия в очагах ограниченной склеродермии рецепторов TGF- β RI ($p = 0,001$) и PDGFR- α свидетельствует об их важной роли в патогенезе заболевания и активации процессов формирования фиброза в коже.

Ключевые слова: **локализованная склеродермия, трансформирующий фактор роста β_1 , рецептор I типа трансформирующего фактора роста β , α -рецептор тромбоцитарного фактора роста, иммуногистохимические исследования кожи.**

The content and skin distribution of the transforming growth factor β_1 (TGF- β_1), transforming growth factor- β receptor type I receptor (TGF- β RI) and platelet-derived growth factor receptor α (PDGFR- α), which are key fibrosis mediators, were examined in ten patients with localized scleroderma and ten healthy volunteers by using the immunohistochemistry method. A reduced derma concentration of TGF- β_1 + cells ($p = 0.007$) and increased amount of TGF- β RI+ ($p = 0.001$) and PDGFR- α + ($p < 0.001$) cells was discovered in the patients vs. the control group. The reduced amount of TGF- β_1 in the affected loci can be apparently explained by its reduced production by cells taking part in the immune inflammation. Increased expression of TGF- β RI receptors ($p = 0.001$) and PDGFR- α in the foci of localized scleroderma confirms their important role in the pathogenesis of the disease and activation of the fibrosis process in the skin.

Key words: **localized scleroderma, transforming growth factor β_1 , transforming growth factor- β receptor type I receptor, platelet-derived growth factor receptor α , immunohistochemistry of the skin.**

Многие аспекты патогенеза локализованной склеродермии до сих пор остаются невыясненными. Важной характерной чертой заболевания является развитие склеротических изменений в коже, в основе которых лежит нарушение процессов фиброгенеза. В результате повышенной активации фибробластов в коже и подлежащих тканях происходит избыточное

отложение компонентов экстрацеллюлярного матрикса, в том числе коллагена.

Известно, что в формировании фиброза активное участие принимают различные цитокины и ростовые факторы [1—3]. К ключевым медиаторам фиброгенеза относятся трансформирующий фактор роста β_1 (TGF- β_1) и тромбоцитарный фактор роста (PDGF).

TGF- β_1 способствует дифференцировке миофибробластов и формированию фиброгенного фенотипа фибробластов, регулирует образование PDGF, стимулирует синтез компонентов межклеточного матрикса, в том числе коллагена и фибронектина [4—7]. PDGF является сильным митогеном гиперпластического роста фибробластов и участвует в стимуляции их пролиферации и миграции [8—10].

Вопрос о роли этих ростовых факторов в патогенезе локализованной склеродермии до настоящего времени остается нерешенным. Данные литературы о состоянии TGF- β_1 в очагах локализованной склеродермии имеют противоречивый характер. В одних исследованиях обнаружена значительная [11—13] или слабая [14—15] экспрессия цитокина в коже, в других его экспрессия не отличалась от таковой в здоровой коже [16] или отсутствовала [17]. Однако в большинстве указанных работ исследования были выполнены у небольшого числа больных без статистической обработки данных.

Известно, что биологические эффекты TGF- β и PDGF опосредуются активацией клеточных рецепторов, высокоаффинных к этим факторам. В коже человека экспрессируются три изоформы TGF- β : TGF- β_1 , TGF- β_2 и TGF- β_3 , к которым существует три типа рецепторов: TGF- β I типа, TGF- β II типа и TGF- β III типа. Тромбоцитарный фактор роста встречается в трех изоформах: AA, BB и AB, которые различаются по функциональным свойствам. К этим изоформам имеются два типа рецептора: α (A-тип) и β (B-тип). Состояние указанных рецепторов в коже больных локализованной склеродермией практически не изучено.

Целью настоящей работы явилось исследование иммуногистохимическим методом содержания и распределения в дерме пораженной кожи больных локализованной склеродермией трансформирующего фактора роста β_1 (TGF- β_1), рецепторов I типа трансформирующего фактора роста β (TGF- β RI) и α -рецепторов тромбоцитарного фактора роста (PDGFR- α).

