

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ОЧАГОВОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

Л. В. Ганковская^{1✉}, О. А. Свитич², И. В. Хамаганова¹, Д. М. Гюльалиев¹

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

² Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова, Москва

Роль механизмов врожденного иммунитета в патогенезе ограниченной склеродермии практически не изучена. Однако все чаще признается ведущая роль молекул врожденного иммунитета (Toll-подобных рецепторов и цитокинов) в формировании склероза при ограниченной склеродермии. Целью работы было исследование экспрессии генов *TLR2*, *HBD-1* и *TNF-α* в очаге патологического процесса и в непораженном участке кожи больных ограниченной склеродермией. Используемый метод — ПЦР в реальном времени. В исследование были включены 63 пациента с ограниченной склеродермией: с бляшечной формой склеродермии — 49 больных, с идиопатической атрофодермией Пазини–Пьерини — 8, у 6 человек отмечено сочетание бляшечной склеродермии со склероатрофическим лихеном. Контрольную группу составили 8 здоровых доноров. В результате в патологическом очаге выявлен дисбаланс показателей врожденного иммунитета, проявляющийся в снижении экспрессии гена *TLR2*, увеличении экспрессии генов *HBD-1* и *TNF-α* по сравнению с кожей здоровых доноров. Выявленные изменения в показателях врожденного иммунитета могут свидетельствовать о нарушении процессов распознавания патогенов и эндогенных лигандов, активации локального воспаления за счет повышения экспрессии гена *TNF-α*, а также усиления фибробластических процессов, опосредуемых высоким уровнем противомикробного пептида HBD-1.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, склеродермия, дефенсины, Toll-подобные рецепторы, фактор некроза опухоли

✉ Для корреспонденции: Людмила Викторовна Ганковская
117997, Москва, ул. Островитянова, 1; lvgan@yandex.ru
Статья получена: 11.09.2015 Статья принята в печать: 12.11.2015

A CHANGE IN INNATE IMMUNE FACTORS EXPRESSION IN LOCALIZED SCLERODERMA

Gankovskaya LV^{1✉}, Svitich OA², Khamaganova IV¹, Gyluliev DM¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

² I. I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow

The role of innate immune mechanisms in the pathogenesis of localized scleroderma is still not understood. However molecules of innate immunity such as toll-like receptors and cytokines are increasingly seen as a driver for sclerosis development in patients with localized scleroderma. The objective of this study was to investigate the expression of *TLR2*, *HBD-1* and *TNF-α* genes both in the lesions and unaffected skin areas in patients with localized scleroderma. This study was real time PCR based. It enrolled 63 patients with localized scleroderma including 49 individuals with plaque morphea, 8 individuals with idiopathic atrophoderma of Pasini and Pierini, and 6 individuals with co-occurring plaque morphea and lichen sclerosus. The control group consisted of 8 healthy donors. The study showed the imbalance of innate immune factors in the lesion areas with the reduction in *TLR2* gene expression and increase in *HBD-1* and *TNF-α* genes expression compared to healthy donors skin. These changes in the innate immune factors can indicate defects in the processes of pathogene and endogenous ligand recognition, local inflammation development as a result of increased *TNF-α* expression, and fibroblast activity mediated by a high level of HBD-1 antimicrobial peptide.

Keywords: innate immunity, scleroderma, defensins, Toll-like receptors, tumor necrosis factor

✉ Correspondence should be addressed: Lyudmila Gankovskaya
1, Ostrovityanova st., Moscow, 117997; lvgan@yandex.ru
Received: 11.09.2015 Accepted: 12.11.2015

Очаговая склеродермия (ОСД) — хроническое заболевание соединительной ткани, главным образом поражающее кожу и подлежащие ткани, характеризующееся появлением локальных очагов склероза на фоне воспалительных процессов (эритемы, отека) и дальнейшим прогрессированием в атрофию и гипо/гиперпигментацию кожи [1]. Очаговую склеродермию относят к числу дерматозов, в этиологии и патогенезе которых до настоящего времени остается много сложных и нерешенных аспектов [2]. Этиология склеродермии представляется как сочетание генетической предрасположенности и воздействия на организм неблагоприятных факторов как внешнего, так и внутреннего генеза. Эти факторы вызывают аутогенную активацию иммунной системы и нарушение гемодинамики [3, 4].

