

Г.П. Терещенко

аспирант кафедры кожных и венерических болезней факультета последипломного профессионального образования ГОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздравсоцразвития России»

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЙ МЕСТНЫХ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ ПРИ ГНЕЗДНОЙ АЛОПЕЦИИ С УЧЕТОМ АКТИВНОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Цель. Изучение морфологических особенностей гнездной алопеции в зависимости от активности заболевания.

Материал и методы. Исследованы биоптаты кожи скальпа пациентов с гнездной алопецией. Наряду со стандартными морфологическими признаками оценена экспрессия CD4+, CD8+, CD68+, интерлейкина-2 (IL-2), интерферона- γ (IFN- γ), фактора некроза опухолей α (ФНО- α)

Результаты. Данные клинико-морфологического и иммуногистохимического исследований подтверждают иммунный механизм воспаления при гнездной алопеции, который связан с формированием местной (обусловленной CD4+ и CD8+) цитотоксической воспалительной реакции Т-лимфоцитов при участии провоспалительных цитокинов Th1 (IL-2, IFN- γ , ФНО- α) и других клеток лимфогистиоцитарного инфильтрата. Результаты исследования позволяют выявить прямую корреляционную связь между активностью заболевания и иммуноморфологическими изменениями в коже при гнездной алопеции.

Заключение. Признаки участия иммунных механизмов в патогенезе гнездной алопеции позволяют обсуждать целесообразность применения соответствующих патогенетических методов лечения.

Ключевые слова: гнездная алопеция, иммунное воспаление, цитотоксические Т-лимфоциты

Aim. Description of morphological characteristics of alopecia areata according to the disease activity.

Methods. Skin biopsies from scalp of patients with alopecia areata were studied: expression of CD4+, CD8+, CD68+, interleukin-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor α (TNF- α) was assessed.

Results. In alopecia areata local inflammatory CD4+- and CD8+-mediated cytotoxic immune response develops with participation of proinflammatory cytokines (IL-2, IFN- γ , TNF- α). Correlation between clinical and morphological signs of alopecia areata activity can be seen.

Conclusion. Local skin immune-mediated inflammatory response in alopecia areata can be considered as target for pathogenetic therapy.

Key words: alopecia areata, immune response, cytotoxic T-lymphocytes

Введение

Гнездная алопеция (ГА) — распространенное воспалительное заболевание, характеризующееся патологическим выпадением волос и формированием очагов облысения на волосистой части головы, а иногда на других участках кожного покрова, включая область бороды, бровей, ресниц и туловища [1, 17, 18]. Этиология ГА по-прежнему неясна; большинство исследователей связывают заболевание с аутоиммунизацией, опосредованной аутоактивированными Т-лимфоцитами, при участии генетических факторов, экзогенных и эндогенных пусковых механизмов [4, 10, 11, 13].

ГА имеет три стадии клинической активности, последовательно сменяющие друг друга. В острой, или активной, стадии выявляют интенсивное выпадение волос с покраснением кожных покровов, в устье зияющих волосяных фолликулов (ВФ) — черные точки кадаверизованных волос либо пеньки волос в виде восклицательного знака. При хронической, или стационарной, стадии лишенный волос очаг остается без изменений, гиперемия исчезает, а кожа приобретает обычный цвет. Хроническая стадия может длиться неопределенный промежуток времени: от нескольких недель до нескольких лет. При благоприятном течении болезни в случае спонтанной ремиссии или в результате успешной терапии наступает следующая фаза — регрессирующая (или восстановительная), во время которой наблюдается возобновление роста волос в очаге.

Гистологические и иммуногистохимические (ИГХ) исследования ГА демонстрируют наличие местной тканевой воспалительной реакции в очагах выпадения волос, при этом неспецифический воспалительный инфильтрат может располагаться вокруг волосяных фолликулов (ВФ), вокруг сосудов и иногда проникать интрафолликулярно. Воспалительный клеточный инфильтрат состоит в основном из Т-лимфоцитов, макрофагов и клеток Лангерганса. Т-лимфоциты, а именно CD4⁺ и CD8⁺, составляют основную массу клеток воспалительного инфильтрата, и, очевидно, играют ключевую роль в патогенезе ГА [3, 8, 15, 22, 24]. Однако потеря волос при ГА является результатом не только прямого воздействия на волосяные луковицы активированных Т-лимфоцитов, но и опосредованного влияния различных цитокинов [19]. Под действием активированных Т-хелперов происходит повышенная продукция провоспалительных Th1-цитокинов, основными из которых являются IL-2, IFN- γ , и ФНО- α [6, 7, 20].

