

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТЧНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ КРАСНЫМ ПЛОСКИМ ЛИШАЕМ И ВЛИЯНИЕ НА НЕГО ИММУНОМОДУЛЯТОРА ЛИКОПИДА

Л. М. Ханухова, О. Ф. Рабинович, Н. М. Голубева, К. Ф. Хамидуллина, С. В. Климова, Б. В. Пинегин

ГНЦ — Институт иммунологии Минздрава РФ ЦНИИ стоматологии Минздрава России, Москва

Красный плоский лишай (КПЛ) является хроническим воспалительным процессом эпителия кожи и слизистой полости рта аутоиммунной природы [8]. В инициации данного заболевания существенная роль принадлежит клеткам Лангерганса. В результате активации эти клетки приобретают способность представлять Т-клеткам аутоантигены и продуцировать ряд провоспалительных цитокинов: интерлейкин (ИЛ)-1, ИЛ-6, фактор некроза опухоли (ФНО) и ряд других. Последние вызывают синтез на клетках эндотелия молекул адгезии (ICAM-1), способствующих миграции нейтрофилов и лимфоцитов в пораженный участок, и активируют продукцию Th1-лимфоцитами другого провоспалительного цитокина — γ -интерферона (γ -ИФН). В свою очередь все это ведет к инфильтрации пораженного участка кожи или слизистой оболочки Т-лимфоцитами и, прилипанию их к кератиноцитам и разрушению последних [16, 21].

На ранних этапах заболевания в пораженных участках преобладают Т-клетки CD4⁺, на поздних — CD8⁺ [10]. Большую роль в этиопатогенезе КПЛ играют и сами кератиноциты: после активации они продуцируют провоспалительные цитокины в значительно большем количестве, чем мононуклеарные клетки, инфильтрирующие пораженные ткани [21, 22]. В конечном счете КПЛ можно отнести к таким аутоиммунным процессам, в этиопатогенезе которых главная роль принадлежит Th1-клеткам (воспалительным Т-хелперам CD4⁺), вызывающим воспалительный процесс типа гиперчувствительности замедленного типа [20]. Как известно, главным маркерным цитокином этой популяции клеток является γ -ИФН [12], который, как уже указывалось, в значительной степени опосредует имеющиеся при КПЛ иммунопатологические явления. В связи с этим были предприняты попытки [9, 11] лечить КПЛ с помощью α -ИФН, вызывающего хороший клинический эффект при ряде других Th1-опосредованных аутоиммунных заболеваний — рассеянном склерозе и ревматоидном артрите [1, 15, 19]. Были предприняты попытки успешного лечения КПЛ с помощью некоторых иммуномодуляторов, в частности диэтилдитиокарбамата, повышающего функциональную активность Т-лимфоцитов [17].

Целью настоящего исследования было изучение клеточного иммунитета у больных с различными формами КПЛ и влияния на него нового отечественного иммуномодулятора ликопида. Этот иммуномодулятор вызывает хороший клинический эффект при ряде заболеваний, связанных с нарушениями иммунной системы [2], в частности, при некоторых аутоиммунных заболеваниях кожи [3].

Методика исследований. В основную группу были включены 42 пациента с КПЛ — 32 женщины и 10 мужчин в возрасте от 20 до 60 лет. Продолжительность заболевания у них колебалась от 6 мес до 10 лет. Контрольную группу составили 42 здоровых донора в возрасте от 20 до 60 лет. У всех больных исследовали иммунный статус по методологии, принятой в ГНЦ — Институте иммунологии Минздрава РФ [5]. Наиболее подробно методические подходы описаны Р. М. Хаитовым и соавт. [6].

Больные получали ликопид в таблетках (производство ЗАО "Пептек") по 10 мг 2 раза в день внутрь за 30—40 мин до еды в течение 10 дней. Перед началом и через 3—5 сут после

окончания лечения у больных исследовали иммунологические показатели. Наблюдения за клиническим состоянием больных вели в течение 1 года.

Материалом для исследования служила периферическая кровь, взятая из кубитальной вены с гепарином (25 БД/мл). Использовали мононуклеары, выделенные из периферической крови с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколла-пика, $d=1,077$ ("Fannacia").