Материал и методы

Материалом для исследования служили иммуногистохимические препараты кожи 10 больных бляшеч-

ной формой локализованной склеродермии (4 мужчины и 6 женщин) в возрасте от 23 до 57 лет и длительностью болезни от 5 мес. до 17 лет (см. табл.). У всех больных очаги склеродермии находились в стадии эритемы и индукции кожи. При анализе клинических проявлений в очагах склеродермии определяли площадь индукции кожи (в см²), а также интенсивность эритемы и индукции кожи, которую выражали в баллах от 0 до 3 (0 баллов — отсутствие клинического признака, 1, 2 и 3 балла — минимальная, средняя и максимальная выраженность признака).

Контрольную группу составили 10 здоровых добровольцев (5 мужчин и 5 женщин) в возрасте от 29 до 64 лет (медиана 45,5 года), у которых образцы кожи для исследования брали при хирургической коррекции косметических дефектов. Группа больных не отличалась по возрасту и полу от группы здоровых добровольцев ($p > 0,05$).

Иммуногистохимические исследования профиброзных цитокинов в коже проводили с использованием антител, специфичных к TGF- β_1 — маркеру трансформирующего фактора роста β_1 («Visionbiosystems novocastra», Великобритания), TGF- β RI — маркеру рецептора I типа трансформирующего фактора роста β_1 («Visionbiosystems novocastra», Великобритания) и PDGFR- α — маркеру α -рецептора тромбоцитарного фактора роста («NeoMarkers Thermo Fisher Scientific», США).

Для визуализации иммуногистохимической реакции применяли стрептавидин-биотинилированные вторичные антитела Novocastra Peroxidase Detection System («Leica Microsystems», Великобритания). Срезы направляли на предметных стеклах с полилизининовым покрытием. Постановку реакции осуществляли согласно протоколам, прилагаемым к используемым моноклональным антителам. Высокотемпературную антигенную демаскировку проводили путем кипячения в цитратном буфере (pH 6,0) в СВЧ-печи при максимальной мощности 900 Вт тремя циклами по 5 мин. с интервалами 1 мин. Остывшие препараты промывали в растворе трис-буфера (pH 7,54—7,58), обрабатывали 0,3% раствором перекиси водорода на метаноле

ТАБЛИЦА
Клиническая характеристика больных (n = 10, медианы и квартили)

Клинический показатель	Группа больных
Возраст, годы	27,5 [23; 57]
Пол (муж./жен.), абс.	4/6
Длительность болезни, мес.	1,5 [5; 17]
Интенсивность эритемы, баллы	1,1 [0,7; 1,4]
Интенсивность индукции, баллы	0,3 [0,1; 1,5]
Площадь индукции, см ²	21,0 [7,0; 96,0]

(1:1) для предотвращения эндогенной пероксидазной активности. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 60 мин. при температуре 23 °С, со вторичными антителами — в течение 30 мин. при температуре 37 °С. Для завершения окрашивания осуществляли фоновое контрастирование биоптатов гематоксилином Майера.

Полученные иммуногистохимические препараты заключали под покровное стекло и изучали с помощью светового микроскопа Leica DM4000B (Германия) при увеличении 100—400, изображение документировали цифровой камерой Leica DFC320 (Германия). Содержание цитокинов в дерме оценивали путем подсчета клеток, меченных указанными антителами, в пяти произвольно выбранных полях зрения, после чего для каждого биоптата рассчитывали среднее значение в одном поле зрения.

Статистический анализ полученных данных проводили с применением пакета прикладных программ SPSS 16 (SPSS, Inc., США). Проверка на нормальность распределения осуществлялась с помощью критерия Шапиро—Уилкса. Описание распределений признаков в выборках представляли в виде медиан и границ интерквартильных отрезков. При сравнении показателей в группах использовали U-критерий Манна—Уитни. Оценка корреляционных связей осуществлялась с помощью коэффициентов ранговой корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

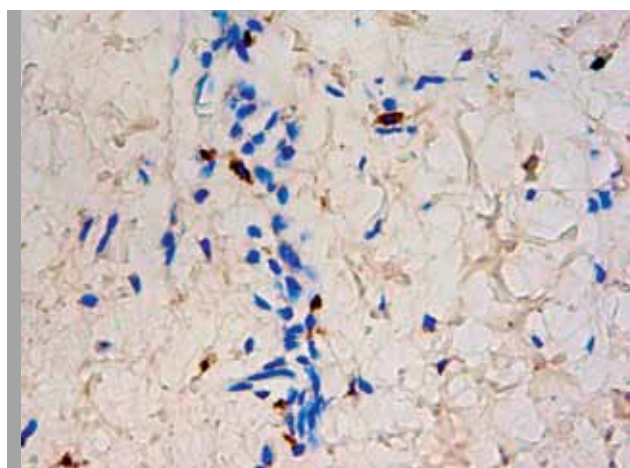
При анализе препаратов кожи в дерме здоровых добровольцев в большинстве случаев выявляли от-

