

УДК 611.517:616.155.3:616-07-08:615.831

© В.А. Бабанин, О.А. Притуло, 2013.

КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ ПРИ УЗКОПОЛОСНОЙ УЛЬТРАФИОЛЕТ В (311 НМ) ТЕРАПИИ

В.А. Бабанин, О.А. Притуло

Кафедра кожных и венерических болезней (зав. кафедрой – проф. Притуло О.А.), Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского», г. Симферополь.

CORRELATION ANALYSIS OF IMMUNOLOGICAL AND CLINICAL PARAMETERS IN PATIENTS WITH PSORIASIS DURING NARROW-BAND ULTRAVIOLET B (311 NM) THERAPY

V.A. Babanin, O.A. Pritulo

SUMMARY

On 1st day the correlations between the severity of psoriasis and inflammation is absent. Immunosuppressive effects of ultraviolet irradiation can modify the immune response and leads to integration of inflammation parameters and clinical criteria of psoriasis. On day 21 the value of DLQI positively correlate with the level of macrophage ($r = 0.20$, $P < 0.05$), T-helper cells ($r = 0.23$, $P < 0.05$) and the index of PASI ($r = 0.22$, $P < 0.05$) and increase of PASI regression negatively correlate with a decrease of CD68 cell ($r = -0.28$, $P < 0.05$) and CD4, CD8 lymphocytes ($r = -0.26$, $P < 0.05$).

КОРЕЛЯЦІЙНИЙ АНАЛІЗ ІМУНОЛОГІЧНИХ ТА КЛІНІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ У ХВОРИХ НА ПСОРИАЗ ПРИ ВУЗЬКОСМУГОВІЙ УЛЬТРАФІОЛЕТ В (311 НМ) ТЕРАПІЇ

В.А. Бабанін, О.О. Притуло

РЕЗЮМЕ

На 1 добу кореляційний зв'язок між показниками тяжкості стану хворих на псоріаз та запаленням відсутній. Імуносупресивна дія ультрафіолетового опромінення модифікує імунну відповідь і приводить до інтеграції параметрів запалення з клінічними критеріями перебігу псоріазу. На 21 добу значення індексу якості життя позитивно корелює з рівнем макрофагів ($r = 0,20$, $P < 0,05$), Т-хелперів ($r = 0,23$, $P < 0,05$) та індексом PASI ($r = 0,22$, $P < 0,05$), а збільшення регресії індексу PASI зі зменшенням експресії CD68 клітин ($r = -0,28$, $P < 0,05$) і CD4, CD8 лімфоцитів ($r = -0,26$, $P < 0,05$).

Ключевые слова: псориаз, узкополосная ультрафиолет В (NB-UVB, 311 нм) терапия.

Псориаз является одним из наиболее часто встречающихся хронических воспалительных заболеваний [1]. Частота заболевания в мире колеблется от 2 до 8 % [2]. Важную роль в патогенезе хронического воспаления

В патогенезе псориаза одним из ключевых этапов в активации воспаления является генетически детерминированная индукция макрофагов и антиген-представляющих клеток [3, 4]. В зависимости от влияния различных цитокинов дендритные клетки и макрофаги могут запускать иммунный ответ по пути активации Т-хелперов 1 или 2 типов [5]. Известно, что изначально высокая концентрация ИФ-γ приводит к гиперактивности Т-хелперов 1 типа, а ИЛ-4 к активации Т-хелперов 2 типа [6]. Генетическая детерминированность хронического воспаления при псориазе также связана с активацией Т-хелперов 1, 17 и 22 типов, которые в свою очередь запускают каскад иммунологических реакций, приводящих к инфильтрации псориазической бляшки цитотоксическими Т-лимфоцитами [7].

Было показано, что в очаге псориазического воспаления наблюдается повышенная инфильтрация Т-лимфоцитами, при этом уровень CD8 был значительно выше CD4 [8].

На клеточном уровне NB-UVB терапия приводит к транзиторной иммуносупрессии [9]. УФ облучение вызывает редукцию Т-лимфоцитов посредством активации апоптоза [10]. Некоторые исследователи показали, что после NB-UVB терапии уменьшается количество клеток Лангенгарса [11], хотя по данным других авторов значительное уменьшение данных клеток не наблюдалось [9, 10]. Тем не менее, очевидно, что NB-UVB облучение *in vivo* нарушает презентацию антигенов дендритными клетками и вызывает толерогенный эффект [12]. В целом, результаты данных исследований указывают на значительные супрессивные эффекты NB-UVB терапии, хотя степень выраженности данных эффектов в зависимости от кратности применения различных режимов и доз практически не раскрыты.

