

УДК 616.517:612.112.94-074:57.083-08

© В.А. Бабанин, 2012.

## ОСОБЕННОСТИ Т-КЛЕТОЧНОГО ИНФИЛЬТРАТА В КОЖЕ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ ПРИ NB-UVB (311 НМ) ТЕРАПИИ

В.А. Бабанин

ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского», кафедра кожных и венерических болезней (зав. – проф. О.А. Притуло), г. Симферополь.

### FEATURES OF T-CELL INFILTRATION IN THE SKIN OF PSORIASIS PATIENTS DURING NB-UVB (311 NM) THERAPY

V.A. Babanin

#### SUMMARY

In 55 patients with plaque psoriasis were studied by immunohistochemistry of skin biopsies with the definition of CD3, CD4, CD8 T-lymphocytes. The patients were divided into two groups: Group 1 - 27 patients who used only standard treatment, group 2 - 28 patients who underwent standard treatment and NB-UVB (311nm) therapy. The use of standard and NB-UVB therapy significantly reduced the level of expression of T-lymphocytes, mainly cytotoxic T lymphocytes in the inflammatory infiltrate of the skin with plaque psoriasis in compare to the group of patients, where they spent only standard treatment. Ratio index CD4/CD8 - 0,74 a threshold diagnostic criterion for the adequacy of the treatment.

### ОСОБЛИВОСТІ Т-КЛІТИННОГО ІНФІЛЬТРАТУ В ШКІРІ ХВОРИХ НА ПСОРІАЗ ПРИ NB-UVB (311 НМ) ТЕРАПІЇ

В.А. Бабанін

#### РЕЗЮМЕ

У 55 хворих на бляшковий псоріаз імуногістохімічним методом досліджені біоптати шкіри з визначенням CD3, CD4, CD8 Т-лімфоцитів. Усі хворі були розділені на дві групи: 1 група - 27 хворих, у яких використовувалося тільки стандартне лікування; 2 група - 28 хворих, у яких проводилося стандартне лікування і NB-UVB (311нм) терапія. Використання стандартної і NB-UVB терапії достовірно знижує рівень експресії Т-лімфоцитів, переважно цитотоксичних Т-лімфоцитів у запальному інфільтраті шкіри при бляшковому псоріазу по відношенню до групи хворих, де проводилося тільки стандартне лікування. Індекс співвідношення CD4/CD8 - 0,74 є пороговим діагностичним критерієм адекватності проведеного лікування.

**Ключевые слова:** псориаз, лимфоциты, иммуногистохимия, NB-UVB терапия.

Несмотря на огромное количество работ, посвященных проблеме псориаза, этиология и многие стороны патогенеза этого заболевания остаются не выясненными [7, 10]. В то же время, в последние годы в фундаментальной медицине были сделаны открытия, которые позволяют по-новому рассмотреть роль известных патогенетических механизмов с позиций взаимосвязи местного и системного иммунного ответа иммунитета, отклонения которых выявляют при псориазе [12, 14, 18, 23, 25].

Данные многих исследователей свидетельствуют о важной роли в развитии воспалительного процесса в коже больных псориазом иммунных реакций, опосредованных Т-лимфоцитами [1, 2, 5, 13, 14, 16, 18, 23]. В частности, установлено повышенное содержание CD4+ и CD8+ лимфоцитов в коже больных псориазом, по сравнению со здоровой кожей [1, 17, 24]. Однако результаты исследований весьма противоречивы: одни авторы отмечают преобладание CD4+ лимфоцитов, другие CD8+.

По данным Cozzi R. и соавторов нарушения клеточного звена иммунитета при прогрессирующей стадии псориаза выражаются как в снижении общего количества лимфоцитов, так и в сдвиге соотношения

популяций Т-хелперы/Т-цитотоксические в сторону преобладания Т-хелперного звена [18]. Изучение распределения субпопуляций Т-лимфоцитов в крови и пораженной коже выявило перемещение Т-хелперов в кожный покров. При этом инфильтраты в очагах поражения состояли исключительно из Т-хелперов и небольшого количества макрофагов [15]. Baker В. установил, что во внешне неизменной коже больных псориазом количество цитотоксических Т-лимфоцитов в 3-5 раз выше, чем в зоне поражения [14].