дельные TGF- β_1 + и TGF- β RI+ клетки (рис. 1 а, 2 а), которые локализовались в периваскулярных инфильтратах и вокруг волосяных фолликулов. Умеренно выраженная экспрессия PDGFR- α наблюдалась на клетках эндотелия, эпителия потовых и сальных желез, а также на фибробластах (рис. 3 а).

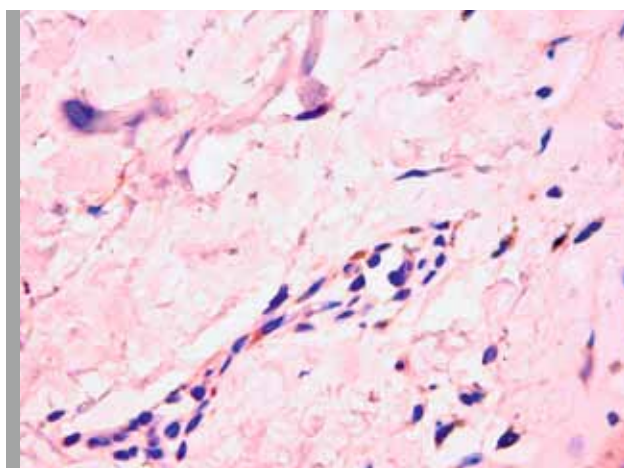
В коже больных экспрессия TGF- β_1 отмечалась в отдельных клетках периваскулярных инфильтратов, а также цитоплазме эпителиоцитов потовых желез (рис. 1 б). Рецепторы TGF- β RI в значительном количестве выявляли на клетках периваскулярных инфильтратов кожи, клетках мышц, поднимающих волос, и сальных желез (рис. 2 б). Рецепторы PDGFR- α обнаруживали в эпителии волосяных фолликулов, потовых и сальных желез, а также в мышцах, поднимающих волос. Экспрессия этих рецепторов наблюдалась также на клетках периваскулярных инфильтратов и фибробластах (рис. 3 б).

При статистическом анализе полученных данных в группе больных установлено пониженное, по сравнению с группой здоровых добровольцев, содержание в дерме пораженной кожи TGF- β_1 + клеток (рис. 4, $p = 0,007$). При анализе экспрессии рецепторов ростовых факторов в коже в группе больных выявлено повышенное количество TGF- β RI+ (в 2,8 раза) и PDGFR- α + клеток (в 1,8 раза, см. рис. 4). Каких-либо корреляционных связей содержания TGF- β_1 , TGF- β RI и PDGFR- α с клиническими показателями не выявлено.

В литературе имеются противоречивые данные о содержании TGF- β_1 в очагах локализованной склеродермии, свидетельствующие как о выраженной экспрессии цитокина в коже [11—13], так и об ее отсутствии [17]. Проведенные нами исследования выявили пониженное



а



б

Рис. 1. Иммуногистохимическая реакция с моноклональными антителами TGF- β_1 ($\times 400$).

Здесь и на рис. 2 и 3: а — дерма здорового добровольца; б — дерма пораженной кожи больного локализованной склеродермией