Для определения популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов использовали набор моноклональных антител (МКАТ) "Simultest IMK-Lymphocyte" ("Becton Dickinson"). Результаты учитывали с помощью проточного цитометра "FACSCalibur" ("Becton Dickinson") по программе "Simulset" в специально составленной панели.

При постановке пролиферативного теста мононуклеары периферической крови культивировали в 96-луночных планшетах ("Flow") в количестве 200 тыс. на лунку в полной ростовой среде (ПРС), состоящей из среды RPMI-1640 ("Flow"). 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки ("Flow"), 10 мМ HEPES-буфера ("Flow"). 2 мМ L-глутамина (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН) и 50 мкг/мл гентамицина ("Pharmacia"). В опытные лунки добавляли ФГА ("Serva") в дозе 10 мкг/мл или митоген лаконоса ("Serva") в дозе 10 мкг/мл. В контрольные лунки вносили эквивалентное количество ПРС. Реакцию учитывали с помощью радиометрического метода с применением ^3H -тимидина в дозе 1 мКи на жидкостном сцинтилляционном β -счетчике ("β-Track").

Для выявления раннего активационного маркера лимфоцитов CD69 мононуклеары, полученные по описанной выше методике, инкубировали в ПРС при 37°C в течение 4 ч в присутствии ФГА в концентрации 10 мкг/мл. После инкубации определяли экспрессию маркера CD69 отдельно на лимфоцитах CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺, используя набор МКАТ "Fast Immune" ("Becton Dickinson"). Определяли процент клеток, несущих маркер CD69, с помощью трехцветного цитометрического анализа в программе "Cell Quest" на проточном цитометре "FACSCalibur" ("Becton Dickinson").

Для выявления лимфоцитов, содержащих внутриклеточные цитокины, использовали методику T. Yung и соавт. [23], которая заключается в следующем. В ПРС культивировали 100 мкл мононуклеаров в концентрации 2 млн клеток на 1 мл в 96-луночных плоскодонных планшетах ("Nunc") с двумя поликлональными активаторами лимфоцитов — форболмириастата ацетатом — ФМА ("Sigma") в концентрации 10 нг/мл и иономицином в концентрации 1 мМ (Sigma) в присутствии 3 мкМ моненсина ("Sigma"). Последний подавляет секрецию цитокинов и способствует их накоплению в клетке. Планшеты инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 6 ч. После окончания инкубации клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида ("Sigma"), пермеабелизировали 0,1 % раствором сапонины ("Sigma") и окрашивали для определения иммунофенотипа клетки анти-CD3-МКАТ, меченными ФИТЦ, а для определения внутриклеточных цитокинов — анти- γ -ИФН-МКАТ, меченными фикоэритрином (ФЭ) или анти-ИЛ-4-МКАТ, меченными ФЭ. Использовали МКАТ фирмы "Becton Dickinson". Определяли процент клеток, несущих поверхностный CD3-антиген (зеленое свечение), и среди них — процент клеток, содержащих в цитоплазме γ -ИФН или ИЛ-4 (красное свечение) с помощью двухцветного анализа в программе "Cell Quest" на проточном лазерном цитометре "FACSCalibur" ("Becton Dickinson").

Для определения способности секретировать цитокины лимфоциты, выделенные по описанной выше методике, культивировали с ФГА ("Serva") в дозе 10 мкг/мл в течение 24 ч. В супернатанте определяли цитокины с помощью двухцентрового иммуноферментного метода, используя набор фирмы R&D для определения γ -ИФН и набор фирмы "Протеиновый контур" (СПБ) для определения ИЛ-4.

Результаты и обсуждение. При изучении популяционного состава было установлено, что содержание основных клеточных популяций лимфоцитов периферической крови больных КПЛ — Т-, В- и НК-клеток находилось в пределах нормы (табл. 1). В

пределах нормы находились также и уровни активированных лимфоцитов — CD3⁺HLA-DR⁺ и CD3⁺HLA-DR⁺. В то же время у больных КПЛ наблюдалась отчетливая тенденция к повышению количества CD8⁺-клеток, которая в силу большого разброса данных не была статистически значимой.

