

ЦИТОИММУНОГРАММА КОЖИ – НОВЫЙ МЕТОД ОБЪЕКТИВНОЙ ЦИФРОВОЙ ОЦЕНКИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА КЛЕТОК КОЖИ

Гольцов С.В.¹, Гольцова Е.Н.¹, Суховой Ю.Г.², Костоломова Е.Г.²,
Паульс В.Ю.¹

¹ Многопрофильное медицинское учреждение NEO-Clinic, г. Тюмень, Россия

² Тюменский филиал Института клинической иммунологии, г. Тюмень, Россия

Резюме. История дерматологии помнит массу попыток преобразовать кожу человека – плотную ткань в жидкость. Поиск способа разделения клеточного субстрата кожи для получения суспензии и изучения фенотипа клеток, входящих в ее состав, стал основой нашего многолетнего исследования, результатом которого явился патентованный способ цифровой оценки субпопуляционного состава клеток кожи – цитоиммунограмма кожи. Именно так называется изобретение, признанное практикоориентированным и перспективным для внедрения в систему общественного здравоохранения резолюцией «X международной конференции иммунологов Урала», на которой впервые был представлен доклад о «Перспективах применения цитоиммунограммы кожи».

Приведенные в качестве примера результаты исследования одного частного случая показывают, что в данном образце кожи:

1) активно представлена субпопуляция кератиноцитов, причем большинство из них активированы, что говорит об умеренной пролиферативной активности базального слоя эпидермиса;

2) присутствуют В-лимфоциты, которые в норме являются резидентами циркулирующего объема крови и лимфы, поскольку имеют положительный таксис к высокоэндотелиальным венулам, находящимся преимущественно в лимфатических узлах; наличие их в коже указывает на активность гуморального иммунитета;

3) присутствие несколько разновидностей Т-лимфоцитов (CD3⁺ лимфоцитов), локализующихся преимущественно в трех наружных слоях эпидермиса, и тот факт, что CD4⁺ клетки несколько преобладают численно над CD8⁺ клетками, говорит об усилении адаптивного иммунитета кожи;

4) низкое содержание Т-цитотоксических лимфоцитов свидетельствует об отсутствии инфекционно-воспалительного процесса;

5) остальные показатели демонстрируют количество специфических клеток кожи, но при этом их низкую активацию, что в совокупности с отсутствием специфических жалоб у данного пациента свидетельствует о нормальном состоянии его кожи;

б) жизнеспособность в нативном образце составила 99,8%, после криоконсервации – 87,0%.

Предлагаемый способ позволяет получить информацию о количественном составе и функциональной активности клеток кожи, что объективно свидетельствует о текущем статусе местного иммунитета пациента и может стать основой для лечебно-профилактической программы, разработанной индивидуально. Цитоиммунограмма кожи, как способ диагностики кожи, проста в исполнении и доступна, позволяет оценить качественный и количественный состав ее отдельных субпопуляций

Адрес для переписки:

Гольцов Сергей Викторович
Многопрофильное медицинское учреждение NEO-Clinic
625002, Россия, г. Тюмень, ул. Немцова, 4.
Тел./факс: 8 (3452) 39-09-05.
E-mail: goltsovs@gmail.com

Address for correspondence:

Goltsov Sergey V.
Multidisciplinary Medical Institution NEO-Clinic
625002, Russian Federation, Tyumen, Nemtsova str., 4.
Phone/Fax: 7 (3452) 39-09-05.
E-mail: goltsovs@gmail.com

Образец цитирования:

С.В. Гольцов, Е.Н. Гольцова, Ю.Г. Суховой, Е.Г. Костоломова, В.Ю. Паульс «Цитоиммунограмма кожи – новый метод объективной цифровой оценки субпопуляционного состава клеток кожи» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 373–382.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-373-382

© Гольцов С.В. и соавт., 2018

For citation:

S.V. Goltsov, E.N. Goltsova, Yu.G. Sukhovey, E.G. Kostolomova, V.Yu. Pauls "Cytoimmunogram of the skin: a new method for objective evaluation of the skin cell subpopulation profile", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 373–382.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-373-382

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-373-382

клеток, оценить их функцию и степень их реагирования в ответ на какие-либо воздействия внешней и внутренней среды. Широкомасштабное применение цитоиммунограммы в перспективе позволит создать популяционный регистр состояния кожи в норме и патологии, что позволит определять степень реагирования кожи на воздействия среды, измерять активность клеточных субпопуляций нативной кожи в условиях нормы и патологии, использовать критерий возрастных изменений кожи, объективно оценивать динамику заболевания кожи, индивидуально подбирать лекарственный препарат и контролировать эффективность применяемых наружных лекарственных средств.

