

На правах рукописи

Нелюбин Евгений Викторович

**ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ И АПОПТОТИЧЕСКАЯ
РЕАКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ
ПСОРИАЗЕ**

14.00.36 – аллергология и иммунология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Екатеринбург – 2007

Работа выполнена в лаборатории иммунофармакологии и иммунотоксикологии Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор Сибиряк С.В.

Официальные оппоненты:

Засл. деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор Теплова С.Н.,
Доктор медицинских наук, профессор Азнабаева Л.Ф.

Ведущая организация: ГНЦ “Институт иммунологии” Росздравсоцразвития

Защита диссертации состоится “___” ноября 2007 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 004.027.01 при Институте иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук по адресу: 620041, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, д. 106.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН по (620219, г. Екатеринбург, ул. С.Ковалевской-Академическая, 22/20), с авторефератом – на сайте Института иммунологии и физиологии УрО РАН – <http://www.iip.uran.ru>

Автореферат разослан “___” _____ 2007 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
д.м.н., проф.

И.А.Тузанкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Иммунопатогенезу псориаза посвящено множество отечественных и зарубежных исследований. Это неудивительно, поскольку это заболевание, описанное впервые более 2000 лет тому назад в *Corpus Hippocraticum* (460–377 г. до н.э.), в настоящее время является самым распространенным хроническим дерматозом – псориазом страдают 2 – 3 % населения земного шара, а существующие методы терапии не всегда приводят к желаемому эффекту. Развитие псориаза сопровождается не только поражением кожи, но и артритом, очень сходным по проявлениям с серонегативным ревматоидным артритом (10 – 30% больных), поражением других внутренних органов. [Bhalerao, Bowcock, 1998; Gladman, 2005; Mease, 2005]. Не случайно многие авторы считают более правильным характеризовать этот дерматоз, как псориагическую болезнь [Довжанский, 1992; Кунгуров и соавт., 2002]. По мнению Krueger [2001], псориаз, как фактор снижения качества жизни и медико-социальная проблема, разделяет первое место с психическими заболеваниями (депрессией), сердечно-сосудистыми заболеваниями и диабетом.

Поскольку гистопатологической основой псориагической бляшки являются незлокачественная гиперпролиферация эпидермальных кератиноцитов, сопутствующая гиперплазия и дилатация поверхностных сосудов кожи, воспалительная реакция, – псориаз долгое время рассматривали исключительно как патологию кожи. Сопутствующие иммунологические изменения считались вторичными. Сегодня точка зрения меняется и Th1-зависимому аутоиммунному процессу (пусковыми факторами которого являются неизвестный аутоантиген, генетические и средовые факторы), отводят ключевую роль в патогенезе псориаза [Nickoloff, Nestle, 2004; Krueger, Bowcock, 2005; Veale et al., 2005]. Подтверждением аутоиммунного генеза псориаза является высокая эффективность препаратов, ингибирующих функции Т клеток, кооперацию Т клеток и антигенпрезентирующих дендритных клеток [Papp, 2004; Winterfield et al., 2005]. Несмотря на интенсивные

исследования, сведения о выявляемых нарушениях иммунного статуса у больных псориазом, взаимосвязи их с клиническими особенностями заболевания, патогенетической значимости тех или иных изменений, чрезвычайно противоречивы. Немногочисленны сведения о структуре субпопуляций CD4⁺ Т лимфоцитов хелперов при псориазе, в том числе и об активно изучаемых в последние годы CD4⁺CD25^{Bright} естественных регуляторных клетках. Одним из подходов к характеристике “спектра” иммунологических нарушений может быть использование “автоматической” классификации с помощью методологии кластерного анализа [Жамбю, 1988; Sibiryak et al., 1999; Курчатова, 1999].

Программированная смерть клеток путем апоптоза играет важнейшую роль в регуляции гомеостаза – контроле над пролиферацией, дифференцировкой, удалением невостребованных клеток и пр. [Schwartzman, Cidlowski, 1993]. С одной стороны, многочисленные исследования свидетельствуют о нарушении механизмов апоптоза кератиноцитов при псориазе [Казанцева, 2000; Новиков и соавт., 2003; Суханова, 2003; Охлопков, 2004; Wrone - Smith et al., 1995; Krueger et al., 1995; Gutierrez-Steil et al., 1998; Nickoloff, Nestle, 2004 и др.]. С другой стороны, апоптоз лимфоцитов является ключевым механизмом иммунорегуляции и поддержания “периферической толерантности” [Ярилин, 1996; Чередеев, Ковальчук, 1997; Ковальчук, Чередеев, 1999; Барышников, Шишкин, 2002; Сибиряк, 2003; Cheredeev, Kovalchuk, 1997; Sharma et al., 1999; Krammer, 2000]. Убедительно аргументировано, что нарушение апоптотической реактивности лимфоцитов (механизмов Fas-зависимого апоптоза, взаимодействия Fas/FasL, дефекты ингибиторных белков семейства bcl - 2, c-FLIP и др.) является важнейшим звеном патогенеза многих аутоиммунных заболеваний (СКВ, рассеянного склероза, ревматоидного артрита и т. д.) [Straus et al., 1999; Krammer, 2000; Sharma et al., 2000]. Нарушение механизмов апоптоза лимфоцитов при псориазе представляется наименее изученным. В большинстве исследований, посвященных этой проблеме, лишь констатируется факт увеличения или снижения экспрессии Fas рецептора (CD95) на лимфоцитах периферической крови, что, безусловно, не является отражением и характеристикой

механизмов апоптотической регуляции. Выяснение механизмов нарушений апоптоза лимфоцитов при псориазе позволит не только углубить понимание патогенеза этого дерматоза, но и позволит наметить новые пути и подходы к иммунокорректирующей терапии. Все это в совокупности и определило цель настоящего исследования.

Цель исследования:

Выявить типовые нарушения субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови и цитокинового профиля, отражающие характер иммуновоспалительного процесса при прогрессирующем псориазе, и дать оценку апоптотической реактивности лимфоцитов периферической крови.

Задачи исследования:

1. Изучить структуру основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови в прогрессирующей стадии вульгарного псориаза и субпопуляционную структуру CD4⁺ Т лимфоцитов хелперов (экспрессию CD25, CD95, CD45RO) при прогрессирующем псориазе.

2. Оценить содержание естественных Т регуляторных клеток (CD4⁺CD25^{Bright}) в периферической крови больных прогрессирующим псориазом.

3. Изучить сывороточный уровень провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-6, IL-2, IFN γ , IL-4) и цитокинов Т хелперных клонов (IL-2, IFN γ , IL-4) у больных с прогрессирующим псориазом.

4. Дать характеристику типам иммунологических нарушений (нарушений субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови, цитокинового статуса) при прогрессирующем псориазе с использованием методов многомерной статистической обработки (кластерного анализа).

5. Изучить интенсивность спонтанного и индуцированного внутри- и внеклеточными сигналами апоптоза лимфоцитов периферической крови при прогрессирующем псориазе.

6. Оценить апоптотическую реактивность лимфоцитов периферической крови при прогрессирующем псориазе: определить уровень растворимого Fas рецептора

(sFas), спонтанный и индуцированный апоптоз лимфоцитов, интенсивность активационно-индуцированной экспрессии CD95 и активационного апоптоза при псориазе.

Научная новизна:

Впервые проведено детальное изучение субпопуляционной структуры Т хелперов у пациентов с прогрессирующим вульгарным псориазом и осуществлен анализ содержания естественных регуляторных Т клеток (Treg) при псориазе в сравнении с условно-здоровыми донорами. Установлено сниженное содержание CD4+CD25^{Bright} Treg, резкое снижение их доли среди всех CD4+ Т хелперов, экспрессирующих α -цепь рецептора к IL-2, у пациентов в прогрессирующей стадии вульгарного псориаза. Подтверждено нарушение цитокинового статуса у больных псориазом; выявлен характер изменения уровня сывороточных цитокинов (TNF α , IL-6, IL-2, IFN γ , IL-4).

Методом кластерного анализа и построения “иерархического древа” выявлены 3 типа нарушений субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови и цитокинового статуса у больных с прогрессирующей стадией вульгарного псориаза, которые отражают особенности иммуновоспалительного процесса.

Впервые установлено, что лимфоциты пациентов в прогрессирующей стадии псориаза характеризуются низкой чувствительностью к апоптозу, индуцированному свободно-радикальным стрессом, что отражает нарушение реактивности систем внутриклеточного сигналинга. Выявлено, что у пациентов с псориазом наблюдается повышение уровня продукта альтернативного сплайсинга mRNA Fas рецептора – растворимой формы Fas-рецептора (sFas). Впервые показано, что у больных псориазом снижена интенсивность Fas-зависимого апоптоза активированных лимфоцитов.

Научно-практическая значимость работы:

Полученные данные расширяют представления о патогенезе псориазической болезни и роли нарушений апоптоза лимфоцитов в механизмах формирования аутоиммунных заболеваний в целом. Разработан методологический подход к оценке

апоптотической реактивности лимфоцитов при анализе иммунного статуса пациентов с иммуно-опосредованными заболеваниями. Результаты работы свидетельствуют, что псориаз можно рассматривать как патологию апоптоза и дефект регуляторных Т клеток, что позволит наметить новые пути и подходы к иммунокорректирующей терапии.