Таблица 1

Показатели клеточного иммунитета у больных КПЛ до и после лечения ликопидом

| Показатель | Норма | До лечения ЛИКОПИДОМ | После лечения ЛИКОПИДОМ |
|---|---------------|-------------------------|----------------------------|
| CD3 ⁺ , % | 69 ± 1,3 | 63 ± 12 | 65 ± 13 |
| CD4 ⁺ , % | 40 ± 0,9 | 41 ± 7 | 35 ± 12 |
| CD8 ⁺ , % | 28 ± 0,9 | 37 ± 9 | 42,5 ± 11 |
| ИРИ | 1,5 ± 0,12 | 1,2 ± 0,5 | 0,9 ± 0,3 |
| CD3 ⁺ HLA-DK ⁺ , % | 15,4 ± 2,6 | 18 ± 8 | 13 ± 4 |
| CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , % | 6,6 ± 4,3 | 6,3 ± 5,4 | 12 ± 5,5 |
| CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ | 14,5 ± 4,1 | 18 ± 8 | 21 ± 11,5 |
| CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ | 4,7 ± 2,8 | 6,3 ± 5,4 | 8,4 ± 6,4 |
| CD19 ⁺ | 11,6 ± 4,1 | 11,2 ± 4 | 9,5 ± 5 |
| CD3 ⁺ CD69 ⁺ | н.д. | 39,1 ± 12,8 | 50,5 ± 9,04** |
| CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺ | 19,5 ± 1,7 | 21,05 ± 10,7 | 26,5 ± 10,1 |
| CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺ | 22,6 ± 2,7 | 18,5 ± 6,6 | 27,7 ± 10,7** |
| Спонтанная пролиферация, имп/мин | 855 ± 501 | 895 ± 374 | 823 ± 412 |
| Пролиферативный ответ на ФГА, имп/мин | 47646 ± 15792 | 26 639 ± 21178* | 25339 ± 14289 |
| Пролиферативный ответ на митоген лаконоса, имп/мин | 11478 ± 3749 | 7740 ± 5395 | 6943 ± 3530 |

Примечание. Н.д. — не делали, ИРИ — иммунорегуляторный индекс. Одна звездочка — $p < 0,05$ между показателями в норме и у больных КПЛ, две звездочки — $p < 0,01$ между показателями до и после лечения.

Однако при таких формах заболевания, как эрозивно-язвенная и буллезная, характеризующихся особой тяжестью и остротой воспалительного процесса, различия по сравнению с контрольной группой были статистически значимыми (данные не представлены). Возможно, это повышение имеет отношение к этиопатогенезу заболевания. В настоящее время имеются данные о роли Т-лимфоцитов CD8⁺ в повреждении кожи при развитии в ней иммунопатологических процессов. Цитотоксические клетки CD8⁺ всегда присутствуют в псориазных бляшках, и при их персистенции не происходит разрешения

патологического процесса. Повышенный уровень Т-клеток CD8⁺ наблюдается и в пораженных участках кожи при КПЛ [10].

При изучении пролиферативного ответа на ФГА было выявлено его снижение, что указывает на подавление функциональной активности Т-лимфоцитов (см. табл. 1). Наибольшее снижение этой активности происходило при язвенно-эрозивной форме, характеризующейся, как уже отмечалось, наибольшей остротой и тяжестью течения заболевания. Снижение пролиферативной активности лимфоцитов на Т-митогены выявляется при других аутоиммунных процессах, особенно при тех, в этиопатогенезе которых ведущая роль принадлежит Th1-клеткам, — при рассеянном склерозе и ревматоидном артрите [1, 7].

При изучении активационного маркера CD69 на лимфоцитах больных КПЛ, стимулированных ФГА (см. табл. 1), установлено, что после лечения ликопидом происходило статистически значимое повышение его уровня на Т-лимфоцитах CD3⁺ и CD3⁺CD8⁺. Увеличение экспрессии CD69 наблюдалось также и на Т-лимфоцитах, CD3⁺CD4⁺, но оно не было статистически значимым.

