

*Белых О.А., Кохан М.М., Кениксфест Ю.В.*

## Исследование различных популяций лимфоцитов периферической крови у больных хроническими дерматозами

ФГУ «Уральский научно-исследовательский институт дерматовенерологии и иммунопатологии»  
Минздравсоцразвития России, г. Екатеринбург

*Belykh O.A., Kokhan M.M., Keniksfest Y.V.*

## The study of different peripheral blood lymphocytes populations in patients with chronic dermatosis

### Резюме

В статье приведены данные о количественном содержании Т-, В- и NK-лимфоцитов периферической крови 221 больного хроническими дерматозами (псориазом, атопическим дерматитом, красным плоским лишаем, злокачественной Т-лимфомой кожи, вульгарной пузырчаткой). Выявлены как общие сдвиги в параметрах иммунной системы, присущие большинству пациентов указанных групп, так и особенности, характерные для определённых патологий. Полученные результаты будут способствовать оптимизации лабораторного обследования больных в зависимости от нозологической формы заболевания кожи.

**Ключевые слова:** псориаз, атопический дерматит, красный плоский лишай, Т-лимфома кожи, вульгарная пузырчатка, проточная цитометрия, лимфоциты

### Summary

The article presents data on the cells immunity in 221 dermatological patients (psoriasis, atopic dermatitis, lichen ruber planus, T-cell lymphoma, pemphigus vulgaris). The content of T-, B- and NK-lymphocytes in peripheral blood was examined. These data are needed for optimization of laboratory studies in patients depending on the nosology form of skin disease.

**Key words:** psoriasis, atopic dermatitis, lichen ruber planus, T-cell lymphoma, pemphigus vulgaris, flow cytometry, lymphocytes

### Введение

Основной из тенденций развития медицинской науки в начале нового тысячелетия является интенсивное изучение иммунопатологических механизмов формирования системной и органной патологии. Многочисленные исследования доказывают тесную взаимосвязь развития большинства дерматологических заболеваний с нарушениями в функционировании иммунной системы, выявляя роль этих нарушений в хроническом течении инфекционной, аллергической, аутоиммунной и неопластической патологии кожи и слизистых оболочек [1,2,3]. В то же время дерматология тесно связана с клинической иммунологией, в задачи которой входит изучение вопросов диагностики и лечения больных с иммуно-опосредованными заболеваниями и иммунопатологическими отклонениями. Изучению роли иммунопатологических нарушений в патогенезе аллерго- и лимфопролиферативных дерматозов посвящены многочисленные исследования как зарубежных учёных, так и наших российских коллег [4-9]. Различные по этиологии, патогенезу, клинике все хронические дерматозы, тем не менее, объединены одним из об-

щих патогенетических механизмов - значимыми отклонениями в иммунной системе организма [10,11]. Однако, несмотря на характерные для определённых заболеваний кожи иммунологические нарушения, в литературе до сих пор встречаются весьма противоречивые данные об отклонениях в иммунной системе. В связи с этим существует необходимость уточнения роли различных факторов иммунитета в патогенезе хронических дерматозов.

Внедрение в российскую лабораторную диагностику метода проточной цитометрии значительно расширило спектр иммунологических исследований. Этот метод позволяет не только быстро и точно подсчитать количество основных популяций лимфоидных клеток, но и охарактеризовать их функциональную активность. Зачастую пациентам дерматологических стационаров проводится стандартное обследование, не несущее решающей информации о нарушениях в иммунной системе и не дающее полной характеристики иммунопатологического процесса у данного пациента. В связи со сказанным возникает необходимость оптимизации лабораторного обследования больных в зависимости от нозологической формы заболевания кожи.

**Цель работы** - описать состояние некоторых популяций и субпопуляций лимфоцитов периферической крови у больных различными хроническими дерматозами для выявления наиболее характерных изменений для каждого заболевания.