Внедрение результатов исследования:

Материалы диссертационной работы внедрены в учебный процесс при чтении лекций и проведении практических занятий на кафедре иммунологии и аллергологии Челябинской Государственной медицинской академии, кафедре клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии Самарского Государственного медицинского университета. Разработанные автором методические подходы к анализу апоптотической реактивности лимфоцитов при аутоиммунных заболеваниях используются в работе иммунологической лаборатории клиники “Familia”(г. Челябинск).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При прогрессирующем псориазе выявляются нарушения структуры основных субпопуляций лимфоцитов, структуры субпопуляций Т хелперов (CD4+CD25+, CD4+CD95+, CD4+CD45RO+ лимфоцитов), изменение содержания провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-6) и цитокинов Т хелперных клонов (IL-2, IL-4, IFN γ) в сыворотке, которые с помощью метода агломеративного кластерного анализа (построение дендрограммы) могут быть классифицированы на три типа. Выявленные нарушения иммунного статуса отражают особенности развития иммуновоспалительного процесса.

2. Прогрессирующая стадия псориаза, вне зависимости от характера и особенностей иммунологических нарушений, сопровождается падением содержания естественных CD4+CD25^{Bright} регуляторных Т лимфоцитов в периферической крови, снижением их доли среди всех клеток, экспрессирующих α -цепь рецептора IL-2 (CD4+CD25^{total}), что позволяет считать “Т регуляторный дефицит” важным звеном патогенеза псориаза.

3. Совокупность полученных данных – выявленное снижение чувствительности лимфоцитов к апоптогенным сигналам, увеличение уровня растворимого Fas рецептора, уменьшение интенсивности Fas-зависимого апоптоза при активации лимфоцитов у пациентов с прогрессирующим псориазом, позволяет рассматривать патогенез псориаза, в числе прочего, с позиций “патологии апоптоза лимфоцитов”, что объединяет его с другими аутоиммунными заболеваниями.

Апробация работы:

Основные результаты работы доложены на научных конференциях: Международном конгрессе “Иммунитет и болезни: от теории к практике” (г. Москва, 2005), IV-м съезде иммунологов Урала (г. Уфа, 2005), V-м съезде иммунологов Урала (г. Оренбург, 2006), Российской научно-практической конференции “Современные технологии в иммунологии: иммунодиагностика и иммунотерапия” (Курск, 2006), Всероссийском научном Форуме “Дни иммунологии в Санкт-Петербурге” (С.-Пб., 2006), Всероссийской научной конференции, посвященной памяти Н.Н. Кеворкова (Пермь, 2006).

Публикации:

По материалам диссертационной работы опубликовано 6 работ.

Объем и структура диссертации:

Диссертация изложена на 125 страницах, иллюстрирована 4 таблицами и 22 рисунками. Она состоит из введения, обзора литературы, раздела, отражающего результаты собственных исследований и их обсуждения, выводов. Список литературы включает 285 источников (64 отечественных и 221 зарубежный).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Иммунологическое исследование проведено у 42 больных псориазом и 38 условно-здоровых доноров. Все обследуемые были поставлены в известность о проводимом исследовании и дали согласие на участие в нем.

Группа условно-здоровых доноров добровольцев (контрольная группа), работников ГУЗ “Всероссийский центр глазной и пластической хирургии” МЗ ,

состояла из 60% мужчин и 40% женщин, средний возраст ($M \pm m$) 40.1 ± 1.8 года. Группа включала лиц, которые на момент обследования не страдали острыми инфекционными заболеваниями, и у которых, судя по анамнестическим данным, не выявлялись инфекционный, аутоиммунный и лимфопролиферативный синдромы. У 14% лиц из этой группы отмечали в анамнезе аллергические реакции на пищевые продукты и лекарства.

Группа больных прогрессирующим вульгарным псориазом состояла из 70% мужчин и 30% женщин, средний возраст 41.2 ± 2.3 года, поступивших на лечение в Башкирский Республиканский кожно-венерологический диспансер (главный врач – Латыпов Б.Г.), и пациентов, обратившихся за медицинской помощью в ООО “Косметологическая лечебница” (главный врач – канд. мед. наук Капулер В.М.). Клиническое обследование пациентов и верификация диагноза осуществлялись канд. мед. наук Капулер О.М. При составлении регистрационной карты пациентов, включенных в исследование, учитывались суммарная продолжительность заболевания, продолжительность прогрессирующей фазы, наличие или отсутствие артропатии, тяжесть псориатического процесса (величина PASI), распространенность поражения кожи (по классификации [Национального фонда псориаза США](#)). Из исследования исключались пациенты с эритродермией, а также сочетанной патологией (атопический дерматит). Иммунологическое обследование пациентов осуществляли до начала проведения терапии в течение 1 – 3 дней после поступления в стационар.

Кровь для иммунологического обследования получали путем пункции локтевой вены в строго стерильных условиях. Взятие крови осуществляли в утренние часы (8 – 9 часов) строго натощак. Для получения сыворотки 5 мл крови помещали в пробирку VACUTAINER для получения (BD). Для иммунофенотипирования 5 мл крови помещали в пробирку VACUTAINER, содержащую динатриевую соль ЭДТА (BD). Для оценки функциональной активности лимфоцитов и апоптоза 5 мл крови помещали в пробирку, содержащую литиевую соль гепарина (BD).

Для выделения мононуклеаров использован стандартный метод градиентного центрифугирования с последующей отмывкой клеток фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7.2) и средой RPMI-1640. Концентрация клеток во всех проведенных исследованиях составляла $1 - 2 \times 10^6$ клеток/мл, жизнеспособность более 95%, примесь гранулоцитов не более 4%.

Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов осуществляли стандартным методом прямого двухпараметрического иммунофлюоресцентного окрашивания цельной крови с использованием коммерческих лизирующих/фиксирующих (CellLyse, BD) и промывающих растворов (CellWash, BD) и панели моноклональных антител (IOtest, Beckman Coulter), - антиCD45-FITC, IgG1/антиCD14-PE, IgG2a, антиCD3-FITC, IgG1 /антиCD19-PE, IgG1, антиCD3-FITC, IgG1 /антиCD4-PE, IgG1, антиCD3-FITC, IgG1 /антиCD8-PE, IgG1, антиCD3-FITC, IgG1 /антиCD16, IgG1+CD56-PE, IgG1 и антиCD4-FITC, IgG2a, антиCD95-PE, IgG1, антиCD25-PE, IgG1, антиCD45RO-PE, IgG2a (Caltag Labs). Контрольные пробы инкубировали с FITC-мечеными или PE-мечеными иммуноглобулинами соответствующего изотипа – мышинные IgG2a – FITC (Caltag Labs), мышинные IgG1-PE (Caltag Labs), мышинные IgG1-FITC/IgG1-PE (IOtest, Beckman Coulter). Цитофлюорометрию осуществляли на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (BD), при этом регистрировали суммарно не менее 10.000 событий. Данные анализировали в рамках программного обеспечения CellQuest (BD).

Анализ содержания естественных регуляторных Т лимфоцитов (Treg) осуществлялся в рамках программы CellQuest (исследование выполнено совместно с научным сотрудником Института иммунологии и физиологии УрО РАН, канд. мед. наук, Сибиряк Д.С.). В качестве “стратегии” логического ограничения региона $CD4+CD25^{Bright}$ клеток среди всей популяции $CD25+$ лимфоцитов ($CD4+CD25^{total}$) использован принцип, предложенный Vaecher-Allan и соавторами [2001].

Идентификацию апоптоза осуществляли с помощью окрашивания ФИТЦ-меченым аннексином V (AnnV) (Caltag Lbs.) и йодистым пропидием (Applechem) по

методу Коорман и соавторов [1994]. Данные анализировали в рамках программного обеспечения CellQuest (BD).

Параллельную оценку апоптоза, экспрессии Fas-рецептора и митогенеза осуществляли в 24-часовых культурах мононуклеаров. В качестве конечной среды культивирования использовалась HEPES-модифицированная среда RPMI-1640 (Sigma, R-4130) с добавлением 5% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, F-7524) и 50 мкг/мл гентамицина сульфата (Sigma). Клетки инкубировали в планшетах для культивирования клеток (Costar) 24-часа в CO₂-инкубаторе (Juan) в атмосфере содержащей 5% CO₂ 24-часа при 37.0 ± 0.5⁰С. Раствор митогена (ФГА-Р, 10 мкг/мл, Difco) добавляли в культуральную среду в объеме 20 мкл. Через 24 часа оценивалась структура клеточного цикла методом метахроматического окрашивания акридиновым оранжевым [Сибиряк с соавторами, 2004г; Darzynkiewicz, 1994]. Часть клеточной взвеси отмывали раствором CellWash с добавлением 2% бычьего сывороточного альбумина (Sigma) и затем ресуспендировали в 200 мкл этого же раствора. Клетки окрашивали PE-мечеными МКА против человеческого CD95 (антиCD95-PE, IgG1, Caltag Lbs.) в течение 15 мин, однократно отмывали раствором CellWash, затем ресуспендировали в “связывающем” буфере, содержащем FITC-AnnV, и через 5 мин осуществляли цитофлюорометрию. Контролем служили клетки, инкубированные с изотипической мышинной сывороткой, и клетки, инкубированные с изотипической мышинной сывороткой и AnnV.

Оценку содержания сывороточного растворимого Fas-рецептора (sFas) проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием стандартной тест-системы human sAPO-1/Fas ELISA BMS245 (Bender MedSystems). Постановку метода осуществляли согласно рекомендациями фирмы - производителя.