В настоящее время известны три наиболее распространенные теории патогенеза ограниченной склеродермии: иммунные нарушения, сосудистая патология и обменные нарушения в соединительной ткани. По всей видимости, патогенные факторы являются провоцирующими, или пусковыми, способны вызвать изменения антигенных свойств собственных тканей и стимулировать синтез аутоантител, которые впоследствии повреждают сосуды [5].

Одним из главных и характерных для локализованной склеродермии признаков считается повышенная продукция и депонирование в коже и подлежащих тканях коллагена и других компонентов экстрацеллюлярного матрикса. Полагают, что активация фибробластов обусловлена цитокинами, высво-

бождаемыми лимфоцитами, макрофагами и эндотелиальными клетками. Профиброзным действием обладают трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), фактор роста фибробластов (FGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF), фактор роста соединительной ткани (CTGF), ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-6 [6].

Привлечению в патологический очаг лимфоцитов и клеток миелоидного происхождения с последующей продукцией цитокинов способствуют так называемые распознающие рецепторы врожденного иммунитета — Toll-подобные рецепторы (TLR) [7]. Существует мнение, что периодически возникающие химические, инфекционные, механические или аутоиммунные повреждения у генетически предрасположенных лиц вызывают активацию фибробластов. Распознающие рецепторы врожденного иммунитета все чаще признают ключевым фактором в развитии фиброза при системной склеродермии. Однако сведений об уровне экспрессии Toll-подобных рецепторов в патологически измененных участках кожи при ограниченной склеродермии найти не удалось.

Активация TLR приводит не только к экспрессии цитокинов, но и индуцирует выработку противомикробных пептидов — β -дефенсинов. Помимо противомикробной активности, дефенсины также принимают участие в процессах, связанных с повреждением, рубцеванием и восстановлением тканей. Человеческие β -дефенсины (hBD) продуцируются многими типами эпителиальных клеток. В частности, hBD-1 экспрессируются в эпителии кожи, почках, эпителии дыхательного и женского репродуктивного тракта [8]. Человеческие дефенсины hBD-2, hBD-3 экспрессируются в воспаленной коже и впервые были обнаружены при псориазе [9].

Роль механизмов врожденного иммунитета в патогенезе ограниченной склеродермии практически не изучена. Нам не удалось найти литературных источников с данными об изменении показателей врожденного иммунитета в очаге при ОСД. Однако не исключено, что исследование показателей врожденного иммунитета позволит разработать новые подходы в диагностике, прогнозе и лечении ОСД.

Для исследования были выбраны следующие маркеры: TLR2, противомикробный пептид HBD-1 и TNF- α . Выбор этих молекул обусловлен их важной функцией в механизмах врожденного иммунитета кожи. TLR2, как известно, является рецептором, распознающим широкий спектр патогенов и эндогенных лигандов. Взаимодействие TLR2 с лигандами индуцирует экспрессию генов противомикробных пептидов и провоспалительных цитокинов, в том числе и TNF- α . HBD-1 дефенсин осуществляет защиту от различных вирусов, бактерий и грибов. Наряду с противомикробной активностью HBD-1 влияет на процессы рубцевания тканей, регулируя функцию фибробластов. Известна ведущая роль TNF- α в индукции воспаления и в процессах репарации тканей [8].

Цель работы — исследование экспрессии генов *TLR2*, *HBD-1* и *TNF- α* в очаге патологического процесса и в непораженном участке кожи больных ограниченной склеродермией.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Под нашим наблюдением были 63 пациента, 10 мужчин и 53 женщины, в возрасте от 16 до 74 лет. Диагностированы следующие клинические формы: у 49 пациентов — бляшечная склеродермия, у 8 — идиопатическая атрофодермия Пазини–Пьерини, у 6 отмечено сочетание бляшечной склеродермии со склероатрофическим лихеном. Давность заболевания составляла от 1 мес до 6 лет. В контрольную группу вошли 8 здоровых доноров. Всем пациентам проведено общеклиническое обследование, включая консультацию терапевта, эндокринолога, хирурга и при необходимости других специалистов, проанализированы также результаты исследований крови,

