

АЛЛЕРГИЧЕСКИЙ КОНТАКТНЫЙ ДЕРМАТИТ У МЫШЕЙ С ДЕФИЦИТОМ ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 В ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТКАХ

Горшкова Е.А., Медведовская А.Д., Губернаторова Е.О.

ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва,
Россия

Резюме. Контактный дерматит — заболевание, характеризующееся воспалением кожи, вызванным внешними агентами, чаще всего аллергенами. У пациентов с контактным дерматитом нарушена барьерная функция кожи, из-за чего эпидермис становится легко проницаемым. Гаптены, в том числе оксазолон, — небольшие молекулы, легко проникающие через эпидермальный барьер. При связывании оксазолон с собственными тканевыми белками образуются новые конформации белков, вызывающие иммунный ответ и впоследствии развитие аллергического контактного дерматита. Ранее была описана патогенная роль интерлейкина-6 в развитии контактного дерматита в различных мышинных моделях. Дендритные клетки, наряду с кератиноцитами, являются важным источником ИЛ-6 в коже и, кроме того, являясь антиген-презентирующими клетками, вовлечены в развитие аллергической реакции. Для того чтобы установить функции ИЛ-6 из дендритных клеток в патогенезе аллергического контактного дерматита, у мышей с дефицитом ИЛ-6 в дендритных клетках и контрольных мышей дикого типа индуцировали контактный дерматит путем нанесения спиртового раствора оксазолон на кожу брюха и затем на кожу ушей. Было установлено, что у мышей с дефицитом ИЛ-6 в дендритных клетках индукция оксазолон-зависимой контактной чувствительности приводит к развитию более сильного заболевания, чем у мышей дикого типа. Таким образом, дендритные клетки при помощи ИЛ-6 могут выполнять протективные и регуляторные функции в АКД. Реализация этих функций может быть опосредована активностью TGF- β , экспрессия которого снижена у мышей с тканеспецифичным нокаутом ИЛ-6 в дендритных клетках. TGF- β является важным регуляторным цитокином, контролирующим баланс эффекторных и регуляторных популяций Т-клеток. Кроме того, TGF- β важен для разрешения воспаления и заживления тканей. В то же время отсутствие разницы в экспрессии ИЛ-4 и ИЛ17а свидетельствует о том, что у высоко чувствительных к дерматиту мышам с дефицитом ИЛ-6 из дендритных клеток не затронуты Th2- и Th17-ветви клеточного ответа. Эффекты системного дефицита ИЛ-6, показанные в различных моделях дерматита, свидетельствуют о преимущественно патогенной роли этого цитокина в развитии аллергического контактного дерматита

Адрес для переписки:

Горшкова Екатерина Александровна
ФГБУН «Институт молекулярной биологии
имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук
119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 32.
Тел.: 8 (499) 135-23-11.
Факс: 8 (499) 135-14-05.
E-mail: gorshsama@gmail.com

Address for correspondence:

Ekaterina A. Gorshkova
Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences
32 Vavilov St
Moscow
119991 Russian Federation
Phone: +7 (499) 135-23-11.
Fax: +7 (499) 135-14-05.
E-mail: gorshsama@gmail.com

Образец цитирования:

Е.А. Горшкова, А.Д. Медведовская,
Е.О. Губернаторова «Аллергический контактный
дерматит у мышей с дефицитом интерлейкина-6
в дендритных клетках» // Медицинская иммунология,
2025. Т. 27, № 3. С. 571-580.
doi: 10.15789/1563-0625-ACD-3164

© Горшкова Е.А. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Gorshkova, A.D. Medvedovskaya, E.O. Gubernatorova
“Allergic contact dermatitis in mice with interleukin-6
deficiency in dendritic cells”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 3,
pp. 571-580.
doi: 10.15789/1563-0625-ACD-3164

© Gorshkova E.A. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-ACD-3164

в мышинной модели, при этом дендритные клетки, по всей видимости, служат источниками «защитного» IL-6, участвуя не только в развитии иммунного ответа, но и в репарации и поддержании барьерных функций кожи.

Ключевые слова: аллергический контактный дерматит, дендритные клетки, IL-6, мышинная модель, оксазолон, воспаление кожи

ALLERGIC CONTACT DERMATITIS IN MICE WITH INTERLEUKIN-6 DEFICIENCY IN DENDRITIC CELLS

Gorshkova E.A., Medvedovskaya A.D., Gubernatorova E.O.

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. Contact dermatitis is a disease characterized by skin inflammation caused by external agents, most commonly, allergens. Patients with contact dermatitis have impaired skin barrier function, causing permeability of the epidermis layer. Haptens, including oxazolone, are the small molecules that easily penetrate the epidermal barrier. When oxazolone binds to the tissue proteins, new antigenic conformations are formed, triggering an immune response and, subsequently, the development of allergic contact dermatitis. The pathogenic role of interleukin-6 in the development of contact dermatitis has been previously described in various murine models. Dendritic cells (DC), along with keratinocytes, are an important source of IL-6 in the skin. Moreover, DC as an antigen-presenting cells are involved in the development of allergic reaction. To establish the functional role of IL-6 from DC in development of allergic contact dermatitis, we induced dermatitis in the knockout mice with deficiency of IL-6 in dendritic cells (CD11c-IL-6 KO), and in wild-type control mice by applying oxazolone to the abdominal skin and then to the skin of the ears.

Mice with deficiency of IL-6 from dendritic cells had more pronounced symptoms of skin inflammation than wild-type mice after sensitization with oxazolone. Thus, IL-6 produced by dendritic cells seems to have protective and regulatory functions in allergic contact dermatitis. Implementation of these functions may be mediated by TGF- β , whose expression was reduced in mice with tissue-specific IL-6 knockout in dendritic cells. TGF- β is an important regulatory cytokine that controls the balance of effector and regulatory T cell populations. Moreover, TGF- β is important for the resolution of inflammation and tissue healing. At the same time, the lack of difference in IL-4 and IL-17a expression between CD11c-IL-6 KO and wild type mice suggests that the Th2 and Th17 branches of the cellular response were not affected in highly susceptible mice with IL-6-deficiency in dendritic cells.