Уровень цитокинов в сыворотке оценивали, используя коммерческие тест-системы для определения цитокинов: Human IL-2 ELISA Kit (BIOSOURCE), Human IFN γ ELISA Kit (BIOSOURCE), Human IL-4 ELISA Kit (BIOSOURCE), для

определения уровней IL-6 и TNF α применяли тест-системы производства ООО “Протеиновый контур” (С.Пб). Постановку метода осуществляли согласно рекомендациями фирмы - производителя. Результаты иммуноферментного анализа оценивали на планшетном фотометре MultiscanPlus (Labsystems).

Статистическая обработка результатов произведена в рамках программного обеспечения Statistica для Windows (версия 6.0). Различия считали статистически значимыми при $P < 0.05$, а при $P < 0.10$ различия рассматривались, как тенденция (Трахтенберг и соавт., 1994). При анализе данных первоначально осуществляли характеристику распределения. В процессе статистической обработки использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), а также непараметрические критерии значимости различий. В качестве метода кластерного анализа были использованы агломеративные методы (построение иерархической дендрограммы) и быстрый метод К-кластеризации, при этом все анализируемые признаки (дескрипторы) были предварительно стандартизированы в рамках опций программного обеспечения.

Результаты и их обсуждение

Структура основных субпопуляций лимфоцитов, субпопуляций CD4+ Т хелперов периферической крови, цитокиновый статус у больных прогрессирующим псориазом и кластерный анализ показателей иммунного статуса

На первом этапе исследования был осуществлен интегральный анализ показателей субпопуляционной структуры лимфоцитов и цитокинового статуса в группе больных псориазом и группе условно-здоровых доноров. Структура основных субпопуляций лимфоцитов в группе больных мало отличалась от таковой в контрольной группе и существенного влияния “фактора заболевания” на дисперсию показателей, характеризующих содержание CD3+ лимфоцитов, CD3+CD4+ Т лимфоцитов-хелперов, CD3+CD8+ Т лимфоцитов, CD19+ В лимфоцитов и NK-клеток, выявлено не было. Однако, существенно изменялась субпопуляционная структура CD4+ Т хелперов: 1) наблюдалась отчетливая тенденция к возрастанию содержания CD4+Т хелперов (+ 18%, $P = 0.052$), экспрессирующих α -цепь рецептора IL-2 (CD4+CD25^{Total}), значимо снижались

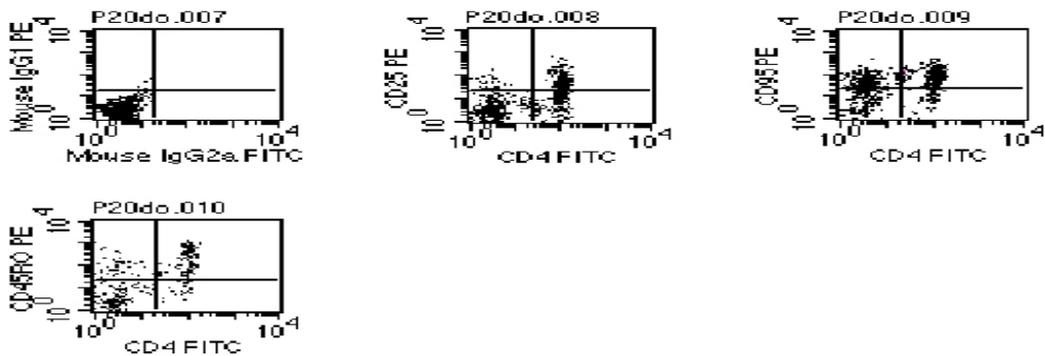
относительное (- 22%, $P = 0.0006$) и абсолютное (- 28%, $P = 0.004$) содержание популяции CD25-“негативных” CD4+ клеток (и соотношение между “негативными” и “позитивными” лимфоцитами); 2) увеличивалось содержание Т хелперов, экспрессирующих Fas рецептор (CD95) (+ 21%, $P=0.007$), снижалось относительное и абсолютное содержание CD4+CD95- лимфоцитов (- 31%, $P = 0.0001$ и - 28%, $P = 0.02$) и соотношение между “негативными” и “позитивными” лимфоцитами; 3) процентное содержание примированных Т хелперов (CD4+CD45RO+) значимо не изменялось, но снижалась доля CD4+CD45RO- лимфоцитов (- 34%, $P=0.007$), их абсолютное количество (- 43 %, $P=0.004$) и соотношение между CD45RO- “негативными” и CD45RO-“позитивными” CD4+ лимфоцитами ($P=0.005$). Все эти признаки отражали состояние активации Т звена иммунной системы, что, в целом, согласуется с результатами других авторов [Кунгуров и соавт., 2002, Mahmoud et al., 1999; Lecewicz-Torun et al., 2001; Sauder, 2004]. Типичные цитофлюорограммы, иллюстрирующие субпопуляционную структуру Т хелперов у здорового донора и пациента с псориазом, иллюстрирует рисунок 1.

Обнаруженный характер нарушений цитокинового статуса соответствовал “находкам” других исследователей [Маркушева и соавт., 1997; Кунгуров и соавт., 2002; Gomi et al., 1990; Castells-Rodellas et al., 1992; Elder et al., 1993; Jacob et al., 2003; Szegedi et al., 2003 Elias et al., 2004; Zalewska et al., 2004]. “Цитокиновый дисбаланс” выражался в статистически значимом нарастании содержания провоспалительных цитокинов (TNF α и IL-6) в сыворотке, отсутствии изменений уровней IL-2 и IL-4, но значимом увеличении уровня IFN γ .

В настоящее время значительно возрос интерес к естественным регуляторным Т лимфоцитам (Treg), характерным отличием которых является чрезвычайно высокая конститутивная экспрессия IL-2R (CD4+CD25^{bright}), в отличие от активированных Т лимфоцитов, которые характеризуются умеренной и слабой экспрессией этого рецептора (CD4+CD25^{low}) [Baecher-Allan et al., 2001]. Естественные Treg ингибируют активацию CD4+CD25- лимфоцитов, развитие аутоиммунных реакций и участвуют в обеспечении “периферической

толерантности” [Suri-Payer et al., 1998; Salomon et al., 2000; Ng et al., 2001; Baecher-Allan et al., 2001]. Идентификация $CD4+CD25^{Bright}$ T reg в периферической крови больных прогрессирующим псориазом выявила статистически значимое ($P_{LSD} < 0.002$) снижение этой популяции (рисунок 2). Соотношение между $CD4+CD25^{Bright}$ клетками и всей популяцией $CD25+$ T хелперов ($CD4+CD25^{total}$) снижалось почти в 3 раза ($P_{LSD} < 0.0001$), а “фактор заболевания” значимо определял дисперсию показателя содержания $CD4+CD25^{Bright}$ клеток (КВФ = 13,1 %, $F = 9.7$, $P = 0.003$) и их соотношение с общей популяцией клеток, экспрессирующих α -цепь IL2-R (КВФ = 21 %, $F = 17.73$, $P = 0.0001$).

Пациент П-кий, муж. 56 лет. Псориаз. Прогрессирующая стадия. Псориатическая артропатия. Продолжительность заболевания более 5 лет. PASI = 39.5



Донор Ш-ев, муж. 53 г.

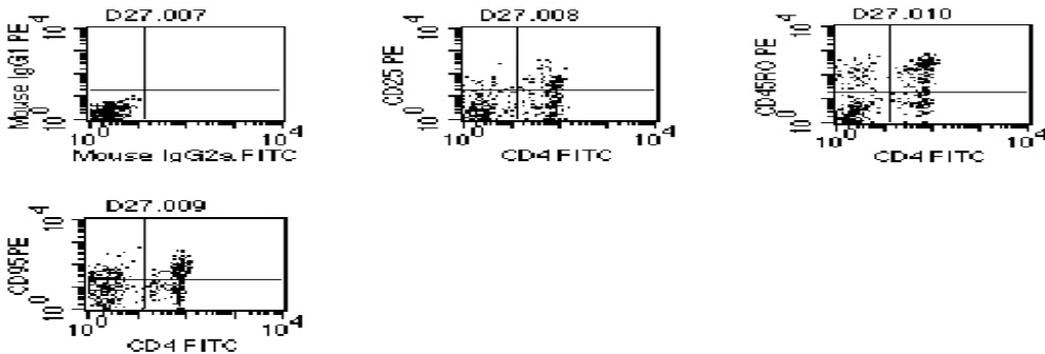


Рис.1. Цитофлюорограммы, иллюстрирующие субпопуляционную структуру T хелперов у больного псориазом и у здорового донора

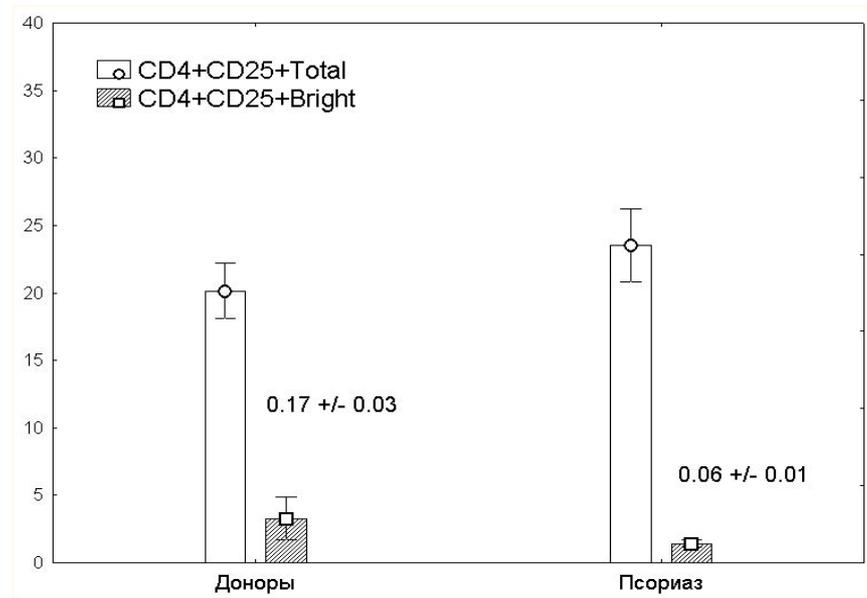


Рис.2. Содержание CD4+CD25^{total} (светлые столбики) и CD4+CD25^{Bright} (темные столбики) у здоровых доноров и пациентов с прогрессирующим псориазом. Цифрами указано соотношение CD4+CD25^{Bright} / CD4+CD25^{total}

Есть мнение, что, к примеру, при ревматоидном артрите падение содержания Treg в крови отражает компенсаторную реакцию, направленную на мобилизацию клеток - иммуносупрессоров в очаге воспаления [DeKleer et al., 2004; Van Amelsfort et al., 2004]. Не исключено, что аналогичные события происходят и при псориазе. Более того, есть сведения о снижении функциональной активности CD4+CD25^{Bright} Treg в дерме при псориазе в исследованиях Sugiyama и соавторов [2005].