Из образцов-соскобов с поверхности кожи в районе очага склеродермии и в районе нормальной ткани была выделена РНК с использованием набора реагентов RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия) строго по протоколу. Для определения уровня экспрессии исследуемых генов с помощью реакции обратной транскрипции была получена кДНК. На следующем этапе исследования с полученной в результате реакции обратной транскрипции кДНК проводили полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия)

Реакцию проводили с использованием «Набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I» («Синтол», Россия). Последовательность праймеров для определения уровня экспрессии данных генов подбирали с помощью программы Vector NTI Suite 8.0 (последовательности мРНК были получены в базе данных GenBank). Системы для определения экспрессии генов *TLR2*, *HBD-1* и *TNF- α* были отработаны ранее [10]. Уровень экспрессии исследуемых генов определяли относительно экспрессии гена β -актина [11].

Данные по экспрессии исследуемых генов представлены в виде количества копий исследуемого гена относительно 10^3 копий гена актина. Результаты на диаграммах и в таблице представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (25–75-й процентиля). Статистическую обработку проводили с использованием программы Statsoft Statistica v. 6.0. Достоверность получаемых различий между группами оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$ [12].

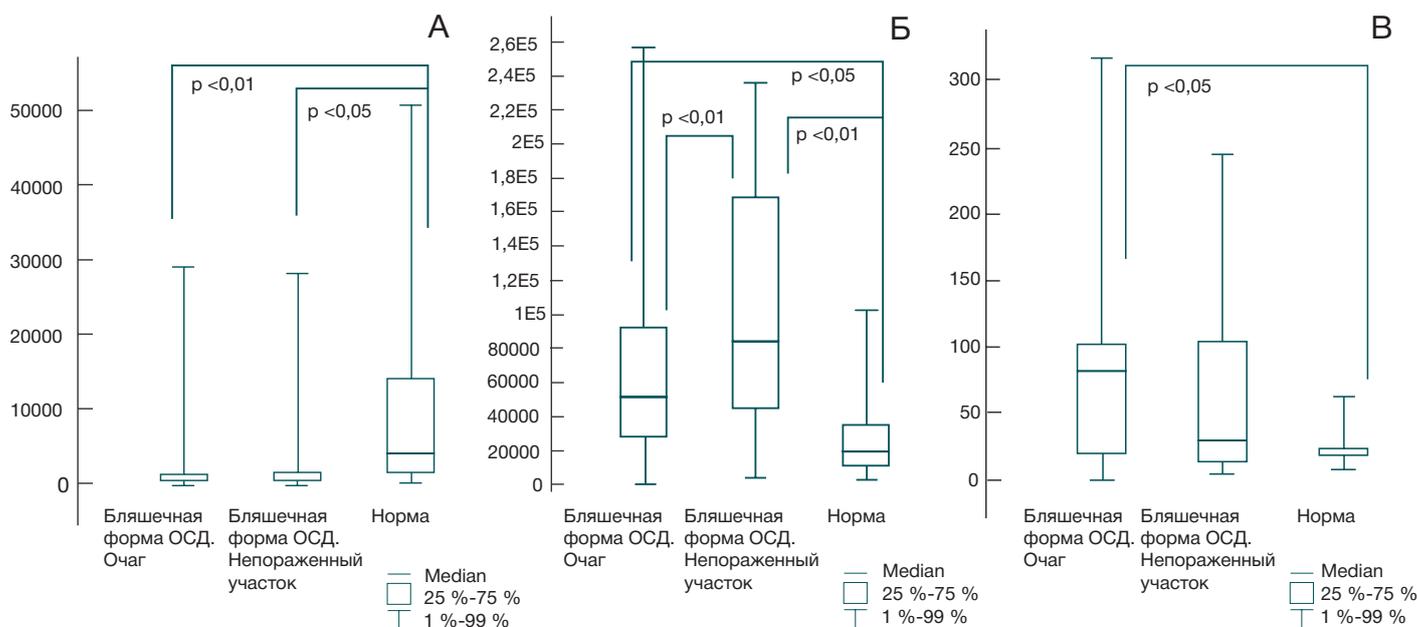
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе проведено комплексное исследование экспрессии генов важных молекул врожденного иммунитета: TLR2, противомикробного пептида HBD-1 и провоспалительного цитокина TNF- α в очаге патологического процесса, в непораженной коже больных с различными формами ОСД и в коже здоровых доноров.