Ключевые слова: кожа, клетки, фенотип, цитоиммунограмма, проточная цитометрия, криоконсервация

CYTOIMMUNOGRAM OF THE SKIN: A NEW METHOD FOR OBJECTIVE EVALUATION OF THE SKIN CELL SUBPOPULATION PROFILE

Goltsov S.V.^a, Goltsova E.N.^a, Sukhovey Yu.G.^b, Kostolomova E.G.^b, Pauls V.Yu.^a

^a Multidisciplinary Medical Institution NEO-Clinic, Tyumen, Russian Federation

^b The Institute of Clinical Immunology, Tyumen Branch, Tyumen, Russian Federation

Abstract. The history of dermatology reminds a lot of attempts to transform the dense human skin samples into a liquid phase. A search for a method aimed to separate cellular substrate of the skin and to obtain a suspension for studying the cell phenotype profile was a basis of our long-term study, which resulted in a proprietary method for digital estimation of distinct subsets composing the skin cell population. The skin cytoimmunogram is the name of the invention, which is recognized as practical and promising for implementation in public healthcare system as recognized by the decision of the “Xth International Conference of Immunologists of the Urals”, where the report on the “Prospects for application of the skin cytoimmunogram” was presented for the first time.

The results of a single case analysis showed the following findings for this skin sample:

1) a subpopulation of keratinocytes is actively represented, most of them activated, which indicates a moderate proliferative activity of the basal layer of the epidermis;

2) there are B-lymphocytes, which normally are residents of the circulating blood and lymph, since they have a positive taxis to the high endothelial venules located mainly in the lymph nodes. Their presence in the skin indicates the activity of humoral immunity;

3) presence of several T-cell types of (CD3⁺ lymphocytes) localized predominantly in the three outer layers of the epidermis, and the findings of CD4⁺ cells predominating over CD8⁺ cells suggests an increase in adaptive skin immunity;

4) low content of T-cytotoxic cells indicates to absence of an infectious/inflammatory process;

5) the remaining parameters reflect the numbers of specific skin cells, characterized by low activation grade, which, along with absence of specific complaints in this patient, indicates to normal state of his skin;

6) cell viability in the native sample was 99.8%, after cryopreservation – 87.0%.

The proposed method allows to obtain information on the quantitative composition and functional activity of skin cells, which distinctly indicates to the present condition of the patient's local immunity and may become a basis for development of personalized curative and prophylactic programs. The Cytoimmunogram of skin as a way of skin diagnostic evaluation, is easy to implement, and it is available for qualitative and quantitative evaluation of separate cell subpopulations, in order to assess their function and degree of their response to any external or internal environmental impact. Widespread application of the cytoimmunogram perspective will allow to create sex- and age-matched registry for skin parameters in normal and pathological conditions, thus determining the extent of skin response to environmental exposures, to measure activities of cell subsets in native skin under normal and pathological conditions, to justify the criteria of age-related skin changes, to objectively assess clinical course of skin diseases, and to individually select the drug and monitor the effectiveness of external medical drugs applied.

Keywords: skin, cells, phenotype, cytoimmunogram, flow cytometry, cryoconservation

Введение

Сегодня нет никаких сомнений в том, что развитие науки связано с новыми технологиями, которые интегрируются в самые сложные формы деятельности человека, в том числе медицинскую науку и ее отдельный сегмент — дерматологию, как науку, изучающую кожу.

Образуя обширную область контакта с внешней средой и представляя собой важнейшую барьерную ткань, ограничивающую внутреннюю среду организма, кожа человека исторически сформировалась в самостоятельный орган иммунной системы, зачастую являясь плацдармом реализации ее механизмов реагирования. Кроме того, обладая многообразием иммунокомпетентных клеток, кооперирующихся между собой как с помощью комплементарных структур на поверхности, так и при участии иммунорегуляторных цитокинов, организация кожи позволяет ей участвовать в иммунных реакциях всего организма, при этом осуществляя некоторые иммунологические процессы самостоятельно, *in situ*.

Клеточный субстрат иммунной компетентности кожи представлен резидентными и рециркулирующими клетками костномозгового происхождения. К резидентным клеткам относятся тучные клетки, клетки Лангерганса, кератиноциты, эндотелиальные клетки, фибробласты, моноциты (макрофаги). Рециркулирующими являются лимфоциты и гранулоциты, причем есть мнение, что лишь определенные типы лимфоцитов способны поселяться в коже. Следует отметить, что первым концепцию лимфоидной ткани, ассоциированной с кожей (SALT — от Skin-Associated Lymphoid Tissue), сформулировал J.W. Streinlein, который объединил этим понятием эпидермис, тропные к нему Т-лимфоциты, сами кератиноциты, а также дренирующие эпидермис лимфатические узлы [3].

Однако ранее к иммунной подсистеме кожи доказательно относили иммунологически значимые клетки, локализованные, главным образом, в дерме — тучные клетки, макрофаги, гранулоциты, эндотелий кровеносных и лимфатических сосудов и др. [4].