Характер иммунологических нарушений при том, или ином заболевании зависит не только от клинических особенностей болезни, но и от индивидуальных особенностей реактивности иммунной системы, стадии развития иммунопатологического процесса, от адаптационных возможностей организма и пр. При многих патологических состояниях изменения субпопуляционной структуры, цитокинового профиля, других, традиционно оцениваемых показателей клинического иммунологического обследования, однотипны и не всегда укладываются в рамки существующих “клинических классификаций”, различна и информативность показателей [Ковальчук, Череев, 1990; Петров и соавт., 1994, 1995; Михайленко и соавт., 2005]. В этой связи более эффективным, и, нередко, более правомочным подходом к оценке иммунологических нарушений является

выявление типов нарушений иммунного статуса, классификации “объектов наблюдения” в “признаковом пространстве” по особенностям реагирования иммунной системы, общности характера “иммунологических проявлений” болезни с ретроспективным анализом клинических особенностей, свойственных тому, или иному типу. Этот подход предполагает использование процедуры кластерного анализа, обеспечивающего классификацию объектов в группы (кластеры) в признаковом пространстве [Жамбю, 1988; Черныш, 2000; Hartigan, 1975; Sibiryak et al., 1999].

Для выяснения типовых изменений субпопуляционной структуры и цитокинового статуса у больных прогрессирующим псориазом был использован метод агломеративного кластерного анализа и построения вертикальной иерархической дендрограммы. Массив дескрипторов включал показатели субпопуляционной структуры, значения уровней сывороточных цитокинов, данных гемограммы. Первоначально производили стандартизацию показателей для придания дескрипторам “одинакового веса”, мерой “расстояния” между объектами

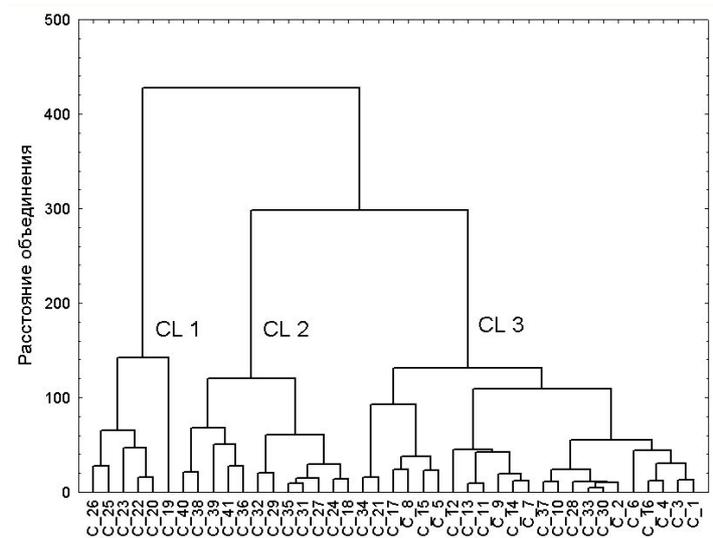


Рис.3. Иерархическое “древо”, полученное в результате кластерного анализа стандартизованных показателей субпопуляционной структуры и цитокинового статуса больных псориазом

взяты квадраты дистанций Евклида $(x,y) = \sum_i (x_i - y_i)^2$, а в качестве правила объединения объектов использовали метод Уорда [Ward, 1963]. Результаты кластерного анализа иллюстрирует **рисунок 3**. Отчетливо видно резкое возрастание евклидова расстояния при слиянии мелких кластеров, “обязывающее” рассмотреть

три крупных, отстоящих друг от друга в признаковом пространстве, группы объектов, которые были названы как кластер 1 (CL1), кластер 2 (CL2) и кластер 3 (CL3). Представительство кластера 1 (CL1) было минимальным – этот кластер описывал лишь 14% объектов; кластер 2 (CL2) описывал 29 % объектов наблюдения; представительство кластера 3 было максимальным, последний в процессе “разбиения” описывал 56 % анализируемых объектов. CL1 мог быть назван “воспалительным”.

В таблице 1 представлены средние значения показателей, характерные для каждого кластера (структура нуклоидов), и сравнение их с контрольной группой.

Для кластера CL1 ведущими были нарушения гемограммы– резкий лейкоцитоз с палочкоядерным “сдвигом влево”, абсолютный лимфоцитоз, обусловленный лейкоцитозом, и, как следствие, увеличение абсолютного содержания практически всех субпопуляций лимфоцитов. Соотношение $CD3+CD4+/CD3+CD8+$ лимфоциты статистически значимо изменяется в пользу $CD3+CD8+$ клеток. Изменения субпопуляционной структуры $CD4+$ Т хелперов были обусловлены, в первую очередь, выраженным лимфоцитозом, хотя имелась тенденция к снижению соотношения между $CD25$ и $CD95$ “негативными” и “позитивными” лимфоцитами. Содержание $CD4+CD25^{Bright}$ регуляторных Т лимфоцитов было снижено. Для этого кластера был характерен высокий уровень $TNF\alpha$ (статистически значимые отличия от доноров), в меньшей степени, повышение уровня $IL-6$, отсутствие статистически значимого возрастания содержания цитокинов Т хелперных клонов. Однако, судя по величине медиан, высокие значения уровней цитокинов встречались чаще, нежели у здоровых лиц, равно, как и явления дисбаланса между содержанием $IFN\gamma$ и $IL-4$, в сторону значимого преобладания последнего.

Тип нарушений иммунного статуса, характерный для CL2, был иной. Обращали на себя внимание отсутствие лейкоцитоза, выраженная абсолютная и тенденция к относительной $CD3+$ и $CD4+$ лимфоцитопении. При этом соотношение субпопуляций $CD3+T$ лимфоцитов, как и в предшествующем кластере, изменялось в

пользу CD3+CD8+ клеток. Абсолютное содержание активированных клеток (CD4+CD25+ Т хелперов и CD4+CD95+ Т хелперов), относительное и абсолютное содержание примированных CD4+CD45RO+ Т хелперов в периферической крови было снижено. Как и в составе CL1 содержание CD4+CD25^{Bright} Т рег лимфоцитов было снижено, равно как и соотношение их с суммарной популяцией CD4+ лимфоцитов, экспрессирующих α -цепь IL-2R. Для этого кластера были характерны высокие уровни TNF α в сыворотке, значимое возрастание уровня IFN γ , тенденция к возрастанию уровня IL-4, при отсутствии дисбаланса между содержанием цитокинов Т хелперных клонов. Медиана уровня IL-2 была несколько ниже, нежели в контрольной группе.

Для структуры нуклоида CL3 были характерны тенденция к снижению процентного содержания лимфоцитов в периферической крови, статистически значимое снижение их абсолютного содержания, абсолютного содержания CD3+ Т лимфоцитов, CD3+CD4+ Т хелперов, тенденция к снижению CD3+CD8+ ЦТЛ, однако процентное соотношение основных популяций Т лимфоцитов существенно не изменялось, при тенденции к снижению содержания CD16+CD56+ NK клеток. Структура субпопуляций Т лимфоцитов отличалась резким нарастанием содержания CD4+CD25+, CD4+CD95+, и CD4+CD45RO+ Т хелперов, типичен был резкий дисбаланс между “негативными” и “позитивными” популяциями.