В результате исследований было выявлено достоверное снижение экспрессии гена *TLR2* в очаге патологического процесса при бляшечной форме ОСД по сравнению с кожей здоровых доноров ($p < 0,01$). Характерной особенностью является снижение уровня экспрессии гена *TLR2* и в участках непораженной кожи больных бляшечной формой ОСД (рисунок А).

При этом наблюдается увеличение экспрессии гена *HBD-1* в 2,5 раза в очаге повреждения по сравнению с кожей здоровых доноров (таблица; рисунок, А). Следует заметить, что в неизмененных участках кожи больных с очаговой формой ОСД ген противомикробного пептида HBD-1 экспрессируется в большей степени, чем в патологическом очаге ($p < 0,01$). У больных с бляшечной формой ОСД выявлено увеличение экспрессии гена *TNF- α* только в патологически измененных очагах кожи (рисунок, В). В участках здоровой кожи экспрессия гена *TNF- α* не отличалась от показателей здоровых доноров. При сочетании бляшечной склеродермии со склероатрофическим лихеном изменения экспрессии генов исследуемых молекул носят схожий характер с группой больных бляшечной формой ОСД (таблица).

При идиопатической атрофодермии Пазини–Пьерини зафиксированы следующие изменения показателей врожденного иммунитета. Экспрессия гена распознающего рецептора TLR2 в патологическом очаге и непораженных участках кожи больных статистически достоверно не отличается от показателей здоровых доноров (таблица). При этом обнаружено выраженное увеличение экспрессии гена *TNF- α* в изолированных очагах, превышающее показатели кожи здоровых доноров в 5,65 раза ($p < 0,01$).



Экспрессия генов *TLR2* (А), *HBD-1* (Б), *TNF-α* (В) в кератиноцитах при бляшечной форме склеродермии и в норме. По оси абсцисс — исследуемые группы, по оси ординат — количество копий изучаемых генов относительно 10^3 копий гена актина.

Экспрессия генов *TLR2*, *HBD-1*, *TNF-α* в кератиноцитах при различных формах склеродермии

Гены врожденного иммунитета	Формы склеродермии	Кератиноциты		
		патологический очаг	непораженный участок	здоровая кожа (норма)
<i>TLR2</i>	бляшечная форма ОСД	710** (543–1278)	774* (572–1704)	4366 (1655–14290)
	атрофодермия Пазини–Пьерини	1433 (863–11133)	2452 (1328–5711)	4366 (1655–14290)
	склероатрофический лишай	972 (584–1509)	852* (514–18165)	4366 (1655–14290)
<i>HBD-1</i>	бляшечная форма ОСД	51007* (28782–92277)	84568** (44982–1687400)	20059
	атрофодермия Пазини–Пьерини	39318 (35535–53224)	51553 (20314–1093800)	20059
	склероатрофический лишай	52163 (48645–73807)	54163* (38711–73029)	20059
<i>TNF-α</i>	бляшечная форма ОСД	83* (20–103)	30 (14–104)	20 (19–23)
	атрофодермия Пазини–Пьерини	116** (59–447)	53 (13–91)	20 (19–23)
	склероатрофический лишай	46* (34–142)	24 (15–77)	20 (19–23)

Примечание: результат представлен в виде медианы (25-75-й процентиля). * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ при сравнении с соответствующим показателем нормы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При бляшечной форме ОСД в очаге патологических изменений выявлен дисбаланс показателей врожденного иммунитета на уровне экспрессии генов *TLR2*, *HBD-1* и *TNF-α*, проявляющийся в снижении *TLR2*, увеличении экспрессии генов *HBD-1* и *TNF-α* в сравнении с кожей здоровых доноров. Можно предположить, что снижение экспрессии гена *TLR2* является следствием патологического процесса, происходящего в коже больных с ОСД, и свидетельствует о выраженном нарушении процессов распознавания патогенов и эндогенных лигандов.