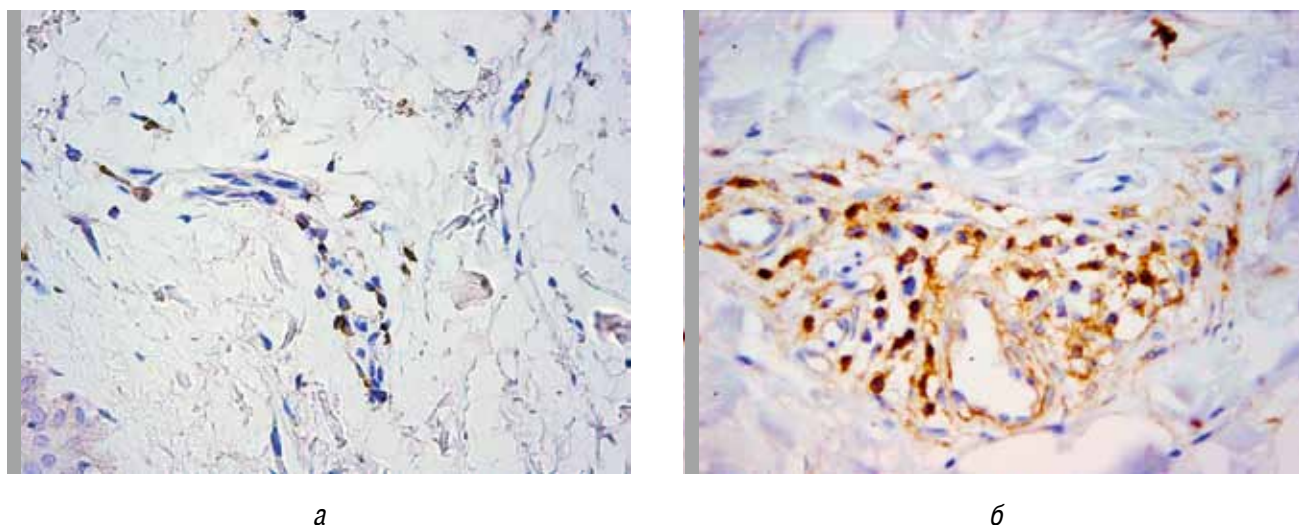


Рис. 2. Иммуногистохимическая реакция с моноклональными антителами TGFRI ($\times 400$)

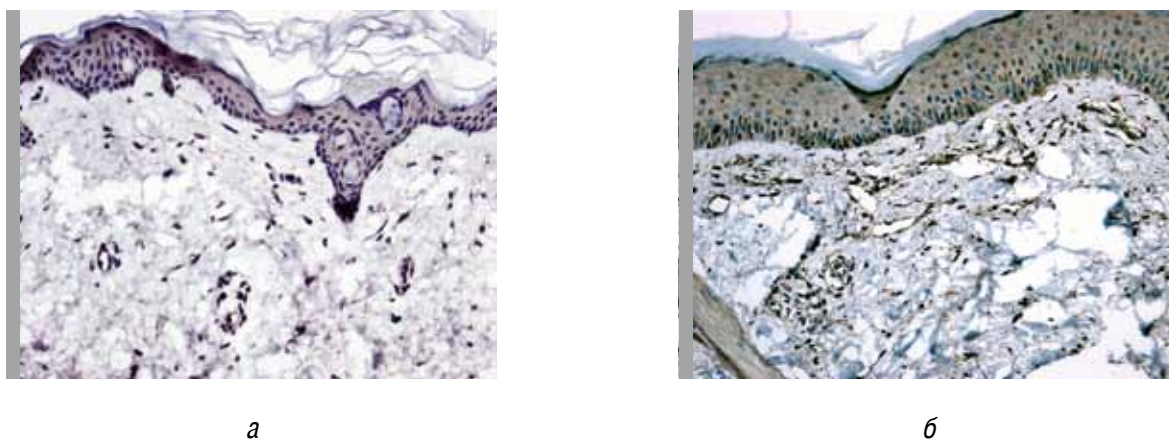


Рис. 3. Иммуногистохимическая реакция с моноклональными антителами PDGFR- α ($\times 400$)

количество TGF- β_1 + клеток в дерме пораженной кожи больных локализованной склеродермией.

Известно, что TGF- β_1 относится к мультифункциональным цитокинам, обладающим широким спектром действия. Он участвует не только в процессах фиброза, но и в реакциях воспаления, ангиогенезе, восстановлении поврежденных тканей [18]. При воздействии на иммунные реакции TGF- β выступает преимущественно в качестве супрессорного фактора, сдерживающего в том числе аутоиммунные процессы [19, 20]. Показано, что он принимает участие в ингибировании гемопоэза, синтеза воспалительных цитокинов, ответа лимфоцитов на интерлейкины 2, 4, 7, подавлении образования цитотоксических NK и T-клеток [21, 22]. Выключение гена TGF- β_1 у экспериментальных животных приводит к развитию фатальной генерализованной воспалительной патологии, в основе которой лежит аутоиммунный процесс.

