

О РОЛИ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК В ПАТОГЕНЕЗЕ ВИТИЛИГО

Д.В. ПРОШУТИНСКАЯ, В.А. ВОЛНУХИН, О.Р. КАТУНИНА, А.В. РЕЗАЙКИНА

On the role of dendritic cells in the pathogenesis of vitiligo

D.V. PROSHUTINSKAYA, V.A. VOLNUKHIN, O.R. KATUNINA, A.V. REZAIKINA

Об авторах:

Д.В. Прошутинская — старший научный сотрудник отдела детской дерматологии, ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва, к.м.н.

В.А. Волнухин — ведущий научный сотрудник ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва, д.м.н.

О.Р. Катунина — заведующая лабораторией патоморфологии ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», к.м.н.

А.В. Резайкина — ведущий научный сотрудник, отделение клинической иммунологии ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва

Приведены результаты иммуногистохимических исследований кожи 10 здоровых добровольцев и 16 больных вульгарным витилиго с определением в эпидермисе и периваскулярных инфильтратах дермы содержания незрелых (CD1a+) и зрелых (CD83+) субпопуляций дендритных клеток (ДК), а также CD4+ и CD8+ лимфоцитов. Обнаружено повышенное количество CD1a+ и CD83+ ДК в зонах депигментированной, краевой и перифокальной нормально пигментированной кожи очагов витилиго. ДК с фенотипом CD1a+ выявлены как в эпидермисе, так и в дерме, ДК с фенотипом CD83+ обнаружены только в дерме. Наряду с повышенным содержанием ДК во всех 3 зонах очагов витилиго обнаружено более высокое, чем у здоровых лиц, количество CD4+ и CD8+ лимфоцитов. Установлена сильная корреляционная связь между количеством CD83+ ДК и CD4+ лимфоцитов в зоне депигментации ($r = 0,84$; $p < 0,001$). Полученные данные свидетельствуют о вовлеченности CD1a+ и CD83+ ДК в патогенез витилиго и участии их в инициации Т-клеточного ответа в очагах поражения.

Ключевые слова: вульгарное витилиго, CD1a+ дендритные клетки, CD83+ дендритные клетки, иммуногистохимические исследования.

The authors give the results of immunohistochemistry studies of the skin of 16 healthy volunteers and 16 patients suffering from vulgar vitiligo with the determination of the contents of immature (CD1a+) and mature (CD83+) subpopulations of dendritic cells (DCs) as well as CD4+ and CD8+ lymphocytes in the epidermis and perivascular infiltrates of the derma. They revealed an increased quantity of CD1a+ and CD83+ DCs in areas of depigmented, peripheral and perifocal normally pigmented skin of vitiligo foci. DCs with the CD1a+ phenotype were revealed both in the epidermis and in the derma while DCs with the CD83+ phenotype were revealed in the derma only. A higher quantity of CD4+ and CD8+ lymphocytes than in healthy volunteers was also revealed along with the increased contents of DCs in all three areas of vitiligo foci. The authors established a strong correlation between the quantity of CD83+ DCs and CD4+ lymphocytes in the depigmentation zone ($r=0.84$; $P<0.001$). The data obtained prove the involvement of CD1a+ and CD83+ DCs in the pathogenesis of vitiligo and their participation in the initiation of T-cell response in the affection foci.

Key words: vulgar vitiligo, CD1a+ dendritic cells, CD83+ dendritic cells, immunohistochemistry studies.

Вопросы этиологии и патогенеза витилиго до сих пор остаются предметом постоянных дискуссий. В научной литературе активно обсуждается роль иммунных и неиммунных механизмов в развитии заболевания [1—4]. В настоящее время наиболее вероятной признана аутоиммунная гипотеза патогенеза витилиго [5, 6]. Считается, что в развитии заболевания, наряду с реакциями, опосредованными аутоантителами, большое значение имеют клеточные иммунные реакции [7—13]. Реализация клеточных иммунных реакций в коже человека осуществляется путем взаимодействия различных типов клеток кожи, главным образом кератиноцитов, лимфоцитов, антигенпрезентирующих клеток, тучных клеток и меланоцитов [14].

