

УДК 616.517 : 612.433.62+ 612.111.19: 577.175.14

© Кауд Дия, 2009.

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНОВ РЕПРОДУКТИВНОЙ СФЕРЫ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

Кауд Дия*Кафедра кожных и венерических болезней (зав. – проф. О. А. Притуло) Крымского государственного медицинского университета им. С.И. Георгиевского, г. Симферополь.*

INFLUENCE OF HORMONS OF REPRODUCTIVE SYSTEM ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF MONONUCLEAR LEUKOCYTES IN PATIENTS WITH PSORIASIS

Kaoud Diya**SUMMARY**

In patients with psoriasis emerging on the background of hypogonadism, dynamics of the level of IL-1 β , IL-4 and TNF- α cytokines in the cultural medium of mononuclear leukocyte culture affected by human testosterone and chorionic gonadotropin was studied. In patients with gonadotrophin, increased synthesis of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-4 and TNF- α is produced by mononuclear leukocyte; this create conditions for relapsing of the pathological process. It has been established that at cell culturing, if the hormones of the reproductive system are present, there is a statistically significant reduction of the level of IL-1 β and IL-4 in the cultural medium.

ВПЛИВ ГОРМОНІВ РЕПРОДУКТИВНОЇ СФЕРИ НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ МОНОНУКЛЕАРНИХ ЛЕЙКОЦИТІВ У ХВОРИХ НА ПСОРИАЗ

Кауд Дія**РЕЗЮМЕ**

У хворих на псоріаз, що протікає на тлі гіпогонадізму, вивчена динаміка рівня цитокінів IL-1 β , IL-4 і TNF- α в культуральному середовищі культури мононуклеарних лейкоцитів під впливом людського тестостерону і хоріонічного гонадотропіну. Установлено, що у хворих із гіпогонадізмом має місце підвищений синтез мононуклеарними лейкоцитами прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-4 і TNF- α , що формує умови для хронізації (рецидивування) патологічного процесу. Доведено, що при культивуванні клітин у присутності гормонів репродуктивної сфери рівень IL-1 β і IL-4 в культуральному середовищі статистично значущо знижується.

Ключевые слова: гормоны репродуктивной сферы, лейкоциты, псориаз.

У больных псориазом системный дефицит и глубокие нарушения метаболизма половых стероидных гормонов выявляются в 31,3–56,5 % случаев [5, 8, 10, 17, 18]. У больных псориазом женского пола помимо выраженного снижения сывороточного уровня эстрогенов, лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов выявлено также снижение уровня эндогенного тестостерона [13]. У больных мужского пола, страдающих псориазом, в исследовании Berth-Jones J. и соавт. (2000) помимо тестостероновой недостаточности выявлено снижение сывороточных уровней лютеинизирующего гормона [19].

Kanda N, Watanabe S. (2005) указывают, что мощные регулирующие эффекты половых стероидов могут рассматриваться как перспективное терапевтическое или профилактическое направление при псориазе, старении, хронических ранах или гранулематозе [9].

При псориазе клеточная инфильтрация распространяется прежде всего в периваскулярном направлении, хотя клетки могут мигрировать и в сторону эпидермиса. Кроме того, большие В-лимфоциты могут формировать примитивные зародышевые центры; функция этих В-клеток не ясна, поскольку для

псориаза не характерны высокие уровни циркулирующих антител [6, 16]. При гистохимическом исследовании установлено, что Т-лимфоциты (прежде всего – CD4-позитивные Т-клетки) при псориазе – наиболее часто встречающиеся клетки in loco morbi [16]. Установлено также, что CD8+ Т-клетки при обострении мигрируют в сторону поврежденного эпидермиса и клиническое улучшение коррелирует с уменьшением указанной субпопуляции клеток в эпидермисе [12]. CD8+–клетки также преобладают в синовиальной жидкости при псориатическом артрите и принимают активное участие в формировании иммунопатологического воспаления в суставах [3]. В исследовании Litjens N. и соавт. (2004) установлено, что Т-лимфоциты периферической крови больных псориазом, стимулированные ЛПС, синтезируют повышенный уровень IL-12p70 [15].

В эпидермальных клетках больных псориазом идентифицирован Т-клеточный рецептор, экспрессируемый, в частности, CD8+–лимфоцитами [3]. В очаге воспаления при псориазе обнаружена фиксация Т-клеток к активированным эндотелиальным клеткам при участии молекул клеточной адгезии (СAM) и последующее трансэндотелиальное перемещение лимфо-

цитов *in loco morbi*. Молекулы клеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1) выявлены также в дерме и синовиальной оболочке суставов [20]. Важное участие мононуклеарных лейкоцитов в патогенезе псориаза документировано и в других исследованиях [4, 14].