Поскольку в нашем исследовании проводился подсчет не только фибробластов, а всех клеток в дерме, прореагировавших с моноклональными антителами,

выявленное нами снижение содержания TGF- β_1 в коже больных может быть, по всей видимости, обусловлено уменьшением его продукции клетками, участвующими в иммунном воспалении — макрофагами, эндотелиоцитами, T-лимфоцитами. В отдельных исследованиях у больных системной склеродермией выявлено уменьшение содержания TGF- β_1 в сыворотке крови [23], а также продукции его циркулирующими моноцитами и T-клетками [24, 25].

В ряде работ показано, что одним из основных пулов, синтезирующих данный ростовой фактор, являются Th3 регуляторные клетки [26]. В исследованиях, проведенных в последнее десятилетие, установлено, что TGF- β_1 активно участвует в иммуносупрессивных реакциях, опосредованных регуляторными лимфоцитами [27—29]. T. Radstake и соавт. (2009) обнаружили взаимосвязь снижения супрессорной функции T-регуляторных клеток (Tregs) и недостаточной продукции этого цитокина [30].

Все вышеизложенное позволяет предположить, что выявленное в нашем исследовании пониженное

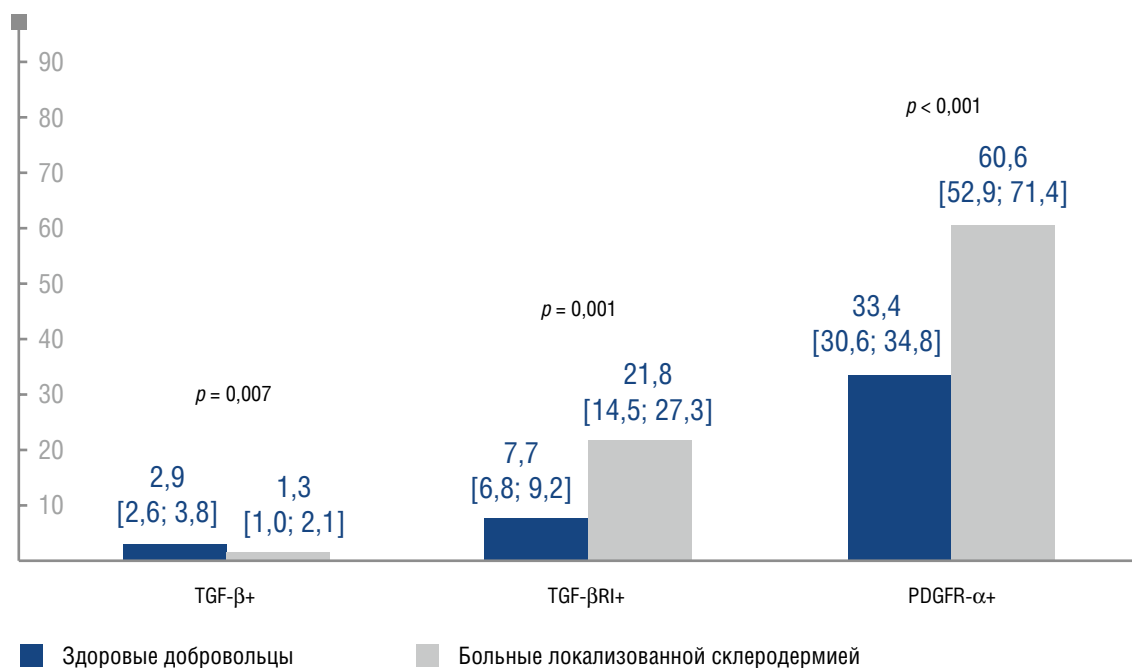


Рис. 4. Содержание TGF-β₊, TGF-βRI₊ и PDGFR-α₊ клеток в коже здоровых добровольцев и больных локализованной склеродермией. Количество клеток в 1 поле зрения; n = 10, медианы и квартили. p — уровень статистической значимости различий при сравнении показателей у здоровых добровольцев и больных (U-критерий Манна — Уитни)

количество TGF-β, в очагах локализованной склеродермии обусловлено уменьшением его продукции Т-клетками. Полученные нами результаты нашли подтверждение в недавно проведенных исследованиях зарубежных коллег, в которых в крови и коже больных локализованной склеродермией установлено пониженное содержание как TGF-β, так и регуляторных Т-лимфоцитов [31].