The effects of systemic IL-6 deficiency shown in various models of dermatitis suggest a predominantly pathogenic role of this cytokine in the development of allergic contact dermatitis. Our data suggests that dendritic cells may serve as sources of “protective” IL-6 activity, participating not only in the development of the immune response but also in repair and maintenance of skin barrier functions.

Keywords: allergic contact dermatitis, dendritic cells, IL-6, mouse model, oxazolone, skin inflammation

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-75-30032.

Введение

Контактный дерматит — распространенное воспалительное заболевание кожи. Известны две основные формы контактного дерматита, отличающиеся по причинам возникновения и механизмам патогенеза: аллергический и ирритативный. Клиническая картина различных форм контактного дерматита сходна и включает в себя покраснение, зуд, шелушение и повышенную чувствительность кожи [3]. Ирритативный контактный дерматит возникает в результате повреждения кожи раздражающими химическими агентами

или при физическом воздействии, и развивается через непродолжительное время в месте повреждения [21]. Аллергический контактный дерматит (АКД) развивается после контакта с аллергеном и сенсибилизации. Участок кожи, взаимодействующий с аллергеном при вторичном контакте, может отличаться от первого, однако на нем будет развиваться клиническая картина дерматита, что свидетельствует о системном ответе на аллерген [11]. Таким образом, АКД можно охарактеризовать как реакцию гиперчувствительности замедленного типа. Нередко клиническая картина, описываемая как АКД, на самом деле является смесью аллергической и ирритативной формы, в связи с наличием как специфичной антиген-зависимой, так и неспецифичной воспали-

тельной реакции. Это связывают, в частности, с зависимостью реакции от дозы антигена: так, для антиген-зависимой реакции требуется небольшая доза, в то время как для неспецифичной воспалительной реакции — значительно большая [6].

Модель контактной гиперчувствительности (КГЧ) у грызунов используется при изучении аллергического контактного дерматита. КГЧ также относится к замедленному типу гиперчувствительности, что делает эту модель клинически релевантной [8]. В мышинных моделях КГЧ для развития заболевания на кожу наносят гаптены — небольшие молекулы, способные инициировать развитие иммунных реакций после взаимодействия с белком-носителем и образования иммуногенного комплекса. Важно отметить, что сам белок и гаптен по отдельности не вызывают сенсibilизацию: гаптен слишком мал, чтобы быть презентируемым в составе МНС, и может туда попасть лишь после связывания более крупной молекулой белка и процессинга комплекса. С другой стороны, было показано, что гаптены, попадая на кожу, могут активировать врожденный иммунитет. При генетической инактивации рецепторов врожденного иммунитета TLR4 и TLR2 у мышей не развивались реакции КГЧ в ответ на тринитрохлорбензол (TNCB), оксазолон и флуоресцеин изотиоцианат (FITC) [10]. Кроме того, при отсутствии IL-12 для того, чтобы КГЧ не развилась, достаточно было инактивации лишь одного из этих рецепторов [13]. Интересно, что TLR2 и TLR4 не распознают гаптены напрямую и активация этих TLR не связана с микробиотой кожи в модели КГЧ [14]. Предполагается, что молекулами, активирующими TLR2 и TLR4, могут являться производные гиалуроновой кислоты, возникающие в результате взаимодействия с активными формами кислорода (АФК). АФК, в свою очередь, выделяются ДК в ответ на проникновение в кожу гаптенов [10].

Ранее было показано, что мыши с дефицитом IL-6 менее чувствительны к индукции АКД оксазолоном и развивают менее выраженное воспаление кожи, чем мыши дикого типа, за счет нарушений адаптивной ветви иммунного ответа — прайминга и созревания антиген-специфичных клеток [9]. При этом использование оксазолон в больших концентрациях с целью индуцировать ирритативную форму контактного дерматита, напротив, приводило к более сильному повреждению ткани у IL-6 KO мышей [9]. Аналогично, в другой модели ирритативного контактного дерматита с использованием реактивного топлива в качестве повреждающего агента, у IL-6 KO мышей наблюдалось усиление симптомов дерматита [12]. Позже было показано, что протективная функция IL-6 в ирритативном дерматите скорее всего связана с его влиянием на кератиноциты: так, генетическое удаление рецептора IL-6Ra на этих клетках также приво-

дило к более выраженному кожному воспалению и гиперплазии кератиноцитов в области повреждения за счет избыточной продукции IL-22 этими клетками [5].

Экспрессирующие CD11c дендритные клетки широко представлены в коже и играют ключевую роль в развитии АКД, презентирова antigen основным эффекторам заболевания — Т-клеткам. Вместе с этим дендритные клетки производят множество цитокинов, включая IL-6, участвующих в привлечении и поляризации эффекторных иммунных клеток. Выделяют несколько субпопуляций ДК: клетки Лангерганса, расположенные в эпидермисе, а также различные дермальные ДК (дДК) [2]. Клетки Лангерганса могут играть защитную роль в моделях АКД, так как при их удалении наблюдается усиленное развитие реакции гиперчувствительности кожи [16]. С другой стороны, в модели атопического дерматита, индуцированного веществом MC903, было показано, что для развития заболевания важны воспалительные, но не резидентные, лангерин-положительные дДК моноцитарного происхождения, так как их удаление приводило к снижению симптомов, в отличие от удаления клеток Лангерганса и резидентных дДК [23, 24]. Кроме того, дендритные клетки способны к уникальному типу передачи сигнала IL-6 — транс-презентации [7].

Итак, при малых дозах антигена IL-6 может играть патогенную роль в развитии дерматита, в то время как при доминировании реакций врожденного иммунного ответа, вызванных получением высокой дозы антигена, IL-6 выступает в роли защитного фактора, модулируя пролиферацию кератиноцитов. Дендритные клетки выступают в роли связующего звена между врожденными и адаптивными ветвями ответа, в том числе при КГЧ. Благодаря этому, они могут служить источником IL-6 как для кератиноцитов в коже, так и для клеток иммунной системы в лимфоузлах на стадии сенсibilизации, либо резидентных и инфильтрирующих иммунных клеток на фазе индукции АКД. В настоящей работе были поставлены опыты по выявлению роли дендритноклеточного IL-6 в коже при помощи мышинной модели оксазолон-индуцированной контактной гиперчувствительности с использованием мышей с генетическим нокаутом IL-6 в CD11c-положительных клетках.