На сегодняшний день уже известно, что в основе развития очаговой склеродермии лежит нарушение функции фибробластов. Последние синтезируют большое количество незре-

лого коллагена. Исследованиями последних десятилетий доказано, что в процессах образования фиброза в дерме активную роль играют цитокины: провоспалительные, трансформирующие, тромбоцитарные и фибробластные факторы роста.

Известно, что провоспалительные цитокины, и в частности *TNF-α*, не только принимают участие в развитии воспаления, но и обладают фиброзогенным действием.

Присутствие *TNF-α* в сыворотке больных ОСД положительно коррелирует с серологическим наличием антител к гистонам, к одноцепочечной ДНК (ssDNA), и *TNF-α* по праву рассматривают в роли маркера, свидетельствующего о тяжести течения ОСД [13]. Однако увеличение экспрессии гена *TNF-α* напрямую не опосредовано *TLR2*-зависимыми механизмами, так как при ОСД наблюдается значительное снижение экс-

прессии гена *TLR2* в коже (рисунок). Как известно, противомикробный пептид HBD-1, наряду с иммунорегуляторной активностью и противомикробным действием, участвует в процессах репарации [14]. Можно предположить, что гиперэкспрессия гена *HBD-1* в коже больных с ОСД изменяет синтез коллагена и способствует формированию фиброза. Увеличение экспрессии гена *HBD-1* можно рассматривать как один из возможных маркеров развития ОСД. При таких формах ОСД, как идиопатическая атрофодермия Пазини-Пьерини, ограниченная форма в сочетании со склероатрофическим лихеном выявлено достоверное увеличение экспрессии этого гена именно в непораженных участках кожи (таблица). В очаге патологического процесса экспрессия гена *HBD-1* увеличена, но недостоверно, что может быть обусловлено небольшой выборкой пациентов исследуемых групп. Полученные результаты позволяют проанализировать роль механизмов врожденного иммунитета в патогенезе очаговой склеродермии, а также в

комплексе с клиническими показателями могут быть использованы для прогноза течения ОСД и оценки эффективности проводимой терапии.

ВЫВОДЫ

В патологически измененных очагах кожи при ограниченной склеродермии выявлены нарушения врожденных механизмов защиты на уровне экспрессии генов *TLR2*, *HBD-1* и *TNF-α*, следствием чего может быть нарушение процессов распознавания патогенов и эндогенных лигандов, индукция локального воспаления и возможная стимуляция формирования фиброза. Полученные результаты об увеличении экспрессии гена противомикробного пептида HBD-1 в непораженных участках кожи больных с ограниченной формой ограниченной склеродермии можно рассматривать как один из возможных маркеров развития этого дерматоза.

Литература

1. Хамаганова И. В., Дворников А. С. Эндокринные нарушения при ограниченной склеродермии. Тер. архив. 2005; 10: 39–44.
2. Болотная Л. А., Шахова Ф. Б., Сербина И. М. Новое в патогенезе и терапии ограниченной склеродермии. Вестн. дерматол. и венерол. 2004; 2: 31–4.
3. Довжанский С. И. Клинико-иммунологические параллели при ограниченной и системной склеродермии. Рос. журн. кожн. и венерич. бол. 2002; 4: 26–9.
4. Скрипкин Ю. К., Мордовцев В. Н., редакторы. Кожные и венерические болезни. Руководство для врачей: в 2 т. М.: Медицина; 1999. 2: 457–500.
5. Скрипкин Ю. К., Бутов Ю. С., Иванов О. Л., редакторы. Дерматовенерология. Национальное руководство М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013. С. 749.
6. Yamamoto T, Nakane T, Osaki T. The mechanism of mononuclear cell infiltration in oral lichen planus: the role of cytokines released from keratinocytes. J Clin Immunol. 2000 Jul; 20 (4): 294–305.
7. Ярилин А. А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010. 749 с.
8. Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В., Мешкова Р. Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. 640 с.
9. Bhattacharyya S, Varga J. Emerging roles of innate immune signaling and toll-like receptors in fibrosis and systemic sclerosis. Curr Rheumatol Rep. 2015 Jan; 17 (1): 474.
10. Ганковская О. А., Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В. и др. Роль Toll-подобных рецепторов и дефенсинов в противомикробной защите урогенитального тракта женщин. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. 2008; 1: 46–50.
11. Сомова О. Ю., Ганковская О. А., Лавров В. Ф. и др. Динамика экспрессии молекул TLR9-опосредованного сигнального пути эпителиальными клетками цервикального канала под действием вируса простого герпеса 2 типа in vitro. Рос. иммунол. журн. 2011; Т. 5 (14) 2: 129–34.
12. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999. 459 с.
13. Hasegawa M, Sato S, Nagaoka T, Fujimoto M, Takehara K. Serum levels of tumor necrosis factor and interleukin-13 are elevated in patients with localized scleroderma. Dermatology. 2003; 207 (2): 141–7.
14. Gomes Pde S, Fernandes MH. Defensins in the oral cavity: distribution and biological role. J Oral Pathol Med. 2010 Jan; 39 (1): 1–9.