Приняв тот факт, что кожа представляет собой активный иммунный орган, так как резидентные и рециркулирующие клетки эпидермиса и дермы способны не только инициировать иммунные процессы, участвовать в них, но и определять состояние кожных покровов, это может быть оценено в ходе осмотра [6, 7].

Визуально состояние кожных покровов может оценить любой человек, основываясь на собственных знаниях. Оценка врача более точна, по сравнению с обывателем, но она все же субъективна и зависит от опыта, стажа работы, количества пациентов. В связи с этим актуализируется потребность в методах оценки состояния кожных покровов. Сегодня для этого используется ряд методов определения функций и свойств кожи. Они безопасны, безболезненны, комфортны и дают возможность многократного проведения процедуры обследования и анализа. К таким методам относятся: корнеометрия, себуметрия, кутометрия, профилометрия [1]. Кроме того, для оценки внутренних структур кожи применяются инвазивные (гистология) и неинвазивные (оптическая когерентная томография, ультразвуковая микроскопия, магнитно-резонансная томография) методы [5].

Однако существенным их недостатком является дороговизна, недоступность, а также невозможность оценить клеточный состав кожи и ее функциональность [8]. Перечисленные методы, описывая ряд свойств кожи, не учитывают того, что кожа — экзосоан, на который постоянно действует окружающая среда и в котором постоянно происходит сложный комплекс межклеточных взаимодействий [9].

При этом на протяжении всего периода изучения кожи было и остается актуальным изучение фенотипа клеток ее составляющих. Актуальным остается изучение роли хемокинов и соответствующих им хемокиновых рецепторов в патогенезе хронических заболеваний кожи [2]. Но сложность исследований обусловлена прочными десмосомальными связями клеток, препятствующими их разделению и изучению в живом виде и по отдельности.

Мы говорим о коже как о целостном органе, но состоящем из множеств и подмножеств клеток, выполняющих соответствующие их предназначению функции, понимание значения каждой из которых возможно только при определении вне отношений с другими клетками. Если бы это было возможным, то такие врачебные специальности, как дерматология и косметология, получили бы ответы на вопросы: возможна ли объективная оценка динамики заболевания кожи и как оценить степень реагирования кожи на воздействия среды, какова функциональная активность клеточных субпопуляций кожи в условиях нормы и патологии и каковы критерии возрастных изменений кожи, насколько эффективно применяемое наружное лекарственное средство и возможен ли строго индивидуальный подбор

лекарственного препарата для наружного применения или косметики?

История дерматологии помнит массу попыток преобразовать кожу человека — плотную ткань в жидкость. Поиск способа разделения клеточного субстрата кожи для получения суспензии и изучения фенотипа клеток, входящих в ее состав, стал основой нашего многолетнего исследования, результатом которого явился патентованный способ цифровой оценки субпопуляционного состава клеток кожи — цитоиммунограмма кожи (Патент на изобретение № 2630607 от 11.09.2017). Именно так называется изобретение, признанное практикоориентированным и перспективным для внедрения в систему общественного здравоохранения резолюцией «X международной конференции иммунологов Урала», на которой впервые был представлен доклад о «Перспективах применения цитоиммунограммы кожи».

Изобретение относится к биологии и медицине и может быть использовано для определения субпопуляционного состава клеток кожи и получения цитоиммунограммы кожи. Общеизвестно, что клетки кожи соединены друг с другом десятками, сотнями, а может и тысячами отростков, крепко-накрепко спаивающих клетки в плотный конгломерат, и разделение их для помещения в жидкость, влечет разрыв мембран и грозит клеткам гибелью. Но для определения функции клетки исследователям нужны живые и только живые клетки. Удалось создать такие условия, при которых клетки кожи, разделенные между собой и приведенные в состояние суспензии, остаются жизнеспособными на 90-99%. А, следовательно, суспензию клеток кожи можно изучать (качественно, количественно), тестировать *in vitro* эффективность различных лекарственных препаратов, а в условиях криобанка еще и хранить весь субпопуляционный состав клеток индивидуального образца.

Материалы и методы

Указанный технический результат достигается способом определения субпопуляционного состава клеток кожи и получения цитоиммунограммы кожи, включающим в себя забор биоптата кожи на глубину 2 мм, гомогенизацию ткани в 0,9% водном растворе хлорида натрия при температуре +23 ... +25 °С, извлечение гомогената, фильтрование гомогената через инертную фильтровальную перегородку с диаметром пор 20 мкм, центрифугирование гомогената при 400 г в течение 5 минут при температуре +23 ... +25 °С, определение жизнеспособности клеток кожи, инкубирование в течение 20 минут в защищенном от света месте клеток кожи с моноклональ-

ными антителами, конъюгированными с флюорохромами, фенотипирование клеток кожи, определение количества клеток кожи определенного фенотипа.