Материалы и методы

Мыши

Мышей с генетическим нокаутом гена *IL6* в дендритных клетках получали путем скрещивания мышей, несущих флуксированный аллель *IL6*, и мышей-делитеров, несущих рекомбиназу Cre под промотором гена *Itgax*, кодирующего белок CD11c, и активного в дендритных клетках [1]. В опытах по индукции оксазолон-зависимого

контактного дерматита использовали две группы: мышей с дефицитом IL-6 из дендритных клеток с генотипом IL-6^{flx/flx} CD11c-Cre, и мышей дикого типа (литтермейты других генотипов) обоих полов возраста 6-12 недель. Животных содержали в конвенциональных условиях в клетках размера T2 с непылевым подстилом (Rehohix) в апатогенных условиях, при температуре 20±2 °С, относительной влажности 40±10%, и стандартном цикле освещенности (12 ч день/12 ч ночь), с постоянным доступом к стерилизованной воде и корму для лабораторных животных («Чара»).

Генотипирование мышей

Генотипы мышей определяли методом ПЦР на образцах геномной ДНК, выделенной из биопсий кончика хвоста. Для определения аллеля *IL6* использовали три праймера: mIL-6-F (5'-CCCACCAAGAACGATAGTCA-3'), mIL-6-R1 (5'-GGTATCCTCTGTGAAGTCTCC-3') и mIL-6-R2 (5'-AGCACTTTATTGGGCTCTATACA-3'), продукт размера 320 п. н. соответствовал аллели *IL6* дикого типа, 420 п. н. — флксированной, и 250 п. н. — нокаутной. Для определения наличия трансгена рекомбиназы CD11c-Cre использовали праймеры CD11c-Cre-F (5'-ACTTGGCAGCTGTCTCCAAG-3') и CD11c-Cre-R (5'-GCGAACATCTTCAGGTTCTG-3'), дающие продукт размером 300 п. н. Условия ПЦР: 94 °С — 3 мин, затем 35 циклов (95 °С — 15 сек, 60 °С — 20 сек, 72 °С — 20 сек). Продукты ПЦР анализировали электрофоретически в 1,8%-ном агарозном геле.

Модель оксазолон-индуцированной контактной гиперчувствительности

Перед индукцией заболевания между экспериментальными группами проводили кохаузинг для выравнивания состава микробиоты. В начале эксперимента осуществляли сенсибилизацию мышей к гаптену. Для этого мышам на заранее освобожденный от шерсти участок брюха наносили 100 микролитров свежеприготовленного 3%-ного раствора оксазолон (4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one, Sigma) в 96,5%-ном этаноле. На седьмой день эксперимента начинали этап индукции гиперчувствительности: в течение четырех дней на правое ухо мыши наносили 20 микролитров свежеприготовленного 3%-ного спиртового раствора оксазолон, а на левое (контрольное) ухо — 96,5%-ный этанол. Для оценки тяжести развиваемой реакции штангенциркулем измеряли толщину мочек ушей, а также отмечали визуальные признаки воспаления кожи. На 11-й день эксперимента у мышей терминально собирали кровь из щеки для цитометрического анализа периферических мононуклеаров и получения сыворотки. Мышей умерщвляли, после чего органолептически оценивали тяжесть развиваемых симптомов контактной гиперчувствительности. Так, использовали 6 критериев: степень покрас-

нения и васкуляризации тканей уха, наличие и число следов от расчесывания на коже, сухость кожи, наличие эрозий, повреждений и отечность тканей по ранее опубликованному протоколу с модификациями [19]. Каждый из параметров оценивали по трехбалльной шкале (0 — отсутствие указанного признака, 3 — очень сильное проявление). Для каждой мыши полученные баллы по шести критериям суммировали (максимальный балл — 18). После этого ткань кожи уха отбирали с помощью стилета на биопсию для дальнейшего экспрессионного либо гистологического анализа. Было поставлено не менее трех независимых опытов.

Анализ экспрессии генов

Гомогенизацию замороженной ткани проводили в TRK буфере (Omega Bio-Tek, США), содержащем бета-меркаптоэтанол, при помощи диспергатора Ultra Turrax IKA T10 (Германия), после чего гомогенат центрифугировали (5 минут, 8 °С, 10000 rpm), а супернатант использовали для выделения тотальной РНК на колонках (E.Z.N.A.® HP Total RNA Kit, Omega Bio-Tek, США). 500 нг РНК, обработанной ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США) использовали для получения кДНК при помощи набора для обратной транскрипции RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fischer Scientific, США) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем (60 мин — 42 °С, 5 мин — 70 °С). Постановку РТ-ПЦР производили при помощи готовой реакционной смеси 5x qPCRmix-HS SYBR (ЗАО «Евроген», Россия). Матрицу кДНК разводили в 3 раза, далее пробы наносили в 96-луночный планшет (The Applied Biosystems® MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate). Реакцию проводили в амплификаторе Applied Biosystems 7500. Последовательности праймеров, использованных в работе, приведены в таблице 1.

Иммуноферментный анализ

Содержание IL-6 в сыворотке определяли с помощью набора Invitrogen™ Mouse IL-6 Uncoated ELISA Kit по стандартному протоколу производителя.

Проточная цитофлуориметрия

Кровь из щеки собирали в раствор гепарина в PBS. Фракцию периферических лейкоцитов крови отделяли методом градиентного центрифугирования на фиколе в течение 30 минут при ускорении 400 g, при плавном торможении центрифуги. Отобранную фракцию периферических мононуклеаров отмывали 2%-ным раствором FBS в PBS (PBS/FBS) и осаждали (300 g, 4 °С, 7 мин). От эритроцитов избавлялись при помощи буфера ACK. Выделенные клетки окрашивали смесью антител (табл. 2), предварительно заблокировав связывание Fcγ-рецепторов антителом против Fcγ (анти-CD16/32 антитело, клон 93, BioLegend, США).