При изучении цитокинсодержащих клеток, активированных ФМА и иономицином, установлено, что процент лимфоцитов, содержащих в цитоплазме ИЛ-4, был крайне низким и существенно не отличался от такового у здоровых доноров (табл. 2). Лечение ликопидом не изменяло процент клеток, содержащих этот цитокин. Противоположная картина наблюдалась при изучении γ -ИФН-содержащих клеток. Оказалось, что процент лимфоцитов и CD3⁺-лимфоцитов, содержащих этот цитокин, статистически значимо был повышен у больных КПЛ (см. табл. 2). После проведенного лечения ликопидом процент γ -ИФН-содержащих лимфоцитов снижался ($p < 0,05$). Процент CD3⁺-лимфоцитов, содержащих этот цитокин, также имел тенденцию к снижению ($p < 0,1$).

Таблица 2

Цитокинсодержащие клетки в периферической крови больных КПЛ до и после лечения ликопидом

| Лимфоциты | Норма | До лечения ликопидом | После лечения ликопидом |
|---|-----------|----------------------|-------------------------|
| ИЛ-4-содержащие | н.д. | 4,4 ± 5,8 | 6,1 ± 4,7 |
| ИЛ-4-содержащие CD3 ⁺ | 1,3 ± 0,6 | 3,4 ± 4,5 | 5,3 ± 4,7 |
| γ -ИФН-содержащие | 8,4 ± 1,3 | 26,8 ± 6,5* | 21,5 ± 4,6** |
| γ -ИФН-содержащие CD3 ⁺ | 6,7 ± 0,8 | 21,1 ± 5,9* | 17,0 ± 3,4*** |

Примечание. Н. д. — не делали. Одна звездочка — $p < 0,05$ между показателями в норме и у больных КПЛ; две звездочки — $p < 0,05$, три — $p < 0,1$ при сравнении показателей до и после лечения.

Таблица 3

Синтез цитокинов мононуклеарами периферической крови больных КПЛ до и после лечения ликопидом

| Цитокин | Норма | До лечения ликопидом | После лечения ликопидом |
|----------------------|-------------|----------------------|-------------------------|
| ИЛ-4, пкг/мл | 87,5 ± 14,8 | 87,9 ± 46,03 | 155,4 ± 77,5* |
| γ -ИФН, МЕ/мл | 35,5 ± 10,1 | 95,5 ± 61,2 | 102,7 ± 81,01 |

Примечание. Звездочка — $p < 0,05$ (различия между группами больных КПЛ до и после лечения).

При изучении цитокинов в супернатанте ФГА-стимулированных клеток установлено, что мононуклеары периферической крови как здоровых доноров, так и больных КПЛ продуцировали одинаковые количества ИЛ-4 (табл. 3). После лечения ликопидом способность синтезировать этот цитокин существенно повышалась у больных КПЛ ($p < 0,01$). Продукция γ -ИФН после лечения указанным иммуномодулятором, несмотря на отчетливую тенденцию к понижению уровня клеток, содержащих в цитоплазме этот цитокин, не изменялась.

При анализе клинической картины установлено, что практически у всех больных КПЛ наблюдался выраженный положительный эффект от лечения ликопидом. При экссудативно-гиперемической форме происходило резкое уменьшение гиперемии и отечности слизистой оболочки. При эрозивно-язвенной форме существенно сокращались размеры поражения, исчезали гиперемия и отечность. В 5 из 7 случаев происходила полная эпителизация эрозий. При буллезной форме наблюдались исчезновение пузырей и отсутствие их возникновения в течение 3 мес, что считается хорошим результатом лечения при этой форме заболевания. Положительный эффект отмечен и при лечении ликопидом гиперкератотической формы.