Жизнеспособность клеток определяют методом проточной цитометрии с помощью внутриклеточного красителя 7-amino-actinomycin D RUO (7AAD). Идентификацию жизнеспособных клеток выполняют путем регистрации двух параметров: бокового светорассеяния (side scatter) и регистрацией флюоресценции по 3 каналу (FL3). Если не определить жизнеспособность клеток кожи, то полученные результаты окажутся менее точными, т.к. некоторые клетки разрушаются.

Полученный образец кожи можно исследовать *ex tempore* (сразу после забора материала) либо после длительной криоконсервации. Для этого проверенный на стерильность образец помещают в криобирку Costar 2 мл с раствором для замораживания (90% Fetal Bovine Serum и 10% DMSO в качестве криопротектора), затем образец замораживают в парах жидкого азота t°-140 °С со скоростью 1 °С в минуту методом витрификации.

Инкубирование клеток кожи проводят в течение 20 минут в защищенном от света месте с моноклональными антителами, конъюгированными с флюорохромами флюоресцеинизотиоцианатом (FITC), фикоэритрином (PE), PE — Texasred (ESD), PE/CY5(PC5), PE/CY7(PC7) (Beckman Coulter, США). Фенотипирование клеток кожи проводили с помощью специфических маркеров: CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD34, CD44, CD45, CD49, CD54, CD63, CD80, CD146, CD203c; CD207, CD249. Выбор типа и количества флюоресцентных красителей может определяться задачей конкретного исследования. В нашем исследовании выделение субпопуляций клеток кожи было обусловлено выбором наиболее влияющих на патогенез часто встречаемых дерматозов. Так, определялись кератиноциты CD49f⁺, из них активированные CD49f⁺HLA-DR⁺; фибробласты (фиб्रोциты) CD45⁻CD14⁻CD44⁺, из них активированные CD45⁻CD14⁻CD44⁺CD80⁺; тучные клетки CD249⁺, из них активированные CD249⁺CD63⁺; моноциты (макрофаги) CD45⁺CD14⁺, из них активированные CD45⁺CD14⁺HLA-DR⁺; внутриэпидермальные макрофаги CD207⁺, из них активированные CD207⁺CD80⁺, CD207⁺HLA-DR⁺, CD207⁺CD80⁺HLA-DR⁺; эндотелиальные клетки CD146⁺, из них активированные CD146⁺CD34⁺, CD146⁺HLA-DR⁺, CD146⁺CD54⁺, CD146⁺CD54⁺HLA-DR⁺; лимфоцитарные популяции: Т-лимфоциты CD45⁺CD3⁺, Т-хелперы CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁻, Т-цитотоксические лимфоциты CD45⁺

CD3⁺CD4⁺CD8⁺, В-лимфоциты CD45⁺CD3⁺CD19⁺, NK-лимфоциты CD45⁺CD3⁺CD16⁺CD56⁺.

Продолжительность инкубирования в 20 минут является оптимальной для данного способа. Попадание света во время инкубирования недопустимо, т.к. приведет к разрушению флюорохромов.

В процессе дифференцировки клеток на их поверхности появляются специфические мембранные молекулы. Такие молекулы обнаруживают с использованием набора специфических моноклональных антител, с помощью которых идентифицируют субпопуляции клеток и определяют их фенотип.

Методом проточной цитометрии определяют количество клеток кожи определенного фенотипа, используя моноклональные антитела, меченные флюорохромами и связывающиеся с определенными рецепторами на мембране клетки.

Для регистрации получаемых результатов и удобства пользования разработан бланк медицинского документа «Цитоиммунограмма кожи», в верхней части которого свободные участки для заполнения лаборантом идентификационного номера цитоиммунограммы кожи с датой проведения анализа, фамилии имени отчества пациента и его возраста.

В средней части документа в две колонки представлен состав клеток кожи с указанием фенотипа каждой популяции. Напротив каждой группы клеток кожи предусмотрены пустые поля в виде сдвоенных прямоугольников для заполнения лаборантом числовых данных в относительных и/или абсолютных единицах по результатам исследования. Представленные числовые данные указывают количество клеток кожи определенного фенотипа.

В нижней части документа имеются свободные участки, предназначенные для заполнения врачом информации о результатах исследования фенотипа клеток кожи, которые могут свидетельствовать о динамической оценке течения заболевания, эффективности использования назначенных лекарственных или косметических средств, оценке возрастных изменений кожи, индивидуальном подборе лекарственных препаратов, оценке степени реагирования клеток кожи на те или иные воздействия. А также заполняются лаборантом в свободные участки сведения об исполнителе и враче, направившем на проведение анализа.

Результаты

В качестве примеров применения цитоиммунограммы кожи представляем три наблюдения предлагаемого способа оценки.