Состояние рецепторов TGF-β и PDGF в коже больных локализованной склеродермией практически не изучено. В литературе имеется лишь одно сообщение о нарушении содержания рецепторов TGF-β в очагах локализованной склеродермии, в котором методом *in situ* гибридизации обнаружена повышенная экспрессия mRNA TGF-βRI и TGF-βRII [32]. В ряде зарубежных работ показано, что в коже больных системной склеродермией также выявляется повышенная экспрессия рецепторов TGF-β, которая ассоциируется с отложением в коже белков экстрацеллюлярного матрикса и формированием фиброза кожи. Полученные нами данные о почти трехкратном повышении количества TGF-βRI+ клеток в пораженной коже больных локализованной склеродермией согласуются с этими результатами и свидетельствуют о вовлечении рецепторов TGF-βRI в патогенез заболевания.

Работ, посвященных изучению содержания рецепторов PDGF в коже больных локализованной склеродермией, в доступной литературе нам не встретилось. В литературе опубликованы отдельные работы по изу-

чению рецепторов PDGF у больных системной склеродермией. Так, L. Klareskog и соавт. (1990) в пораженной коже больных выявили повышенную экспрессию рецепторов PDGF-B, наблюдавшуюся в сосудах дермы, а также расположенных вблизи них фибробластах, в то время как в коже здоровых добровольцев она отсутствовала [33]. В наибольшей степени экспрессия рецепторов была выражена внутри и вокруг кровеносных сосудов дермы, рядом с которыми располагались периваскулярные инфильтраты, состоявшие из Leu-4+ Т-лимфоцитов и HLA-DR+, RFD7+ активированных макрофагов. Периваскулярные воспалительные клеточные инфильтраты и экспрессия рецепторов PDGF-B наблюдались также в видимо непораженной коже больных. На основании полученных данных авторы делают вывод о том, что выявленные фенотипические изменения в коже могут предшествовать макроскопически наблюдаемым признакам склеродермии.

A. Yamakade и соавт. (1992) исследовали содержание PDGFR-α в культуре фибробластов кожи здоровых добровольцев и больных системной склеродермией в ответ на стимуляцию TGF-β. У здоровых добровольцев TGF-β не влиял на синтез или экспрессию mRNA PDGFR-α, тогда как у больных системной склеродермией после стимуляции их TGF-β наблюдалась повышенная экспрессия рецепторов в дермальных фибробластах [34].

Проведенными нами исследованиями установлено статистически значимое повышение уровня рецепто-

ров PDGFR- α в очагах локализованной склеродермии, что свидетельствует об их участии в механизмах развития заболевания.

Заключение

В пораженной коже больных локализованной склеродермией в отличие от здоровых добровольцев обнаружено пониженное содержание в дерме TGF- β_1 ,

что может быть обусловлено уменьшением его продукции клетками, участвующими в иммунном воспалении.

В очагах локализованной склеродермии на клетках дермы выявлена повышенная экспрессия TGF- β 1 и PDGFR- α , свидетельствующая об их важной роли в патогенезе заболевания и активации процессов формирования фиброза в коже. ■