Основными антигенпрезентирующими клетками кожи, выполняющими функции распознавания и связывания антигенов и презентации их Т-лимфоцитам, являются дендритные клетки (ДК). Они занимают центральное положение в индукции и регуляции адаптивного иммунного ответа [15, 16]. В отечественной и зарубежной литературе имеется ряд публикаций, посвященных изучению состояния ДК в коже больных витилиго. Однако в большинстве из них исследовались незрелые CD1a+ ДК, известные как клетки Лангерганса (белые отростчатые эпидермоциты) [17—22]. Эти клетки способны связывать и обрабатывать антиген, однако не могут осуществлять его презентацию Т-лимфоцитам [14].

Вместе с тем для выяснения особенностей «запуска» иммунных механизмов развития витилиго определенный интерес представляет исследование состояния зрелых ДК, обеспечивающих доставку антигена в лимфатические узлы и презентацию его

Т-лимфоцитам. Считается, что незрелые ДК могут поддерживать ауто толерантность, в то время как зрелые ДК могут вызывать ее срыв [23].

Наиболее характерным маркером зрелых и активированных ДК является трансмембранная молекула CD83 [24]. Клетки, несущие на своей поверхности антиген CD83, способны мигрировать с током лимфы и вступать в контакт с наивными Т-клетками (CD4+ и CD8+ лимфоцитами), представляя им антиген [24, 25]. Последующий каскад сигналов между ДК и Т-клетками инициирует активацию наивных Т-клеток и последующую их дифференцировку. Работ, посвященных изучению состояния CD83+ ДК в коже больных витилиго, нам не встретилось.

В настоящей работе представлены результаты иммуногистохимических исследований содержания в коже больных вульгарным витилиго CD1a+ и CD83+ субпопуляций ДК в зоне депигментации, краевой и перифокальной нормально пигментированной зонах очагов поражения.

Материал и методы

Обследованы 16 больных вульгарным витилиго (11 женщин и 5 мужчин) в возрасте от 24 до 52 лет (медиана 38 лет). У всех пациентов установлена прогрессирующая стадия витилиго, продолжительность заболевания варьировала от 1,5 до 42 лет (медиана 12 лет), площадь поражения — от 5 до 50% поверхности тела (медиана 20%).

Биоптаты кожи для исследований брали из 3 зон очагов поражения: зоны депигментации, краевой зоны (пограничной с очагами) и зоны перифокальной нормально пигментированной (видимо здоровой) кожи. Контрольную группу составили 10 здоровых добровольцев в возрасте от 29 до 64 лет.

Иммуногистохимические исследования проводили на парафиновых срезах непрямым иммунопероксидазным методом по стандартной методике с предварительной демаскировкой в СВЧ-печи и применением проявляющей системы Novostain super ABC Kit (universal). Для иммунофенотипирования использовали мышинные моноклональные антитела (Novocastra Laboratories Ltd, Великобритания), специфичные к антигенам CD1a — маркеру незрелых ДК (клеток Лангерганса), CD83 — маркеру зрелых ДК, CD4 — маркеру субпопуляции Т-хелперов/индукторов, CD8 — маркеру субпопуляции супрессорно-цитотоксических Т-клеток. Подготовленные препараты изучали в световом микроскопе «Nikon Eclipse E 600», изображение документировали цифровой камерой «Nikon D 100».

Количество клеток в эпидермисе определяли в поле зрения из расчета на 100 базальных кератиноцитов. При исследовании содержания клеток в дерме в 5 периваскулярных инфильтратах произвольно выбирали по 20 клеток, среди которых подсчитывали количество меченых клеток, после чего для каждого препарата рассчитывали среднее значение относительного содержания клеток.

