

*Черношей Д. А., Лукьянов А. М., Сыманович О. Ю., Хватова Л. А.*

## **ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОНУКЛЕРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И ПАЦИЕНТОВ С ПСОРИАЗОМ**

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

Псориаз является воспалительным заболеванием кожи с характерным изменением пролиферативной и функциональной активности кератиноцитов и других клеток кожи и активным участием иммунной системы. Различные популяции Т-лимфоцитов обнаруживаются в пораженной коже пациентов, однако отсутствуют в неповрежденной коже или в коже здоровых лиц. Современная трактовка особенностей иммунологического повреждения при псориазе включает избыточную активацию Th1 и Th17 лимфоцитов с гиперпродукцией провоспалительных цитокинов и ростовых факторов, что приводит к соответствующей активации клеток кожи и формированию соответствующего порочного круга. Один из возможных путей проникновения Т-клеток в кожу — поступление их из системного кровотока [5, 6]. Исследования периферической крови при псориазе выявили разнонаправленные изменения в количестве и относительном содержании субпопуляций и функции лимфоцитов при псориазе, которые коррелируют с тяжестью заболевания, его периодом и формой [1–4, 7, 8]. Настоящее исследование описывает фенотип и функциональную активность (экспрессию мРНК

провоспалительных цитокинов) мононуклеаров периферической крови пациентов с легкими формами псориаза.

**Цель исследования:** изучить характеристики мононуклеаров периферической крови и их функциональную активность-экспрессию мРНК провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов, важных в патогенезе псориаза.

Объектом исследования явились образцы периферической крови 10 практически здоровых лиц, а также пациентов с установленным диагнозом псориаза легкой степени тяжести в возрасте от 20 до 65 лет без предварительного лечения в течение 3 месяцев. Индекс PASI обследованных пациентов был < 20.

#### **Материалы и методы**

Мононуклеары периферической крови получали методом градиентного центрифугирования. Клетки дважды отмывали, подсчитывали, определяли жизнеспособность и доводили концентрацию суспензии до 1 млн/мл полной питательной средой. Подготовленные клетки в дальнейшем использовались для фенотипирования и постановки функциональных тестов.

*Фенотипирование.* Клетки окрашивали антителами согласно инструкции производителя, фиксировали параформальдегидом и подвергали цитометрии.

*Культивирование.* Мононуклеары периферической крови культивировали с коктейлем митогенов (2 мкл LPS, 4мкл PMA, 4 мкл ConA) или без стимуляторов для оценки стимулированной и спонтанной экспрессии цитокинов соответственно. Культуры инкубировали 24 часа (37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>).

*Оценка экспрессии генов цитокинов.* Клетки снимали, выделение тотальной РНК и обратную транскрипцию проводили согласно инструкции производителей. Экспрессию мРНК цитокинов оценивали в ПЦР реального времени по отношению к экспрессии гена бета-актина.

#### **Результаты и обсуждение**

Параметры лейкоцитов периферической крови обследованных приведены в табл. 1.

Таблица 1

#### **Характеристика лейкоцитов периферической крови обследованных лиц**

Популяция/субпопуляция клеток	Доноры		Пациенты	
	среднее значение	стандартная ошибка	среднее значение	стандартная ошибка
Лейкоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	6,71	0,18	9,41	0,16
Лимфоциты, %	32,90	1,07	36,24	0,90

Показатели белой крови практически здоровых лиц соответствуют норме. Пациенты с псориазом демонстрируют некоторое повышение количества лейкоцитов (верхняя граница нормы,  $p < 0,05$ ). Содержание лимфоцитов находится в пределах нормы.

Основные маркеры мононуклеаров периферической крови практически здоровых лиц соответствуют общепринятым нормам без каких-либо особенностей. Экспрессия маркеров активации (CD25  $7,39 \pm 0,33$ ; CD95  $8,44 \pm 0,27$ ) и иммунорегуляторный индекс (CD4 $\pm$ /CD8 $+$   $1,56 \pm 0,09$ ) также находятся в пределах нормы (табл. 2).