Как уже отмечалось, КПЛ можно отнести к заболеваниям, в этиопатогенезе которых ведущая роль принадлежит Th1-лимфоцитам. В результате их активации происходит повышенный синтез цитокинов, вызывающих в коже воспалительный процесс типа гиперчувствительности замедленного типа. Ингибиторами Th1-клеток являются ИЛ-4 и ИЛ-10, продуцируемые Th2-клетками [14] и относящиеся к разряду противовоспалительных цитокинов. В связи с этим положительный клинический эффект ликопида, вероятно, обусловлен его способностью повышать продукцию Th2-клетками ИЛ-4 и снижать количество клеток, синтезирующих γ -ИФН. Так, у больного В. (типичная форма заболевания) с отличным клиническим эффектом от применения ликопида уровень γ -ИФН после лечения снизился со 137 до 14 МЕ/мл. У больной К. (экссудативно-гиперемическая форма) также с отличным клиническим эффектом процент лимфоцитов и CD3⁺-лимфоцитов, содержащих в цитоплазме γ -ИФН, составил до лечения соответственно 29 и 22, после лечения — 20 и 15. Возможно, положительный клинический эффект ликопида связан с его способностью подавлять продукцию Th1-клетками и других провоспалительных цитокинов, в частности ФНО, играющего существенную роль в развитии воспалительной реакции при КПЛ [18]. Применение ликопида у больных рассеянным склерозом вызывало подавление синтеза мононуклеарами периферической крови этих больных ФНО, играющего важную роль в этиопатогенезе данного заболевания [4].

Положительный клинический эффект ликопида у больных КПЛ мог быть также связан с его нормализующим действием на функциональную активность лимфоцитов. У этих больных наблюдалось изменение функциональной активности Т-лимфоцитов, проявляющееся снижением пролиферации, индуцированной ФГА. Ликопид, не усиливая пролиферативный ответ лимфоцитов, повышал экспрессию на них раннего активационного антигена CD69. Предварительный анализ полученных результатов позволяет говорить о наличии связи между клиническим эффектом и интенсивностью экспрессии этого антигена. Так, у больной К. с отличным клиническим эффектом до лечения ликопидом содержание CD3⁺CD69⁺ составляло 35%, после лечения — 63%. Известно, что этот антиген действует как костимулятор в процессах активации и пролиферации Т-клеток [24]. Он имеет прямое отношение к активации генов, ответственных за синтез ИЛ-2. Сигналы, поступающие с CD69, повышают продукцию этого цитокина и экспрессию на клетках CD25 — рецептора для ИЛ-2 [131]. Вероятно, повышение экспрессии CD69 под влиянием ликопида способствует нормализации функциональной активности лимфоцитов больных КПЛ, что также может быть одной из причин его положительного клинического эффекта.

Выводы

1. У больных КПЛ наблюдалось подавление функциональной активности лимфоцитов периферической крови, проявляющееся их пониженной пролиферативной активностью в отношении Т-тимогена — ФГА, причем наибольшее снижение отмечено у больных с эрозивно-язвенной и буллезной формами заболевания, характеризующимися наибольшей тяжестью клинического течения и остротой воспалительной реакции.

2. Применение ликопида повышало экспрессию на CD3⁺ и CD3⁺CD3⁺-лимфоцитах периферической крови больных КПЛ раннего активационного антигена CD69, что могло быть отражением улучшения функционального состояния этих клеток.

3. У больных КПЛ в периферической крови повышен уровень лимфоцитов и CD3⁺-лимфоцитов, содержащих в цитоплазме провоспалительный цитокин γ -ИФН. Применение ликопида вызывало значимое снижение количества лимфоцитов и CD3⁺-лимфоцитов, содержащих этот цитокин.

4. Применение ликопида повышало секрецию мононуклеарами периферической крови больных КПЛ противовоспалительного цитокина ИЛ-4.