Литература

- Chen K., See A., Shumack S. Epidemiology and pathogenesis of sclero-derma. *Australas J Dermatol* 2003; 44(1): 1—7.
- Yamamoto T. Scleroderma — pathophysiology. *Eur J Dermatol* 2009; 19 (1): 14—24.
- Badea I., Taylor M., Rosenberg A., Foldvari M. Pathogenesis and therapeutic approaches for improved topical treatment in localized scleroderma and systemic sclerosis. *Rheumatology* 2009; 48(3): 213—221.
- Ignatz R.A., Endo T., Massagué J. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 1987; 262: 14(15): 6443—6446.
- Massagué J. The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 597—641.
- Gay S., Trabant A., Moreland L.W. et al. Growth factors, extracellular matrix and oncogenes in scleroderma. *Arthritis Rheum* 1992; 35; 3: 304—310.
- Wrana J.L., Attisano L., Wiesel R. et al. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature* 1994; 370: 6488: 341—347.
- Bonner J.C. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15(4): 255—273.
- Trojanowska M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology* 2008; 47 (Suppl 5): v2—4.
- Andrae J., Gallini R., Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 2008 22(10): 1276—1312.
- Higley H., Persichitte K., Chu S. et al. Immunocytochemical localization and serologic detection of transforming growth factor beta 1. Association with type I procollagen and inflammatory cell markers in diffuse and limited systemic sclerosis, morphea and Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 2: 278—288.
- Querfeld C., Eckes B., Huerkamp C. et al. Expression TGF- β 1, - β 2 and - β 3 in localized and systemic scleroderma. *J Dermatol Sci* 1999; 21: 13—22.
- Gilmour T.K., Wilkinson B., Breit S.N. et al. Analysis of dendritic cell populations using a revised histological staging of morphea. *Br J Dermatol* 2000; 143(6): 1183—1192.
- Vuorio T., Kähäri V.M., Black C. et al. Expression of osteonectin, decorin and transforming growth factor- β 1 genes in fibroblasts cultured from patients with systemic sclerosis and morphea. *J Rheumatol* 1991; 18(2): 247—251.
- Farrell A.M., Dean D., Charnock M. et al. Distribution of transforming growth factor- β isoforms TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 and vascular endothelial growth factor in vulvar lichen sclerosus. *J Reproductive Medicine* 2001 46; 2: 117—124.
- Restrepo J.F., Guzmán R., Rodríguez G. et al. Expression of transforming growth factor- β and platelet-derived growth factor in linear scleroderma. *Biomédica* 2003; 23: 4: 408—415.
- Oikarinen A., Sandberg M., Hurskainen T. et al. Collagen biosynthesis in lichen sclerosus et atrophicus studied by biochemical and in situ hybridization techniques. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1991; 162:3—12.
- Blobe G.C., Schiemann W.P., Lodish H.F. Role of transforming growth factor β in human diseases. *N Engl J Med* 2000; 342: 1350—1358.
- Kawakami T., Ihn H., Xu W. et al.: Increased expression of TGF- β receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF- β signaling to scleroderma phenotype. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 47—51.
- Ярилин А.А. Основы иммунологии: Учебник. М: Медицина 1999; 608.
- Кетлинский С.А., Калинина Н.М. Цитокины мононуклеарных фагоцитов в регуляции реакции воспаления и иммунитета. *Иммунология* 1995; 3: 30—44.
- Yin L., Morita A.I., Tsuji T. The Crucial Role of TGF- β in the Age-Related Alterations Induced by Ultraviolet A Irradiation. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 4: 703—705.
- Dziedzic M., Smith R.E., Abraham D.J. et al. Circulating levels of active transforming growth factor beta1 are reduced in diffuse cutaneous systemic sclerosis and correlate inversely with the modified Rodnan skin score. *Rheumatol* 2005; 44: 12: 1518—1524.
- Giacomelli R., Cipriani P., Danese C. et al. Peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic sclerosis produce increased amounts of interleukin 6, but not transforming growth factor beta 1. *J Rheumatol* 1996; 23: 2: 291—296.
- Scala E., Pallotta S., Frezzolini A. et al. Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement. *Clin Exp Immunol* 2004; 138: 540—546.
- Apostolou I., Verginis P., Kretschmer K. et al. Peripherally induced Treg: mode, stability, and role in specific tolerance. *J Clin Immunol* 2008; 28: 6: 619—624.
- Marie J.C., Letterio J.J., Gavin M. et al. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *JEM* 2005; 201: 7(4): 1061—1067.
- Pyzik M., Piccirillo C.A. TGF- β 1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4+ T cell subsets. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 335—346.
- Taylor A.W. Review of the activation of TGF- β in immunity. *J Leukoc Biol* 2009; 85: 1: 29—33.
- Radstake T.R.D.J., van Bon L., Broen J. et al. Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGF β expression. *PLoS ONE* 2009; 4: 6: e5981.
- Antiga E., Quaglino P., Bellandi S. et al. Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphea. *Br J Dermatol* 2010; 162: 5: 1056—1063.
- Kubo M., Ihn H., Yamane K. et al. Up-regulated expression of transforming growth factor beta receptors in dermal fibroblasts in skin sections from patients with localized scleroderma. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 3: 731—734.
- Klareskog L., Gustafsson R., Scheynius A. et al. Increased expression of platelet-derived growth factor type B receptors in the skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 10: 1534—1541.
- Yamakage A., Kikuchi K., Smith E.A. et al. Selective upregulation of platelet-derived growth factor alpha receptors by transforming growth factor beta in scleroderma fibroblasts. *J Exp Med* 1992; 175: 5: 1227—1234.