

# ИССЛЕДОВАНИЕ КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ЛЕЧЕНИИ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА ПРЕПАРАТАМИ ЛИНИИ АКРИДЕРМ

Эртнеева И.Я., <sup>1</sup>Матушевская Е.В., <sup>2</sup>Свирщевская Е.В.

КВД № 27 ДЗ г. Москва, <sup>1</sup>ГОУ ВПО «РГМУ Росздрава»,  
<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.В. Овчинникова РАН

## РЕЗЮМЕ

Целью исследования явилась оценка эффективности топических кортикостероидных препаратов «линии» Акридерм® при atopическом дерматите (АД), проведенная на основе анализа иммунологических характеристик больных. Клиническую эффективность оценивали по индексу SCORAD. Анализ влияния Акридермов® на продукцию цитокинов проводили по

оценки экспрессии ЛПК матричной РНК ИЛ-5 и ИЛ-13 и уровню IgE в сыворотке крови. Показали, что Акридермы® эффективны в виде монотерапии у больных с легкой и средней степенями заболевания, и в комплексной терапии у больных с тяжелой степенью тяжести. Применение Акридермов® вызывает снижение продукции цитокинов и общего IgE.

**Ключевые слова:** atopический дерматит, топические стероиды, акридерм, цитокины, пролиферация, IgE

В настоящее время под atopическим дерматитом (АД) понимают хроническое аллергическое заболевание, характеризующееся экссудативными и лихеноидными высыпаниями, повышенным уровнем сывороточного IgE и гиперчувствительностью к специфическим раздражителям. Однако, как показано в ряде работ отечественных и зарубежных исследователей, лишь у некоторых больных повышен уровень общего и аллергенспецифического IgE, что позволяет отнести только этих больных к группе с IgE-опосредованным типом заболевания. У ряда больных не удается выявить IgE-опосредованной гиперчувствительности в патогенезе, однако имеет место гиперчувствительность замедленного типа [1]. Кроме этих двух групп выявляются больные, у которых в патогенезе принимают участие несколько типов аллергических реакций – группа смешанного типа. И, наконец, у ряда больных патогенез АД обусловлен другими, не иммунными механизмами [2].

Несмотря на успехи иммунологии и множество публикаций об иммунных механизмах развития atopического дерматита, многие аспекты остаются спорными и недостаточно изученными. IgE-опосредованные реакции при АД описаны достаточно полно. В отличие от гуморального звена иммунитета при АД, данных о механизмах участия Т-клеток в патогенезе заболевания значительно меньше. Показано, что в патогенезе аллергических заболеваний в целом основная роль принадлежит Т-хелперам 2 типа, продуцирующим цитокины (ИЛ-4, 5, 10 и 13), отвечающих за переключение В-клеток на синтез IgE (ИЛ-4 и ИЛ-13) и эозинофилию (ИЛ-5). Участие Th1 в патогенезе АД в последние годы уделяется значительно больше внимания. Основное внимание при изучении функциональных характеристик иммунной системы в литературе последних лет отводится вопросам регуляции синтеза IgE *in situ* в коже, роли Т хелперов 1, 2 и 17 и синтезируемых ими цитокинов, а также роли Т-клеток регуляторов и ряда молекул, экспрессируемых кожей больных АД [3-10]. Исследования участия Т-клеток в патологических процессах и взаимосвязь гуморального и клеточного иммунитета при АД являются актуальными.

Лечение больных atopическим дерматитом представляет сложную проблему для специалиста ввиду особенностей па-

тогенеза заболевания, многообразия фенотипических проявлений и стадийного течения процесса [11-13]. Наружная терапия является неотъемлемой частью комплексного лечения atopического дерматита, занимая в ней ведущее место.

Основой современной терапии АД остаются топические кортикостероиды. Существующие побочные эффекты от применения глюкокортикостероидов (ГКС) усиливают потребность в поиске новых кортикостероидных препаратов отвечающих оптимальному соотношению эффективности/безопасность [1, 14-17].