References

1. Khamaganova IV, Dvornikov AS. Endocrine disturbances in circumscribed scleroderma. Ter Arkh. 2005; 77 (10): 39–44. Russian.
2. Bolotnaya LA, Shakhova FB, Serbina IM. Novoe v patogeneze i terapii ogranichennoy sklerodermii. Vestn Dermatol Venerol. 2004; 2: 31–4. Russian.
3. Dovzhanskiy SI. Kliniko-immunologicheskie paralleli pri ogranichennoy i sistemnoy sklerodermii. Ross Zh Kozhn Venerich Bol. 2002; 4: 26–9. Russian.
4. Skripkin YuK, Mordovtsev VN, editors. Kozhnye i venericheskie bolezni. Rukovodstvo dlya vrachev: in 2 vol. M.: Meditsina; 1999. 2: 457–500. Russian.
5. Skripkin YuK, Butov YuS, Ivanov OL, editors. Dermatovenerologiya. Natsional'noe rukovodstvo. Moscow: Geotar-Media; 2013. P. 749. Russian.
6. Yamamoto T, Nakane T, Osaki T. The mechanism of mononuclear cell infiltration in oral lichen planus: the role of cytokines released from keratinocytes. J Clin Immunol. 2000 Jul; 20 (4): 294–305.
7. Yarinin A. A. Immunology. Moscow: Geotar-Media, 2010. 749 c. Russian.
8. Koval'chuk LV, Gankovskaya LV, Meshkova RYa. Klinicheskaya immunologiya i allergologiya s osnovami obshhey immunologii. Moscow: Geotar-Media; 2011. 640 p. Russian.
9. Bhattacharyya S, Varga J. Emerging roles of innate immune signaling and toll-like receptors in fibrosis and systemic sclerosis. Curr Rheumatol Rep. 2015 Jan; 17 (1): 474.
10. Gankovskaya OA, Koval'chuk LV, Gankovskaya LV. et al. Role of Toll-like receptors and defensins in antimicrobial protection of urogenital tract in females. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 2008 Jan-Feb; 1: 46–50. Russian.
11. Somova OYu, Gankovskaya OA, Lavrov VF, et al. Dinamika ekspressii molekul TLR9-oposredovannogo signal'nogo puti epiteliial'nymi kletkami tservikal'nogo kanala pod deystviem virusa prostogo gerpesa 2 tipa in vitro. Ross Immunol Zh. 2011; Vol. 5 (14) 2: 129–34. Russian.
12. Glantz S. Mediko-biologicheskaya statistika. Moscow: Praktika; 1999. 459 p. Russian.
13. Hasegawa M, Sato S, Nagaoka T, Fujimoto M, Takehara K. Serum levels of tumor necrosis factor and interleukin-13 are elevated in patients with localized scleroderma. Dermatology. 2003; 207 (2): 141–7.
14. Gomes Pde S, Fernandes MH. Defensins in the oral cavity: distribution and biological role. J Oral Pathol Med. 2010 Jan; 39 (1): 1–9.