Наблюдение первое – частный случай оценки состояния кожи человека

С помощью инструмента для биопсии мы осуществили забор биоптата кожи человека с ягодичной области. После пробоподготовки, описанной выше, методом проточной цитометрии на Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) определяли количество клеток кожи определенных фенотипов, используя моноклональные антитела, меченные флюорохромами и связывающиеся с определенными рецепторами на мембране клетки. Результаты фиксировали на бланке (рис. 1).

Приведенные в качестве примера результаты исследования одного частного случая показывают, что в данном образце кожи:

1) активно представлена субпопуляция кератиноцитов, причем большинство из них активированы, что говорит об умеренной пролиферативной активности базального слоя эпидермиса;

2) присутствуют В-лимфоциты, которые в норме являются резидентами циркулирующего объема крови и лимфы, поскольку имеют положительный таксис к высокоэндотелиальным венам, находящимся преимущественно в лимфатических узлах. Наличие их в коже указывает на активность гуморального иммунитета;

3) присутствие несколько разновидностей Т-лимфоцитов (CD3⁺ лимфоцитов), локализующихся преимущественно в трех наружных слоях эпидермиса, и тот факт, что CD4⁺ клетки несколько превалируют численно над CD8⁺ клетками, говорит об усилении адаптивного иммунитета кожи;

4) низкое содержание Т-цитотоксических лимфоцитов свидетельствует об отсутствии инфекционно-воспалительного процесса;

5) остальные показатели демонстрируют количество специфических клеток кожи, но при этом их низкую активацию, что в совокупности с отсутствием специфических жалоб у данного пациента свидетельствует о нормальном состоянии его кожи.

Наблюдение второе – сравнительная оценка цитоиммунограммы кожи нативных и криоконсервированных образцов

Для демонстрации возможностей использования цитоиммунограммы кожи нами было отобрано 64 человек, которых мы разделили на группы по полу и возрасту: 25–45 лет и 45–65 лет, по 16 человек в каждой.

Деление обследованных по полу и возрасту было необходимым, чтобы показать различие измеряемых параметров в разных половозрастных группах. Исследование состояло из двух этапов:

ЦИТОИММУНОГРАММА КОЖИ № 42/2

Cytoimmunogramm of the skin №

« 22 » января 2017 г.

Ф.И.О. XXX
Last name XXX

Возраст _____
Age _____

Кератиноциты Keratinocytes CD49f ⁺	54,2	Эндотелиальные клетки Endothelial cells C146 ⁺	0,6
из них активированные of which activated CD49f ⁺ HLA-DR ⁺	41,4	из них активированные of which activated C146 ⁺ CD34 ⁺	0
Фибробласты (фиброциты) Fibroblasts CD45 ⁺ CD14 ⁺ CD44 ⁺	86,0	C146 ⁺ HLA-DR ⁺	60,3
из них активированные of which activated CD45 ⁺ CD14 ⁺ CD44 ⁺ CD80 ⁺	6,2	C146 ⁺ CD54 ⁺	5,4
		C146 ⁺ CD54 ⁺ HLA-DR ⁺	5,9
Тучные клетки Mast cells CD249 ⁺	6,8	Лимфоцитарные популяции: Lymphocyte populations: Т-лимфоциты T-lymphocytes	13,0
из них активированные of which activated CD249 ⁺ CD63 ⁺	1,1	C45 ⁺ CD3 ⁺	
Моноциты (макрофаги) Monocytes (macrophages) CD45 ⁺ CD14 ⁺	7,0	Т-хелперы T-helpers C45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	11,9
из них активированные CD45 ⁺ CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	2,6	Т-цитотоксические лимфоциты T-cytotoxic cells C45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	1,2
Внутриэпидермальные макрофаги CD207 ⁺ Intraepidermal macrophages	46,1	В-лимфоциты B-lymphocytes C45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺	8,1
из них активированные of which activated CD207 ⁺ CD80 ⁺	0	НК-лимфоциты NK-lymphocytes C45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	12,5
CD207 ⁺ HLA-DR ⁺	4,9		
CD207 ⁺ CD80 ⁺ HLA-DR ⁺	0,3		

Результаты исследования свидетельствуют _____
The results of the observation _____

Для врача _____
For the doctor _____
анализ проводил _____
The analysis conducted _____

Рисунок 1. Результаты цитоиммунограммы кожи на бланке

Figure 1. Results of the skin citoimmunogram (standart form)

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФЕНОТИПА КЛЕТОК БИОПТАТА КОЖИ ИЗ НАТИВНОГО И КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО ОБРАЗЦА