Таблица 1

Типовые нарушения иммунного статуса больных псориазом (структура нуклоидов кластеров), выявленные в результате иерархического кластерного анализа

Показатель	Значение показателей, М ± m			
	Доноры (n = 40)	Псориаз		
		CL1 (n = 6)	CL2 (n = 12)	CL3 (n = 23)
1	2	3	4	5
Гемограмма				

Лейкоциты, 10 ⁹ /л	6.0 ± 1.7	10.5 ± 4.5*	5.1 ± 1.4	5.3 ± 2.1
Нейтрофилы пал., %	3.6 ± 0.3	9.8 ± 2.4*	5.7 ± 0.8*	5.1 ± 2.5*
Нейтрофилы сег., %	52.2 ± 1.5	46.5 ± 5.1	46.1 ± 3.7	52.0 ± 1.5
Эозинофилы, %	2.3 ± 0.4	2.8 ± 1.0	4.1 ± 1.7	3.3 ± 0.5
Базофилы, %	0.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Моноциты, %	5.1 ± 0.5	4.7 ± 1.1	5.6 ± 1.0	5.5 ± 0.6
Лимфоциты, %	36.7 ± 1.4	36.6 ± 6.1	35.5 ± 2.4	33.5 ± 1.6
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	2.20 ± 0.11	3.48 ± 0.21*	2.00 ± 0.23	1.74 ± 0.13*
Основные субпопуляции лимфоцитов				
CD3+, %	71.7 ± 1.4	70.4 ± 3.0	69.3 ± 1.6	72.3 ± 1.8
Абс. 10 ⁹ /л CD3+CD4+, %	1.55 ± 0.08	2.45 ± 0.17*	1.23 ± 0.17*	1.26* ± 0.10
Абс. 10 ⁹ /л CD3+CD8+, %	0.92 ± 0.06	1.37 ± 0.30*	0.68 ± 0.07*	0.71 ± 0.03*
Абс. 10 ⁹ /л CD4+/CD8+	0.56 ± 0.04	1.07 ± 0.12*	0.53 ± 0.06	0.48 ± 0.06
CD19+, %	1.83 ± 0.12	1.35 ± 0.15*	1.35 ± 0.10*	1.82 ± 0.14
Абс. 10 ⁹ /л CD3-CD16+CD56+, %	8.5 ± 0.5	9.7 ± 1.0	8.9 ± 1.1	9.3 ± 1.2
Абс. 10 ⁹ /л	0.19 ± 0.02	0.35 ± 0.05*	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02
% Абс. 10 ⁹ /л	16.9 ± 1.3	15.6 ± 4.0	16.3 ± 2.7	14.7 ± 1.8
	0.36 ± 0.03	0.53 ± 0.13	0.32 ± 0.07	0.28 ± 0.05
Субпопуляции CD4+ Т хелперов				
CD4+CD25 ^{Total} , % Абс. 10 ⁹ /л	20.1 ± 1.0	21.4 ± 3.7	16.6 ± 1.9	27.7 ± 1.7*
CD4+CD25 ^{Bright} , % Абс. 10 ⁹ /л	0.42 ± 0.03	0.70 ± 0.10*	0.31 ± 0.05*	0.47 ± 0.04
CD25 ^{Bright} /CD25 ^{Tot.} , % Абс. 10 ⁹ /л	23.9 ± 0.9	19.6 ± 2.8	21.8 ± 1.4	16.8 ± 1.6*
CD4+CD25 ^{Bright} , % Абс. 10 ⁹ /л	0.53 ± 0.04	0.71 ± 0.10*	0.40 ± 0.04	0.28 ± 0.03*
CD25 ^{Bright} /CD25 ^{Tot.} , % Абс. 10 ⁹ /л	1.35 ± 0.11	1.12 ± 0.27	1.67 ± 0.34	0.67 ± 0.07*
CD4+CD95+, % Абс. 10 ⁹ /л	3.30 ± 0.80	1.27 ± 0.20*	1.32 ± 0.20*	1.47 ± 0.20*
CD25 ^{Bright} /CD25 ^{Tot.} , % Абс. 10 ⁹ /л	0.07 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01*	0.02 ± 0.01*
CD4+CD95+, % Абс. 10 ⁹ /л	0.17 ± 0.03	0.07 ± 0.02*	0.09 ± 0.01*	0.05 ± 0.01*
CD4+CD95-, % Абс. 10 ⁹ /л	24.5 ± 0.9	26.0 ± 2.8	20.9 ± 1.3	33.8 ± 1.6*
CD4+CD95-, % Абс. 10 ⁹ /л	0.51 ± 0.03	0.88 ± 0.06*	0.38 ± 0.05*	0.57 ± 0.04
CD95-/CD95+, % Абс. 10 ⁹ /л	19.6 ± 1.1	17.7 ± 2.1	18.6 ± 1.4	10.2 ± 1.1*
CD95-/CD95+, % Абс. 10 ⁹ /л	0.42 ± 0.03	0.62 ± 0.1*	0.35 ± 0.03	0.20 ± 0.04*
CD4+CD45RO+, % Абс. 10 ⁹ /л	0.84 ± 0.06	0.72 ± 0.11	1.00 ± 0.12	0.32 ± 0.03*
CD4+CD45RO-, % Абс. 10 ⁹ /л	29.4 ± 1.4	26.2 ± 2.9	24.5 ± 1.3*	36.8 ± 1.3*
CD4+CD45RO-, % Абс. 10 ⁹ /л	0.62 ± 0.04	0.92 ± 0.11*	0.41 ± 0.04*	0.62 ± 0.04
CD45RO-/CD45RO+, % Абс. 10 ⁹ /л	14.7 ± 1.1	14.5 ± 1.9	13.3 ± 2.0	7.0 ± 0.7*
CD45RO-/CD45RO+, % Абс. 10 ⁹ /л	0.33 ± 0.03	0.41 ± 0.07	0.23 ± 0.03	0.11 ± 0.01*
CD45RO-/CD45RO+, % Абс. 10 ⁹ /л	0.54 ± 0.05	0.61 ± 0.13	0.56 ± 0.08	0.19 ± 0.01*
Цитокиновый статус (Ме, 25 - 75%-ный квартиль)				
TNFα, пкг/мл	0, 0 - 8	10, 3 - 16*	21, 0 - 34*	10, 2 - 27*
IL-6, пкг/мл	0, 0 - 3	3, 0 - 7	6, 0 - 12	6, 0 - 18*
IL-2, пкг/мл	24, 11 - 43	20, 5 - 43	15, 0 - 22	26, 13 - 35
IFNγ, пкг/мл	6, 1 - 13	11, 7 - 15	16, 13 - 42*	17, 8 - 45*
IL-4, пкг/мл	9, 2 - 16	24, 12 - 67	18, 1 - 52	7, 1 - 34
IL4/ IFNγ	1, 0 - 3	2, 0 - 8*	1, 3, 0 - 2	0, 3, 0 - 2

* - различия в сравнении с контролем статистически значимы, $P_{LSD} < 0.05$, для непараметрической статистики $P_{KS} < 0.05$

Содержание CD4+CD25^{Bright} Treg лимфоцитов было низким, а доля их среди всех лимфоцитов, экспрессирующих α -цепь рецептора IL-2, была минимальной. Для этого кластера был характерен максимальный уровень провоспалительных цитокинов (как TNF α , так и IL-6) в сыворотке и изолированное нарастание уровня IFN γ .

Представляло интерес провести ретроспективный анализ клинических особенностей болезни в зависимости от принадлежности пациентов к тому или иному кластеру или типу иммунологических нарушений. Из **таблицы 2** видно, что при равноценной половой структуре CL1 “объединял” более молодых пациентов, хотя значимых различий не было. В составе кластеров число пациентов с площадью псориатического поражения более 10% поверхности тела различалось незначительно. Псориатическая артропатия практически в 2 раза чаще ассоциировалась со 2-м и 3-м типами нарушений иммунного статуса, причем частота встречаемости артропатии была одинакова в составе этих кластеров. Тип иммунологических нарушений, описываемый CL2 и CL3, ассоциировался с длительным псориатическим процессом, равно, как и с наибольшим числом пациентов с продолжительной прогрессирующей фазой, причем для CL3 наблюдались статистически значимые различия.

Таким образом, характер изменений субпопуляционной структуры и цитокинового статуса не специфичен, а лишь в большей, или меньшей мере, свойственен определенным клиническим проявлениям. Скорее всего, обнаруживаемые изменения отражают особенности комплекса патологических, защитно-компенсаторных реакций иммунной системы, степень структурно-функциональной “дезорганизации”, которые определяются реактивностью и, возможно, стадийностью иммуновоспалительного процесса в коже.

Первый тип иммунного статуса отражает инициальный период реакции иммунной системы на развитие топического процесса, перехода стационарной фазы заболевания в прогрессирующую, что сопровождается активацией гемопоэза, началом миграции CD4+ T лимфоцитов в кожу (дисбаланс между процентным

содержанием CD4+ и CD8+ лимфоцитов в периферической крови). Изменения субпопуляционной структуры Т хелперов незначительны и выражаются в абсолютном нарастании числа активированных (CD25+ и CD95+ лимфоцитов). Тем не менее, уже на этом этапе Трег мигрируют в зону воспаления (“максимальной надобности”). Судя по характеру цитокинового дисбаланса (преобладание уровня IL-4 в сыворотке над уровнем IFN γ), возможно участие гуморальных механизмов в инициации повреждения, что подтверждается мнением других исследователей [Rajendran et al., 2003; Matsushita et al., 2005].

Иммунологические нарушения, описываемые кластерами 2 и 3, отражают более глубокие нарушения иммунореактивности, сопровождающие длительное прогрессирование, формирование экстракутаных поражений (артропатия), причем “сценарий” развития иммунологических нарушений может быть различен.

Таблица 2

Клинические особенности прогрессирующего псориаза в зависимости от типовых изменений субпопуляционной структуры и цитокинового статуса

	CL1	CL2	CL3
<u>Представительство” кластера</u>	14 %	29 %	56 %
<u>Возраст пациентов</u>	32.7 \pm 3.3	39.7 \pm 5.0	42.7 \pm 2.7
<u>Пол</u>			
Мужчины	66 %	62 %	69 %
Женщины	34 %	38 %	31 %
Величина PASI	17.7 \pm 3.5	17.2 \pm 2.8	21.3 \pm 3.1
Площадь поражения более 10% поверхности	67 %	58 %	70 %
Наличие артропатии	16.6 %	33%	30%
Продолжительность болезни более 5 лет	16.6 %	58%	60 %
<u>Продолжительность прогрессирующей фазы</u>			
До 2-х мес	100 %	67 %	56,5 %
Более 2-х мес	0 %	33 %	43,5 %
			($\chi^2=3.98$)

В одном случае (CL2), несмотря на клинически выраженный процесс, системные изменения выражены незначительно. Наиболее характерным является содержание CD4+ Т хелперов в крови, отчетливое уменьшение “доли” активированных Т хелперов, примированных CD4+ Т лимфоцитов

“иммунологической памяти” в циркуляции, скорее всего вследствие их интенсивной миграции в кожу. Эти изменения также сопровождаются снижением уровня супрессорной популяции Treg в циркуляции. Происходит постепенная “поляризация” иммунного ответа в сторону Th1- зависимого типа реагирования.