Статистический анализ данных выполняли с использованием пакета программ Statistica 6.1 (StatSoft, Inc., США). Описательная статистика количественных признаков представлена медианами и квартилями (в формате Me [Q₁; Q₃]). Для сравнения групп по количественным и порядковым признакам применяли тест Манна — Уитни. Корреляционный анализ проводили непараметрическим методом Спирмена. Поскольку в исследовании проводились множественные сравнения, пороговый уровень значимости рассчитывали с учетом поправки Бонферрони по формуле 0,05/n, где n — число выполненных статистических тестов. При проверке гипотез различия считались статистически значимыми при уровне значимости (P_н) меньшем порогового уровня значимости, определенного с учетом поправки Бонферрони [26].

Результаты и их обсуждение

Сравнительный анализ групп больных и здоровых добровольцев показал, что они не различались статистически по возрасту и полу (соответственно P = 0,200 и P = 0,130).

При иммуногистохимическом исследовании содержания ДК в коже здоровых добровольцев в эпидермисе обнаруживали только CD1a+ клетки (рис. 1, а), тогда как CD83+ клетки отсутствовали. В дерме встречались как CD1a+ ДК, так и CD83+ ДК (рис. 2, а).

В эпидермисе больных витилиго в отличие от группы здоровых добровольцев во всех 3 зонах очагов поражения выявлено повышенное количество CD1a+ ДК (для всех зон P < 0,001; см. таблицу, рис. 1). В периваскулярных инфильтратах кожи различий в содержании CD1a+ ДК между группами больных и здоровых лиц не установлено. CD83+ ДК в эпидермисе больных, как и у здоровых лиц, отсутствовали. В то же время в периваскулярных инфильтратах их количество во всех зонах статистически значимо превышало таковое у здоровых добровольцев (см. таблицу, рис. 2).

Следует отметить, что количество CD1a+ клеток в эпидермисе больных во всех 3 зонах очагов поражения превышало таковое у здоровых добровольцев в 1,4 раза, тогда как количество CD83+ клеток в дерме в зоне депигментации, краевой зоне и зоне перифокальной нормально пигментированной кожи было выше показателя у здоровых добровольцев соответственно в 2,4, 3,3 и 2,8 раза.

Анализ содержания основных субпопуляций Т-клеток в коже показал, что у здоровых лиц CD4+ и CD8+ лимфоциты в эпидермисе отсутствовали, тогда как в дерме обнаруживали небольшое их количество. В эпидермисе больных CD4+ клетки также не были выявлены, в то время как отдельные CD8+ клетки находили во всех 3 зонах очагов поражения. Тем не менее статистически значимые различия в содержании CD8+ лимфоцитов в эпидермисе боль-

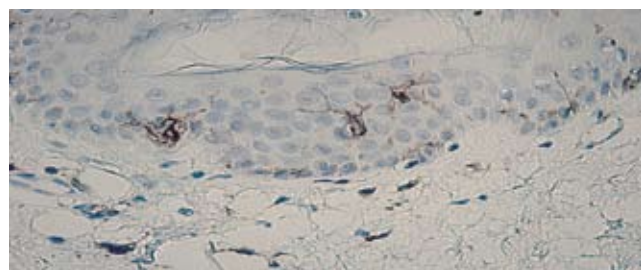
Таблица

Содержание ДК и Т-лимфоцитов в коже здоровых добровольцев и больных витилиго (проценты, медианы и квантили)