TABLE 1. COMPARATIVE EVALUATION OF PHENOTYPE OF SKIN BIOPSY CELLS FROM NATIVE AND CRYOPRESERVED SAMPLES

Клеточный состав кожи Cellular composition of the skin	Локализация Localization	Фенотип Phenotype	Нативный образец (%) The native sample (%)	Размороженный образец (%) Thawed sample (%)
Кератиноциты Keratinocytes	эпидермис epidermis	CD49 ⁺	70,25±3,75	68,2±2,01
Активированные кератиноциты Activated keratinocytes		CD49 ⁺ HLA-DR ⁺	3,25±0,75	1,3±0,04***
Фибробласты Fibroblasts	дерма dermis	CD45 ⁺ CD14 ⁺ CD44 ⁺	76,5±3,5	66,8±4,0*
Активированные фибробласты Activated fibroblasts		CD45 ⁺ CD14 ⁺ CD44 ⁺ CD80 ⁺	4,93±2,47	3,5±0,2
Эпидермальные клетки Лангерганса Epidermal Langerhans cells	эпидермис дерма epidermis dermis	CD207 ⁺	48±1,0	46,4±1,2
Активированные клетки Лангерганса Activated Langerhans cells		CD207 ⁺ CD80 ⁺ HLA-DR ⁺	3,8±0,9	0***
		CD207 ⁺ CD80 ⁺ HLA-DR ⁻ CD207 ⁺ CD80 ⁺ HLA-DR ⁺	5,1±1,1 0	1,3±0,05*** 3,5±0,9***
Эндотелиальные клетки Endothelial cells	дерма dermis	CD146 ⁺	1,32±0,98	0,6±0,03***
Активированные эндотелиальные клетки Activated endothelial cells		CD146 ⁺ CD54 ⁺ HLA-DR ⁺ CD146 ⁺ CD54 ⁺ HLA-DR ⁻	0 22,88±2,52	0 50,0±4,6**
		CD146 ⁺ CD54 ⁺ HLA-DR ⁺ CD146 ⁺ CD34 ⁺	0,33±0,17 6,93±1,07	0* 36,0±5,2***
Тучные клетки Mast cells	эпидермис epidermis	CD249 ⁺	3,43±1,77	2,5±0,99
Активированные тучные клетки Activated mast cells		CD249 ⁺ CD63 ⁺	1,1±0,2	1,6±0,3
Моноциты (Макрофаги) Monocytes (Macrophages)	дерма dermis	CD45 ⁺ CD14 ⁺	7,75±1,25	5,6±1,01
Активированные моноциты (Макрофаги) Activated monocytes (Macrophages)		CD45 ⁺ CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	0,23±0,16	0***
Эпидермальные лимфоциты Т-общие Epidermal lymphocytes T common	эпидермис дерма epidermis dermis	CD45 ⁺ CD3 ⁺	14,0±1,0	11,2±1,99
Т-хелперы T helpers		CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	11,0±1,0	9,9±0,75
Т-цитотоксические T cytotoxic		CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	2,5±0,5	1,3±0,22*
В-лимфоциты B lymphocytes		CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁺	6,0±1,0	7,0±1,05
НК-клетки NK cells		CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	10,5±1,5	9,5±1,14

Примечание. Достоверность различия по сравнению с нативным образцом: * – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001.

Note. Significance of differences as compared to the native sample, *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

1 этап – исследовался биоптат с ягодичной области патентованным способом;

2 этап – исследовался криоконсервированный аналог биоптатов.

В результате исследования впервые из общей гетерогенной популяции клеток кожи были получены отдельные субпопуляции и определен фенотип клеток из нативного и криоконсервированного образца (табл. 1).

Жизнеспособность в нативном образце составила 99,8%, после криоконсервации – 87,0%. При сравнении данных процентного соотношения клеток кожи двух образцов существенного расхождения в показателях не обнаружено, за исключением клеток, экспрессирующих на своей поверхности HLA-DR антигены и молекулы адгезии, то есть являющихся антигенпрезентирующими.

Наблюдение третье – сравнительная характеристика количества кератиноцитов эпидермиса и фибробластов дермы

Основными звеньями иммунной системы кожи являются кератиноциты и фибробласты, которые регулируют физиологические функции кожи, а продуцируемые ими вещества – сигнальными молекулами для локальной координации межклеточных и межтканевых взаимодействий. Причем эти субпопуляции клеток кожи являются резидентами разных ее слоев, а их согласованное взаимодействие определяет способность поддерживать гомеостаз кожи и реагировать на воздействие внешней и внутренней среды. В качестве

примера мы демонстрируем наблюдение количества кератиноцитов и фибробластов в исследуемых образцах (табл. 2).

Как видно, количество кератиноцитов в эпидермисе с течением времени уменьшается. Результаты достоверны в группах сравнения 25-45 и 45-65 у обоих полов, а также в группах сравнения 25-45 и 45-65 между мужчинами и женщинами. Необходимо отметить, что у мужчин количество кератиноцитов в эпидермисе больше, чем у женщин, на 4%. Это можно объяснить тем, что анатомически толщина кожи у мужчин выражена значительно больше, чем у женщин. Причем у мужчин количество кератиноцитов в эпидермисе с возрастом уменьшается на 16,3%, а у женщин на 23,6%. Такое снижение клеток, возможно, связано с различием гормонального фона между полами.