Таблица 2

**Фенотип мононуклеаров периферической крови обследованных лиц**

CD-маркер	Контрольная группа	Пациенты с псориазом
CD3	$70,31 \pm 1,68$	$64,40 \pm 1,04$
CD4	$37,23 \pm 1,30$	$44,17 \pm 1,39$
CD8	$24,36 \pm 1,22$	$26,43 \pm 0,85$
CD16	$13,89 \pm 0,78$	$14,35 \pm 0,42$
CD19	$12,03 \pm 0,36$	$11,81 \pm 0,37$
CD25	$7,39 \pm 0,33$	$10,56 \pm 0,36$
CD95	$8,44 \pm 0,27$	$10,57 \pm 0,33$
CD4/CD8	$1,56 \pm 0,09$	$1,69 \pm 0,07$

Экспрессия CD маркеров мононуклеарами периферической крови пациентов с псориазом также находится в нормальных пределах. Тем не менее, можно отметить существенное повышение содержания и количества CD4 $+$  клеток ( $44,17 \pm 1,39$  против  $37,23 \pm 1,3$  у группы контроля,  $p < 0,05$ ). Экспрессия маркеров активации также повышена ( $10,56 \pm 0,36$  и  $10,57 \pm 0,33$  для CD25 $+$  и CD95 $+$  клеток соответственно,  $p < 0,05$ ). Иммунорегуляторный индекс у пациентов с псориазом незначительно повышен ( $1,69 \pm 0,07$  против  $1,56 \pm 0,09$ ), однако различия недостоверны,  $p > 0,05$ .

Спонтанная экспрессия мРНК цитокинов мононуклеарами периферической крови находится на пороговом уровне обнаружения, отмечается лишь незначительная экспрессия ИЛ6 ( $7,03 \pm 0,25$ ). Стимулированная митогенами экспрессия всех исследованных цитокинов достоверно увеличивается. Особенно выражено возрастание экспрессии ФНО $\alpha$  (8,9 раз) и ИФН-гамма (27 раз) по сравнению со спонтанной экспрессией. В то же время стимулированная экспрессия ИЛ10, ИЛ12 и ИЛ6 возросла в меньшей степени. Экспрессия мРНК ИЛ17 изменилась не существенно (табл. 3).

Таблица 3

**Экспрессии мРНК цитокинов мононуклеарами периферической крови обследованных лиц**

Медиатор	Контрольная группа		Пациенты с псориазом	
	спонтанная	стимулированная	спонтанная	стимулированная
ИЛ6	$7,03 \pm 0,25$	$14,53 \pm 0,55$	$10,69 \pm 0,42$	$17,89 \pm 0,58$
ФНО- $\alpha$	$1,23 \pm 0,25$	$10,91 \pm 0,45$	$3,48 \pm 0,25$	$10,18 \pm 0,35$
ИФН- $\gamma$	$0,31 \pm 0,06$	$8,39 \pm 0,42$	$2,61 \pm 0,19$	$10,47 \pm 0,44$
ИЛ12	$0,38 \pm 0,09$	$5,27 \pm 0,26$	$0,51 \pm 0,10$	$9,49 \pm 0,40$
ИЛ17	$1,41 \pm 0,18$	$4,92 \pm 0,32$	$2,76 \pm 0,09$	$9,69 \pm 0,44$
ИЛ10	$1,93 \pm 0,16$	$8,89 \pm 0,43$	$1,57 \pm 0,11$	$4,40 \pm 0,17$

Таким образом, мононуклеары периферической крови практически здоровых лиц характеризуются слабой экспрессией про- и противовоспалительных цитокинов, которая существенно возрастает при стимуляции коктейлем митогенов. При этом стимулированная экспрессия носит сбалансированный характер, что отражает активацию и последовательное развитие цитокинового каскада. Экспрессия системы провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ -ИЛ12-ИЛ23/ИЛ17 мононуклеарами периферической крови практически здоровых лиц носит умеренный характер: пороговая спонтанная экспрессия и существенное возрастание экспрессии мРНК первой половины каскада при стимуляции.