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРАЙМЕРОВ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ДЛЯ qRT-PCR АНАЛИЗА

TABLE 1. MOUSE GENES, THE RELATIVE EXPRESSION OF WHICH WAS STUDIED IN THIS WORK, AND SEQUENCES OF PRIMERS USED IN qRT-PCR

Ген Gene	Кодируемый белок Protein	Последовательность прямого праймера Forward primer	Последовательность обратного праймера Reverse primer
Actb	Actin β	5'-CTCCTGAGCGCAAGTACTCTGTG-3'	5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'
IL4	IL-4	5'-GGTCTCAACCCCGAGCTAGT-3'	5'-GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT-3'
IL6	IL-6	5'-CTGATGCTGGTGACAACCAC-3'	5'-GCCACTCCTTCTGTGACTCC-3'
IL17a	IL-17A	5'-GGACTCTCCACCGCAATGA-3'	5'-GGCACTGAGCTTCCCAGATC-3'
Tgfb	TGF- β	5'-ACCATGCCAACTTCTGTCTG-3'	5'-CGGGTTGTGTTGGTTGTAGA-3'

ТАБЛИЦА 2. ПАНЕЛЬ АНТИТЕЛ ДЛЯ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

TABLE 2. FLOW CYTOMETRY PANEL OF ANTIBODIES

Маркер Marker	Краситель Fluorescent dye	Клон Clone	Титр Dilution factor	Производитель Manufacturer
Viability Dye	eFluor 780		3200	Invitrogen
CD45	PerCP-Cy5.5	30-F11	1000	eBioscience
CD4	PO	GK1.5	3000	BioLegend
МНСII	APC	M5/114.15.2	1000	Invitrogen
Ly6G	FITC	1A8	3000	BioLegend
CD11B	PE-Cy7	M1/70	3000	BioLegend
CD19	PB	6D6	400	BioLegend
SiglecF	PE	E50-2440	200	BD

Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе BD FACS Canto и анализировали при помощи программы FlowJo (Treestar, США).

Гистология

Ткани уха фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального забуференного формалина (NBF, Neutral Buffered Formalin) в течение 24 часов. После фиксации ткань отмывали в PBS. Ткань дегидратировали последовательной сменой спиртов с возрастающей концентрацией, после чего заключали в парафиновые блоки, ориентируя ткань таким образом, чтобы получить поперечный срез уха. Срезы толщиной 4 мкм были получены при помощи микротомы SLEE Cut 4055 (Slee, Германия). Окрашивание гематоксилином и эозином проводили по стандартному протоколу (ООО «БиоВитрум», Россия).

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 7. Принадлежность выборки к нормальному распределению оценивали по критерию д'Агостино–Пирсона. Если выборка

подчинялась нормальному распределению, для оценки статистической значимости применяли t-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

IL-6 из дендритных клеток играет защитную роль в модели оксазолон-индуцированного контактного дерматита у мыши

Ранее было показано, что мыши с полным нокаутом IL-6 устойчивы к развитию контактной гиперчувствительности в модели оксазолон-зависимого дерматита [9]. В ходе многолетних исследований способов передачи сигнала от IL-6 было установлено, что функции этого цитокина могут зависеть от клеточного источника IL-6. Так, оказалось, что дендритные клетки способны к уникальному типу передачи сигнала IL-6 – транс-презентации [7]. В нашей лаборатории ранее были получены мыши с генетическим нокаутом IL-6 в дендритных клетках – IL-6^{fllox/fllox} CD11c-Cre [1].

У $IL-6^{flx/flx}$ CD11c-Cre и мышей дикого типа индуцировали контактный дерматит при помощи гаптена оксазолон. На стадии сенсибилизации (день 0) оксазолон наносили на кожу живота, затем, на стадии индукции (дни 7–10), – на ткань правого (экспериментального) уха. На левое (контрольное) ухо наносили этанол в том же объеме. Терминацию эксперимента производили на 11-й день (рис. 1А, см. 2-ю стр. обложки).

Было установлено, что мыши с генетическим нокаутом $IL-6$ в дендритных клетках более чувствительны к оксазолон-опосредованной индукции контактной гиперчувствительности (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки). Утолщение мочки уха после обработки оксазолоном связано с отеком и инфильтрацией иммунных клеток, по-

этому большая толщина мочки уха у группы с дефицитом $IL-6$ из дендритных клеток (рис. 1В, см. 2-ю стр. обложки) свидетельствует о более выраженной реакции гиперчувствительности. В подтверждение гипотезы о повышенной чувствительности CD11c- $IL-6$ КО мышей к индукции дерматита, органолептическая оценка тяжести заболевания (скора) у данной группы мышей показала более высокие баллы (рис. 1Г, см. 2-ю стр. обложки). Гистологический анализ ткани уха мышей с дендритноклеточным нокаутом $IL-6$ продемонстрировал образование выраженного слоя кератинизированных клеток, а также более яркую картину инфильтрации иммунных клеток, как в эпидермисе, так и в дерме, по сравнению с диким типом (рис. 2А).