Количество фибробластов в дерме также демонстрирует возрастное снижение. Результаты достоверны в группах сравнения 25-45 и 45-65 у обоих полов, а также в группах сравнения 25-45 и 45-65 между мужчинами и женщинами. У мужчин количество клеток больше по сравнению с женщинами на 4%. Динамика снижения с возрастом – у мужчин количество фибробластов в дерме уменьшается на 13,9%, а у женщин – на 17%.

В большей степени происходит снижение количества кератиноцитов в эпидермисе, чем фибробластов в дерме. Причем у женщин эти изменения более выражены с возрастом. Скорее всего,

ТАБЛИЦА 2. ПОЛОВОЗРАСТНАЯ КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЕРАТИНОЦИТОВ ЭПИДЕРМИСА И ФИБРОБЛАСТОВ ДЕРМЫ ОБСЛЕДОВАННОГО КОНТИНГЕНТА

TABLE 2. GENDER/AGE-RELATED QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF EPIDERMAL KERATINOCYTES AND DERMAL FIBROBLASTS OF THE GROUPS EXAMINED

Возраст, лет Age, years	25-45	45-65
Кератиноциты эпидермиса Epidermal keratinocytes		
мужчины men	69,9±0,96	58,5±1,18***
женщины women	66,88±0,47	51,1±1,9***
Фибробласты дермы Dermal fibroblasts		
мужчины men	74,25±1,1	63,9±1,0***
женщины women	71,25±0,34	59,1±0,9***

Примечание. Достоверность сравнения с контрольной группой: * – p < 0,05; ** – p < 0,01; * – p < 0,001.**

Note. Significance of differences when compared to the control group, *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001

это связано с тем, что кожа является гормонально зависимым органом, но эти результаты предстоит определить точнее.

Обсуждение

Таким образом, предлагаемый способ позволяет получить информацию о количественном составе и функциональной активности клеток кожи, что объективно свидетельствует о текущем статусе местного иммунитета пациента и может стать основой для лечебно-профилактической программы, разработанной индивидуально.

Цитоиммунограмма кожи, как способ диагностики кожи, проста в исполнении и доступна, позволяет оценить качественный и количественный состав ее отдельных субпопуляций клеток, оценить их функцию и степень их реагирования в ответ на какие-либо воздействия внешней и внутренней среды.

Изобретение цитоиммунограммы кожи открывает для практической дерматологии и косметологии путь к новому пониманию процессов, проходящих в коже человека, дает возможность количественно оценить показатели состояния

кожи не только в рамках отдельного человека, но и в рамках популяции, не только в условиях нормы, но, что немаловажно, в условиях патологии. Тем более что в роли системы хемокинов в коже, например в патогенезе псориаза, уже нет никаких сомнений [2].

Возможность исследовать криоконсервированный образец позволяет сделать повторное исследование спустя некоторое время или после каких-либо процедур, воздействий, применении наружных препаратов или косметических средств и, сравнив данные, позволит врачу объективно оценивать изменения.

Широкомасштабное применение цитоиммунограммы в перспективе позволит создать популяционный регистр состояния кожи в норме и патологии, что позволит определять степень реагирования кожи на воздействия среды, измерять активность клеточных субпопуляций нативной кожи в условиях нормы и патологии, использовать критерий возрастных изменений кожи, объективно оценивать динамику заболевания кожи, индивидуально подбирать лекарственный препарат и контролировать эффективность применяемых наружных лекарственных средств.