Мак В. В. при исследовании эффекта комбинированной ПУВА-терапия с эксимерным лазером показал подавление иммунопатологической реакции в коже, о чем свидетельствуют снижение экспрессии Т-лимфоцитов (CD3+) в дермальном инфильтрате, усиление супрессорной активности Т-лимфоцитов (CD8+) с преобладанием цитотоксических Т-лимфоцитов над Т-хелперами и снижение пролиферативной активности в виде нормальной экспрессии Ki 67 [6, 8, 9].

С другой стороны Катунина О. Р. определила в коже больных бляшечным псориазом преобладание CD8+ клеток над CD4+ лимфоцитами вне зависимости от давности заболевания, его распространенности,

пола и возраста больных [3]. Такие же результаты получили Sabrijan и соавторы [17].

Таким образом, фенотипические особенности Т-лимфоцитов в псориатическом воспалительном инфильтрате дискутабельны, четко не отражают патогенетические механизмы псориатического процесса, в зависимости от этого и точки приложения терапевтических воздействий на очаг поражения.

С учетом роли Т-лимфоцитов в иммунологическом механизме развития заболевания, особый интерес представляют методы лечения, способные корректировать иммунные нарушения [19]. Одним из таких методов является NB-UVB (narrow-band ultraviolet-B, 311 нм), который приводит к транзиторному подавлению иммунных реакций в очагах воспаления [8, 9, 22]. Данные о механизмах иммуносупрессивного влияния на лимфоциты имеют неоднозначное мнение и требуют более глубокого детального анализа с учетом фенотипических особенностей клеток воспалительного инфильтрата [8, 9, 21, 22, 25], что и определяет актуальность изучаемой проблемы.

В доступной литературе имеются единичные работы по изучению действия и эффективности фототерапии 311 нм у больных псориазом, поэтому необходимо дальнейшее изучение механизма действия этого метода, его безопасности и эффективности.

Цель работы: изучить влияние NB-UVB на качество и уровень Т-клеточного воспалительного инфильтрата в коже больных бляшечным псориазом.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для исследования – биоптаты кожи, взятые у 55 больных с бляшечным псориазом, которые наблюдались в учебно-научно-лечебном комплексе «Университетская клиника» ГУ «КГМУ имени С.И. Георгиевского», г. Симферополь. Каждый пациент получал подробную информацию о проводимом исследовании и давал информированное согласие на участие в исследовании. Диагностика и лечение больных с псориазом проводилась в соответствии протоколу утвержденном приказом МОЗ Украины №312 от 08.05.2009 г.

Все пациенты с бляшечным псориазом были разделены путем случайной выборки на 2 группы в зависимости от схемы лечения. В 1 группу вошли 27 больных, у которых использовалось только стандартное лечение; во 2 группу – 28 больных, у которых проводилось стандартное лечение и NB-UVB (311 нм) терапия.

Стандартное лечение включало назначение седативной, дезинтоксикационной, гипосенсибилизирующей, гепатопротекторной, вегетотропной и местной терапии.

NB-UVB терапию проводили с использованием прибора Series X311-8 (серийный номер: НО 5048-SNBX-0008, тип контролера: Flex) производства фирмы Daavlin, США. NB-UVB (311 нм) назначалась 3 раза в неделю, при этом использовалась стартовая доза 0,1-0,3 J/cm<sup>2</sup> и средняя кумулятивная доза от 30 до 60 J/cm<sup>2</sup>.

Контрольную группу составили 28 условно здоровых волонтеров сопоставимых по возрасту с опытной группой.

На первый день поступления и 21 день от начала проведения терапии всем пациентам производилась биопсия кожи с периферии псориатических элементов. Из всех биоптатов кожи по стандартным методикам были приготовлены парафиновые срезы толщиной не более 3-5 мкм, которые окрашивались гематоксилином и еозином [11].

Иммуногистохимическое исследование биоптатов выполнялись на серийных парафиновых срезах кожи иммунопероксидазным методом в соответствии со стандартными протоколами [20]. Иммуногистохимическая панель включала в себя следующие антитела: CD4 (Clone 4B12), CD8 (Clone C8/144B) (DakoCytomation). 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.