Целью данной работы было изучение клинической эффективности препаратов «линии» Акридерм® при лечении больных atopическим дерматитом, а также анализ влияния Акридермов® на общий IgE в сыворотке крови и уровень экспрессии лимфоцитами периферической крови (ЛПК) провоспалительных цитокинов, ассоциированных с аллергическими реакциями, интерлейкинов (ИЛ) 5 и 13.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Клиническая характеристика больных

Под нашим наблюдением находилось 63 больных atopическим дерматитом (42 мужчин и 21 женщин) в возрасте  $23,46 \pm 5,6$  лет. Эритемато-сквамозная (со слабой или умеренной лихенификацией) форма АД выявлена у 28 больных (45%), лихеноидная у 16 больных (25%), пруригоподобная – у 12 (19%), экзематоидная – у 7 (11%) больных (таблица 1). Тяжесть течения заболевания оценивали по следующим критериям: SCORAD < 40 – легкая форма, от 40 до 60 – средняя форма; > 60 – тяжелая форма. У 24 (38%) пациентов была легкая форма заболевания, у 36 (57%) больных – средняя тяжесть, у 3 (5%) тяжелая форма заболевания. У 12 (19%) пациентов основной процесс был осложнен вторичной инфекцией. В исследование не были включены пациенты при наличии гиперчувствительности к препарату, беременности, больные, принимающие кортикостероиды и цитостатики. Длительность исследования составила 6-8 недель.

Все больные получали только наружную терапию. Для лечения применяли препараты «линии» Акридерм®. Бетаметазонсодержащие препараты выпускаются в виде различных

Таблица №1. Клиническая эффективность препаратов линии акридерм у больных атопическим дерматитом

Результаты лечения	Легкая степень тяжести	Средняя степень тяжести	Тяжелая степень тяжести	Всего больных
Клиническая ремиссия	16	6	—	22 (35 %)
Значительное улучшение	8	17	—	25 (40 %)
Улучшение	—	13	2	15 (24 %)
Без эффекта	—	—	1	1 (1 %)
Всего больных	24	36	3	63 (100 %)

лекарственных форм: Акридерм® крем и мазь, Акридерм® СК мазь, Акридерм® ГК крем, Акридерм® Гента крем. Бетаметазон дипропионат (БД) является β-изомером дексаметазона, содержащий один атом. БД обладает высокой местной противовоспалительной и антиаллергической активностью и не оказывает системного влияния, что связано с особенностями его химической структуры и метаболизма. Акридерм® крем применяли у больных АД при остром воспалении без мокнутия, при подостром воспалении (эритема, отек, папулезные и пруригиозные элементы, эксфолиация и шелушение). Акридерм® СК использовали у больных с кожными поражениями, сопровождающиеся инфильтрацией и лихенизацией. При присоединении вторичной инфекции, при подостром и хроническом воспалении, осложненном бактериальной и/или грибковой инфекции назначали Акридерм® ГК и Акридерм® Гента. Препараты «линии» Акридерм® наносили тонким слоем на пораженные участки кожи два раза сутки (утром и вечером), после уменьшения воспалительных явлений достаточно однократного применения. Продолжительность лечения составляла от 1 до 2-4 недель. Эффективность лечения оценивали по следующим критериям: клиническая ремиссия; значительное улучшение; улучшение; без эффекта.

Объективными параметрами клинической эффективности служили уменьшение выраженности кожной симптоматики заболевания или их полное разрешение, оцениваемое с помощью шкалы SCORAD.

#### Выделение ЛПК

Лимфоциты выделяли из гепаринизированной периферической крови больных на градиенте фиколл-верографин (Sigma) по стандартной процедуре, рекомендованной производителем. Выделенные ЛПК отмывали три раза фосфатным буфером (ФБ) и переводили в культуральную питательную среду (ПС). ПС готовили на основе среды RPMI-1640 с добавлением 10% инактивированной нагреванием сыворотки эмбрионов коровы, 300 мкг/мл L-глутамина, 50 (М 2-меркаптоэтанол) и 30 мкг/мл линкомицина. Для индукции экспрессии мРНК ЛПК в ПС вносили по 5 млн/лунку 24-луночного планшета и стимулировали 20 мкг/мл фитогемагглютина (ФГА) в течение 24 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Далее клетки собирали, отмывали в ФБ и выделяли РНК.

#### Анализ экспрессии мРНК ИЛ-5 и ИЛ-13

После окончания инкубации клетки отмывали фосфатным буфером, и выделяли из них РНК согласно описанной методике [18]. Синтез кДНК проводили по методу [21] с помощью обратной ММТВ транскриптазы («Бион», Москва). Анализ продукции мРНК ИЛ-5 и ИЛ-13 проводили стандартным методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфичных праймеров для актина, ИЛ-5 и ИЛ-13. Анализ экспрессии гена β-актина использовали в качестве положительного контроля. Прямой и обратный праймеры для β-актина, ИЛ-5 и ИЛ-13 использовали следующие:

β-актин:

5'-CACTCTTCCAGCCTTCCCTTCC 3'

5'-CGGACTCGTCATACTCCTGCTT 3'

ИЛ-5:

5'-AGACCTTGGCACTGCTTTC-3'

5'-CTCTCCGTCTTTCTTCTCCAC-3'

ИЛ-13:

5' CCATCGAGAAGACCCAGAGG 3'

5' CCTGGGGTCCACTGCTTTAG 3', 15, 20, 25 и 30.