Список литературы / References

1. Агафонова С.Г., Индилова Н.И., Иванова Е.В., Гуткин Д.В., Ткаченко С.Б. Неинвазивные методы диагностики в дерматологии и дерматокосметологии // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология, 2010. № 4. С. 41-45. [Agafonova S.G., Indilova N.I., Ivanova E.V., Gutkin D.V., Tkachenko S.B. Noninvasive diagnostic techniques in dermatology and dermatocosmetology. *Ekspperimentalnaya i klinicheskaya dermatokosmetologiya = Experimental and Clinical Dermatocosmetology*, 2010, no. 4, pp. 41-45. (In Russ.)]
2. Бельтюкова А.С., Сысоев К.А., Ильина Т.Н., Шемеровская Т.Г., Хобейш М.М., Монахов К.Н., Тотолян Арег А. Экспрессия мРНК хемокинов и хемокиновых рецепторов в коже больных псориазом // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 4-5. С. 337-346. [Beltiukova A.S., Syssoev K.A., Ilyina T.N., Shemerovskaya T.G., Hobeish M.M., Monakhov K.N., Totolian Areg A. Expression of mRNAs for chemokines and chemokine receptors in the skin from patients with psoriasis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 10, no. 4-5, pp. 337-346. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2008-4-5-337-346.
3. Боровик Т.Э., Макарова С.Г., Дарчия С.Н., Гамалева А.В., Грибакин С.Г. Кожа как орган иммунной системы // Педиатрия, 2010. Т. 89, № 2. С. 132-136. [Borovik T.E., Makarova S.G., Darchiya S.N., Gamaleeva A.V., Gribakin S.G. Skin as an organ of the immune system. *Pediatriya = Pediatrics*, 2010, Vol. 89, no. 2, pp. 132-136. (In Russ.)]
4. Гусак В.К., Николенко Ю.И., Фисталь Э.Я., Попандопуло О.М. Иммунная компетентность кожи как один из механизмов развития аутоагрессии при термических повреждениях // Вестник гигиены и эпидемиологии, 2000. Т. 4, № 2. С. 256-261. [Gusak V.K., Nikolenko Yu.I., Fistal E.Ya., Popandopulo O.M. Immune competence of the skin as one of the mechanisms of development of autoaggression during thermal damage. *Vestnik gigiyeny i epidemiologii = Bulletin of Hygiene and Epidemiology*, 2000, Vol. 4, no. 2, pp. 256-261. (In Russ.)]
5. Золотенкова Г.В., Ткаченко С.Б., Пиголкин Ю.И. Современные неинвазивные методы оценки возрастных изменений кожи // Судебно-медицинская экспертиза, 2015. Т. 58, № 1. С. 26-30. [Zolotenkova G.V., Tkachenko S.B., Pigolkin Yu.I. The modern non-invasive methods for the evaluation of the age-specific changes in the skin. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza = Forensic-Medical Examination*, 2015, Vol. 58, no. 1, pp. 26-30. (In Russ.)]
6. Козлова Н.Н., Прокопенко В.Д. Кожа как иммунный орган // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2006. № 4. С. 34-40. [Kozlova N.N., Prokopenko V.D. The skin as an organ of immunity. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2006, no. 4, pp. 34-40. (In Russ.)]

7. Резайкин А.В., Кубанова А.А., Резайкина А.В. Неинвазивные методы исследования кожи // Вестник дерматологии и венерологии, 2009. № 6. С. 28-32. [Rezaikin A.V., Kubanova A.A., Rezaikina A.V. Non-invasive skin examination methods. *Vestnik dermatologii i venerologii = Bulletin of Dermatology and Venerology*, 2009, no. 6, pp. 28-32. (In Russ.)]

8. Тимофеев Г.А. Методы аппаратного исследования кожи человека // Косметика и медицина, 2005. № 4. С. 30-38. [Timofeev G.A. Methods of hardware research of human skin. *Kosmetika i meditsina = Cosmetics and Medicine*, 2005, no. 4, pp. 30-38. (In Russ.)]

9. Ткаченко С.Б. Потехаев Н.Н. Старение кожи. Теория свободных радикалов // Клиническая дерматология и венерология, 2003. № 4. С. 85-88. [Tkachenko S.B. Potekayev N.N. Skin aging. Theory of free radicals. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya = Clinical Dermatology and Venerology*, 2003, no. 4, pp. 85-88. (In Russ.)]

Авторы:

Гольцов С.В. — к.м.н., доцент, дерматолог,
Многопрофильное медицинское учреждение NEO-Clinic,
г. Тюмень, Россия

Гольцова Е.Н. — к.м.н., дерматокосметолог,
Многопрофильное медицинское учреждение NEO-Clinic,
г. Тюмень, Россия

Суховей Ю.Г. — д.м.н., профессор, иммунолог,
Тюменский филиал Института клинической
иммунологии, г. Тюмень, Россия

Костоломова Е.Г. — к.б.н., биолог, Тюменский филиал
Института клинической иммунологии, г. Тюмень,
Россия

Паульс В.Ю. — к.т.н., доцент, инженер,
Многопрофильное медицинское учреждение NEO-Clinic,
г. Тюмень, Россия

Поступила 11.08.2017

Отправлена на доработку 25.09.2017

Принята к печати 16.10.2017

Authors:

Goltsov S.V., PhD (Medicine), Associate Professor
(Dermatology), Multidisciplinary Medical Institution NEO-
Clinic, Tyumen, Russian Federation

Goltsova E.N., PhD (Medicine), Dermatologist/Cosmetologist,
Multidisciplinary Medical Institution NEO-Clinic, Tyumen,
Russian Federation

Sukhovey Yu.G., PhD, MD (Medicine), Professor,
Immunologist, Institute of Clinical Immunology, Tyumen
Branch, Tyumen, Russian Federation

Kostolomova E.G., PhD (Biology), Biologist, Institute of
Clinical Immunology, Tyumen Branch, Tyumen, Russian
Federation

Pauls V.Yu., PhD (Technology), Associate Professor, Engineer,
Multidisciplinary Medical Institution NEO-Clinic, Tyumen,
Russian Federation

Received 11.08.2017

Revision received 25.09.2017

Accepted 16.10.2017