Изучение связи иммунологических критериев, как на локальном, так и на системном уровне с клиническими параметрами, возможно, позволит нам раскрыть эффективность или неэффективность различных режимов фототерапии.

В связи с этим целью данного исследования стало изучение корреляционной связи между показателями воспаления и тяжестью состояния у больных псориазом при лечении узкополосной ультра-

фиолет В (311 нм) терапией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Критериями включения в исследование были пациенты с диагностированным бляшечным псориазом в стационарной стадии, среднетяжелым течением, индексом PASI более 10 и фототипом кожи III, IV.

Каждый пациент получал подробную информацию о проводимом лечении и давал информированное согласие на участие в исследовании.

Диагностика и лечение больных с псориазом проводилась в соответствии с протоколом утвержденным приказом МОЗ Украины №312 от 08.05.2009 г.

В основную группу – 69 больных, у которых проводилось NB-UVB (311нм) терапия.

Оценку индекса PASI проводили на 1 сутки и 21 сутки и 12. Индекс регрессии PASI (IP PASI) оценивали на 21 сутки по формуле: $IP\ PASI = \frac{PASI_{1\ \text{сутки}}}{PASI_{21\ \text{сутки}}} \times 100\%$, где $PASI_{1\ \text{сутки}}$ – значение индекса на 1 сутки, $PASI_{21\ \text{сутки}}$ – значение индекса на 21 сутки.

NB-UVB терапию проводили с использованием прибора Series X311-8 (серийный номер: HO 5048-SNBX-0008, тип контролера: Flex) производства фирмы Daavlin, США. NB-UVB (311 нм).

Пациентам было предложено заполнить анкету DLQI (Dermatology Life Quality Index) на 1 и 21 сутки. DLQI является опросником с помощью которого пациент определяет насколько проблемы с кожей затрагивают качество их жизни за последние 7 дней. Он состоит из 10 вопросов. Каждый вопрос имеет 4 вариантов ответа: «очень сильно» – 3 балла, «сильно» – 2 балла, «незначительно» – 1 балл и «совсем нет» – 0 баллов. DLQI рассчитывается путем суммирования баллов каждого вопроса, в результате максимальный результат составит 30 баллов и минимальный 0. Чем выше оценка (количество баллов), тем хуже качество жизни. Количество баллов – 0-1 интерпретируется как не влияющее на жизнь пациента, 2-5 оказывает незначительный эффект, 6-10 – умеренный эффект, 11-20 – очень сильный эффект, и 21-30 как чрезвычайно сильный эффект [13].

В нашей работе при лечении псориаза узкополосной UVB терапией, мы использовали протокол, который предполагает использование определения минимальной эритемной дозы (МЭД) [14]. МЭД является минимальной дозой NB-UVB облучения, которое вызывает резко ограниченную эритему после 24 часов от момента облучения и которая похожа на минимальный загар. Первая доза облучения составляла 70 % от МЭД. Последующие дозы определялись в зависимости от ответа кожи на облучение. При едва отличимой эритеме – использовалась начальная доза, при средней эритеме дозу уменьшали на 20 %, в случае тяжелой эритемы – лечение прекращали до исчезновения ожога, а когда ожог исчезал, то продолжали лечение с дозой 50%

от последней, затем дозу увеличивали на 10%, при отсутствии эритемы дозу увеличивали на 20%. Частота лечения составила 3 раза в неделю (понедельник, среда, пятница).

Уровни цитокинов в сыворотке определяли на 1 сутки с помощью иммуноферментного анализа. Измерение активности ферментативной реакции проводили на автоматическом фотометре для микропланшетов «Stat Fax 2100» (США). Содержание ИЛ-22, ИЛ-6 и ФНО- α выражали в пг/мл.

На первый и 21 день от начала проведения терапии всем пациентам производилась биопсия кожи с периферии псориазических элементов. Гистологическое исследование осуществляли по общепринятой методике с последующей окраской гематоксилином и эозином с целью выявления общей гистологической картины [15]. Иммуногистохимические реакции (ИГХР) проводили по стандартизованной методике [16] с использованием серийных парафиновых срезов толщиной 3-5 мкм, помещенных на адгезивные стекла, покрытые полизином («Menzel-Glaser», Германия) и реактивов компании DAKO.

Иммуногистохимическая панель включала в себя следующие антитела: CD4 (Clone 4B12), CD8 (Clone C8/144B) (DakoCytomation) CD68 (Clone PG-M1, разведение 1:50). Для визуализации использовалась проявочная система визуализации EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH (Link), Code K8012 на автостейнере фирмы DAKO.