#### Гель-электрофорез

Анализ продуктов ПЦР с обратной транскрипцией проводили с помощью горизонтального фореза в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Результаты реакции выявляли с помощью УФ тран-иллюминатора (Vilber Lourmat, Франция) и регистрировали с помощью цифровой камеры (Vilber Lourmat). Появление полосы на 15 цикле обозначали реакцией +4, на 20 цикле — +3, на 25 цикле — +2, на 30 цикле — +1. Отсутствие продукта — 0. Актин во всех случаях экспрессировался на уровне +4.

#### Статистический анализ

Статистическая обработка результатов проведена с помощью программы Excell по t-критерию Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного лечения (таблица 1) состояние клинической ремиссии, а именно исчезновение зуда и воспалительных изменений кожи в среднем через 3-4 недели от момента начала терапии, было достигнуто у 16 (25%) больных с легкой степенью и у 6 (10%) больных со средней степенью тяжести заболевания. Значительное улучшение отмечалось у 8 (13%) пациентов с легкой и у 17 (27%) со средней степенью тяжести АД, что составило 25 человек (40%). Положительная динамика на фоне проводимой терапии в виде улучшения была отмечена у 15 больных (24%): у 13 (21%) пациентов со средней тяжестью АД и у 2 (3%) — с тяжелой формой атопического дерматита. У 1-го пациента с тяжелой степенью тяжести заболевания эффекта от проводимого лечения не наблюдалось.

Таким образом, при применении топических кортикостероидных препаратов «линии» Акридерм® положительный клинический эффект наблюдался у 62 больных (98%) с преимущественно легкой и средней степенью тяжести заболевания. Пациентам с отсутствием положительной динамики симптомов АД, вне рамок настоящего исследования, назначали дополнительно общепринятое лечение (антигистаминные, десенсибилизирующие, седативные, ферментные препараты).

Оценка регресса отдельных симптомов заболевания — эритемы, мокнутия, шелушения, лихенификации, зуда и жжения — показало высокую эффективность терапии.

Число пациентов с выраженной эритемой сократилось с 38,1% до 0%, а число случаев незначительного покраснения — с 34,9% до 9,5%.

Лихенификация наблюдалась у 40 больных на начало лечения, на 5-7 день отмечается выраженное уменьшение симптоматики — у 10 больных сохранялась умеренная лихенизация, у 22 — лихенизация легкой степени. Через 14 дней лечения Акридермом® наблюдалась незначительная лихенизация у 14 больных.

Из 49,2% пациентов, оценивавших зуд как интенсивный в начале лечения, только 4,7% не отметил его интенсивности после лечения. Другие симптомы (эритема, везикуляция, сухость) регрессировали несколько меньше.

Таким образом, с учетом изменений симптоматики у больных и локализации высыпаний, Акридерм® можно рекомендовать больным с лихеноидной и пруригоподобной формами.

Соответственно, данные препараты можно использовать в виде монотерапии у больных с легкой и средней степенями заболевания, и в комплексной терапии у больных с тяжелой степенью тяжести. Переносимость Акридермов® пациентами была хорошей, не было отмечено ни одного случая осложнения или побочных действий.

Для обоснованности эффективности и применения Акридермов® провели изучение продукции цитокинов Тх2 ряда (ИЛ-5 и ИЛ-13) и оценку общего уровня IgE в крови до и после лечения препаратами.

#### **Влияние препаратов «линии» Акридерм® на продукцию ИЛ-5 и ИЛ-13**

Анализ экспрессии матричной РНК ИЛ-5 и ИЛ-13 ЛПК больных АД проводили до и после лечения методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией. ЛПК после выделения на градиенте плотности стимулировали конканавалином А в субоптимальной дозе и инкубировали 24 ч. Результаты ПЦР оценивали полуколичественно (от 0 до +4) по времени появления продукта. Результаты анализа показали, что при выбранном методе стимуляции ЛПК только у 8 из 13 (62%) больных регистрируется продукция цитокинов. Лечение Акридермом® приводило к снижению продукции цитокинов у 6 из 8 (75%) этих больных (таблица 2). Различий по значению SCORAD до и после лечения между группой с высокой и низкой продукцией цитокинов не было, что свидетельствует об эффективности препаратов, независимо от типа иммунного ответа.