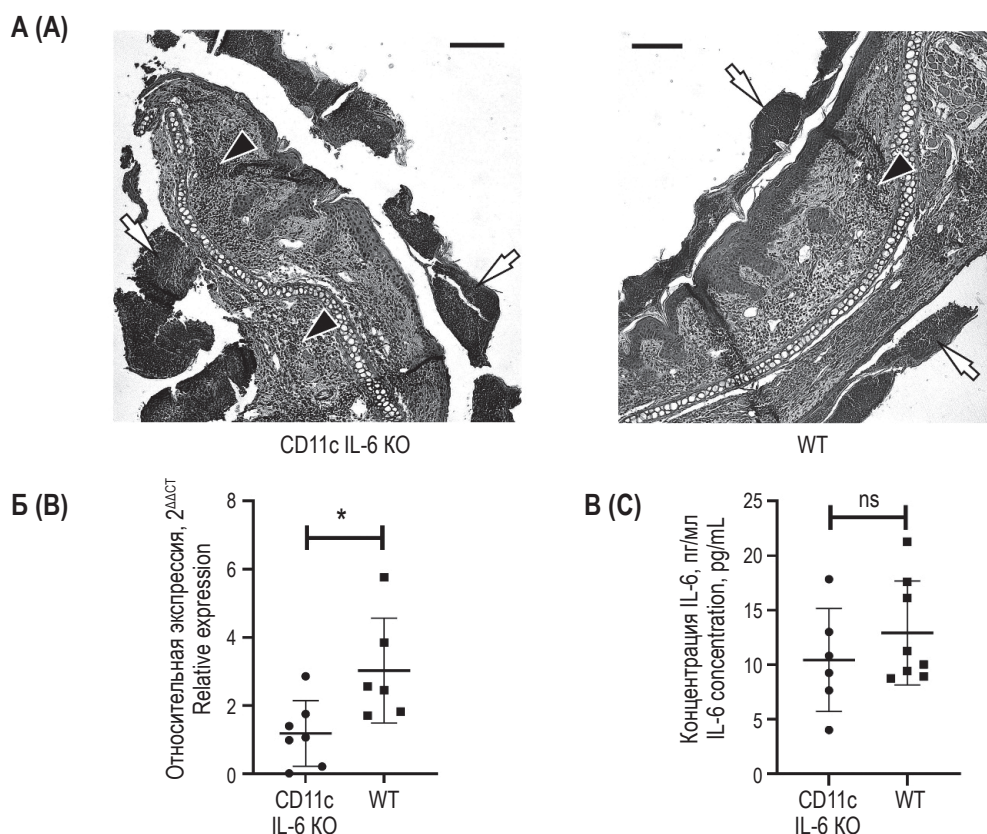


Рисунок 2. Более тяжелое течение АКД у мышей с дефицитом $IL-6$ из дендритных клеток, по сравнению с диким типом, ассоциировано с локальным дефицитом $IL-6$ в пораженных тканях

Примечание. А – гистологические срезы уха CD11c $IL-6$ КО мышей и мышей дикого типа (WT) на 11-й день в модели АКД. Черными стрелками отмечены области инфильтрации иммунных клеток, белыми – корка из ороговевшей ткани. Масштабная линейка – 100 мкм. Б – изменение экспрессии гена $IL6$ в ткани больного уха относительно здорового ($2^{\Delta\Delta CT}$) у мышей различных генотипов на 11-й день эксперимента. ΔCT для $IL6$ вычислялся относительно $Actb$. В – уровень $IL-6$ (пг/мл) в сыворотке мышей на 7-й день эксперимента. Для определения достоверности различий использовали тест Стьюдента, достоверной считали разницу при значениях $p < 0,05$ (*).

Figure 2. Severe course of ACD in CD11c $IL-6$ KO mice is associated with $IL-6$ deficiency in affected tissues

Note. A, histologic sections of the ear of CD11c $IL-6$ KO mice and wild-type (WT) mice at day 11 in the ACD model. Black arrows indicate areas of immune cell infiltration, white arrows indicate keratinized tissue crust. The scale bar is 100 μm . B, change of $IL6$ gene expression in the tissue of the diseased ear relative to the healthy ear ($2^{\Delta\Delta CT}$) in mice of different genotypes on day 11 of the experiment. ΔCT for $IL6$ was calculated relative to $Actb$. C, $IL-6$ level (pg/mL) in the serum of mice on day 7 of the experiment. Student's t-test was used to determine the reliability of differences; the difference was considered significant at p values < 0.05 (*).

У мышей дикого типа при индукции АКД возрастала экспрессия гена *IL6* в поврежденной ткани относительно здоровой (рис. 2Б). При этом у мышей с дендритноклеточным нокаутом IL-6 изменения экспрессии *IL6* в поврежденной ткани не происходило (рис. 2Б), из чего можно сделать вывод, что дендритные клетки являются критически важным источником IL-6 в коже в использованной модели АКД. Вместе с этим системный уровень IL-6 в сыворотке крови на пике заболевания не отличался между группами (рис. 2В). Таким образом, можно предположить, что недостаток именно локальной продукции IL-6 дендритными клетками в воспаленной коже приводит к более тяжелому течению АКД у мышей.

Дефицит IL-6 из дендритных клеток приводит к снижению системной нейтрофилии

В ходе работы мы оценивали системные эффекты отсутствия продукции IL-6 дендритными клетками в контексте оксазолон-опосредован-

ного дерматита, а именно содержание популяций гранулоцитов — важнейших эффекторных иммунных клеток в этой модели, в крови и селезенке мышей различных генотипов. Между генотипами не было обнаружено различия в доле эозинофилов ($CD45^+CD11b^{dim}SiglecF^+$) и нейтрофилов ($CD45^+CD11b^+Ly6G^{hi}$) крови (рис. 3А, Б), а также эозинофилов в селезенке (рис. 3В) на фоне индукции дерматита. С другой стороны, оказалось, что у мышей с дефицитом IL-6 из дендритных клеток наблюдается снижение содержания нейтрофилов в селезенке по сравнению с диким типом в модели АКД (рис. 3Г). Интересно, что при этом содержание других основных популяций селезенки — Т- и В-лимфоцитов не отличалось между генотипами (данные не представлены). Можно предположить, что пониженное содержание нейтрофилов в селезенке свидетельствует о перераспределении данной популяции в организме и, вероятно, привлечении их в очаг

