

Функциональные особенности макрофагов в очаге витилиго

В.В. Жульмина, Е.Н. Кологривова, П.Н. Пестерев, Н.П. Лабзовская

Functional characteristics of macrophages in the vitiligo foci

V.V. ZHULMINA, YE.N. KOLOGRIVOVA, P.N. PESTEREV, N.P. LABZOVSKAYA

об авторах:

В.В. Жульмина — аспирант кафедры дерматовенерологии ГБОУ ВПО «СибГМУ» Минздрава России, Томск

Е.Н. Кологривова — д.м.н., профессор кафедры иммунологии и аллергологии ГБОУ ВПО «СибГМУ» Минздрава России, Томск

П.Н. Пестерев — д.м.н., профессор кафедры дерматовенерологии ГБОУ ВПО «СибГМУ» Минздрава России, Томск

Н.П. Лабзовская — к.м.н., врач-дерматовенеролог клиники кожных и венерических болезней ГБОУ ВПО «СибГМУ» Минздрава России, Томск

Цель. Изучение хемотаксической активности макрофагов и локальной продукции цитокинов в стерильном кожном воспалительном экссудате у пациентов с генерализованным (вульгарным) витилиго.

Материал и методы. Обследованы 22 пациента с генерализованным витилиго и 22 здоровых добровольца.

Оценку функциональной активности макрофагов осуществляли с помощью метода «кожного окна» по методике Д.Н. Маянского в модификации В.В. Климова. На мазках-отпечатках, полученных через 6 ч. из участка скарификации эпидермиса здоровой и депигментированной кожи, окрашенных по методу Романовского — Гимзы, с помощью световой микроскопии оценивали состав стерильного клеточного экссудата. Кроме того, в супернатанте экссудата «кожного окна» из очага витилиго, полученном путем центрифугирования, определялись цитокины.

Результаты. В очаге депигментации при витилиго выявлено преобладание мононуклеарных фагоцитов над полиморфно-ядерными лейкоцитами, что наряду с высоким уровнем интерлейкина-18 свидетельствует об активном участии макрофагов в патогенезе данного заболевания. Низкий уровень IL-10 в экссудате «кожного окна» свидетельствует о слабости супрессорного влияния в зоне повреждения меланоцитов.

Выявленные результаты подтверждают значимую роль клеток фагоцитарного звена иммунитета в патогенезе витилиго и позволяют рассматривать их в качестве потенциальных клеток-мишеней для разработки патогенетически обоснованных подходов к терапии данного заболевания.

Ключевые слова: витилиго, макрофаги, нейтрофилы, цитокины, «кожное окно».

Objective. Study of the chemotactic activity of macrophages and local production of cytokines in sterile skin inflammatory exudate in patients with generalized vitiligo (vitiligo vulgaris).

Materials and methods. The authors conducted a study of 22 patients with generalized vitiligo and 22 healthy volunteers.

The functional activity of macrophages was assessed with the use of the skin window method based on the method of D.N. Mayansky as amended by V.V. Klimov. The composition of sterile cell exudate was examined with the use of impression smears taken after 6 hours from an epidermis scarification section on the healthy and depigmented skin colored according to the Romanovsky-Gimza method with the use of light microscopy. In addition, cytokines were determined in the supernatant fluid of the skin window exudate from the vitiligo focus obtained by means of centrifugation.

Results. The prevalence of mononuclear phagocytes over polymorphonuclear leukocytes was revealed in the depigmentation site, which confirms that macrophages take an active part in the disease pathogenesis (along with a high level of interleukin-18). A low level of IL-10 in the skin window exudate confirms that the suppressor effect in the melanocyte damage zone is weak.

These results confirm the important role played by such cells of the immune system as phagocytes in vitiligo pathogenesis, which makes it possible to consider them as potential target cells for developing pathogenetically substantiated approaches to the treatment of the disease.