Результаты изучения фенотипа клеток воспалительного инфильтрата и отражающие соотношение CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов в воспалительном инфильтрате, в некоторой степени противоречивы [9, 13, 16, 20], поскольку в них не учитывались степень активности заболевания — острая и хро-

ническая стадии. Мы предположили, что степень активности заболевания должна коррелировать с изменением иммуноморфологического фенотипа клеток инфильтрата в очаге ГА. В связи с этим целью нашего исследования явились изучение морфологических и ИГХ-особенностей острой и хронической стадий ГА и уточнение патогенеза заболевания на основании полученных данных.

Материал и методы

Исследование выполнено на материале биопсий кожи скальпа 28 больных с клиническим диагнозом гнездная алопеция, подтвержденным гистологически. Возраст пациентов составил от 18 до 54 лет, в исследовании приняли участие 18 женщин и 10 мужчин. На основании объективного осмотра все пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от степени активности заболевания. В 1-ю группу с активной стадией патологического процесса (продолжительность заболевания или текущего эпизода гнездной алопеции в среднем от 2–3 нед до 3 мес) были включены 14 пациентов. Из них потеря волос менее 25% была у 7, потеря волос 25–49% — у 3, потеря волос 50–74% — у 3 и потеря волос 75–99% — у 1. Хроническая стадия заболевания (продолжительностью от 3 мес до 5 лет и более) констатирована у оставшихся 14 больных. Из них у 3 потеря волос составила менее 25%, потеря волос 25–49% — у 2, потеря волос 75–99% — у 3 и полная потеря волос (100%) — у 6. Все пациенты не получали лечения по поводу ГА в течение 3 мес.

Образцы кожи из очагов облысения брали с помощью одноразового punch-биоптата диаметром 4 мм. Ткань фиксировали в 4% нейтральном забуференном формалине и заливали в парафин с установкой биоптатов «на ребро». Затем приготавливали серийные парафиновые срезы толщиной 4 мкм на стекла с поли-L-лизинным покрытием для иммуногистохимических исследований. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике.

ИГХ-исследования проводили с применением моноклональных антител к CD4⁺, CD8⁺, CD68⁺, IL-2, IFN- γ , ФНО- α («LabVision»).

По серийным парафиновым срезам, окрашенным гематоксилином и эозином, оценивали общие морфологические процессы при ГА, такие как наличие воспалительного инфильтрата и его распределение, наличие склероза, патология эпителия фолликулов, присутствие волос в ВФ. С помощью иммуногистохимической окраски определяли клеточный и цитокиновый состав воспалительного инфильтрата в биоптатах кожи больных с ГА. Результаты ИГХ-реакций оценивали количественно и полуколичественно. Рассчитывали число клеток CD4⁺, CD8⁺, CD68⁺ в поле зрения $\times 400$, а цитокины IL-2, IFN- γ и ФНО- α оценивали полуколичественно в баллах по общепринятой методике.

Полученные результаты сравнивали со данными полученными при морфологическом исследовании биоптатов кожи 7 здоровых людей, взятых с волосистой части головы (контрольная группа).

Результаты и обсуждение

Больные 1-й группы с активной стадией ГА и продолжительностью текущего эпизода 2–3 нед предъявляют жалобы на усиленное выпадение волос, сопровождающееся формированием очагов облысения, субъективно ощущаются симптомы в виде умеренного зуда, жжения, чувства ползания мурашек в коже скальпа, где позже формируются очаги алопеции. При осмотре пациентов на волосистой части головы определяются 1 или более очаги облысения диаметром 3–5 см. Очаги слегка гиперемированы, имеют четкую границу. В самом очаге и по его краю наблюдаются капаверизованные волосы в виде черных точек в устье фолликулов, а также пеньки волос в виде восклицательного знака. При ручной эпиляции волос на границе очагов выявляется зона расшатанных волос шириной около 0,3–1 см, в которой легко эпилируются телогеновые либо дистрофичные волосы, обламывающиеся у основания их выхода из устья ВФ на поверхность кожи.