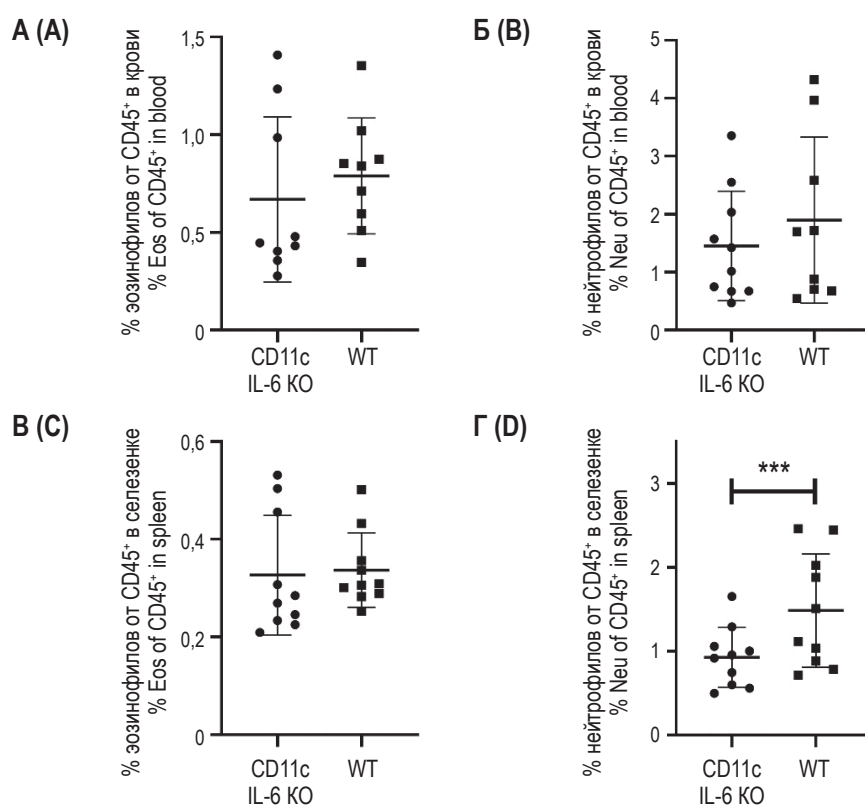


Рисунок 3. Снижение доли нейтрофилов в селезенке у мышей с нокаутом IL-6 в дендритных клетках ассоциировано с более тяжелым протеканием АКД

Примечание. Процентное содержание эозинофилов (А) и нейтрофилов (Б) от $CD45^+$ лейкоцитов крови. Процентное содержание эозинофилов (В) и нейтрофилов (Г) от $CD45^+$ лейкоцитов селезенки. Для определения достоверности различий использовали тест Стьюдента, $p < 0,001$ (***).

Figure 3. Reduced proportion of neutrophils in the spleen in mice with IL-6 knockout in dendritic cells is associated with a more severe course of ACD

Note. Percentage of eosinophils (A) and neutrophils (B) from $CD45^+$ blood leukocytes. Percentage of eosinophils (C) and neutrophils (D) from $CD45^+$ spleen leukocytes. Student's t-test was used to determine the reliability of differences, $p < 0.001$ (***).

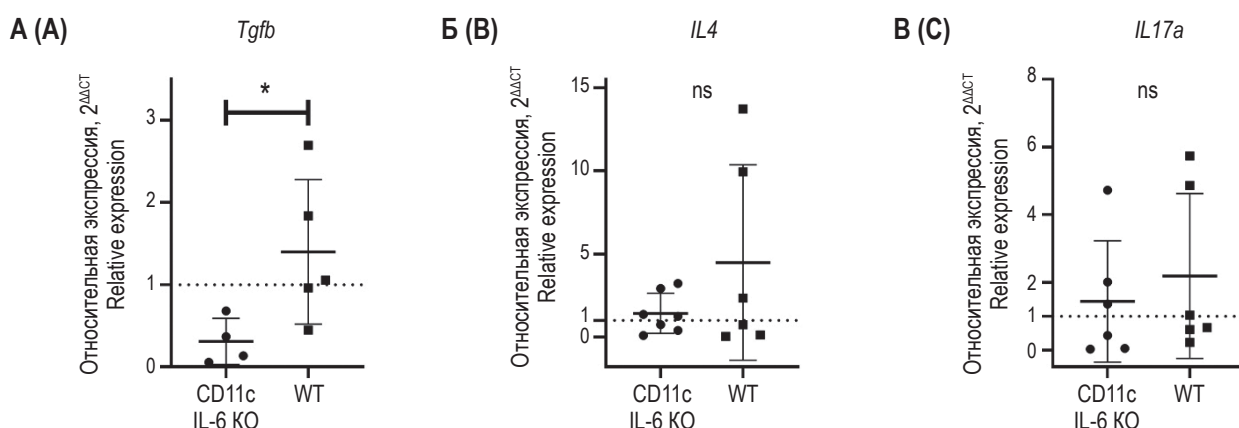


Рисунок 4. У мышей с дефицитом IL-6 из дендритных клеток снижена экспрессия *Tgfb* в поврежденных тканях уха в модели АКД

Примечание. Изменение экспрессии генов, ассоциированных с основными ветвями иммунного ответа: *Tgfb* (А), *IL4* (Б) и *IL17a* (В) – в ткани больного уха относительно здорового (2^{-ΔΔCT}) у мышей различных генотипов на 11-й день эксперимента. ΔСТ вычислялся относительно *Actb*. Для определения достоверности различий использовали тест Стьюдента, достоверной считали разницу при значениях $p < 0,05$ (*).

Figure 4. CD11c-IL-6 KO mice have reduced expression of *Tgfb* in damaged ear tissues in the ACD model

Note. Changes in the expression of genes associated with major branches of the immune response: *Tgfb* (A), *IL4* (B) and *IL17a* (C) – in diseased ear tissue relative to healthy ear tissue (2^{-ΔΔCT}) in mice of different genotypes on day 11 of the experiment. ΔСТ was calculated relative to *Actb*. Student's T-test was used to determine the reliability of differences; the difference was considered significant when p values were < 0.05 (*).

воспаления в ухе, что могло бы коррелировать с более тяжелым течением заболевания у CD11c-IL-6 KO мышей.