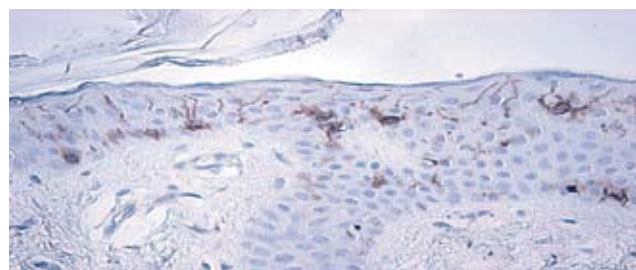
Субпопуляции клеток	Здоровые добровольцы (n = 10)	Больные витилиго (n = 16)			P	P ₁	P ₂
		зона депигментации	зона краевая	зона пигментированной кожи			
Эпидермис (количество клеток на 100 базальных кератиноцитов)							
CD1a+	9,3 [8,8; 9,8]	13,2 [12,4; 14,4]	13,8 [13,2; 14,4]	13,2 [12,6; 14,4]	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*
CD83+	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0 [0; 0]	—	—	—
CD4+	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0 [0; 0]	—	—	—
CD8+	0 [0; 0]	0,2 [0; 0,4]	0,2 [0; 0,9]	0,2 [0; 0,4]	0,002	0,002	0,001*
Периваскулярные инфильтраты (%)							
CD1a+	6,5 [5,0; 8,0]	7,0 [5,0; 9,0]	7,0 [5,5; 11,5]	6,0 [5,0; 7,0]	0,558	0,489	0,788
CD83+	6,5 [6,0; 10,0]	15,5 [10,0; 21,0]	21,5 [16,5; 25,5]	18,0 [14,0; 21,5]	0,001*	< 0,001*	< 0,001*
CD4 + 6,0 [5,0; 8,0]	11,0 [9,5; 13,0]	13,0 [10,5; 14,5]	13,0 [10,0; 15,0]	0,001* < 0,001* < 0,001*			
CD8 + 9,0 [7,0; 13,0]	22,0 [18,0; 27,0]	26,0 [22,5; 33,5]	26,5 [24,0; 29,0]	< 0,001* < 0,001* < 0,001*			

Примечание. P, P₁ и P₂ — уровни статистической значимости при сравнении показателей здоровых добровольцев и больных соответственно в зоне депигментации, краевой зоне и зоне перифокальной нормально пигментированной кожи.

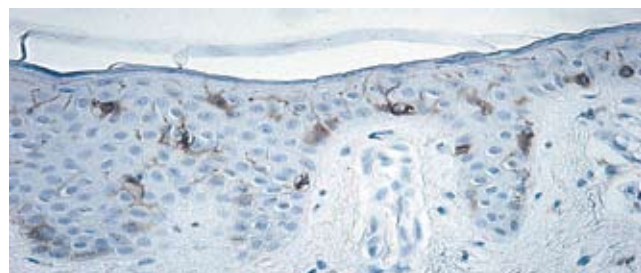
* Статистически значимые различия с учетом поправки Бонферрони (P_B = 0,002).



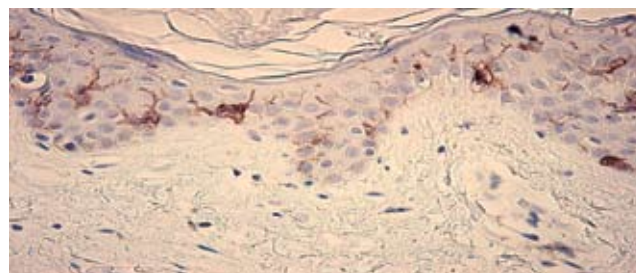
а



б



в



г

Рис. 1. Иммуногистохимическая реакция с моноклональными антителами CD1a в коже здорового добровольца и больного вульгарным витилиго. ×200:

а — кожа здорового добровольца; б — очаг витилиго, зона депигментации; в — очаг витилиго, краевая зона; г — очаг витилиго, зона перифокальной нормально пигментированной кожи