Во втором случае (CL3), что более типично, особенно у пациентов старшей возрастной группы, формируются системные нарушения: развивается лимфопения (вследствие интенсивной топической миграции лимфоцитов?), пул активированных и примированных Т хелперов рециркулирует и резко преобладает над “наивными” лимфоцитами. Содержание Treg в циркуляции резко снижено и дисбаланс между активированными ($CD4+CD25^{Low}$) и регуляторными ($CD4+CD25^{Bright}$) клетками максимален. Преобладает Th1-зависимый тип воспаления.

Правомерность такой интерпретации подтверждают и данные других исследователей. Содержание $CD4+$ Т лимфоцитов в периферической крови снижается в активной фазе псориатического процесса и, особенно, при осложненных формах псориаза [Новиков и соавт., 2003; Rubins, Merson, 1987; Rubins et al., 1987; Kokelj, Presani, 1989; Lecewicz-Torun et al., 2001]. Имеется параллелизм между снижением $CD4+$ лимфоцитов в периферической крови, их нарастанием в псориатической бляшке и пролиферативной активностью кератиноцитов [Вавилов и соавт., 2000; Новиков и соавт., 2003]. В условиях модели псориатического поражения у животных, инъекция $CD4+$ Т лимфоцитов, выделенных из псориатической бляшки, в нормальную кожу приводит к индукции псориатического поражения [Nickoloff, Wrono-Smith, 1999]. Содержание лимфоцитов, экспрессирующих ранние ($CD25$, $CD71$) и поздние (HLA-DR) антигены активации, у больных псориазом увеличивается в фазе прогрессирования болезни [Н.В. Кунгурова и соавт., 2002; Прокофьева и соавт., 2006; Kagi et al., 1994; Mahmoud et al., 1999 и др.].

В этих, и многих других исследованиях не проводилось “разбиения” объектов наблюдения, в то же время, судя по полученным данным, главный “вклад” в суммарные результаты “вносят” именно пациенты с 3-м типом иммунологических

нарушений, “представительство” которых максимально, что и определяет характер интегральных данных. Объясним и характер изменения уровня цитокинов—повышение уровня $TNF\alpha$, который при псориазе продуцируется как кератиноцитами, так и активированными лимфоцитами [Nickoloff, Nestle, 2004], вне зависимости от типа иммунного статуса, статистически значимое возрастание уровня IL-6 (“позднего” провоспалительного цитокина) именно у пациентов с 3-м типом иммунологических нарушений. Сопоставляется с данными других исследователей и относительное преобладание IL-4 у пациентов, классифицируемых в CL1. Возрастание тяжести и продолжительности псориаза ассоциируется со снижением уровня IL-4, повышенного у пациентов с непродолжительным и относительно нетяжелым заболеванием [Маркушева и соавт., 2004]. При этом уровень $IFN\gamma$, продукта активированных Th1-лимфоцитов, закономерно нарастает.

Нацеленность алгоритмов кластерного анализа на определенную структуру группировок объектов в пространстве признаков может приводить к неоптимальным или даже неправильным результатам, если гипотеза о типе группировок неверна. В случае отличия реальных распределений от гипотетических указанные алгоритмы часто “навязывают” данным не присущую им структуру и дезориентируют исследователя [Johnson, 1967; Hartigan, 1975]. Поэтому экспериментатор, в условиях априорной неопределенности должен использовать несколько алгоритмов кластерного анализа. Для проверки правильности моделирования процедура разбиения была осуществлена также с помощью кластеризации методом K-средних - статистического подхода, который принципиально отличается от агломеративных. Соответствие “членов” кластеров, полученных путем кластеризации методом K-средних, «членам» кластеров, полученных путем построения дендрограммы, составило для CL1 - 100%, для кластера 2 - 83 %, а для CL3 - 74 %, т.е. было высоким. Структура нуклоидов была практически схожей, что подтверждает правомерность классификации.

Нарушение апоптоза лимфоцитов периферической крови у больных прогрессирующим псориазом

В настоящее время патогенез большинства аутоиммунных расстройств интерпретируется в контексте нарушений апоптотической регуляции [Ярилин, 1996; Барышников, Шишкин, 2002; Ktammer, 2000; Stuart, Huges, 2002; Kuhlreiber et al., 2003]. Среди лимфоцитов периферической крови здоровых доноров спонтанный уровень апоптоза был невелик, содержание клеток, находящихся в ранней фазе апоптоза (Ann V+), составило ($M \pm m$) 4.7 ± 0.5 % (Рисунок 4). У больных псориазом содержание апоптотирующих клеток было несколько выше ($5.5 \pm 0.6\%$), однако статистически значимых различий не было. Полученные результаты согласуются также с данными Прокофьевой и соавторов [2006], которые, используя метод окрашивания лимфоцитов Hoechst 33342, также не выявили значимых изменений апоптоза лимфоцитов у больных псориазом.

Инкубация лимфоцитов здоровых доноров в среде, содержащей $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ (4 часа 37°C , $5\% \text{CO}_2$), приводила к индукции апоптоза – содержание AnnV+ клеток возрастало практически в 2 раза, в сравнении с контрольными культурами ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0.0002$). У больных псориазом также отмечалась индукция апоптоза, в сравнении с контрольными культурами ($P_{\text{Wilcoxon}} = 0.011$), но степень этой индукции была существенно ниже, причем фактор наличия заболевания значимо влиял на дисперсию этого показателя (КВФ = 17%, $F = 5.36$, $P = 0.02$).

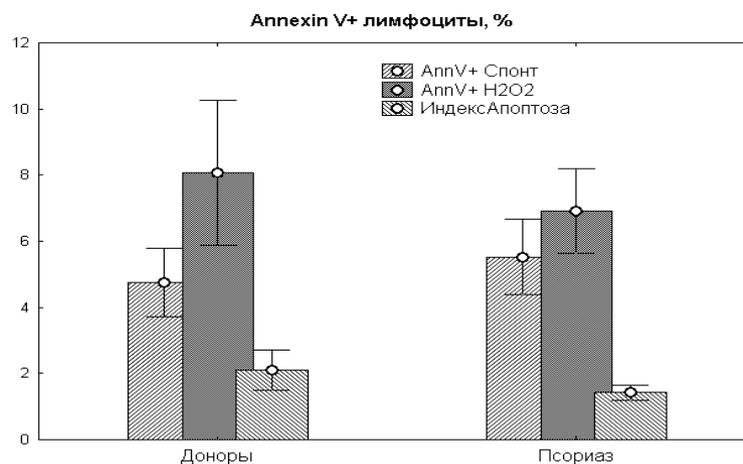


Рис.4. Спонтанный уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови и апоптоз лимфоцитов индуцированный H_2O_2 у здоровых доноров и больных псориазом

Внутриклеточный оксидативный статус, как экзогенные, так и образующиеся в самих клетках активные формы кислорода, является определяющим фактором реактивности клеток, в том числе и Т лимфоцитов [Zoschke., Staite, 1987; Hildeman et al., 2003; Remans et al., 2005]. H₂O₂ индуцирует сопряженные с тирозинкиназой ZAP-70 мембранные сигнальные системы Т клеток, активирует транскрипционный фактор NF-κB, индуцирует как митогенез, так и апоптоз [Schieven et al., 1994; Zhuang et al., 2000; Gilston et al. 2001]. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о нарушении механизмов нерцепторного апоптоза у больных с псориазом.

Ассоциированный с мембраной клетки Fas-рецептор (CD95) является ключевой молекулой, опосредующей апоптоз [Барышников, Шишкин, 2002; Sharma et al., 1999], а Fas-опосредованный апоптоз лимфоцитов является важнейшим механизмом регуляции иммунного гомеостаза. Нарушение адекватного апоптоза лимфоцитов, снижение интенсивности Fas-опосредованного апоптоза приводит к формированию аутоиммунных заболеваний [Nagata, Suda, 1995; Jianguo et al., 1996; Vaishnaw et al., 1999; Kanemitsu et al., 2002; Cohen et al., 2002]. Для оценки Fas-индуцированного апоптоза интактных лимфоцитов периферической крови больных псориазом и здоровых доноров выделенные мононуклеары инкубировали с физиологическим индуктором апоптоза – IgM МКА против Fas-рецептора человека (BD), которые добавляли в концентрации 500 нг/ 10⁶ клеток. Инкубация лимфоцитов периферической крови с антиFas МКА практически не вызывала индукции апоптоза и увеличения AnnV⁺ клеток в культурах лимфоцитов здоровых доноров. Это закономерно, поскольку лимфоциты периферической крови резистентны к Fas-индуцированному апоптозу [Барышников, Шишкин, 2002; Wesselborg et al., 1993]. Лимфоциты больных псориазом были также резистентны к индукции апоптоза антиFas МКА, более того индекс апоптоза был на 14% ниже такового в донорской группе (различия статистически не значимы).