## Материал и методы

Обследован 221 пациент дерматологической клиники, из них 42 больных атопическим дерматитом (АД), 82 - псориазом, 47 - красным плоским лишаем (КПЛ), 22 - Т-лимфомой кожи (Т-ЛК), 28 - вульгарной пузырчаткой (ВП); 55 условно здоровых лиц составили контрольную группу. Кровь для иммунологического обследования получали путем пункции локтевой вены в утренние часы строго натощак в пробирку VACUTAINER с антикоагулянтом. Для выделения мононуклеаров использовали стандартный метод градиентного центрифугирования с последующей отмывкой клеток фосфатно-солевым буферным раствором. Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов осуществляли стандартным методом прямого двух- и трёхпараметрического иммунофлюоресцентного окрашивания мононуклеаров с использованием коммерческих лизирующих/фиксирующих и промывающих растворов и панели моноклональных антител производства Beckman Coulter. Количественная характеристика популяций и субпопуляций лимфоцитов включала в себя определение следующих маркеров: CD45+CD3+ (Т-лимфоциты), CD45+CD3+CD4+ (Т-хелперы), CD45+CD3+CD8+ (Т-цитотоксические лимфоциты), CD45+CD3+CD(16+56)+ (NKT-клетки), CD45+CD3+HLA-DR+ (Т-клетки в поздней фазе активации), CD4+CD27+ (Т-хелперы памяти), CD45+CD3-CD19+ (В-лимфоциты), CD19+CD5+ (В1-лимфоциты), CD19+CD27+ (В-лимфоциты памяти), CD45+CD3-CD(16+56)+ (NK-клетки). Качественная характеристика заключалась в анализе экспрессии рецепторов. Статистическую обработку результатов производили в рамках программного обеспечения Statistica для Windows (версия 6.0).

## Результаты и обсуждение

Выявлено уменьшение содержания Т-хелперов у больных ВП и КПЛ в периферической крови, как в целом популяции CD4-позитивных клеток ( $p < 0,01$ ), так и Т-хелперов памяти ( $p < 0,05$ ) при нормальном количестве Т-цитотоксических клеток. Клетки с фенотипом CD4+CD27+ обладают высокой способностью к продукции IFN- $\gamma$ . Наблюдаемое изменение их количества может свидетельствовать о снижении эффективности иммунного ответа.

У больных АД, псориазом, Т-ЛК и ВП отмечено повышение количества активированных Т-лимфоцитов ( $p < 0,01$ ). Следует отметить, что этот показатель особенно возрастает при эритродермических формах дерматозов ( $p < 0,05$ ). HLA-DR является маркером не только поздней, но и длительной активации клеток, т.е. HLA-DR-позитивные лимфоциты длительно циркулируют в крови, а экспрессия этого маркера наиболее полно отра-

жает активационное состояние клеток. Поэтому именно HLA-DR наиболее часто используется для определения наличия клеточной активации, а в динамике позволяет оценить остроту воспалительного процесса и проводить мониторинг эффективности лечения: динамическое снижение этого показателя свидетельствует о затухании воспаления, динамическое повышение – об активизации.

NKT-клетки играют немаловажную роль в патогенезе различных аутоиммунных заболеваний, в том числе при псориазе, ВП и др., что привлекает внимание исследователей к этой популяции лимфоцитов у больных дерматологического профиля. Нами выявлено сниженное количество NKT-лимфоцитов у больных псориазом и Т-ЛК ( $p < 0,05$ ). Эти данные согласуются с результатами зарубежных исследований, показывающих значительное снижение количества натуральных киллерных Т-лимфоцитов в периферической крови больных некоторыми дерматозами, в частности, псориазом [12].

Количество натуральных киллеров снижено только у больных АД ( $p < 0,01$ ), при всех других заболеваниях наблюдаются нормальные значения этого показателя. Однако функционально эти клетки отличаются от таковых у здоровых лиц. Нами была проанализирована субпопуляция NK-клеток, несущих на своей поверхности CD8. Натуральные киллеры с таким фенотипом (CD3-CD8+CD(16+56)+) обладают повышенной цитотоксичностью. С активацией натуральных киллеров связывают развитие местного воспаления при различных вирусных инфекциях, а маркер CD8 является активационным. У всех групп больных мы выявили снижение цитотоксичности NK-клеток, особенно выраженное у больных ВП и АД ( $p < 0,05$  и  $p < 0,01$  соответственно).

Возможно, данные особенности при наличии нарушений в регуляторных функциях Т-лимфоцитов в некоторой степени могут обуславливать значение вирусной инфекции, как «триггера» патологического кожного процесса, например, у некоторых пациентов, больных псориазом.