#### **Изучение корреляции между продукцией цитокинов и уровнем общего IgE в сыворотке крови больных atopическим дерматитом**

Состояние гуморального иммунитета больных atopическим дерматитом оценивали путем определения уровня общего IgE в сыворотке крови. Результаты исследования общего циркулирующего IgE показали повышение его уровня у 8 из 13 обследованных больных (61,5%) (таблица 2).

Доля больных, у которых выявляли повышенный уровень IgE в крови, была выше в группе с повышенной продукцией цитокинов (75%) по сравнению с группой, в которой продукция цитокинов была в норме (40%), хотя объем выборки не позволяет говорить о статистической значимости вывода. Оценка уровня общего IgE в сыворотке крови больных АД как с повышенной, так и с нормальной продукцией цитокинов, показала, что эти группы дополнительно разбиваются на подгруппы с высоким и нормальным уровнями IgE. Заметна тенденция у больных с гиперпродукцией в сторону формирования IgE-опосредованного atopического дерматита. И, наоборот, у больных с нормальной продукцией цитокинов - в сторону формирования не IgE-опосредованного atopического дерматита.

#### **Влияние лечения препаратов «линии» Акридерм® на уровень общего IgE в сыворотке крови больных atopическим дерматитом**

Анализ уровня общего IgE провели у 12 больных АД до и после лечения препаратами линии акридерм. Данные по результатам анализа приведены в таблице 3. Повышенный уровень общего IgE в сыворотке крови до лечения выявили у 7 из 12 больных. У 5 из них уровень IgE достоверно снижился после лечения ( $p < 0,05$ ,  $t$ -тест Стьюдента). Таким образом, бетаметазона дипропионат способствует снижению общего уровня IgE у больных АД, имеющих повышенный уровень IgE. Интересно, что даже в группе с исходно низким уровнем

**Таблица №2. Продукция ИЛ-13 и ИЛ-5 до и после лечения препаратами линии акридерм у больных atopическим дерматитом**

		SCORAD		актин/ИЛ-13/ИЛ-5a		IgE, МЕ/млб
		До	После	До	После	
1	2	3	4	5	6	7
1	АД64	26,8	7,9	4/2/1	4/2/1	3647
2	АД100	63,4	18,9	4/3/2	4/2/3	2092
3	АД91	18,5	5,3	4/2/2	4/1/0*в	1596
4	АД77	18,9	26,4	4/2/3	4/1/3*	723
5	АД80	31,3	15,1	4/3/3	4/1/1*	623
6	АД62	46,9	24,4	4/3/2	4/1/1*	289
7	АД78	40,2	10,6	4/2/2	4/2/2*	82
8	АД67	54,9	27,8	4/2/2	4/1/1*	83
Среднее±SD		39±17	17±9*			1142±1242
9	АД68	27,8	9,9	2/0/1	4/0/2	1191
10	АД69	60,3	32,9	2/0/0	4/0/0	292
11	АД66	30,3	17,8	4/0/1	4/0/2	33
12	АД65	28,4	8,0	3/0/0	4/0/0	93
13	АД76	33,0	12,4	2/0/0	4/0/0	26
Среднее±SD		34±13	16±10*			327±49

а) В столбце приведены данные по уровню экспрессии мРНК актина, ИЛ-5 и ИЛ-13. Актин использовали в качестве контроля. Максимальный уровень продукции принят за 4 балла, минимальный - за 0 баллов (см. Материалы и Методы).

б) Уровень IgE > 150 МЕ/мл считается повышенным.

в) Звездочкой отмечены значения, достоверно снижающиеся по сравнению с данными до лечения.

IgE в сыворотке крови наблюдается тенденция к снижению IgE после лечения, хотя и не достоверная ( $p=0,67$ ). Различий по значению SCORAD между группами с высоким и нормальным IgE не выявили ни до, ни после лечения.

Таким образом, препараты «линии» Акридерм® показаны для лечения всех иммунных форм АД, так как воздействуют на основные патогенетические звенья заболевания, а именно подавляют продукцию цитокинов, отвечающих за переключение В-клеток на синтез IgE и эозинофилию, и снижают уровень IgE в сыворотке крови больных. Препараты «линии» Акридерм® обладают противовоспалительным, противозудным и противоаллергическим действием и эффективны при всех клинических формах АД и различной степенью тяжести

заболевания. Клиническая эффективность препаратов «линии» Акридерм® при лечении больных АД составила 98% (62 пациента). В результате применения Акридермов® не было отмечено ни одного случая осложнений или развития побочных явлений системного характера. Высокая эффективность Акридермов®, отсутствие осложнений и побочных эффектов, позволяют рекомендовать препараты «линии» Акридерм® для наружной терапии больных АД.