5. Применение ликопида вызывало выраженный клинический эффект практически при всех формах КПЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусев Е. И., Демина Т. Л., Бойко А. Н. Рассеянный склероз. — М., 1997.
2. Иванов В. Т., Хаитов Р. М., Андропова Т. М., Пинегин Б. В. // Иммунология. — 1996. — № 2. — С. 4—6.
3. Короткий Н. Г., Шарова Н. М. // Актуальные вопросы дерматологии и венерологии. — СПб., 1994. — С. 64—65.
4. Пащенко М. В., Бойко А. И., Пинегин Б. В. и др. // Человек и лекарство: Тезисы докладов 5-й Всерос. нац. конгресса. — М., 1998. — С. 164.
5. Петров Р. В., Хситов Р. М., Пинегин Б. В. и др. // Иммунология. - 1992. - № 6. - С. 51-62.
6. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В., Истамов Х. И. Экологическая иммунология. — М., 1995.
7. Ярилина А. А., Ннконова М. Ф., Литвина М. М. и др. // Иммунология. — 1999. — № 3. — С. 51—55.
8. Andre J., Laporte M., Delavault P. // Acta stomat. belg. — 1990. — Vol. 87. — P. 229—231.
9. Areias J., Velho G. C., Cerqueira A. et al. // Eur. J. Gastroent. Hepatol. — 1996. — Vol. 8. - P. 325-828.
10. De Panfilis G. // Exp. Derm. - 1998. - Vol. 7. - P. 121-131.
11. Hildebrand A., Kolde G., Luger T A., Schwarz T. // J. Amer. Acad. Derm. - 1995. - Vol. 33. - P. 880-883.
12. Judich E. A., Maizels R. M. // Immunol. Today. — 1997. — Vol. 18. - P. 387-391.
13. Lio D., Candore G., Cinga D. et al. // Mech. Ageing Develop. — 1996. - Vol. 31. - P. 51-58.
14. Romagnani S. // Clin. Immunol Immunopath. — 1996. — Vol. 80. - P. 225-235.
15. Shiozawa S., Morimoto I., Tanaka X., Shiozawa K. W. // Brit. J. Rheum. — 1992. — Vol. 31. - P. 405-408.
16. Sosroseno W., Herminajeng E., Goeno S. // Asian Pac Allergy Immunol. — 1994. — Vol. 12. - P. 161-168.
17. Su. M., Qian D. H., Chen Y. H. // Chung Kuo Yao Li Hsuch Pao. — 1991. — Vol. 12. - P. 378—380.
18. Sugerma P. B., Savage N. W., Seymour G. J., Walsh L. J. // J. oral Path. Med. - 1996. - Vol. 25 - P. 219-224.
19. Taylor H. G., Nixon N., Daves B.T. // Scand. J. Rheum. — 1993. - Vol. 22. - P. 280-284.
20. Welsh L. J., Savage N. W., Ishil T., Seymour G. J. // J. oral Path. Med. — 1990. — Vol. 19. — P. 389-396.
21. Yamamoto T., Osaki T., Yoneda K., Ueta E. // Ibid. — 1994. — Vol. 23. — P. 309—315.

22. Yamamoto T., Osaki T. //J. invest. Derm. — 1995. — Vol. 104. — P. 784-788.
23. Yung T., Schauer U., Heuser C. et. al. // J. immunol. Meth. — 1993. - Vol. 159. - P. 197-207.
24. Ziegler S. F., Ramsdell F., Anderson M. R. // Stem Cells. — 1994. — Vol. 12. — P. 456—465.

Поступила 25.03.99

SPECIFIC FEATURES OF CELLULAR IMMUNITY IN PATIENTS WITH LICHEN RUBER PLANUS AND EFFECTS OF IMMUNOMODULATOR LIKOPIDE – *L. M. Khanukhova, O. F. Rabinovich, N. M. Golubeva, K. F. Khamidullina, S. V. Klimova, B. V. Pinegin*

Summary. Clinical and immunological efficacy of likopide was studied in patients with lichen niber planus (LRP). They have high peripheral blood levels of lymphocytes and CD3+ cells. Cytoplasm of the above cells contain a proinflammatory cytokin — gamma-interferon. Likopide treatment diminished the number of lymphocytes abd CD3+ cells containing this cytokine/Lymphocytic interleukin-4 content in LRP patients did not differ from that in healthy donors. In LRP patients likopide stimulated secretion of this interleukin by peripheral blood mononuclear cells and enhanced expression of early activation antigen CD69 on CD3+ and CD3+CD8+ lymphocytes of peripheral blood indicating improvement in the function of these cells. Likopide treatment appeared effective in many forms of LRP. It is suggested that a positive effect of this immunomodulator may be due to inhibition of activity of Th1 cells producing proinflammatory cytokines; enhancement of functional activity of Th2-cells producing antiinflammatory cytokines; normalization of functional activity of T-lymphocytes which consists in high expression of early activation antigen CD69 involved in production of interleukin-2.