При формировании иммунного ответа, наряду с Т-клетками, важную роль играют В-лимфоциты. Подобно Т-лимфоцитам они не однородны по своим функциям и подразделяются на несколько субпопуляций: В1-лимфоциты (CD19+CD5+), В2-лимфоциты (CD19+CD5-), В-клетки памяти (CD19+CD27+). В отличие от В2-лимфоцитов, В1-клетки способны продуцировать аутоантитела, так как не подвергаются селекции. С этой субпопуляцией В-лимфоцитов связывают развитие аутоиммунной патологии и лимфопролиферативных процессов. При анализе данной субпопуляции нами были получены противоречивые данные. Значительно повышенное содержание этих клеток обнаружено не у больных ВП или псориазом, как можно было предположить, а у пациентов, страдающих Т-ЛК, АД и КПЛ ( $p < 0,05$ ). В то же время некоторые исследователи также отмечают отклонения в содержании CD5-позитивных В-лимфоцитов у пациентов, страдающих атопическим дерматитом, при развитии экзематозных реакций на белок коровьего молока, подчёркивая диагностическое значение изменения ко-

личества В1-клеток [7]. Данный факт требует подтверждения в исследованиях с привлечением дополнительных методов, в частности, определения аутоантител, и дальнейшего осмысления. В-клетки памяти важны не только при дифференцировке В-лимфоцитов в плазматические клетки. Изменение данной субпопуляции имеет определённое значение в возникновении лейкозов и некоторых аутоиммунных заболеваний, в связи с чем изучение этих клеток является перспективным иммунологическим направлением в дерматологии. Нами зафиксировано достоверное повышение содержания лимфоцитов памяти у больных ВП, что может свидетельствовать о влиянии данной субпопуляции клеток на развитие патологического кожного процесса при пузырчатке.

В клинической практике важное значение на диагностическом этапе и этапе проведения терапии имеют не только количественные характеристики, но и анализ экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов. Распределение клеток по морфологическим показателям. Например, появление субпопуляции CD3-позитивных лимфоцитов с большей экспрессией молекулы CD3, чем обычно, позволяет предположить наличие у пациента хронической вирусной или бактериальной инфекции, так как клетки с таким фенотипом (CD3brightCD4-, CD3brightCD8dim, CD3brightCD8-) – это обычно  $\gamma\delta$ -Т-клетки [13]. Данная субпопуляция может усиливать иммунный ответ, производя большие количества IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и хемокины. Обнаружение увеличенной субпопуляции  $\gamma\delta$ -Т-клеток может говорить о недавней или продолжающейся хронической стимуляции, особенно на слизистых оболочках или участках кожи. Эта информация позволяет клиницистам делать предположение о возможном медленно прогрессирующем инфекционном заболевании [14]. В рутинной практике не всегда есть возможность использования дорогостоящих реактивов для определения  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Однако, даже при использовании стандартных панелей для цитометрии клеток крови, иммунолог может дать клиницистам важную информацию, оценивая не только количественную характеристику популяций клеток, но и уровень экспрессии определённых рецепторов. Проведен анализ данных по обнаружению лимфотропных вирусов у пациентов, страдающих ВП, и наличие у них клеток с фенотипом CD3brightCD8dim. Лимфоциты с данным фе-

нотипом обнаружены у 46,4% больных. Из них у подавляющего большинства (84,62%) в лимфоцитах методом ПЦР были обнаружены вирусы герпеса 6 или 8 типа или вирус Эпштейна-Бара. В группе больных с нормальной экспрессией рецепторов CD3 и CD8 только у 53,33% были обнаружены лимфотропные вирусы ( $p < 0,05$ ). Таким образом, появление подобной популяции клеток на гистограмме при цитометрии в рамках стандартной иммунограммы должно привлечь внимание иммунолога с последующим акцентом на этой особенности в заключении. Лечащий врач должен обратить внимание на это отклонение, и учесть его при дальнейшем планировании методов диагностики и терапии.