В месте локализации антигена визуализировался продукт реакции коричневого цвета.

Интенсивность экспрессии CD68 оценивали полуколичественным методом на основании выраженности окраски и количества гранул в цитоплазме по следующей схеме: слабая экспрессия и выраженная.

Слабую экспрессию клеток мы расценили как клетки с низкой функциональной активностью, выраженную – с высокой функциональной активностью.

Морфометрическое исследование включало подсчет позитивных клеток в 5 полях зрения при увеличении 200. Полученные данные пересчитывали на 1 мм² среза. Просмотр и цифровые фотографии микропрепаратов осуществляли цифровой камерой OLYMPUS C 5050Z, установленной на микроскопе «Olympus CX-41».

Все полученные результаты подвергнуты статистической обработке для параметрических и непараметрических критериев с использованием программы «MedStat» (серийный №MS0011) ДНПП ООО «Альфа», г. Донецк. При анализе проверки распределения на нормальность использовали Хи-квадрат и критерий W Шапиро-Уилка. Анализ наличия связей между показателями хронического воспаления и клиническими критериями проводил-

ся с использованием коэффициента парной корреляции Кендалла.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Корреляционная связь между показателями воспаления и тяжестью состояния у больных псориазом на 1 сутки представлена в таблице 1.

Результаты проведенного корреляционного анализа на первые сутки (таблица 1) свидетельствуют о слабой отрицательной корреляционной связи между уровнем ФНО- α и макрофагами с высокой экспрессией ($r=-0,17$, $P<0,05$).

В свою очередь содержание данных макрофагов (ВЭ, CD68) положительно коррелирует с уровнем общего пула CD68+ клеток ($r=0,30$, $P<0,05$), которые имеют положительную корреляционную связь с макрофагами низкой экспрессии ($r=0,60$, $P<0,05$).

Резкое увеличение цитотоксических Т-лимфоцитов (табл. 1) связано со снижением соотношения CD4/CD8 ($r=-0,38$, $P<0,05$), которое коррелирует с относительным уменьшением уровня CD4 ($r=0,52$, $P<0,05$).

Таблица 1

Коэффициенты парной корреляции Кендалла у больных псориазом на 1 сутки

Переменные	ФНО- α	ИЛ-6	ИЛ-22	СЭ, CD68	ВЭ, CD68	Всего, CD68	CD4	CD8	CD4/8	PASI	DLQI
Основная группа (n=69)											
M \pm m	26,82 \pm 1,86	15,38 \pm 2,35	36,21 \pm 5,09	55,0 \pm 1,53	31,0 \pm 1,07	89,0 \pm 1,67	27,0 \pm 0,87	91,0 \pm 2,59	0,30 \pm 0,01	20,0 \pm 1,09	17,0 \pm 0,49
ФНО- α	-	-	-	-	-0,17	-	-	-	-	-	-
ИЛ-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ИЛ-22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
СЭ, CD68	-	-	-	-	-	0,60	-	-	-	-	-
ВЭ, CD68	-0,17	-	-	-	-	0,30	-	-	-	-	-
Всего, CD68	-	-	-	0,60	0,30	-	-	-	-	-	-
CD4	-	-	-	-	-	-	-	-	0,52	-	-
CD8	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,38	-	-
CD4/8	-	-	-	-	-	-	0,52	-0,38	-	-	-
PASI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Контрольная группа											
M \pm m	3,65 \pm 0,40	2,63 \pm 0,37	5,38 \pm 0,64	6,50 \pm 0,34	5,00 \pm 0,42	11,60 \pm 0,52	14,50 \pm 1,08	15,90 \pm 1,05	0,91 \pm 0,02	-	-

Примечание: выведены значения коэффициентов, отличные от 0 ($P<0,05$).

Анализируя проведенный корреляционный анализ на 1 сутки (табл. 1) можно предположить о разобщение иммунного ответа, которое связано с одной стороны с возрастанием уровней ФНО- α , макрофагов и Т-лимфоцитов в сравнении с показателями контрольной группы, с другой абсолютное увеличение макрофагов и Т-лимфоцитов находится в тесной связи с относительным уменьшением макрофагов с высокой экспрессией и Т-хелперов. Установить корреляционную связь между показателями тяжести состояния больных псориазом и воспалением не удалось.

Очевидно, что иммуносупрессивное действие ультрафиолетового облучения может модифицировать иммунный ответ и интегрировать параметры системного и локального воспаления с клиническими критериями течения псориаза.