Возможным механизмом “Fas-рецепторной недостаточности” при аутоиммунных расстройствах является увеличение содержания растворимого Fas-

рецептора (sFas), который является продуктом альтернативного сплайсинга мРНК FasR и протеолитического отщепления трансмембранного FasR [Cheng et al., 1995]. sFas способен конкурентно блокировать Fas/FasL- зависимый апоптоз и угнетать элиминацию активированных лимфоцитов [Papoff et al., 1996]. Увеличенное содержание sFas выявлено у пациентов с СКВ, ревматоидным артритом, дерматомиозитом, синдромом Сьегрена, ANCA-позитивным системным васкулитом, гломерулонефритом [Nozawa et al., 1997; Lorenz et al., 1997; Sano et al., 1998; Van der Linden et al., 2001; Christensson et al., 2002]. В доступной литературе есть единичные работы, свидетельствующие об увеличении уровня sFas при генерализованном пустулезном псориазе, причем авторы отмечали корреляцию между тяжестью псориатического поражения, уровнями sFas, TNF и IL-6 [Seishima et al., 1998].

Рисунок 5 иллюстрирует результаты определения sFas в сыворотке методом твердофазного ИФА. Уровень sFas в группе доноров составил 1281.4 ± 142.5 пкг/мл, что согласуется с результатами других исследователей [Chen et al., 1994]. У больных псориазом концентрация sFas в сыворотке была выше и фактор заболевания статистически значимо влиял на дисперсию этого показателя (КВФ = 6%, $F = 4.61$, $P = 0.035$).

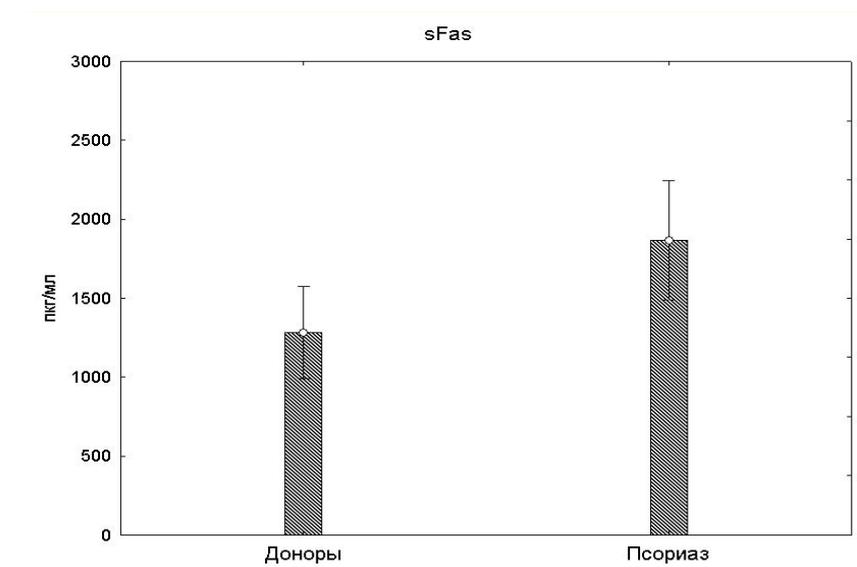


Рис.5. Сывороточный уровень растворимого Fas рецептора (sFas) в группе здоровых доноров и больных прогрессирующим псориазом

Показатели спонтанного апоптоза лимфоцитов имели тенденцию к нарастанию у пациентов, классифицированных в CL1 и CL3, а у пациентов, классифицируемых в кластер 2, наблюдалась тенденция к снижению содержания апоптотирующих лимфоцитов, причем отмечались статистически достоверные различия с показателями CL1 и CL2. Вероятно, наблюдаемые изменения отражали увеличение доли активированных (в первом случае - абсолютного, во втором, - относительного и абсолютного содержания), и, соответственно, доли апоптотирующих клеток в периферической крови. Закономерно, поэтому, что “зеркальным” образом изменялась чувствительность лимфоцитов к апоптозу, индуцированному пероксидом, причем в составе кластера 3, наблюдалось статистически значимо меньшая чувствительность, чем в CL1 и CL2. Этот факт хорошо согласуется с увеличением популяции CD4+CD45RO+ лимфоцитов в этом кластере. CD4+CD45RO+ лимфоциты представляют дискретную популяцию, среди которой есть популяция т.н. эффекторных клеток, мигрирующих в очаги воспаления, экспрессирующих Fas и резистентных к апоптозу, и чувствительная к апоптозу популяция. Известно, что активированные Т клетки и CD45RO+ клетки памяти менее чувствительны к H₂O₂. [Lahdenpohja, Naive, 1996; Nindl et al., 2004], что связывают с более высокой внутриклеточной экспрессией γ -глутамилтранспептидазы [Carlisle1 et al., 2003]. Уровень sFas у пациентов 1-го кластера был невысок, но статистически значимо возрастал у пациентов 2-го и 3-го кластеров, т.е. по мере прогрессирования болезни. Таким образом, характер апоптотической реактивности лимфоцитов периферической крови четко соответствовал субпопуляционным сдвигам и, возможно, этапам иммуновоспалительного процесса.

На следующем этапе исследования была дана характеристика активационного Fas-опосредованного апоптоза, для чего был осуществлен одновременный анализ экспрессии CD95 и интенсивности апоптоза после 24 часовой инкубации лимфоцитов с ФГА. После культивирования клетки окрашивали МКА против Fas рецептора (антиCD95-PE), а затем AnnV-FITC. Параллельно оценивался митогенез.

Стимуляция лимфоцитов здоровых доноров ФГА приводила к закономерному снижению содержания покоящихся клеток (G0-фаза), нарастанию содержания клеток, находящихся в пресинтетической фазе (G1), а также суммарное содержание клеток, находящихся в S+G2+M фазах (таблица 3). Нарастает содержание апоптотирующих лимфоцитов. В наших наблюдениях статистически значимых различий между показателями митогенеза лимфоцитов больных псориазом и здоровых доноров в 24 - часовых культурах обнаружено не было, однако в группе больных отмечалась незначительная тенденция к снижению доли G0-лимфоцитов в нестимулированных культурах. Это согласуется с мнением Маркушевой и соавторов [1998-1999], отмечавших “омоложение” лимфоцитов. Активация лимфоцитов доноров ФГА закономерно усиливала экспрессию CD95 – содержание Fas-экспрессирующих лимфоцитов в культуре возрастало в 2 раза ($P_w = 0.001$); нарастало и содержание клеток, находящихся в ранней фазе апоптоза ($P_w = 0.001$), причем большая часть апоптотирующих клеток экспрессировали CD95 (Fas-зависимый апоптоз). Следует отметить, что содержание апоптотирующих клеток, выявляемое “аннексиновым” методом, превышало таковое, выявляемое при окрашивании акридином оранжевым, поскольку в последнем случае окрашиваются только клетки с фрагментированной ДНК, т.е. в поздней фазе апоптоза.

Отношение числа AnV+CD95+ лимфоцитов ко всем апоптотирующим клеткам, т.е. доля Fas-зависимого апоптоза, составило в группе доноров 0.62 ± 0.05 (более 60%), а отношение числа AnV+CD95+ лимфоцитов ко всем CD95+ лимфоцитам (реализация апоптоза Fas-экспрессирующими клетками) составила 0.55 ± 0.06 (55%). Это свидетельствует о том, что значительная часть активированных клеток в краткосрочной культуре погибает по механизму Fas-зависимого апоптоза, однако из всех Fas-экспрессирующих лимфоцитов лишь 50% подвергается Fas-зависимой гибели. По данным, полученным Т.Ю. Григоровой и соавторами [2002], в краткосрочной культуре подвергаются апоптозу преимущественно CD4+ лимфоциты, в то время как экспрессия Fas рецептора максимально возрастает на CD8+ лимфоцитах.

В группе пациентов с псориазом спонтанная и индуцированная ФГА экспрессия Fas была несколько ниже, чем у здоровых лиц, однако статистически значимых различий выявлено не было. Спонтанное и индуцированное активацией содержание апоптотирующих лимфоцитов также было аналогично таковым у здоровых лиц. Содержание AnnV+CD95+ лимфоцитов как в нестимулированных, так и в стимулированных ФГА культурах было несколько снижено и, поэтому, отношение числа этих клеток к общему числу Fas-экспрессирующих клеток было таким же, как у доноров. В то же время, отношение содержания AnnV+CD95+ лимфоцитов ко всем апоптотирующим клеткам было статистически значимо ($P_{LSD} = 0.02$) ниже, нежели в донорской группе, и фактор наличия заболевания значимо определял дисперсию показателя ($F = 7.96$, $P = 0.007$). Это свидетельствует о снижении “доли” Fas-зависимого апоптоза лимфоцитов при их активации и относительном преобладании не Fas-зависимых механизмов апоптотической гибели. Выявленный факт представляет интерес в том контексте, что гибель активированных CD4+ Т лимфоцитов, мигрировавших в дерму, осуществляется по Fas-FasL-зависимому механизму, при контакте с FasL, экспрессированным на мембране кератиноцитов [Arnold et al., 1999]. Таким образом, полученные результаты подтверждают предположение о роли нарушений Fas-зависимых механизмов апоптоза при псориазе.