Дефицит IL-6 из дендритных клеток приводит снижению экспрессии TGF-β в поврежденной ткани в модели АКД

Для того чтобы оценить особенности иммунного ответа в ткани, пораженной дерматитом, у мышей разных генотипов был определен уровень экспрессии генов цитокинов *IL4* и *IL17a*, а также противовоспалительного гена *Tgfb*. Было установлено, что у мышей дикого типа наблюдается повышение относительной экспрессии *Tgfb* по сравнению с мышами с дефицитом IL-6 из ДК (рис. 4А). TGF-β обладает регуляторной ролью, ингибируя активность эффекторных клеток, в том числе и в моделях гиперчувствительности замедленного типа [22]. Можно предположить, что у мышей с дефицитом IL-6 в дендритных клетках нарушены процессы торможения иммунного ответа и заживления, что и является причиной более сильных симптомов АКД.

Обсуждение

Представленные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что тяжесть развиваемых симптомов в модели гаптен-индуцированного АКД обусловлена клеточным истоником IL-6. Так, у мышей с дефицитом IL-6 в дендритных клетках индукция оксазолон-зависимой контактной гиперчувствительности приводит

к развитию более сильного заболевания, чем у мышей дикого типа (рис. 1Б, В). Полученные результаты свидетельствуют о защитной роли этого цитокина, производимого дендритными клетками, в контексте воспаления кожи. Вместе с этим генетическая делеция цитокина во всех клетках организма, напротив, снижает симптомы заболевания, что ранее было показано в литературе [9] и воспроизведено в нашей лаборатории (данные не приведены).

При генетической инактивации IL-6 только в ДК, уровень экспрессии IL-6 в коже значимо снижается (рис. 2Б), что согласуется с данными о том, что эта популяция является одним из основных источников IL-6 при воспалении кожи [18]. Толщина мочки уха у мышей CD11c-IL-6 KO больше по сравнению с диким типом (рис. 1В) на основании данных о пониженной плотности ткани больного уха у CD11c-IL-6 KO мышей (данные не приведены), а также гистологических наблюдений, можно предположить, что барьерная функция кожи у данных мышей нарушена сильнее (рис. 2А).

Интересно, что у мышей с дефицитом IL-6 из дендритных клеток наблюдалось уменьшение процентного содержания нейтрофилов селезенки (рис. 3Г), что может свидетельствовать о перераспределении пула нейтрофилов в очаг воспаления – ухо. Действительно, в разных моделях контактного дерматита у мышей была показана значимая миграция нейтрофилов в ткань уха при

индукции заболевания, которая сопровождалась также снижением содержания нейтрофилов системно [23], кроме того, было показано, что нейтрофилы вносят значимый вклад в повреждение тканей, обусловленное миелопероксидазой [20]. С другой стороны, IL-6 важен для привлечения нейтрофилов [15], в том числе посредством участия в поляризации Th17-клеток [4]. Таким образом, наблюдение, сделанное в настоящей работе (рис. 3), не дает однозначного объяснения роли системного снижения доли нейтрофилов в развитии более тяжелого фенотипа у CD11c-IL-6 KO мышей в АКД.

Ранее было установлено, что IL-6, совместно с TGF- β , обеспечивает дифференцировку наивных Т-клеток в продуцирующих IL-17 CD4⁺ и CD8⁺Т-клетки [13, 17]. Кроме того, уровень экзогенного TGF- β влияет на пластичность Th17-клеток и их способность дифференцироваться в Treg популяции [22, 25]. Так как у CD11c-IL-6 KO мышей снижен уровень экспрессии TGF- β по сравнению с диким типом на фоне воспаления, можно предположить, что баланс локальных популяций Th17/Treg также изменен, несмотря на то, что статистически значимых отличий по экспрессии IL-17 выявлено не было (рис. 4B). Вместе с этим усиление симптомов АКД у мышей

данного генотипа указывает на то, что именно дендритные клетки при помощи IL-6 могут выполнять протективные и регуляторные функции. Мы полагаем, что реализация этих функций может быть опосредована активностью TGF- β , экспрессия которого у мышей с тканеспецифичным нокаутом достоверно снижена (рис. 4A).

В результате настоящей работы было показано, что у мышей с дефицитом IL-6 в дендритных клетках индукция оксазолон-зависимой контактной чувствительности приводит к развитию более сильного заболевания, чем у мышей дикого типа. Вероятно, дендритные клетки при помощи IL-6 могут выполнять протективные и регуляторные функции в АКД.

Благодарности

Эксперименты на мышах частично проводились на базе Автономного экспериментально-биологического комплекса для временного размещения и исследования генетически модифицированных линий лабораторных мышей категории SPF Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИМБ РАН (в рамках соглашения № 075-15-2019-1660 с Министерством науки и высшего образования Российской Федерации).