Следующим этапом работы стал анализ корреляционной связи между иммунологическими показателями воспаления и клиническими параметрами тяжести состояния больных псориазом на 21 сутки лечения NB-UVB терапией (табл.2).

На 21 сутки (табл. 2) возрастание уровня ФНО- α связано увеличением макрофагов со слабой экспрессией ($r=0,20$, $P<0,05$), уровни которых положительно коррелируют с макрофагами общего пула ($r=0,62$, $P<0,05$) и высокой экспрессией ($r=0,25$, $P<0,05$). Возрастание уровней Т-хелперов (CD4) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8) имело положительную корреляционную связь ($r=0,24$, $P<0,05$), хотя соотношение CD4/8 отрицательно коррелировало с уровнем CD8 клеток ($r=-0,33$, $P<0,05$) и положительно с CD4-лимфоцитами ($r=0,46$, $P<0,05$), что свидетельствует об относительном превалировании в очаге воспаления цитотоксических Т-лимфоцитов.

Кроме того, возрастание уровня ИЛ-22 (табл. 2) связано с увеличением макрофагов общего пула ($r=0,21$, $P<0,05$) и с высокой экспрессией ($r=0,20$, $P<0,05$).

На предыдущем этапе корреляционного анализа (1 сутки) нами не было выявлено связи между клиническими и иммунологическими параметрами, что возможно связано с недостаточно большой вы-

боркой или статичностью индекса PASI. При анализе регрессии индекса PASI на 21 сутки, который отражает динамику его изменения, были выявлены, совершенно новые корреляционные связи. Так, чем больше регрессия PASI, тем меньше уровень мак-

рофагов ($r=-0,28$, $P<0,05$) и CD4, CD8 лимфоцитов ($r=-0,26$, $P<0,05$). В свою очередь показатель качества жизни DLQI положительно коррелирует с уровнем макрофагов ($r=0,20$, $P<0,05$), Т-хелперов ($r=0,23$, $P<0,05$) и индексом PASI ($r=0,22$, $P<0,05$).

Таблица 2

Коэффициенты парной корреляции Кендалла у больных псориазом на 21 сутки

Переменные	ФНО- α	ИЛ-6	ИЛ-22	СЭ, CD68	ВЭ, CD68	Всего, CD68	CD4	CD8	CD4/8	PASI	ИР PASI %	DLQI
Основная группа (n=69)												
M \pm m	21,68 \pm 1,36	11,15 \pm 1,01	29,26 \pm 1,84	18,0 \pm 0,69	22,0 \pm 0,81	40,0 \pm 1,25	20,0 \pm 0,98	30,0 \pm 1,40	0,71 \pm 0,05	9,6 \pm 0,56	53,7 \pm 1,24	8,0 \pm 0,46
ФНО- α	-	-	-	0,20	-	0,17	-	-	-	-	-	-
ИЛ-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ИЛ-22	-	-	-	-	0,20	0,21	-	-	-	-	-0,17	-
СЭ, CD68	0,20	-	-	-	0,25	0,62	-	-	-	0,17	-0,22	0,20
ВЭ, CD68	-	-	0,20	0,25	-	0,68	-	-	-	-	-0,25	0,17
Всего, CD68	0,17	-	0,21	0,62	0,68	-	0,17	-	-	-	-0,28	0,20
CD4	-	-	-	-	-	0,17	-	0,24	0,46	0,18	-0,26	0,23
CD8	-	-	-	-	-	-	0,24	-	-0,33	-	-0,26	0,17
CD4/8	-	-	-	-	-	-	0,46	-0,33	-	-	-	-
PASI	-	-	-	0,17	-	-	0,18	-	-	-	-0,17	0,22
ИР PASI %	-	-	-0,17	-0,22	-0,25	-0,28	-0,26	-0,26	-	-0,17	-	-0,36
DLQI	-	-	-	0,20	0,17	0,20	0,23	0,17	-	0,22	-0,36	-
Контрольная группа												
M \pm m	3,65 \pm 0,40	2,63 \pm 0,37	5,38 \pm 0,64	6,50 \pm 0,34	5,00 \pm 0,42	11,60 \pm 0,52	14,50 \pm 1,08	15,90 \pm 1,05	0,91 \pm 0,02	-	-	-

Примечание: выведены значения коэффициентов, отличные от 0 ($P<0,05$).

Таким образом, определение индексов качества жизни DLQI и регрессии PASI в сочетании с идентификацией уровня экспрессии тканевых макрофагов и Т-лимфоцитов в очаге хронического воспаления может служить клинико-лабораторным критерием, позволяющим определить эффективность NB-UVB терапии у больных псориазом.