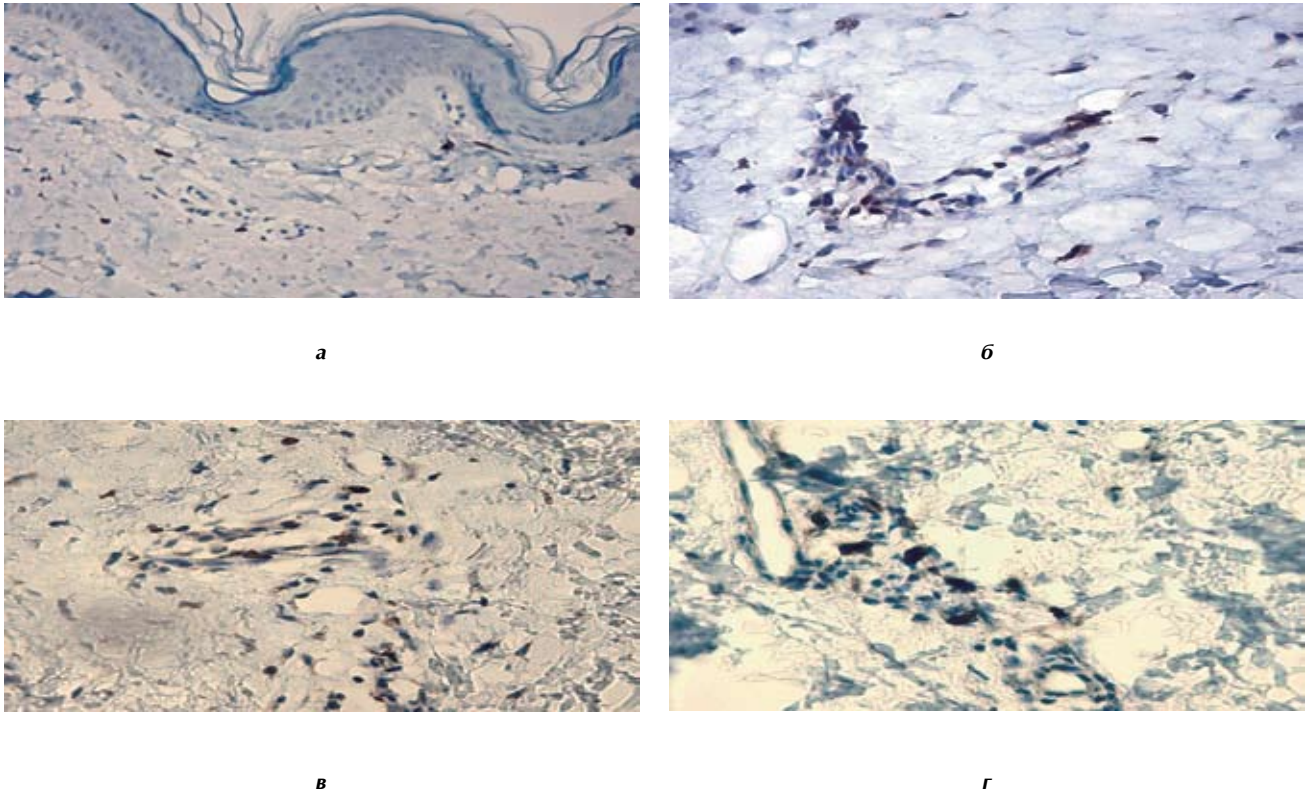


Рис. 2. Иммуногистохимическая реакция с моноклональными антителами CD83 в коже здорового добровольца (×200) и больного вульгарным витилиго (×400): а — кожа здорового добровольца; б — очаг витилиго, зона депигментации; в — очаг витилиго, краевая зона; г — очаг витилиго, зона перифокальной нормально пигментированной кожи

ных и здоровых добровольцев выявлены только в зоне перифокальной нормально пигментированной кожи ($P = 0,001$). В периваскулярных инфильтратах кожи больных во всех 3 зонах очагов поражения обнаружено повышенное количество как CD4+, так и CD8+ клеток (см. таблицу).

При корреляционном анализе в зоне депигментации установлена сильная корреляционная связь между содержанием CD83+ ДК и CD4+ лимфоцитов ($r = 0,84$; $P < 0,001$).

Полученные в нашей работе данные об увеличении содержания незрелых CD1a+ ДК в очагах вульгарного витилиго подтверждают результаты других исследований [17–22]. Выявленное нами значительное повышение содержания зрелых CD83+ ДК в периваскулярных инфильтратах кожи во всех 3 зонах очагов витилиго свидетельствует об их вовлеченности в патогенез заболевания. В литературе имеются отдельные публикации о повышенном содержании CD83+ клеток в очагах поражения больных лепрой и псориазом [27, 28], однако работы по изучению состояния данной субпопуляции ДК в коже больных витилиго отсутствуют.