У пациентов 2-й группы с хронической стадией заболевания клиническая картина ГА имеет более скудные симптомы. Пациенты жалуются на отсутствие роста волос, при этом субъективные жалобы, связанные с нарушением или изменением чувствительности кожи в очагах облысения, отсутствуют. Кожа в очагах облысения гипотрофична и имеет обычную окраску. Устья фолликулов не визуализируются, отсутствует зона расшатанных волос, черные точки обломанных волос или волосы в виде восклицательного знака не выявляются.

При окрашивании гематоксилином и эозином морфологическая картина в очагах ГА у всех больных определяется в виде неспецифического воспалительного инфильтрата, состоящего из Т-лимфоцитов, макрофагов и других лимфоцитотроцитарных элементов, включая клетки Лангерганса (рис. 1).

Неспецифический воспалительный инфильтрат особенно выражен в активную стадию ГА, при этом основную массу клеток составляют Т-лимфоциты и макрофаги. Инфильтрат может располагаться как вокруг волосяных фолликулов, так и вокруг сосудов. На основании распределения инфильтрата условно можно выделить 3 морфологических типа воспаления:

- с преимущественной перифолликулярной инфильтрацией – у 5 из 14 больных с активной стадией ГА (36%);
- с преимущественной периваскулярной инфильтрацией – у 4 из 14 больных с активной стадией ГА (28%);
- смешанный вариант (инфильтрация как вокруг сосудов, так и вокруг волосяных фолликулов) – у 5 из 14 больных с активной стадией ГА (36%).

В активной стадии ГА отмечается также выраженный дис- и паракератоз эпителия (в единичных биоптатах наблюдались признаки апоптоза), инфильтрация стромы.

В хронической стадии очаги воспалительной инфильтрации слабо выражены. Отмечаются атрофия волосяных фолликулов, перифолликулярный и периваскулярный склероз, склероз дермы, который заключается в утолщении коллагеновых волокон, фиброзных тяжах, уменьшении отека тканей, склероз стенок сосудов (в одном биоптате в просвете наблюдались детрит и петрификаты) (рис. 2).

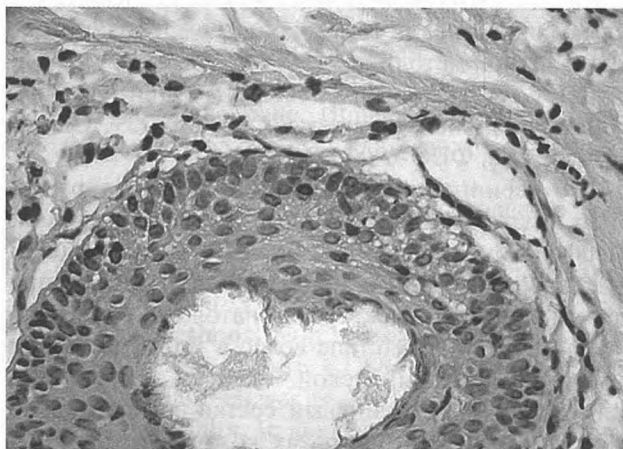


Рис. 1. Гистологическая картина ГА, активная стадия (×400)

Обильный воспалительный клеточный инфильтрат, окружающий ВФ и состоящий из лимфоцитов и макрофагов.