Спонтанная экспрессия медиаторов воспаления мононуклеарами периферической крови пациентов с псориазом (табл. 3) характеризуется повышением содержания мРНК ИЛ6, ФНО $\alpha$ , ИФН-гамма и ИЛ17, что свидетельствует о базовом повышении провоспалительной активности иммунокомпетентных клеток. Указанная особенность реагирования прослеживается и при изучении стимулированной активности мононуклеаров. Наряду со сходным увеличением экспрессии ИЛ6, ФНО $\alpha$  и ИФН-гамма отмечается существенное возрастание содержания мРНК ИЛ12 и ИЛ17 ( $9,49 \pm 0,4$  и  $9,69 \pm 0,44$  соответственно,  $p < 0,05$ ). Подобная провоспалительная активность с преимущественным повышением экспрессии мРНК цитокинов 1 типа характерна для иммунокомпетентных клеток пациентов с псориазом и имеет патогенетическое значение. Важной особенностью стимулированного возрастания экспрессии цитокинов воспаления в этом случае является дисбаланс между про- и противовоспалительными цитокинами. Так, на фоне значительного повышения экспрессии ИЛ17 происходит уменьшение содержания мРНК ИЛ10 ( $4,40 \pm 0,17$  против  $8,89 \pm 0,43$  в группах пациентов и контроля, соответственно,  $p < 0,05$ ).

### **Выводы**

В целом, исследование фенотипа мононуклеаров периферической крови пациентов с псориазом низкой активности (PASI < 20) свидетельствует об умеренной активации лейкоцитов крови, о чем свидетельствует повышение количества лейкоцитов, повышение содержания CD4+ лимфоцитов, увеличение иммунорегуляторного индекса, повышение экспрессии маркеров активации (CD25 и CD95).

Мононуклеары периферической крови пациентов с псориазом характеризуются повышенной провоспалительной активностью, что проявляется в увеличении спонтанной экспрессии провоспалительных цитокинов, а также существенным возрастанием, по сравнению с группой контроля, экспрессии цитокинов Т-хелперов первого типа и иммунорегуляторных цитокинов, способствующих стимуляции клеточного иммунного ответа (ИЛ12).

Активация иммунокомпетентных клеток пациентов с псориазом под влиянием коктейля митогенов происходит с дисбалансом в сторону повы-

шения провоспалительной активности за счет возрастания экспрессии мРНК ИЛ17 при снижении содержания мРНК ИЛ10.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Адильгожина, С. М. Субпопуляции Т-лимфоцитов при псориазе / С. М. Адильгожина // Наука и здравоохранение. 2009. № 2. С. 83–84.
2. Субпопуляции лимфоцитов при псориазе / С. В. Сибиряк [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2006. № 1. С. 92–98.
3. Рыбкина, В. Л. Обоснование применения кларитромицина для лечения псориаза / В. Л. Рыбкина // Медицинская иммунология. 2005. Т. 7, № 4. С. 405–410.
4. Profiles of activated T lymphocytes in peripheral blood of Kuwaiti psoriasis vulgaris patients / H. Abul [et al.] // J. Dermatol. 2002. Vol. 29(4). P. 202–208
5. T-cell subpopulations in the blood and skin of patients with psoriasis / B. S. Baker [et al.] // Brit. J. Dermatol. 1984. Vol. 110(1). P. 37–44.
6. The peripheral blood lymphocyte pattern in psoriasis preceded by an infection / B. Lecewicz-Torún [et al.] // Med. Sci. Monit. 2001. Vol. 7(5). P. 889–893.
7. Lymphocyte subsets in peripheral blood of patients with moderate-to-severe versus mild plaque psoriasis / A. Langewouters [et al.] // Arch. Dermatol. Res. 2008. Vol. 300. P. 107–113.
8. Mozzanica, N. Production of type-1 and type-2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells of psoriatic patients / N. Mozzanica, A. Cattaneo, D. Trabattoni // Immunology. 1995. Vol. 86. P. 422–426.

***Charnashei D. A., Lukyanov A. M., Symanovich O. J., Khvatova L. A.***

#### **Phenotypic and functional characteristics of peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals and patients with psoriasis**

Peripheral blood mononuclear cells of patients with psoriasis, PASI < 20, are characterized by increased content of CD4 + lymphocytes, an immunoregulatory index and activation markers expression. Patients PBMCs exhibit increased spontaneous and induced expression of pro-inflammatory (TNF, IL17) and immunoregulatory cytokines of Th1 spectrum (IL12) with a decrease in IL-10 mRNA.