Морфометрическое исследование включало подсчет позитивных клеток в 5 полях зрения при увеличении 200. Полученные данные пересчитывали на 1 мм<sup>2</sup> 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, сравнение центральных тенденций двух независимых выборок с использованием W-критерия Вилкоксона и сравнение средних двух независимых выборок по критерию Стьюдента. Для множественного сравнения непараметрических данных использовали ранговый однофакторный анализ Крускала-Уоллиса и критерий Дана [4].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологическое исследование биоптатов кожи больных бляшечной формой псориаза (стационарная стадия) позволило определить характерные признаки, достаточно описанные в научно-практической литературе [5, 13], а именно – воспаление и

эпидермальная пролиферация клеточных элементов. По данным литературы [5, 13] в нормальной коже всегда присутствует небольшое количество Т-лимфоцитов, которые, как правило, располагаются вокруг посткапиллярных венул поверхностного сплетения или придатков кожи. Соотношение хелперы/супрессоры в неповрежденной дерме по разным авторам составляет 0,93-0,96 [3]. В нашем исследовании в контрольной группе здоровых волонтеров индекс соотношения хелперы/супрессоры составил  $0,91 \pm 0,02$  ( $P=0,29$ ).

Иммуногистохимические реакции с моноклональными антителами CD4 и CD8 на 1 сутки исследования в обеих группах характеризовались резким повышением клеток лимфоцитарного ряда в дермальном инфильтрате с преобладанием цитотоксических CD8 позитивных Т-лимфоцитов, обнаруживаемых в количестве  $87,52 \pm 3,36$  и  $89,46 \pm 4,73$  в 5 полях зрения при увеличении микроскопа 200. CD4 Т-лимфоциты – хелперы определялись в количестве  $27,22 \pm 1,25$  и  $26,57 \pm 1,26$ . Индекс соотношения хелперы/супрессоры составил  $0,32 \pm 0,02$  и  $26,68 \pm 1,95$  (табл.1).

Таблица 1

**Уровень экспрессии CD4- и CD8- лимфоцитов в воспалительном инфильтрате кожи больных псориазом на 1 и 21 сутки исследования**

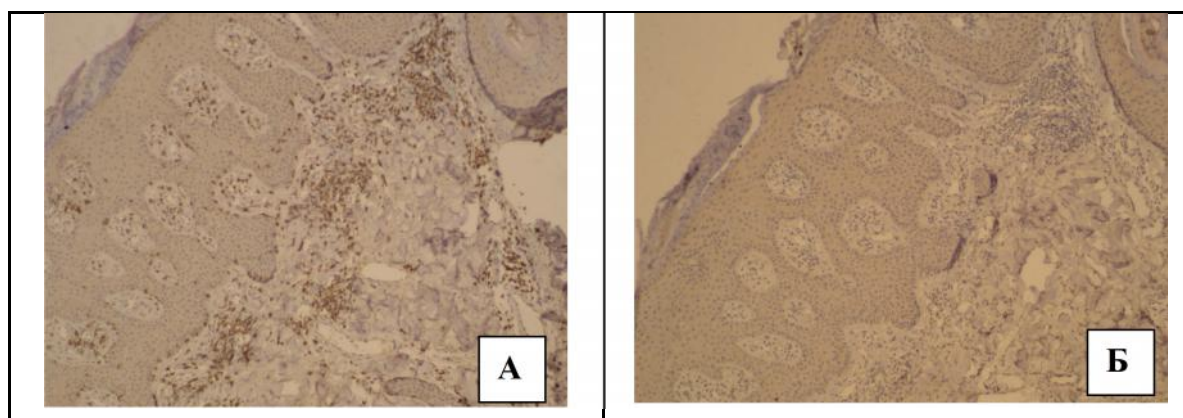
| Экспрессия CD | Контр. Группа (n=10) | 1 группа (n=27)    |                       | 2 группа (n=28)    |                       |
|---------------|----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
|               |                      | 1 сутки            | 21 сутки              | 1 сутки            | 21 сутки              |
| CD4           | $14,50 \pm 1,08$     | $27,22 \pm 1,25^*$ | $25,37 \pm 1,19^{\#}$ | $26,57 \pm 1,26^*$ | $16,64 \pm 1,41^{\#}$ |
|               |                      | P=0,29             |                       | P<0,01             |                       |
| CD8           | $15,90 \pm 1,05$     | $87,52 \pm 3,36^*$ | $53,44 \pm 3,06^{\#}$ | $89,46 \pm 4,73^*$ | $26,68 \pm 1,95^{\#}$ |
|               |                      | P<0,01             |                       | P<0,01             |                       |
| CD4/ CD8      | $0,91 \pm 0,02$      | $0,32 \pm 0,02^*$  | $0,52 \pm 0,04^{\#}$  | $0,34 \pm 0,02^*$  | $0,74 \pm 0,10^{\#}$  |
|               |                      | P<0,01             |                       | P<0,01             |                       |