Key words: vitiligo, macrophages, neutrophils, cytokines, skin window.

■ Витилиго — мультифакторное приобретенное полигенное заболевание кожи из группы дисхромий, характеризующееся хроническим течением, появлением на коже депигментированных пятен белого цвета, склонных к периферическому росту, слиянию вследствие отсутствия либо снижения содержания меланина в коже. По данным ВОЗ, в мире страдают витилиго от 0,2 до 1% всего населения (около 30 млн человек) [1]. Актуальность изучения витилиго обусловлена, с одной стороны, его распространенностью, устойчивостью течения, склонностью к прогрессированию, а с другой стороны, очаги депигментации — это выраженный косметический недостаток, в значительной степени влияющий на психосоциальный статус пациента [2].

Механизмы развития витилиго на сегодняшний день остаются все еще недостаточно изученными. Отсутствие целостной концепции патогенеза витилиго затрудняет разработку эффективных и надежных методов лечения, делает невозможным прогнозирование клинического течения данного дерматоза [3]. Существующие на сегодняшний день результаты научных исследований, направленные на изучение патогенеза витилиго, часто носят противоречивый характер, и единого мнения о патогенетической значимости обнаруженных отклонений в развитии витилиго не сформировалось [4]. Научные факты последних десятилетий свидетельствуют о важности иммунных нарушений в патогенезе витилиго [5].

Предполагается, что меланоциты погибают вследствие аутоиммунной агрессии под действием цитотоксических эффекторных Т-лимфоцитов или посредством аутоантител к поверхностным антигенам меланоцитов, меланину и тирозиназе [6]. В крови у пациентов с витилиго наблюдается достоверное снижение абсолютного и относительного количества зрелых Т-лимфоцитов (CD3), Т-хелперов (CD4), Т-супрессоров (CD8) и относительное снижение количества натуральных киллеров (CD16) [7, 8]. Однако в большинстве случаев результаты проведенных иммунологических исследований отражают состояние всего организма в целом, поэтому достаточно сложно говорить об участии тех или иных клеток иммунной системы в развитии витилиго. Наибольший интерес представляет исследование роли изменений иммунологических параметров непосредственно в очагах депигментации.

С целью уточнения патогенеза заболевания предпринимались попытки изучения клеточного состава в очаге депигментированной кожи с помощью световой и электронной микроскопии. Ультраструктурные методы исследования позволили обоснованно утверждать о гибели меланоцитов на основании некротических изменений в виде нарушения структур цитоплазматических филаментов, митохондрий, клеточных мембран. В результате гистохимического исследования очаговой кожи было установлено достоверное увеличение количества клеток Лангерганса в зоне

депигментации по сравнению с окружающей видимо здоровой кожей [13].

Результаты научных исследований позволяют предполагать непосредственное участие неспецифического клеточного звена иммунитета в патогенезе витилиго. Косвенные признаки свидетельствуют о том, что развитие депигментации может быть обусловлено гибелью меланоцитов на фоне изначального повышения количества и активности внутриэпидермальных макрофагов [8]. В то же время усиленная миграция макрофагов в очаги депигментации может быть вторичной и обусловленной гибелью меланин-продуцирующих клеток под воздействием какого-либо другого повреждающего агента. Метод «кожного окна», заключающийся в анализе состава экссудата из участка скарификации эпидермиса, позволяет оценить функциональную активность фагоцитов по способности их миграции в очаг искусственно созданного асептического воспаления [9].

Цель исследования: оценить клеточный состав экссудата «кожного окна» у пациентов с витилиго и исследовать локальную продукцию цитокинов, оказывающих паракринные и аутокринные эффекты в отношении клеток фагоцитарного ряда.