С учетом вышесказанного продолжение научного поиска по проблемам гормонозависимой функциональной активности лейкоцитов у больных псориазом и оценка полученных фактов с сано- и патогенетических позиций представляется нам перспективным научным направлением, раскрывающим новые возможности дифференцированной терапии заболевания.

Основной целью исследования явилось научное обоснование целесообразности использования и оценка клинической эффективности применения гормонов репродуктивной сферы для коррекции цитокинового гомеостаза и функциональной активности иммунитета в комплексном лечении псориаза. В настоящей работе нами предпринята попытка подойти к проблеме расшифровки патогенетических особенностей течения псориаза с позиции оценки гормоно-опосредованной функциональной активности клеточного иммунитета.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением состояло 94 больных мужского пола, разделенных на две группы. 1-ю группу составили 30 больных псориазом с сохраненным уровнем секреции эндогенного тестостерона. Во 2-ю группу вошли 36 больных псориазом со сниженным уровнем секреции эндогенного тестостерона.

Определение содержания тестостерона в плазме крови (проводилось в 8:00–9:00, то есть во время максимальной концентрации гормона в течение суток) осуществлялось с помощью набора «Testosterone EIA COBAS CORE» методом иммуноферментного анализа.

Концентрацию цитокинов IL-1 β и IL-4 в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов (ООО «Цитокины») IL-1 β , протеиновый контур – TNF- α , IL-4). Оценка результатов осуществляется фотометрически.

Нами использован модифицированный метод краткосрочных органных культур, обеспечивающий культивирование мононуклеарных лейкоцитов *in vitro* в присутствии антибиотиков (бензилпенициллина натриевой соли 1000 ЕД и стрептомицина сульфата 0,01 г на 1 мл культуральной среды) [1]. Мононуклеарные лейкоциты выделяли из гепаринизированной крови центрифугированием на градиенте плотности фиколл-верографина с 1,077 с последующим двукратным отмыванием в 0,01 М фосфатно-солевом буфере PBS (рН 7,2–7,4). Примесь эритроцитов разрушалась обработкой Tris-HCl, (0,84 % водный раствор NH₄Cl, рН 7,6 (Tris-NH₄Cl)) [2, 11]. Культивировались 3Ч10⁵ клеток (контроль в камере Горяева) в RPMI

1640. С мононуклеарными клетками параллельно проводились несколько экспериментов, включая культивацию с введением 6,0 нг/мл человеческого тестостерона (химической компании SIGMA, США, для растворения жирорастворимого полового стероида использовался ацетон с его последующим полным испарением), 12,0 ЕД/мл раствора хорионического гонадотропина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В 1-ю группу нами включены больные мужского пола с псориазом, у которых уровень тестостерона в плазме крови существенно не отличался от соответствующего показателя у здоровых лиц соответствующего возрастного диапазона (у которых уровень полового стероида составляет 6,72 \pm 0,35 нг/мл). 2-ю группу составили больные мужского пола, страдающие псориазом, у которых уровень тестостерона в плазме крови был снижен до 4,13 \pm 0,24 нг/мл, что статистически значимо ниже ($p < 0,001$) в сравнении со здоровыми лицами мужского пола.

Результаты исследования гормонозависимой динамики уровня цитокинов в культуральной жидкости культуры мононуклеарных клеток больных псориазом представлены в табл.

Анализ представленных в табл. 1 научных фактов свидетельствует, что в культуральной среде культуры мононуклеарных клеток у больных 1-й группы уровень цитокина IL-1 β составляет 14,61 \pm 0,48 пг/мл. В опыте 2 под влиянием введения в культуральную среду тестостерона исследованный показатель снижается на 22,2 % ($p < 0,001$), а в культуральной экспериментальной модели с плацентарным гормоном (опыт 3) – снижается на 15,3 % ($p < 0,001$).

У больных 2-й группы исходный (в опыте 1) уровень IL-1 β в 1,6 раза ($p_1 < 0,001$) выше, чем у больных 1-й группы и статистически значимо снижается под влиянием тестостерона и гонадотропина (соответственно на 24,3 % и 15,1 %, $p < 0,001$). Обращает на себя внимание, что на всех этапах эксперимента исследованный показатель у больных 2-й группы выше, чем у больных 1-й группы.