Примечание: \* – достоверность отличия значений группы 1, 2 от контроля ( $P<0,01$ ); # – достоверность отличия между значениями группы 1 и 2 на 21 сутки ( $P<0,05$ ).

При гистологическом исследовании на фоне стандартной и NB-UVB (311нм) терапии в биоптатах кожи на 21 день исследования отмечалось уменьшение объема воспалительного инфильтрата, а показатели лимфоцитов обоих фенотипов снижались, особенно во 2 основной группе, где уровень CD4 Т-лимфоцитов составил  $16,64 \pm 1,41$ , а CD8 Т-лимфоцитов -  $26,68 \pm 1,95$ , что почти в 4 раза

меньше, чем до лечения. Причем индекс соотношения хелперы/супрессоры (CD4/CD8) повышался более чем в 2 раза по сравнению с первым днем исследования и составил  $0,74 \pm 0,10$ .

Все показатели имели достоверное отличие от контроля ( $P<0,01$ ) и между значениями группы 1 и 2 на 21 сутки ( $P<0,05$ ).



**Рис. 1. Фрагмент кожи. 2 группа больных псориазом. 21 сутки исследования. Экспрессия CD8 (А)- и CD4 – лимфоцитов (Б), локализующихся в дерме с преобладанием в инфильтрате Т-лимфоцитов супрессоров. ИГХР. Система визуализации FLEX. Ув. 20<sup>x</sup>.**

Таким образом, узкополосная фототерапия, уменьшая количество Т лимфоцитов, преимущественно за счет CD8 лимфоцитов, объясняет клинический эффект регресса псориатических элементов за счет цитостатического эффекта на Т-клеточную инфильтрацию в очагах поражения при бляшечном псориазе, тем самым подавляя иммунопатологическую реакцию в коже. Индекс соотношения хелперы/супрессоры (CD4/CD8) 0,74 можно считать объективным показателем эффективности терапии и иммуногистохимическим пороговым критерием адекватности проводимого лечения.

#### ВЫВОДЫ

1. Использование стандартной и NB-UVB терапии достоверно снижает уровень экспрессии Т-лимфоцитов, преимущественно цитотоксических Т-лимфоцитов в воспалительном инфильтрате кожи при бляшечном псориазе по отношению к группе больных, где проводилось только стандартное лечение.

2. Индекс соотношения хелперы/супрессоры (CD4/CD8) 0,74 является пороговым диагностическим критерием адекватности проводимого лечения.

**Перспективы дальнейших исследований.** С учетом полученных данных о количестве и фенотипических особенностях Т-лимфоцитарного инфильтрата в биоптатах кожи больных бляшечным псориазом необходимо изучить клиническую эффективность NB-UVB терапии, их взаимосвязь с макрофагальным компонентом воспалительного инфильтрата и содержанием цитокинового профиля в системном кровотоке.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вавилов А.М. Иммунологические исследования Т-лимфоцитов в коже больных псориазом / А.М.Вавилов, В.А.Самсонов, Л.Е.Димант и др. // Вестн. дерматол. – 2000. – №4. – С.4-5.

2. Городилов Р.В. Морфологическая характеристика клеточного обновления эпидермиса и иммунофенотипа клеток воспалительного инфильтрата в различные стадии вульгарного псориаза (биопсийное исследование): Дис. к.мед. наук. – Омск, 2003. – 119с.

3. Катунина О.Р. Иммуноморфологическая характеристика клеток воспалительного инфильтрата при псориазе / О.Р.Катунина // Вестник дерматологии и венерологии. – 2005. – №2. – С.25-28.

4. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях / С.Н.Лапач, А.В.Чубенко, П.Н.Бабиц // К. – Морион – 2000 – 319с.