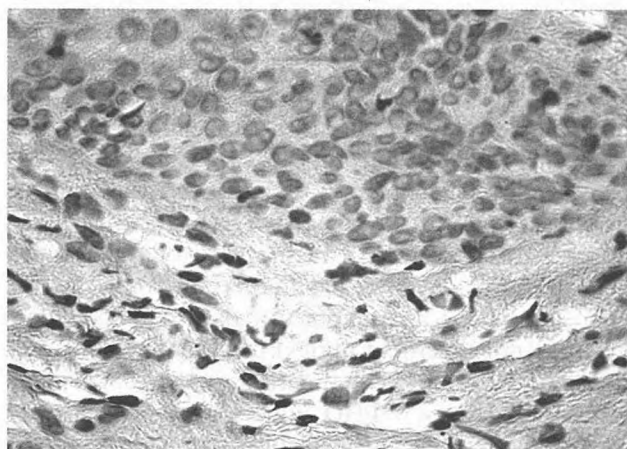


Рис. 2. Гистологическая картина ГА, хроническая стадия (×400)

Отмечается склероз дермы с выраженным перифолликулярным склерозом.

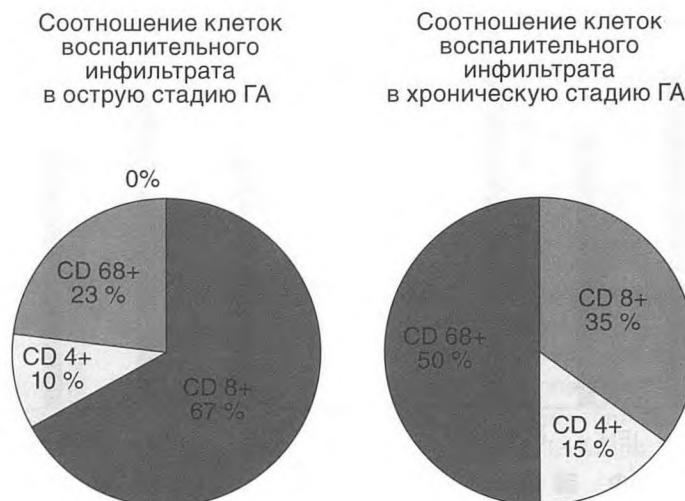


Рис. 3. ИГХ-исследования клеточного состава воспалительного инфильтрата

При ИГХ-исследовании в активную стадию ГА основную массу клеток перифолликулярного и периваскулярного инфильтрата составляют Т-лимфоциты CD8+ — до 67%, CD4+ — до 10%, CD68+ — до 23%. Хроническая стадия ГА характеризуется снижением абсолютного количества клеток CD8+, CD4+, CD68+ инфильтрата в поле зрения, тогда как в процентном отношении происходит перераспределение клеток с уменьшением CD8+ (до 35 %) и относительным увеличением CD4+ и CD68+ (до 15 и 50% соответственно). Распределение клеток воспалительного инфильтрата при ИГХ-исследовании в активную и хроническую стадии ГА показано в табл. 1.

Характеризуя профиль воспалительных цитокинов Th-1 при ГА, следует отметить повышенное содержание IFN- γ в воспалительном инфильтрате (5 баллов) и внутри волосяных фолликулов (4 балла), причем эти значения одинаковы как в активную, так и в хроническую стадии ГА. Провоспалительный цитокин IL-2 определяется в большей степени в активную стадию ГА как в воспалительном инфильтрате (до 6 баллов), так и в волосяных фолликулах (до 2 баллов), однако его содержание несколько снижается при хронической форме заболевания. Высокое содержание TNF- α больше выражено в активную стадию заболевания (до 6 баллов), оставаясь повышенным в хроническую стадию (до 4 баллов) (рис. 4).

Сопоставив результаты морфологического и ИГХ-исследования с клинической картиной заболевания, можно выявить прямую корреляцию между активностью патологического процесса и местными иммунноморфологическими изменениями в коже при ГА. Так, в активную (острую) стадию заболевания определяется массивный воспалительный инфильтрат с преоблада-