В культуральной среде культуры мононуклеарных клеток у больных 2-й группы уровень лимфокина IL-4 в 2,0 раза ($p_1 < 0,001$) выше, чем у больных 1-й группы и статистически значимо снижается в экспериментальных культуральных моделях с тестостероном (на 34,6 %, $p < 0,001$) и плацентарным гормоном (на 31,2 %, $p < 0,001$). У больных 1-й группы выявлены подобные биологические эффекты полового стероидного гормона; в опыте же 3 динамика исследованного показателя под влиянием гонадотропина не обнаружено.

Уровень провоспалительного цитокина TNF- α в культуральной среде культуры мононуклеарных клеток у больных 1-й составляет 17,05 \pm 0,35 пг/мл у больных 2-й группы – на 34,0 % ($p_1 < 0,001$) выше. Обра-

Таблица 1

Влияние тестостерона и хорионического гонадотропина на уровень цитокинов в культуральной среде культуры мононуклеарных клеток у больных 1-й и 2-й групп в эксперименте *in vitro*

Показатель, пг/мл	Этапы эксперимента	Статистический показатель	1-я группа	2-я группа
IL-1 β	Опыт 1	M \pm m n p ₁	14,61 \pm 0,48 30 –	23,25 \pm 0,80 36 < 0,001
	Опыт 2 (+ тестостерон)	M \pm m n p p ₁	11,36 \pm 0,46 30 < 0,001 –	17,59 \pm 0,72 36 < 0,001 < 0,001
	Опыт 3 (+ гонадотропин)	M \pm m n p p ₁	12,38 \pm 0,40 30 < 0,001 –	19,74 \pm 0,70 36 < 0,001 < 0,001
IL-4	Опыт 1	M \pm m n p ₁	3,21 \pm 0,09 30 –	6,38 \pm 0,14 36 < 0,001
	Опыт 2 (+ тестостерон)	M \pm m n p p ₁	2,27 \pm 0,08 30 < 0,001 –	4,17 \pm 0,11 36 < 0,001 < 0,001
	Опыт 3 (+ гонадотропин)	M \pm m n p p ₁	3,01 \pm 0,09 30 < 0,2 –	4,39 \pm 0,11 36 < 0,001 < 0,001
TNF- α	Опыт 1	M \pm m n p ₁	17,05 \pm 0,35 30 –	22,85 \pm 0,69 36 < 0,001
	Опыт 2 (+ тестостерон)	M \pm m n p p ₁	17,74 \pm 0,27 30 < 0,2 –	21,33 \pm 0,65 36 < 0,2 < 0,001
	Опыт 3 (+ гонадотропин)	M \pm m n p p ₁	15,92 \pm 0,30 30 < 0,02 –	23,14 \pm 0,62 36 > 0,5 < 0,001

Примечание: p – достоверность различий, высчитанная в сравнении с соответствующим опытом 1 в той же группе больных, p₁ – достоверность различий, высчитанная в сравнении с соответствующим опытом у больных 1-й группы.

щает на себя внимание, что у больных 2-й группы достоверного влияния на синтез TNF- α мононуклеарными клетками тестостерона и плацентарного гормона не выявлено. У больных 1-й группы выявлено снижение исследованного показателя (на 6,6 %, p < 0,02) в экспериментальной модели с плацентарным гормоном.

Ранее синтез TNF- α мононуклеарными клетками у больных псориазом исследовали Карр А. и соавт. (1997) [7].

ВЫВОДЫ

1. У больных псориазом, протекающем на фоне гипогонадизма, в культуральной экспериментальной модели выявлен повышенный синтез мононуклеарными лейкоцитами провоспалительных цитокинов IL-

1 β , IL-4 и TNF- α , что формирует условия для хронизации (рецидивирования) патологического процесса.

2. Доказано, что эндокринный контроль функциональной активности мононуклеарных клеток реализуется, в том числе, на уровне гормонов репродуктивной сферы – тестостерона и плацентарного гормона: при культивировании клеток в присутствии гормонов репродуктивной сферы уровень цитокинов (за исключением TNF- α) в культуральной среде статистически значимо снижается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лурия Е.А. Органная культура кроветворной и лимфоидной ткани: Автореф. дис. ...д-ра биол. наук: 03.099. / Академия мед. наук СССР. – М., 1972. – 37 с.

2. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow // *Scand. J. Clin. Lab.* – 1968, Vol.21. – P.97-101.
3. CD8+ T cells in psoriatic lesions preferentially use T-cell receptor V beta 3 and/or V beta 13.1 genes / Chang J., Smith L., Froning K. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994, Vol. 91. – P. 9282–9286.
4. Clonal characteristics of T cell infiltrates in skin and synovium of patients with psoriatic arthritis / Tassiulas I., Duncan S., Centola M. et al. // *Hum. Immunol.* 1999, Vol.60. – P.479–491.
5. Disorders of steroid metabolism in inflammatory skin diseases / Buhles N., Holzel C., Spitteller G. et al. // *Z. Hautkr.* – 1993, Vol.62. – P.1356-1358.
6. Immunohistological study of entheses in spondyloarthropathies: comparison in rheumatoid arthritis and osteoarthritis / Laloux L., Voisin M., Allain J. et al. // *Ann. Rheum. Dis.* – 2001, Vol.60. – P.316–321.
7. Immunomodulating cytokines in atopic dermatitis and psoriasis: production of tumour necrosis factor and lymphotoxin by mononuclear cells in vitro / Kapp A., Textor A., Krutmann J., Moller A. // *Br. J. Dermatol.* – 1997, Vol.122. – P.587-592.
8. Increase in serum 5 alpha-androstane-3 alpha,17 beta-diol glucuronide as a possible marker of the androgen-mediated immunosuppressive activity exerted by cyclosporin A: preliminary results / Cutolo M., Sulli A., Giusti M. et al. // *Clin Exp Rheumatol.* – 1994, Vol.12. – P.350-351.
9. Kanda N., Watanabe S. Regulatory roles of sex hormones in cutaneous biology and immunology // *J. Dermatol. Sci.* – 2005, Vol.38. – P.1-7.
10. Morsches B., Benes P., Holzmann H. Radioimmunoassay of dehydroepiandrosterone and 5-androstene-3-beta, 17-beta-diol in the plasma of psoriatics and controls // *Arch. Dermatol. Res.* – 1993, Vol.266. – P.181-185.
11. Paavonen T, Andersson L., Adlercreutz H. Sex hormone regulation of in vitro immune response. Estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen-stimulated cultures // *J. Exp. Med.* – 1981, Vol.154. – P.1935-1945.
12. Paukkonen R., Naukarinen A., Horsmanheimo M. The development of manifest psoriatic lesions is linked with the invasion of CD8+ T cells and CD11c+ macrophages into the epidermis // *Arch. Dermatol. Res.* – 1992, Vol.284. – P.375–379.
13. Pietrzak A, Lecewicz-Torun B, Jakimiuk A. Lipid and hormone profile in psoriatic females. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska.* – 2002, Vol.57. – P.478-483.
14. Predominance of CD8+ T lymphocytes in psoriatic arthritis / Costello P., Bresnihan B., O'Farrelly C., FitzGerald O. // *J. Rheumatol.* – 1999, Vol.26. – P.1117–1124.
15. Psoriasis is not associated with IL-12p70/IL-12p40 production and IL12B promoter polymorphism / Litjens N., van der Plas M., Ravensbergen B. et al. // *J. Invest. Dermatol.* – 2004, Vol.122. – P.923-926.
16. Reduced synovial membrane ELAM-1 expression, macrophage numbers and lining layer hyperplasia in psoriatic arthritis as compared with rheumatoid arthritis / Veale D., Yanni G., Rogers S. et al. // *Arthritis Rheum.* – 1998, Vol.36. – P.893–900.
17. Schwarz W., Schell H., Hornstein O. Testosterone serum levels in male psoriatics // *Arch. Dermatol. Res.* – 1994, Vol.270. – P.377-379.
18. The effects of photochemotherapy on endocrine secretion in patients with psoriasis. Rogers SC, Shuster S, Marks JM, Penny RJ, Thody AJ. // *Acta Derm Venereol.* – 1993, Vol.61. – P.350-352.
19. Treatment of psoriasis with oral liarozole: a dose-ranging study / Berth-Jones J., Todd G., Hutchinson P., Thestrup-Pedersen K. // *Br J Dermatol.* – 2000, Vol.143. – P.1170-1176.
20. Veale D., Rogers S., Fitzgerald O. Immunolocalization of adhesion molecules in psoriatic arthritis, psoriatic and normal skin // *Br. J. Dermatol.* – 1995, Vol.132. – P.32–38.