Наряду с повышенным содержанием ДК во всех 3 зонах очагов витилиго нами найдено более высокое количество по сравнению с группой здоровых добровольцев основных субпопуляций Т-клеток — CD4+ и CD8+ лимфоцитов. Кроме того, при корреляционном анализе выявлена сильная корреляционная связь между содержанием CD83+ ДК и Т-хелперной субпопуляции (CD4+ лимфоцитами). Эти данные косвенно свидетельствуют о важной роли CD83+ ДК в инициации Т-клеточного иммунного ответа в коже больных витилиго.

Похожие данные получены Т. Коба и соавт., которые обнаружили в периваскулярных инфильтратах кожи больных псориазом наряду с повышенным содержанием CD83+ ДК наличие тесного контакта между CD83+ клетками и Т-лимфоцитами, указывающего на участие CD83+ клеток в обеспечении иммунного ответа [28]. В исследовании N. Nigano и соавт. показано, что при активном участии в презентации антигена CD83+ клеток может развиваться пролиферация специфических CD8+ супрессорно-цитотоксических лимфоцитов [29]. Учитывая эти данные, нельзя исключить вовлечения CD83+ ДК в иммунологические клеточно-опосредованные ме-

ханизмы повреждения меланоцитов при развитии очагов поражения у больных витилиго.

Таким образом, обнаруженное нами повышенное количество как незрелых, так и зрелых ДК в эпидермисе и дерме больных витилиго может свидетельствовать о наличии в коже персистирующей антигенной детерминанты, стимулирующей активацию и созревание ДК и вызывающей вовлечение антигенпрезентирующих клеток в патологический процесс, что приводит к развитию каскада последующих Т-клеточных иммунных реакций. С другой стороны, постоянное присутствие зрелых ДК в коже вследствие aberrантной экспрессии лимфоидных хемокинов или недостаточного апоптоза этих клеток, сопровождающееся длительным представлением аутоантигенов, может приводить к срыву аутоагрессивного иммунного ответа [23].

Заключение

Проведенными иммуногистохимическими исследованиями установлено значительное повышение в очагах витилиго количества незрелых CD1a+ и зрелых CD83+ ДК, а также основных субпопуляций Т-клеток — CD4+ и CD8+ лимфоцитов. Полученные данные наряду с выявленной сильной корреляционной связью содержания в коже CD83+ клеток с уровнем Т-хелперов свидетельствуют о вовлечении различных субпопуляций ДК в механизмы развития витилиго и подтверждают важную роль клеточных иммунных реакций в патогенезе заболевания.