5. Лившиц Е.Г. Патоморфологические особенности кожи при различных формах псориаза / Е.Г. Лившиц // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2006. – №5. – с. 35-36.

6. Мак В. В. Патогенетическое обоснование комбинированной фототерапии ладонно-подошвенного псориаза / В. В.Мак // Дис. к. мед. наук..., Москва–2011. – 116с.

7. Новоселов В.С. Псориаз: патогенетические и клинико-терапевтические аспекты проблемы / В.С.Новоселов, А.В.Новоселов // Consilium medicum. Дерматология. – 2007. – №1. – с. 14-19.

8. Олисова О.Ю. Влияние узкополосной (311 нм) фототерапии на показатели клеточного и гуморального иммунитета у больных псориазом / О.Ю.Олисова, А.М.Талыбова, Е.В.Владимилова, В.В.Владимиров // Клини. дерматология и венерология. – 2011. – №1. – С. 80-82.

9. 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.

10. Самсонов В.А. Псориаз: этиопатогенез, клиника, лечение Электронный ресурс / В.А. Самсонов, А.Ф. Знаменская // Медицина для всех, 2001. – №2. – Режим доступа : <http://medi.ru/doc/8310202.htm>.

11. Сапожников А.Г. Гистологическая и микроскопическая техника: Руководство. / А.Г. Сапожников, А.Е. Дорошевич // Смоленск: САУ, 2000. – 476 с.

12. Хайрутдинов В.Р. Современные представления об иммунных механизмах развития псориаза / В.Р.Хайрутдинов, А.В.Самцов и др. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2007. – №1. – С.3-7.

13. Цветкова Г.М. Патоморфология болезней кожи: руководство для врачей / Г.М.Цветкова, В.В.Мордовцев и др. // Москва, 2003. – 496с.

14. Baker B.S. Recent advances in psoriasis: The role of the immune system / B.S. Baker // Medicine at St. Mares. London, 2000. – 172p.

15. Bjerke J.R. Characterization of mononuclear cell infiltrates in psoriatic lesions/ J.R Bjerke., H.K.Krogh, R.Matre // J.Invest Dermatol. – 1978. – №71. – С.340-343.

16. Bos J.D. Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies / J.D.Bos, H.J.Hulsebosch, S.R. Krieg et al. // Arch. Dermatol. Res. – 1983. – Vol.275. –P.181-189.

17. Иабрижан Лео. Growth CD4 and CD8 lymphocytes and macrophages in psoriasis / Leo Иабрижан, Jasna Lipozenič, Tanja Batinac, et al. // Acta Dermatovenerology. – 2009. – Vol. 17, № 3. – С.162-165.

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

19. Charlesworth E.N. Immunomodulation in dermatology lessons learned in the treatment of psoriasis / E.N. Charlesworth // Allergy Asthma Proc. – 2006. – Vol. 27, №2. – P. 123-125.

20. Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry / Dabbs D.J. // London: Churchill Livingstone, 2006. – 828 p.
21. Dawe R.S. UVB-phototherapy clears psoriasis through local effects / R.S.Dawe, H.Cameron, S.Yule et al. // Arch Dermatol. – 2002. – Vol. 138, №8. – С.1071-1076.
22. Ferahbas A., Donmez-Altuntas H., Hamurcu Z. Micronucleus evaluation in mitogen-stimulated lymphocytes of narrow-band (311 nm TL-01) UVB-treated patients / A.Ferahbas, H.Donmez-Altuntas, Z.Hamurcu/. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. – 2004. – Vol. 20, №2. – С.81-85.
23. Gudjonsson J.E. Review immunopathogenic mechanisms in psoriasis / J.E.Gudjonsson, A.Johnston, H.Sigmudsdottir, H.Valdimarsson // Clin. Exp. Immunol. – 2004. – Vol.135, № 1. –P.1-8.
24. Prens E. T-lymphocytes in psoriasis /E.Prens, R.Debets, J.T. Hegmans // Clin.Dermatol. – 1995, Vol. 13, №2. – С. 115-129.
25. Rotsztejн H. Influence of systemic photochemotherapy on regulatory T cells and selected cytokine production in psoriatic patients: a pilot study /H.Rotsztejн // Med. Sci. Monit. – 2005. – Vol. 11, № 12. – С.594-598.