#### Благодарности

Работа выполнена при поддержке грантов Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих школ Российской Федерации НШ-2077.2003.4 и НШ-4397.2008.7.

Таблица №3. Влияние лечения препаратами линии акридерм на уровень общего IgE в сыворотке крови больных атопическим дерматитом

N п/п	№ больного	SCORAD		IgE, МЕ/мл	
		До	После	До	После
1	АД64	26,8	7,9	3647	2580*
2	АД100	63,4	18,9	2092	1507*
3	АД91	18,5	5,3	1596	1485
4	АД68	27,8	9,9	1191	859*
5	АД69	60,3	32,9	552	420
6	АД69	60,3	32,9	292	178*
7	АД62	46,9	24,4	289	215*
Среднее±SD		43±19	19±12*	1380±1210	1035±878*
8	АД78	27,8	10,6	82	91
9	АД67	17,8	27,8	83	59
10	АД66	8,0	17,8	33	23
11	АД65	12,4	8,0	93	69
12	АД76	33,0	12,4	26	18
Среднее±SD		37±11	17±9*	63±31	32±31

\*Отмечены достоверные ( $t$ -тест,  $p<0,05$ ) отличия от значений до лечения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Матушевская Е.В., Богош П.Г., Свищевская Е.В. и др. Анализ аллергенспецифических Ig E у больных атопическим дерматитом в Москве. // Вестник дерматол. и венерол. 2003. - №2. - с. 4-8.
2. Akdis C.A., Akdis M., Trautmann A., et al. Immune regulation in atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol*, 2000; 12: 6: 641-646.
3. Lipozencic J, Wolf R. Atopic dermatitis: an update and review of the literature. *Dermatol Clin*. 2007 Oct;25(4):605-12.
4. Staumont-Salle D, Abboud G, Brenuchon C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates skin inflammation and humoral response in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Apr;121(4):962-8.e6. Epub 2008 Feb 4.
5. Plager DA, Leontovich AA, Henke SA, et al. Early cutaneous gene transcription changes in adult atopic dermatitis and potential clinical implications. *Exp Dermatol*. 2007 Jan;16(1):28-36.
6. Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, et al. Possible Pathogenic Role of Th17 Cells for Atopic Dermatitis. *Invest Dermatol*. 2008 Apr 24. [Epub ahead of print]
7. van Beelen AJ, Teunissen MB, Kapsenberg ML, et al. Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007 Oct;7(5):374-81.
8. Reefer AJ, Satinover SM, Solga MD, et al. Analysis of CD25hiCD4+ «regulatory» T-cell subtypes in atopic dermatitis reveals a novel T(H)2-like population. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Feb;121(2):415-422.e3. Epub 2008 Jan 4.
9. Wang YH, Angkasekwinai P, Lu N, et al. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med*. 2007 Aug 6;204(8):1837-47.
10. Ardern-Jones MR, Black AP, Bateman EA, Ogg GS. Bacterial superantigen facilitates epithelial presentation of allergen to T helper 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 27;104(13):5557-62.
11. Суворова К.Н. Атопический дерматит: иммунопатогенез и стратегия иммунотерапии. //Русский медицинский журнал. Специальный выпуск. Дерматология, 1998, №6, с. 363-367.
12. Самсонов В.А., Чистякова И.А. Новые препараты для лечения дерматозов. // Вестник дерматол. и венерол. - 1999. - №1. - С.46-48.
13. Федоров С.М., Гура А.Н. Иммунные механизмы развития аллергических дерматозов. // Вестник дерматол. и венерологии, 1999, №6, с.11-14.
14. Schmitt J, Schakel K, Schmitt N, Meurer M. Systemic treatment of severe atopic eczema: a systematic review. *Acta Derm Venereol*. 2007;87(2):100-11.
15. Bornhovec EC, Burgdorf WH, Wollenberg A. Immunomodulatory macrolactams for topical treatment of inflammatory skin diseases. *Curr Opin Investig Drugs*. 2002 May;3(5):708-12.
16. Сергеев Ю.В., Иванов О.Л., Новиков Д.К. Атопический дерматит: современная диагностика и лечение. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2001. - №4. - С. 28-48.
17. Кунгуров Н.В., Кохан М.М., Кениксфест Ю.В., Мирина Ю.Г., Ведерникова С.В. Об оптимизации терапии больных атопическим дерматитом детей и взрослых. // Вестник дерматол. и венерол. 2004. - №3. С. 23- 29.
18. Molecular Cloning, A laboratory manual. Ed. J.Sambrook, E.F.Fritson and T.Maniatis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.