нием цитотоксических Т-лимфоцитов и повышенным содержанием провоспалительных цитокинов. Учитывая клиническую картину активной стадии ГА, можно предположить, что именно эти местные иммунные реакции являются причиной размягчения и выпадения волос, а также специфических изменений кожи, таких как легкая гиперемия и парестезии. Напротив, в хроническую стадию ГА, когда клинически очаг облысения уже сформирован, отсутствуют гиперемия кожи и специфические признаки расширения границ очагов. В эту стадию мы можем наблюдать характерные патоморфологические и ИГХ-изменения: минимальную степень клеточного ответа в виде уменьшения воспалительного инфильтрата и перераспределения клеток инфильтрата (CD8+ и CD4+) с преобладанием фибробластических и гистиоцитарных элементов. Содержание провоспалительных цитокинов Th-1 в хроническую стадию ГА также достоверно снижается. Эти изменения отражают смену воспалительной реакции в очаге ГА на репаративные и склеротические механизмы.

Отсутствие единого мнения о причинах появления и закономерностях течения ГА делает актуальной проблему изучения звеньев патогенеза этого дерматоза, поскольку полученные данные позволяют разработать патогенетические методы терапии.

Полученные к настоящему времени данные о патологии ГА свидетельствуют о том, что в основе патогенеза заболевания лежат локальные иммунные нарушения в волосяных фолликулах по механизму реакция гиперчувствительности IV типа (РГЧ IV типа, или гиперчувствительность замедленного типа), которая обусловлена клеточными иммунными реакциями в виде сенсибилизации Т-лимфоцитов, проявляющих цитотоксичность

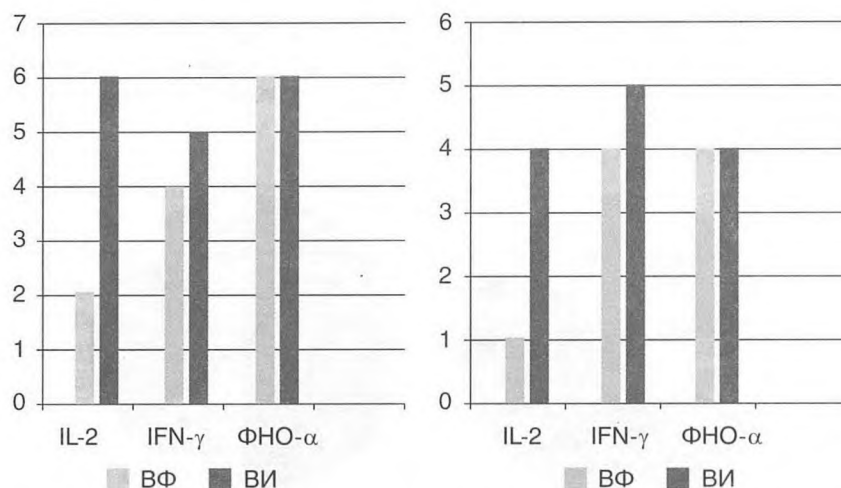


Рис. 4. Распределение провоспалительных цитокинов при ИГХ в активную и хроническую стадии ГА
Примечание: ВФ – волосяной фолликул; ВИ – воспалительный инфильтрат.

путем секреции цитокинов [2]. При ГА эти нарушения связаны с действием Т-лимфоцитов CD8+ и CD4+ и изменением цитокинового профиля при действии IL-2, IFN-γ и ФНО-α и способствуют усилению апоптоза в матриксе ВФ и формированию неспецифического аутоиммунного воспаления.

В нашем исследовании мы определили, что выявляемый при гистологическом и ИГХ-исследовании воспалительный инфильтрат состоит в основном из цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+ и CD4+), макрофагов CD68+ и других лимфогистиоцитарных клеток, включая клетки Лангерганса. Среди Т-лимфоцитов преобладают CD8+, которые, по-видимому, обуславливают формирование цитотоксического иммунного ответа. Полученные данные совпадают с результатами работ ряда авторов, в которых также отмечено преобладание CD8+ по сравнению с CD4+ что указывает на их высокую патогенетическую значимость [7, 21, 23]. Считают, что высокое содержание лимфоцитов CD8+ за счет кооперации с Т-хелперами (CD4+), макрофагами и клетками Лангерганса формирует опосредованный Т-клетками цитотоксический иммунный ответ, ассоциированный с NK-клетками [5, 6, 17]. Воспалительный лимфогистиоцитарный инфильтрат располагается не только вокруг ВФ, но может проникать внутрь клеток волосяной луковицы и окружать сосуды, что отражает морфогенез аутоиммунного воспаления. Иммунный цитолиз клеток ВФ осуществляется не только за счет Т-лимфоцитов, но и за счет провоспалительных цитокинов Th-1, таких как IL-2, IFN-γ и ФНО-α. При этом предполагают, что IL-2 играет роль инициатора аутоиммунного воспалительного процесса [7]. В настоящее время IFN-γ рассматривается