Материал и методы

Исследование выполнено на базе кафедр дерматовенерологии, иммунологии и аллергологии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Томска. В исследовании приняли участие 22 пациента, страдающих витилиго (5 мужчин и 17 женщин в возрасте от 18 до 50 лет). Все больные имели генерализованную форму витилиго и длительность заболевания от полугода до 40 лет. В качестве контрольной группы было отобрано 22 здоровых добровольца (5 мужчин и 17 женщин). Среди обследованных пациентов 10 (45%) человек считали, что появление очагов депигментации спровоцировали психоэмоциональные перегрузки, 6 (27%) — пребывание в условиях инсоляции, у 3 (14%) пациентов имел место генетический фактор и 3 (14%) не смогли точно указать причину заболевания.

Клиническое обследование включало сбор анамнестических данных, учет объективных и субъективных симптомов. Оценку функциональной активности макрофагов осуществляли с помощью метода «кожного окна» по методике Д.Н. Маянского [9] в модификации В.В. Климова [10]. На мазках-отпечатках, полученных через 6 ч. из участка скарификации эпидермиса здоровой и депигментированной кожи, окрашенных по методу Романовского — Гимзы, с помощью световой микроскопии оценивали состав стерильного клеточного экссудата. Кроме того, в супернатанте экссудата «кожного окна» из очага витилиго, полученном путем центрифугирования (1500 об./мин., 10 мин.), определялись цитокины, для которых характерны короткодистантные варианты аутокринного и паракринного действия на

клетки-мишени — интерлейкины (IL)-8, -18, -10 и -17. Для определения продукции данных цитокинов были использованы наборы для иммуноферментного анализа (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия). Постановку иммуноферментного анализа проводили в соответствии с методическими рекомендациями производителя для сыворотки крови. Статистическая обработка результатов исследования выполнялась с помощью пакета статистических программ SPSS. Достоверность различий оценивали при помощи критериев Вилкоксона и Манна—Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ препаратов «кожного окна» в очаге депигментации у пациентов с витилиго указывает на преобладание мононуклеарных фагоцитов и снижение выхода нейтрофилов в сравнении с аналогичными показателями группы контроля (табл. 1). На кожных мазках-отпечатках, полученных с участков здоровой кожи пациентов с витилиго, содержание макрофагов составило $42,2 \pm 6,5\%$, нейтрофилов — $57,5 \pm 7,1\%$, при этом также наблюдались достоверные различия при сравнении мазков-отпечатков пациентов с витилиго и здоровых добровольцев контрольной группы по содержанию мононуклеарных фагоцитов и нейтрофилов (см. табл. 1).

При анализе уровня цитокинов в экссудатах кожного окна, полученных из очага витилиго, было обнаружено высокое содержание IL-18 (табл. 2). IL-18 — плейотропный цитокин, продуцирующийся главным образом активированными макрофагами и дендритными клетками [11]. Этот цитокин также известен как интерферон (IFN)- γ -индуцирующий фактор и первично был охарактеризован как потенциальный индуктор синтеза IFN- γ Т- и НК-клетками. Известно, что IL-18 вызывает продукцию хемокина CXCL10 в эпидермисе пораженной кожи, что способствует привлечению Т-лимфоцитов и продукции IFN- γ [12]. Т-лимфоциты накапливаются вблизи дермоэпидермальной границы в непосредственной близости от кератиноцитов, среди которых локализуются меланоциты. Показано, что экспрессия Т-хелперами типа 1 и НК-клетками Fas-лиганда, участвующего в реализации механизмов