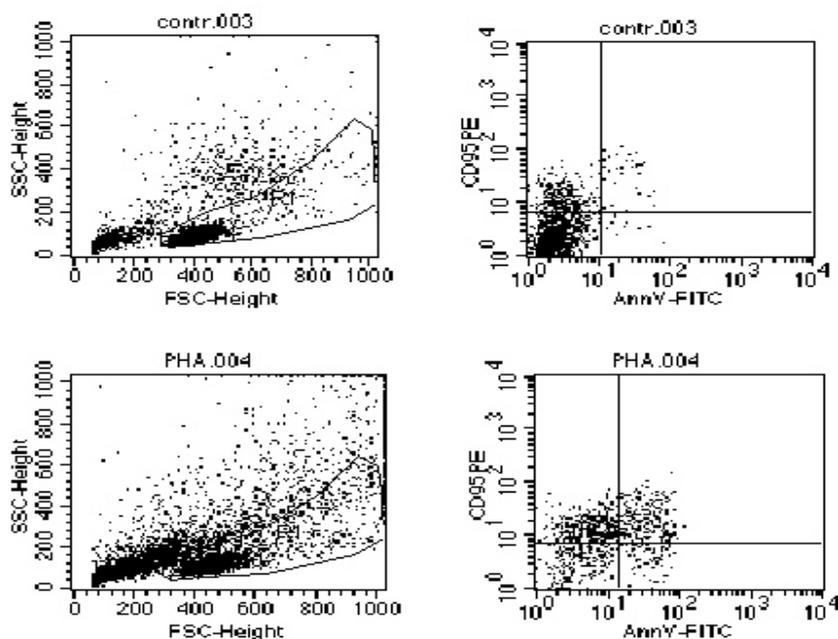


Рис.6. Цитофлюорограммы, иллюстрирующие экспрессию Fas-рецептора (CD95) и связывание FITC-меченого Аннексина V активированными лимфоцитами периферической крови здорового донора в 24-часовых культурах лимфоцитов периферической крови при активации ФГА-Р Difco (5 мкг/мл).

Максимальное снижение отношения апоптотирующих лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецептор, ко всем апоптотирующим лимфоцитам, т.е., доли Fas-зависимого апоптоза среди механизмов апоптотической гибели лимфоцитов, наблюдалось у пациентов кластеров 2 и 3, в то время как статистически значимого нарушения механизмов реализации апоптоза Fas-экспрессирующими лимфоцитами, т.е. отношения AnV+CD95+ ко всем CD95+ клеткам выявлено не было. Таким образом, как и следовало ожидать, нарушения Fas-зависимого апоптоза активированных лимфоцитов наблюдались при длительном прогрессировании, наличии осложнений заболевания, ассоциировались с высоким уровнем растворимого Fas-рецептора в периферической крови и, в равной степени, с “супрессивным” или “активированным” типами иммунологических нарушений, что предполагает их патогенетическую значимость.

Таблица 3

Активационно-индуцированная экспрессия Fas (CD95) рецептора и Fas-зависимый апоптоз в 24-часовой культуре лимфоцитов периферической крови здоровых доноров и больных прогрессирующим псориазом

	Экспрессия CD95 (суммарное количество Fas+ лимфоцитов, %)		Апоптоз			
	Спонтанная	Активационная	Суммарное количество Ann V+ (апоптотирующих) лимфоцитов, %		Fas-зависимый апоптоз (Ann V+CD95+ лимфоциты, %)	
			Спонтанное	Активационное	Спонтанный	Активационный
Здоровые доноры	22.0 ± 3.7	44.9 ± 5.5 P _W = 0.001	10.5 ± 1.0	37.3 ± 4.8 P _W = 0.001	5.8 ± 1.0	22.8 ± 3.7 P _W = 0.001
Псориаз	15.6 ± 3.6	30.8 ± 5.3 P _W = 0.006 P _{LSD} =0.07	10.4 ± 1.1	36.6 ± 3.5 P _W = 0.001	3.6 ± 0.7	16.6 ± 3.1 P _W = 0.001

P_W – в сравнении с показателями в не стимулированных культурах (парный критерий Вилкоксона).

P_{LSD} - межгрупповые различия

ВЫВОДЫ

1. Нарушения структуры основных субпопуляций лимфоцитов, субпопуляций Т хелперов периферической крови и цитокинового статуса в прогрессирующей стадии псориаза неоднородны. С помощью агломеративного кластерного анализа выявлены 3 типа нарушений, отражающие особенности развития иммуновоспалительного процесса и, возможно, рециркуляции Т клеток:

- 1 тип нарушений иммунного статуса характеризуется “воспалительными” изменениями гемограммы, умеренным Т-субпопуляционным дисбалансом, с преобладанием CD3+CD8+ лимфоцитов, незначительными признаками активации CD4+ Т хелперов, высоким уровнем TNF α в сыворотке, преимущественным возрастанием уровня IL-4. Этот тип нарушений ассоциируется с непродолжительным заболеванием, небольшой длительностью прогрессирующей фазы, неосложненным псориазом;

- 2 тип нарушений иммунного статуса характеризуется количественным преобладанием CD3+CD8+ Т лимфоцитов, снижением абсолютного содержания активированных CD25+ и CD95+ и примированных CD45RO+ Т хелперов в периферической крови, нарастании уровней TNF α и IFN γ в сыворотке. Этот тип ассоциируется преимущественно с длительным заболеванием, длительной прогрессирующей фазой, артропатией;

- 3 тип нарушений иммунного статуса характеризуется абсолютной CD3+ и CD3+CD4+ лимфопенией, но резким увеличением относительного содержания активированных CD25+ и CD95+ и примированных CD45RO+ Т хелперов, нарастанием уровней TNF α , IL-6 и IFN γ в сыворотке. Этот тип также ассоциируется преимущественно с длительным заболеванием, длительной прогрессирующей фазой, артропатией.

2. Вне зависимости от остальных нарушений иммунного статуса, прогрессирующая стадия псориаза сопровождается снижением числа CD4+CD25^{Brigh} Т регуляторных лимфоцитов в периферической крови и их доли среди всех клеток, экспрессирующих α -цепь рецептора к IL-2 (CD4+CD25^{total}).

3. При прогрессирующем псориазе выявляются нарушения “апоптотической реактивности” лимфоцитов периферической крови, которые выражаются в снижении чувствительности лимфоцитов к апоптозу, индуцированному пероксидом, а также снижении интенсивности Fas-опосредованного апоптоза при активации лимфоцитов. Максимальные нарушения апоптоза характерны для 2-го и 3-го типов нарушений иммунного статуса.

4. При прогрессирующем псориазе выявляется повышенный уровень продукта альтернативного сплайсинга Fas рецептора - растворимого Fas рецептора (sFas) в сыворотке крови.

5. Совокупность нарушений субпопуляционной структуры, цитокинового статуса и апоптоза лимфоцитов позволяет считать дефицит естественных регуляторных клеток и нарушения апоптоза лимфоцитов при псориазе патогенетически значимыми и рассматривать псориаз, наряду с другими аутоиммунными заболеваниями, как “дефицит негативной иммунорегуляции” и “патологию апоптоза лимфоцитов”.

Практические рекомендации

Метод кластерного анализа рекомендуется использовать для характеристики нарушений иммунного статуса при различных патологических процессах, как эффективный подход к выяснению скрытой структуры – «типа реагирования», порождаемого сходством индивидуальных реакций, характерным для некоторого подмножества объектов внутри рассматриваемой группы.

В рамках характеристики иммунного статуса и стандартного двухпараметрического окрашивания рекомендуется оценивать содержание CD4+CD25^{Bright} регуляторных Т клеток.

Оценку чувствительности лимфоцитов периферической крови к апоптозу, индуцированному пероксидом, моноклональными антителами против Fas рецептора, определение уровня растворимого Fas рецептора рекомендуются для выявления нарушений апоптотической реактивности лимфоцитов при иммунопатологических состояниях.

Благодарность

Автор приносит глубокую благодарность главному врачу РКВД МЗ РБ Латыпову Б.Г. за предоставленную возможность проведения исследования, канд. мед. наук Капулер О.М. за клиническое обследование пациентов и помощь при анализе клинических данных, лаборантам канд. биол. наук Курчатовой Н.Н. и канд. биол. наук Юсуповой Р.Ш. за помощь в проведении цитометрических методов анализа.

Список публикаций по теме диссертационной работы

1. Нелюбин Е. В. Кластерный анализ показателей иммунного статуса больных псориазом / О.М. Капулер, Е.В.Нелюбин, С.В. Сибиряк, [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки – 2006. - № 3 (1). – С.76 - 79

2. Нелюбин Е.В. Апоптотическая реактивность лимфоцитов периферической крови при псориазе / Е.В.Нелюбин, О.М.Капулер, С.В. Сибиряк // Иммунология Урала. - 2006 - № 1(5) - С.61 -63

3. Нелюбин Е.В. Цитокиновый статус пациентов с прогрессирующим вульгарным псориазом / О.М.Капулер, Е.В.Нелюбин, С.В. Сибиряк // Иммунология Урала. - 2006 - № 1(5) - С.66 -63.

4. Нелюбин Е.В. Апоптоз и иммунная система / С.В. Сибиряк, О.М.Капулер, Е.В.Нелюбин , [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. - 2006. - № 1. – С.113-119.

5. Нелюбин Е.В. Субпопуляции лимфоцитов при псориазе / С.В. Сибиряк, Нелюбин Е.В., Сибиряк Д.С. , [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2006. - № 1. – С.92-98.

6. Нелюбин Е. В. Апоптоз лимфоцитов при псориазе / О.М.Капулер, Е.В.Нелюбин, Д.А. Каут, С.В.Сибиряк // Медицинская иммунология. - 2006. - № 4. - 123 - 128.

Нелюбин Евгений Викторович

**ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ И АПОПТОТИЧЕСКАЯ
РЕАКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ
ПСОРИАЗЕ**

14.00.36 – аллергология и иммунология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Екатеринбург – 2007

Отпечатано