как единственный цитокин, способный индуцировать HLA-DR антигены в клетках волосяных фолликулов, что является важным условием специфического взаимодействия цитотоксических Т-лимфоцитов с эпителием матрикса волоса [14, 19]. ФНО-α, являясь сильным индуктором апоптоза, подавляет пролиферацию кератиноцитов и совместно с IFN-γ оказывает синергичный антипролиферативный эффект, что также обуславливает возможную роль ФНО-α в иммунном механизме развития очаговой алопеции [12, 21]. Высокое содержание ФНО-α, больше выраженное в активную стадию заболевания, подтверждает его участие в механизмах цитотоксического повреждения волосяных фолликулов. Исследуемые цитокины продуцируются клетками как лимфогистиоцитарного инфильтрата, так и ВФ при их иммунном повреждении. Мы подтвердили это, обнаружив IL-2 и IFN-γ в воспалительном инфильтрате и между клетками матрикса ВФ. Поврежденный эпителий ВФ является главным продуцентом ФНО-α, подготавливая тем самым апоптоз поврежденных клеток.

На основании полученных данных можно говорить о патогенезе ГА, развивающемся по механизму аутоиммунного воспаления, соответствующему РГЧ IV типа. В связи с этим иммунноморфологические и противовоспалительные подходы к терапии ГА должны быть направлены на подавление цитотоксических Т-лимфоцитов и цитокинов Th-1.

Таким образом, ГА имеет иммунный патогенез с развитием иммунного воспаления при участии цитотоксических Т-лимфоцитов, которые доминируют среди клеток воспалительного инфильтрата. Цитотоксический эффект осуществляется за счет кооперации Т-лимфоцитов (CD8+ и

CD4+) и гистиоцитов, включая макрофаги CD68+ и клетки Лангерганса, а также гиперпродукции провоспалительных цитокинов Th-1 (IL-2, IFN- γ и ФНО- α) как клетками воспалительного инфильтрата, так и клетками ВФ. В результате этого происходят усиление апоптоза и иммунный цитолиз матричных клеток ВФ, что проявляется выпадением волос в активную стадию ГА и формированием склеротических изменений в перифолликулярных тканях в хроническую стадию патологического процесса.