апоптотической гибели клеток, также происходит под влиянием IL-18 [13]. С другой стороны, известно, что IFN- γ участвует в активации экспрессии самого Fas-рецептора, появляющегося на готовящихся к апоптотической гибели клетках [14]. Независимо от IL-12 интерлейкин-18, влияя на секрецию IFN- γ , по механизму положительной обратной связи быстро активирует клетки моноцитарно-макрофагальной системы. Кроме того, IL-18 приводит к усилению выработки фактора некроза опухоли- α в кератиноцитах, который, в свою очередь, способен индуцировать апоптоз в соседних клетках, в том числе в меланоцитах [13]. Анализ внутридермального содержания IL-18 при системной красной волчанке, atopическом дерматите, Т-клеточной лимфоме и псориазе показал более высокий уровень продукции этого цитокина в поврежденной коже по сравнению со здоровой кожей [12]. На основании результатов нашего исследования и данных литературы можно предположить, что IL-18 самостоятельно (индуцируя экспрессию FasL на лимфоцитах-эффекторах) или посредством IFN- γ (опосредуя появление Fas-молекулы на меланоцитах) и TNF- α стимулирует инициализацию процессов апоптоза меланоцитов в очаге депигментации.

IL-8 считается в настоящее время главным хемокином, ответственным за миграцию нейтрофильных гранулоцитов в очаги тканевого воспаления. Низкий уровень IL-8 в экссудате «кожного окна» в нашем исследовании (см. табл. 2) был ассоциирован с достоверно низкими по отношению к контрольной группе показателями, характеризующими относительное содержание нейтрофилов в составе клеточного экссудата, полученного из участка депигментированной кожи. Возможно, ограничение миграции нейтрофильных гранулоцитов в очаг депигментации является одной из важнейших патогенетических особенностей витилиго, однако механизмы, обеспечивающие такой режим функционирования гранулоцитарных фагоцитов, не выяснены.

Обнаружение IL-17 в экссудате «кожного окна» (см. табл. 2) может свидетельствовать о присутствии аутоиммунного компонента в патогенезе витилиго, однако по результатам нашего исследования содержание этого цитокина в экссудате «кожного окна» не отлича-

ТАБЛИЦА 1

Клеточный состав (в %) мазков-отпечатков «кожного окна» у пациентов с витилиго и здоровых добровольцев ($M \pm m$)

Группа обследованных	Макрофаги		Нейтрофилы	
	очаг депигментации	здоровая кожа	очаг депигментации	здоровая кожа
Пациенты с витилиго (n = 22)	60,1 ± 5,6*	42,2 ± 6,5*	39,8 ± 5,4*	57,5 ± 7,1*
Здоровые добровольцы (n = 22)	—	13,5 ± 1,4	—	83,2 ± 2,2

Примечание. Здесь и в табл. 2 * — достоверность различий по сравнению с показателями здоровых добровольцев ($p < 0,05$).

ТАБЛИЦА 2

Содержание цитокинов в экссудате «кожного окна» у пациентов с витилиго и здоровых добровольцев, Ме (Q₁—Q₃)

Группа обследованных	Цитокины, пг/мл			
	IL-8	IL-18	IL-10	IL-17
Пациенты с витилиго (очаг депигментации, n=22)	20,0 (13,7—43,8)*	385,0 (80,0—510,0)*	2,0 (1,6—3,0)*	10,0 (7,1—18,0)*
Здоровые добровольцы (n=22)	35,0 (31,0—133,0)	92,5 (20,0—235,0)	7,0 (3,5—13,5)	26,0 (18,2—40,2)

лось от уровня, выявленного у здоровых. Недавно проведенные исследования зарубежных авторов показали, что IL-17 вырабатывается Т-хелперами 17-го типа в поврежденной коже при витилиго, однако роль этой клеточной субпопуляции, принимающей участие в патогенезе многих аутоиммунных расстройств, в механизмах депигментации в настоящее время не уточнена [15]. Тем не менее эффективность применения иммуносупрессивной терапии с использованием системных и местных кортикостероидов подтверждает участие аутоиммунных механизмов в патогенезе витилиго [16].

IL-10 относится к числу противовоспалительных цитокинов. Его продуцентами могут быть моноциты, макрофаги, активированные Т-хелперы и клетки с выраженной иммуносупрессорной активностью — Т-регуляторы (Трег). Обращает на себя внимание способность самих макрофагов продуцировать этот цитокин, являющийся для них сильнейшим ингибитором [17]. Низкий уровень IL-10 в экссудате «кожного окна» (см. табл. 2) свидетельствует о слабости супрессорного влияния в зоне повреждения меланоцитов.