Список литературы / References

1. Круглов А.А., Носенко М.А., Корнеев К.В., Свириева Е.Н., Друцкая М.С., Идальго Х., Недоспасов С.А. Получение и предварительная характеристика мышей с генетическим дефицитом IL-6 в дендритных клетках // Иммунология, 2016. Т. 37, № 6. С. 316-319. [Kruglov A.A., Nosenko M.A., Korneev K.V., Sviriaeva E.N., Drutskaya M.S., Hidalgo J., Nedospasov S.A. Generation and preliminary characterization of mice with genetic deficiency of IL-6 in dendritic cells. *Immunologiya = Immunology*, 2016, Vol. 37, no. 6, pp. 316-319. (In Russ.)]
2. Clausen B.E., Stoitzner P. Functional specialization of skin dendritic cell subsets in regulating t cell responses. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 534. doi: 10.3389/fimmu.2015.00534.
3. Dong H., Feng C., Cai X., Hao Y., Gu X., Cai L., Wu S., Chen J., Liu Z., Xie W., Lu X., Qian H., Liu Y., Cao Y., Zhu J., Xu J., Zhou Y., Ma S., Yang S., Shi Y., Yu H., Shi M., Wang Y., Gu H.F., Fan L., Wu L. 7-Methoxyisoflavone ameliorates atopic dermatitis symptoms by regulating multiple signaling pathways and reducing chemokine production. *Sci. Rep.*, 2022, Vol. 12, no. 1, 8760. doi: 10.1038/s41598-022-12695-3.
4. Fan X., Shu P., Wang Y., Ji N., Zhang D. Interactions between neutrophils and T-helper 17 cells. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1279837. doi: 10.3389/fimmu.2023.1279837.
5. Frempah B., Luckett-Chastain L.R., Calhoun K.N., Gallucci R.M. Keratinocyte-specific deletion of the IL-6R α exacerbates the inflammatory response during irritant contact dermatitis. *Toxicology*, 2019, Vol. 423, pp. 123-131.
6. Grabbe S., Steinert M., Mahnke K., Schwartz A., Luger T.A., Schwarz T. Dissection of antigenic and irritative effects of epicutaneously applied haptens in mice. Evidence that not the antigenic component but nonspecific proinflammatory effects of haptens determine the concentration-dependent elicitation of allergic contact dermatitis. *J. Clin. Invest.*, 1996, Vol. 98, no. 5, pp 1158-1164.
7. Heink S., Yorgev N., Garbers C., Herwerth M., Aly L., Gasperi C., Husterer V., Croxford A.L., Moller-Hackbarth K., Bartsch H.S., Sotlar K., Krebs S., Regen T., Blum H., Hemmer B., Misgeld T., Wunderlich T.F., Hidalgo J., Oukka M., Rose-John S., Schmidt-Supprian M., Waisman A., Korn T. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic T(H)17 cells. *Nat. Immunol.*, 2017, Vol. 18, no. 1, pp 74-85.
8. Honda T., Egawa G., Grabbe S., Kabashima K. Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, 2013, Vol. 133, no. 2, pp. 303-315.
9. Hope J.C., Campbell F., Hopkins S.J. Deficiency of IL-2 or IL-6 reduces lymphocyte proliferation, but only IL-6 deficiency decreases the contact hypersensitivity response. *Eur. J. Immunol.*, 2000, Vol. 30, no. 1, pp 197-203.

10. Kaplan D.H., Igyarto B.Z., Gaspari A.A. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 2, pp. 114-124.
11. Kimber I., Basketter D.A., Gerberick G.F., Dearman R.J. Allergic contact dermatitis. *Int. Immunopharmacol.*, 2002, Vol. 2, no. 2-3, pp. 201-211.
12. Lee E.G., Mickle-Kawar B.M., Gallucci R.M. IL-6 deficiency exacerbates skin inflammation in a murine model of irritant dermatitis. *J. Immunotoxicol.*, 2013, Vol. 10, no. 2, pp. 192-200.
13. Lin Y.L., Chen S.H., Wang J.Y. Critical role of IL-6 in dendritic cell-induced allergic inflammation of asthma. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 2016, Vol. 94, no. 1, pp. 51-59.
14. Martin S.F., Dudda J.C., Bachtanian E., Lembo A., Liller S., Durr C., Heimesaat M.M., Bereswill S., Fejer G., Vassileva R., Jakob T., Freudenberg N., Termeer C.C., Johnner C., Galanos C., Freudenberg M.A. Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, no. 9, pp. 2151-2162.
15. McLoughlin R.M., Hurst S.M., Nowell M.A., Harris D.A., Horiuchi S., Morgan L.W., Wilkinson T.S., Yamamoto N., Topley N., Jones S.A. Differential regulation of neutrophil-activating chemokines by IL-6 and its soluble receptor isoforms. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, no. 9, pp. 5676-5683.
16. McMin P.C., Halliday G.M., Muller H.K. Effects of gliotoxin on Langerhans' cell function: contact hypersensitivity responses and skin graft survival. *Immunology*, 1990, Vol. 71, no. 1, pp. 46-51.
17. Nurieva R., Yang X.O., Chung Y., Dong C. Cutting edge: in vitro generated Th17 cells maintain their cytokine expression program in normal but not lymphopenic hosts. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 5, pp. 2565-2568.
18. Paquet P., Pierard G.E. Interleukin-6 and the skin. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1996, Vol. 109, no. 4, pp. 308-317.
19. Peng G., Mu Z., Cui L., Liu P., Wang Y., Wu W., Han X. Anti-IL-33 antibody has a therapeutic effect in an atopic dermatitis murine model induced by 2, 4-dinitrochlorobenzene. *Inflammation*, 2018, Vol. 41, no. 1, pp. 154-163.
20. Strzepa A., Gurski C.J., Dittel L.J., Szczepanik M., Pritchard K.A. Jr., Dittel B.N. Neutrophil-derived myeloperoxidase facilitates both the induction and elicitation phases of contact hypersensitivity. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, pp. 608871. doi: 10.3389/fimmu.2020.608871.
21. Tan C.H., Rasool S., Johnston G. A. Contact dermatitis: allergic and irritant. *Clin. Dermatol.*, 2014, Vol. 32, no. 1, pp. 116-124.
22. Wang J., Zhao X., Wan Y.Y. Intricacies of TGF-beta signaling in Treg and Th17 cell biology. *Cell. Mol. Immunol.*, 2023, Vol. 20, no. 9, pp. 1002-1022.
23. Weber F.C., Nemeth T., Csepregi J.Z., Dudeck A., Roers A., Ozsvari B., Oswald E., Puskas L.G., Jakob T., Mocsai A., Martin S.F. Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.*, 2015, Vol. 212, no. 1, pp. 15-22.
24. Xiao C., Zhu Z., Zhang C., Gao J., Luo Y., Fang H., Qiao H., Li W., Wang G., Fu M. A population of dermal Langerin(+) dendritic cells promote the inflammation in mouse model of atopic dermatitis. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 981819. doi: 10.3389/fimmu.2022.981819.
25. Xu L., Kitani A., Fuss I., Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 11, pp. 6725-6729.

Авторы:

Горшкова Е.А. — к.б.н., научный сотрудник лабораторных механизмов иммунитета; младший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Медведовская А.Д. — лаборант лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Губернаторова Е.О. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов иммунитета; научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Gorshkova E.A., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity; Junior Researcher, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Medvedovskaya A.D., Laboratory Assistant, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Gubernatorova E.O., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity; Researcher, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Поступила 28.12.2024
Отправлена на доработку 10.01.2025
Принята к печати 23.03.2025

Received 28.12.2024
Revision received 10.01.2025
Accepted 23.03.2025