Литература

1. Адаскевич В.П., Мяделец О.Д., Тихоновская И.В. Алопеция. Медицинская книга. — Н. Новгород: Изд. НГМА, 2000. — 79 с.
2. Аллергология и иммунология: Клинические рекомендации / Под ред. Р.М. Хаитова, Н.И. Ильиной. — М: ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 240 с.
3. Гаджигорова А.Г., Коган Е.А., Потеев Н.Н. и др. Соотношение процессов апоптоза, пролиферации, неоваскуляризации и клеточной дифференцировки при иммунном воспалении в очагах гнездовой алопеции // Клин. дерматол. и венерол. — 2010. — № 2. — С. 23–31.
4. Суворова К.Н., Гаджигорова А.Г. Гнездовая алопеция. Ч. 1: Этиология и патогенез // Вестн. дерматол. и венерол. — 1998. — № 5. — С. 67–73.
5. Bodemer C., Peuchmaur M., Fraitag S. et al. Role of cytotoxic T cells in chronic alopecia areata // J. Invest. Dermatol. — 2000. — Vol. 114, N 1. — P. 112–116.
6. Brajac I., Gruber F., Petrovec M., Malnar-Dragojevic D. Interleukin-2 receptor alpha-chain expression in patients with alopecia areata // Acta Dermatovenereol. Croat. — 2004. — Vol. 12, N 3. — P. 154–156.
7. Chodorowska G., Dabrowska-Czlonka M., Bartozinska J. et al. The immunological aspects of alopecia areata // Ann. Univ. Mariae Curie Sklodowska. — 2007. — Vol. LXII, N 1. — P. 37.
8. Emel D.C., Ekin S., Meltem U. et al. Investigation of the inflammatory mechanisms in alopecia areata // Am. J. Dermatopathol. — 2009. — Vol. 31. — P. 53–60.
9. Gilhar A., Landau M., Assy B. et al. Mediation of alopecia areata by cooperation between CD4+ and CD8+ lymphocytes: transfer to human scalp explants on Prkdc(scid) mice // Arch. Dermatol. — 2002. — Vol. 138. — P. 916–922.
10. Gilhar A., Paus R., Kalish R.S. Lymphocytes, neuropeptides, and genes involved in alopecia areata // J. Clin. Invest. — 2007. — Vol. 117, N 8. — P. 2019–2027.
11. Goh C., Finkel M., Cristos P.J. et al. Profile of 513 patients with alopecia areata: association of disease subtypes with atopy, autoimmune disease and positive family history // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. — 2006. — Vol. 20. — P. 1055–1060.
12. Hibino T., Nishiyama T. Role of TGF-beta2 in the human hair cycle // J. Dermatol. Sci. — 2004. — Vol. 35. — P. 9.
13. Kalish R.S., Gilhar A. Alopecia areata: autoimmunity — the evidence is compelling // J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. — 2003. — Vol. 8, N 2. — P. 164–167.
14. Katagiri K., Arakawa S., Hatano Y. In vivo levels of IL-4, IL-10, TGF-beta1 and IFN-gamma mRNA of the peripheral blood mononuclear cells in patients with alopecia areata in comparison to those in patients with atopic dermatitis // Arch. Dermatol. Res. — 2007. — Vol. 298, N 8. — P. 397–401.
15. Khalid Jameel, Amer Ejaz, Majid Sohail et al. Value of transverse section scalp biopsy in alopecia areata — a clinicopathological correlation // J. Col. Physicians Surgeons Pakistan. — 2008. — Vol. 18, N 6. — P. 338–341.
16. McElwee K.J. et al. The pathogenesis of alopecia areata in rodent models // J. Invest. Dermatol. Symp. Proc. — 2003. — Vol. 8. — P. 6.
17. Messenger A.G., Bleehen S.S. Expression of HLA-DR by anagen hair follicles in alopecia areata // J. Invest. Dermatol. — 1985. — Vol. 85. — P. 569–572.
18. Olsen E., Hordinsky M., McDonald-Hull S. et al. Alopecia areata investigational assessment guidelines. National Alopecia Areata Foundation // J. Am. Acad. Dermatol. — 1999. — Vol. 40. — P. 242–246.
19. O'Shea J., Ma A., Lipsky. Cytokines and autoimmunity // Nat. Rev. Immunol. — 2002. — Vol. 2. — P. 37–45.
20. Shapiro J., Madani S. Alopecia areata update // J. Am. Acad. Dermatol. — 2000. — Vol. 42. — P. 549.
21. Thein C., Strange P., Hansen E.R., Baadsgaard O. Lesional alopecia areata T lymphocytes downregulate epithelial cell proliferation // Arch. Dermatol. Res. — 1997. — Vol. 289, N 7. — P. 384–388.
22. Todes-Taylor N., Turner R., Wood G.S. et al. T cell subpopulations in alopecia areata // J. Am. Acad. Dermatol. — 1984. — Vol. 11. — P. 216–223.
23. Tsuboi H., Tanei R., Fujimura T. et al. Characterization of infiltrating T cells in human scalp explants from alopecia areata to SCID mice: possible role of the disappearance of CD8+ T lymphocytes in the process of hair regrowth // J. Dermatol. — 1999. — Vol. 26. — P. 797–802.
24. Whiting D.A. Histopathologic features of alopecia areata: a new look // Arch. Dermatol. — 2003. — Vol. 139. — P. 1555–1559.