Полученные нами результаты подтверждают значимую роль клеток фагоцитарного звена иммунитета в патогенезе витилиго и позволяют рассматривать их в качестве потенциальных клеток-мишеней для разработки патогенетически обоснованных подходов к терапии данного заболевания.

Выводы

1. Преобладание мононуклеарных фагоцитов в очаге асептического воспаления, искусственно сформированного в зоне депигментации, на фоне сниженной хемотаксической способности нейтрофилов можно рассматривать как отражение активного участия тканевых макрофагов в механизмах повреждения меланоцитов при витилиго.

2. Выявленные у пациентов с витилиго особенности локальной секреции цитокинов в «кожном окне» (высокий уровень IL-18 и низкое содержание IL-8) позволяют рассматривать макрофаги в качестве наиболее значимых инициаторов апоптотической гибели меланоцитов. ■

Литература

1. Ломоносов К.М. Иммунопатогенез и терапия витилиго иммунокорректором неовиром. *Росс. журн. кож. и вен. бол.* 2010; 2: 36—39.
2. Taneja A. Treatment of Vitiligo. *J Derm Treatm* 2002; 13: 19—258.
3. Корсунская И.М., Дворянкова Е.В., Ефремова Е.И. Опыт применения полиоксидония в терапии витилиго. *Иммунология.* 2005; 4: 236—239.
4. Дворянкова Е.В., Ткаченко С.Б. Роль сопутствующей патологии и факторов риска в развитии и течении витилиго. *Клин. дерматол. и венерол.* 2006; 1: 63—64.
5. Kemp E.H., Waterman E.A., Weetman A.P. Auto-immune aspects of vitiligo *Autoimmunity* 2001; 34(1): 65—77.
6. Rezaei N, Gavalas N.G., Weetman A.P., Kemp E.H. Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. *J EADV* 2007; 21: 865—876.
7. van den Wijngaard, R. et al. Local immune response in skin of generalized vitiligo patients. Destruction of melanocytes is associated with the prominent presence of CLA+ T cells at the perilesional site. *Lab Invest* 2000; 80: 1299—1309.
8. Дворянкова Е. В. Особенности иммунологического статуса у больных витилиго. *Эксперим. и клин. дерматокосметол.* 2006; 2: 9—11.
9. Маянский Д.Н. Лекции по клинической патологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007.
10. Способ диагностики аллергического диатеза. В.В. Климов, Т.В. Кошовкина, В.К. Раткин, А.А. Денисов. — Патент № 1534395 от 10.09.1993.
11. Якушенко Е.В., Лопатникова Ю.А., Сенников С.В. Интерлейкин-18 и его роль в иммунном ответе. *Мед. иммунол.* 2005; 7; 4: 355—364.
12. Park H.J., Kim J.E., Lee J.Y., Cho B.K. et al. Increased expression of IL-18 in cutaneous graft-versus-host disease. *Immunol Lett* 2004; 95 (1): 57—61.
13. Kemp E.H. Immunological pathomechanisms in vitiligo. *Exp Rev Mol Med* 2001: 1—22.
14. Wittmann M, Macdonalda A, Renneb J. IL-18 and skin inflammation. *Autoimmunity Reviews* 2009; 9 (1): 45—48.
15. Bassiouny D.A., Shaker O. Role of interleukin-17 in the pathogenesis of vitiligo. *Clin Exp Dermatol* 2011; 36(3): 292—7.
16. Kim S.M., Lee H.K., Hann S.K. The efficacy of low-dose oral corticosteroids in the treatment of vitiligo patients. *Int J. Dermatol* 1999, Jul; 38(7): 546—550.
17. Marks V. Et al. *Differential diagnosis by laboratory medicine* 2002 Springer Verlag: 234—240.