Литература

1. Bystryn J.-C. Immune mechanisms in vitiligo. *Clin Dermatol* 1997; 15: 853—861.
2. Sehgal V.N., Srivastava G. Vitiligo: auto-immunity and immune responses. *Int J Dermatol* 2006; 45: 583—590.
3. Dell'Anna M. L., Picardo M. A review and a new hypothesis for non-immunological pathogenetic mechanisms in vitiligo. *Pigment Cell Res* 2006; 19: 406—411.
4. Schallreuter K. U., Bahadoran P., Picardo M. et al. Vitiligo pathogenesis: autoimmune disease, genetic defect, excessive reactive oxygen species, calcium imbalance, or what else? *Exper Dermatol* 2008; 17: 139—160.
5. Kemp E. H., Waterman E. A., Weetman A. P. Autoimmune aspects of vitiligo. *Autoimmunity* 2001; 34: 65—77.
6. Ongenaes K., Van Geel N., Naeyaert J.-M. Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo. *Pigment Cell Res* 2003; 16: 90—100.
7. Van den Wijngaard R. M., Wankowicz-Kalinska A., Pals S. et al. Autoimmune melanocyte destruction in vitiligo. *Lab Invest* 2001; 81: 8: 1061—1067.
8. Le Poole I. C., Wankowicz-Kalinska A., Van den Wijngaard R. M. et al. Autoimmune aspects of depigmentation in vitiligo. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2004; 9: 1: 68—72.
9. Le Poole I. C., Van den Wijngaard R. M., Westerhof W. et al. Presence of T cells and macrophages in inflammatory vitiligo skin parallels melanocyte disappearance. *Am J Pathol* 1996; 148: 4: 1219—1228.
10. Das P. K., Van den Wijngaard R., Wankowicz-Kalinska A. et al. A symbiotic concept of autoimmunity and tumor immunity: lessons from vitiligo. *Trends Immunol* 2001; 22: 3: 130—136.
11. Rezaei N., Gavalas N. G., Weetman A. P. et al. Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2007; 21: 7: 865—876.
12. Rashtak S., Pittelkow M. R. Skin involvement in systemic autoimmune diseases. *Curr Dir Autoimmun* 2008; 10: 3: 44—58.
13. Le Poole I. C., Luiten R. M. Autoimmune etiology of generalized vitiligo. *Curr Dir Autoimmune* 2008; 10: 227—243.
14. Ярилин А. А. Основы иммунологии: Учебник. М.: Медицина, 1999; 608.
15. Пашенков М. В., Пинегин Б. В. Роль дендритных клеток в регуляции иммунного ответа. *Иммунология*. 2002; 5: 313—321.
16. Макаренкова В. П., Кост Н. В., Шушин М. Р. Система дендритных клеток в индукции иммунитета и в патогенезе инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний. *Иммунология*. 2002; 2: 68—76.
17. Westerhof W., Groot I., Krieg S. R. et al. Langerhans cell population studies with OKT6 and HLA-DR monoclonal antibodies in vitiligo patients treated with oral phenylalanine loading and UVA irradiation. *Acta Derm Venerol* 1986; 66: 259—262.
18. Moncada B., Sandoval M., Amaro R. S. et al. Increased numbers of Langerhans' cells in vitiligo. *Arch Dermatol* 1987; 123: 10: 1267—1268.
19. Horn T. D. Analysis of the lymphocytic infiltrate in a case of vitiligo. *Am. J. Dermatopathol* 1997; 19: 4: 400—402.
20. Hann S. K., Kim Y. S., Yoo J. H., Chun Y. S. Clinical and histopathologic characteristics of trichome vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 4: 589—596.
21. Сохибова З. Н. Морфофункциональная характеристика постоянных и мигрирующих в кожу иммунокомпетентных клеток у больных витилиго в динамике курсового лечения: Автореф. дис... канд. мед. наук. Душанбе, 2000; 21.
22. Кошевенко Ю. Н. К вопросу о причинах гибели меланоцитов при витилиго. Патоморфологическая картина пораженной кожи (сообщение I) *Рос. журн. кож. и венер. болезней*. 2000; 1: 53—63.
23. Пашенков М. В., Пинегин Б. В. Физиология клеток врожденной иммунной системы: дендритные клетки. *Иммунология* 2006; 6: 368—378.
24. Prechtel AT, Steinkasserer A. CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Arch Dermatol Res* 2007; 299 (2): 59—69.
25. Prazma CM, Tedder TF. Dendritic cell CD83: a therapeutic target or innocent bystander? *Immunol Lett* 2008; 15: 115 (1): 1—8.
26. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2002; 312.
27. Sieling P.A., Jullien D., Dahlem M. et al. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J Immunol* 1999; 162 (3): 1851—1858.
28. Koga T., Duan H., Urabe K., Furue M. In situ localization of CD83-positive dendritic cells in psoriatic lesions. *Dermatology* 2002; 204: 2: 100—103.
29. Hirano N., Butler M., Xia Z. et al. Engagement of CD83 ligand induces prolonged expansion of CD8+T cells and preferential enrichment for antigen specificity. *Blood* 2006; 107: 1528—1536.