## Выводы

В результате проведенных исследований нами выявлены как общие сдвиги в параметрах иммунной системы, присущие больным с большинством хронических дерматозов, так и особенности, характерные для определённых патологий. Данные особенности клеточного иммунитета у больных хроническими дерматозами позволят сформировать приоритетные направления дальнейших клинико-иммунологических исследований иммунопатогенеза дерматозов, в том числе с использованием методологии проточной цитометрии с разработкой конкретных рекомендаций по формированию комплексов исследуемых параметров иммунитета, углубленной характеристикой особенностей рецепторного аппарата иммунокомпетентных клеток периферической крови, характерных и значимых для отдельных дерматологических нозологий. ■

*Белых О.А. – к.б.н., научный сотрудник ФГУ «УрНИИДВиИ» Минздрава России, г. Екатеринбург; Кохан М.М. – д.м.н., профессор, руководитель научного клинического отдела дерматологии ФГУ «УрНИИДВиИ» Минздрава России, г. Екатеринбург; Кениксфест Ю.В. – к.м.н., ведущий научный сотрудник научного клинического отдела дерматологии ФГУ «УрНИИДВиИ» Минздрава России, г. Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку - Белых Ольга Александровна, e-mail: belykho@ya.ru, тел: +79028728959*

## Литература:

1. Кениксфест Ю.В., Кунгуров Н.В., Кохан М.М. Взаимосвязь клинических проявлений и иммунологических параметров при различных типах течения атопического дерматита у детей // Клиническая дерматология и венерология: научно-практический журнал. — 2004. — №1. — С.40-42;
2. Левчик Н.К., Белых О.А., Кохан М.М. и др. Характеристика иммунологических показателей периферической крови больных Т-клеточными лимфомами кожи низкой степени злокачественности // Иммунология: Двухмесячный научно-теоретический журнал / РАМН. — 2003. — Том 24, № 4. — С. 222-223
3. Виноградова Ю.Е., Лежах И.В., Варламова Е.Ю., Шлякваркина А.П., Замулаева И.А., Селиванова Е.И., Саенко А.С. Показатели аутоиммунитета у больных с Т- и В-клеточными лимфатическими опухолями. Мат-лы 2-й Московской международной конференции «Иммунофизиология. Естественный аутоиммунитет в норме и патологии», М., 2008;
4. Rober C., Kupper T.S. Inflammatory Skin Diseases, T Cells, and Immune Surveillance // Neng. Med. J. — 1999. — Vol.24(341). — P. 1817—1828.
5. Baker B.S. Recent Advances in PSORIASIS: The Role of the Immune System [Text] / B.S. Baker // ICP Imperial College Press. — 2000. — P. 180;

6. Asadullah R., Sterry W., Volk H.D. Analysis of Cytokine Expression in Dermatology // Arch. Dermatol. — 2002. — Vol. 138. — P. 1189—1196.
7. Lee JH, Noh J, Noh G, Kim HS, Mun SH, Choi WS, Cho S, Lee S Allergen-specific B cell subset responses in cow's milk allergy of late eczematous reactions in atopic dermatitis// Cell Immunol. 2009 Dec 29;
8. Кунгуров Н.В., Филимонкова Н.Н., Тузанкина И.А. и др. Типы иммунопатогенетических процессов при псориазе // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2004. 32. С. 35-38;
9. Ковалева А.С., Теплова С.Н., Пискалова Т.П. Популяционный состав лимфоцитов, процессы апоптоза и характер цитокин- и нитроксидазической регуляции у больных с множественными папилломами (нитевидными бородавками) кожи // Российский журнал кожных и венерических болезней. - 2010. - N 1. - С. 13-16;
10. Bos J.D., De Rie MA. Immunology in clinical practice // Ned Tijdschr Geneesk. — 1999. — Vol. 29(48). — P. 2334—2338;
11. Foley PA. Recent advances Dermatology // Brith. Med. J. — 2000. — Vol. 3. — P. 850—853;
12. A. Koreck, A. Surbnyi, B. J. Szuny, B. Farkas, Z. Bata-Csurcu, L. Kemény, A. Dobozy / CD3+CD56+ NK T cells are significantly decreased in the peripheral blood of patients with psoriasis / Clinical & Experimental Immunology // Volume 127, Issue 1, January 2002, p. 176–182;
13. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., 2008 – Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение/ Под ред. С.В.Хайдукова, А.В.Зурочки – Челябинск, 2008. -195 с.;
14. Chen Z.W., Letvin N.L. Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2 T-cells: a new paradigm. // Trends. Immunol. – 2003, -24, P/213-219);