ВЫВОДЫ

1. На 1 сутки корреляционную связь между показателями тяжести состояния больных псориазом и воспалением отсутствует.

2. Иммуносупрессивное действие ультрафиолетового облучение на 21 сутки модифицирует иммунный ответ и приводит к интеграции параметров воспаления с клиническими критериями течения псориаза. На 21 сутки значение индекса качества жизни положительно коррелирует с уровнем макрофагов ($r=0,20$, $P<0,05$), Т-хелперов ($r=0,23$, $P<0,05$) и индексом PASI ($r=0,22$, $P<0,05$), а увеличение регрессии индекса PASI с уменьшением экспрессии CD68 клеток ($r=-0,28$, $P<0,05$) и CD4, CD8 лимфоцитов ($r=-0,26$, $P<0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Lebwohl M Psoriasis. // Lancet. – 2003. –

Vol. 361. – P.1197–204.

2. Ibrahim G, Waxman R, Helliwell PS. The prevalence of psoriatic arthritis in people with psoriasis. // Arthritis and Rheumatism. – 2009. – Vol. 61, N10. – P.1373-1378.

3. Mosser DM, Edwards JP Exploring the full spectrum of macrophage activation. // Nat Rev Immunol. – 2008. – N. 8. – P. 958–969.

4. Mantovani A, Sica A, Sozzani S et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. // Trends Immunol. – 2004. – Vol. 25. – P. 677–686.

5. Teunissen MB, Piskin G, Res PC, de Groot M Picavet DI et al. State of the art in the immunopathogenesis of psoriasis. // G Ital Dermatol Venereol. – 2007. – Vol. 142. – P. 229–242.

6. J. Fuentes-Duculan, M. Suarez-Farinas, L. C. Zaba A Subpopulation of CD163-Positive Macrophages Is Classically Activated in Psoriasis // Journal of Investigative Dermatology. – 2010. – Vol. 130. – P. 2412–2422.

7. Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Steinman RM et al. Normal human dermis contains distinct populations of CD11cBDCA-1 dendritic cells and CD163FXIIIA macrophages. // J Clin Invest – 2007.

– Vol.117. – P. 2517–2525.

8. Vissers WH, Arndtz CH, Muys L, Van Erp PE, De Jong EM, et al. Memory effector (CD45RO+) and cytotoxic (CD8+) T cells appear early in the margin zone of spreading psoriatic lesions in contrast to cells expressing natural killer receptors, which appear late. // *Br J Dermatol.* – 2004. – Vol. 150. – P. 852–859.

9. Carrascosa JM, Tapia G, Bielsa I et al. Effects of narrowband UV-B on pharmacodynamic markers of response to therapy: an immunohistochemical study over sequential samples. // *J Cutan Pathol.* – 2007. – Vol. 34. – P. 769–776.

10. Erkin G, Ugur Y, Gurer CK et al. Effect of PUVA, narrow-band UVB and cyclosporin on inflammatory cells of the psoriatic plaque. // *J Cutan Pathol.* – 2007. – Vol.34. – P. 213–219.

11. Tjioe M, Smits T, van de Kerkhof PC et al. The differential effect of broad band vs narrow band UVB with respect to photodamage and cutaneous inflammation. // *Exp Dermatol.* – 2003. – Vol. 12. – P. 729–733.

12. Goettsch W, Hurks HM, Garssen J et al. Comparative immunotoxicology of ultraviolet B exposure I. Effects of in vitro and in situ ultraviolet B exposure on the functional activity and morphology of Langerhans cells in the skin of different species. // *Br J Dermatol.* – 1998. – Vol. 139. – P. 230–238.

13. Finlay AY, Khan GK. Dermatology Life Quality Index (DLQI)—a simple practical measure for routine clinical use. // *Clin Exp Dermatol.* – 1994. – Vol. 19. – P. 210-216.

14. Alice N. Do, John Y.M. Koo Initiating Narrow-band UVB for the Treatment of Psoriasis // *Journal for national psoriasis foundation.* – 2004. – Vol.10, N 1 – P. 1-6.

15. Пинсон И.Я. Иммунопатологические механизмы псориаза и их коррекция при фототерапии УФБ лучами (308 нм) эксимерным лазером: Дис. д. мед. наук. – Москва, 2006. – 183 с.

16. Cozzi R. Aspetti immunologic della psoriasis / R.Cozzi, B.Denter, S.Tranchese et al. // *Chron Dermatol.* – 1985. – Vol. 16, №1. – С.33-38.