

УДК 616-008.64:616-092:577.17

© Э.Ю. Бекирова, 2012.

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА D НА УРОВЕНЬ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ IL-1 β И TNF- α В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ КЕРАТИНОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ С D-ДЕФИЦИТОМ

Э.Ю. Бекирова

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

THE EFFECT OF VITAMIN D ON THE LEVELS OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IL-1 β AND TNF- α IN THE CULTURE MEDIUM OF KERATINOCYTES OF PATIENTS WITH PSORIASIS AND D-DEFICIENCY

E. Yu. Bekirova

SUMMARY

The level of vitamin D in the the Crimean region inhabitants suffering from skin psoriasis in the autumn-and-winter period (October-February) has been studied. It has been established that D-deficiency in patients with psoriasis is associated with increased level of cytokine IL-1 β and TNF- α -induced keratinocytes. Differential effects of vitamin D (24,25 (OH) 2D3) on synthesis of cytokines IL-1 β and TNF- α in patients with psoriasis have been revealed, which depends on the level of 25 (OH) D3 in the systemic circulation and reaches statistically significant values in patients with 25 (OH) D3 in the serum <10 ng/ml (D-deficiency).

ВПЛИВ ВІТАМІНУ D НА РІВЕНЬ ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ IL-1 β І TNF- α В КУЛЬТУРАЛЬНОМУ СЕРЕДОВИЩІ КЛІТИННОЇ КУЛЬТУРИ КЕРАТИНОЦІТІВ ХВОРИХ НА ПСОРИАЗ З D-ДЕФІЦИТОМ

Е.Ю. Бекірова

РЕЗЮМЕ

У жителів Кримського регіону, які страждають шкірними формами псоріазу, вивчено вміст вітаміну D в осінньо-зимовий період (жовтень-лютий). Встановлено, що D-дефіцит у хворих на псоріаз пов'язаний з підвищенням синтезу цитокінів IL-1 β і TNF- α індукованими кератиноцитами. Виявлено диференційований вплив вітаміну D (24,25 (OH) 2D3) на синтез цитокінів IL-1 β і TNF- α у хворих на псоріаз, що залежить від рівня 25 (OH) D3 в системному кровотоці та досягає статистично значущих значень у хворих з рівнем 25 (OH) D3 в сироватці крові <10 нг / мл (D-дефіцитом).

Ключевые слова: дефицит витамина D, цитокины, кератиноциты, псориаз.

В рамках современного учения о псориазе в последние годы указанный дерматоз стали все чаще относить к заболеваниям, развитие которых ассоциировано с дефицитом витамина D, а накопленные научные факты позволили подвести к этой научной концепции патогенетический «базис» [4, 5, 6, 7]. К центральным механизмам, лежащим в основе системных проявлений как псориаза, так и дефицита витамина D, относят низкоактивное генерализованное неспецифическое воспаление, характеризующееся возрастанием уровня маркеров системного воспаления и формированием глубокого иммунного дисбаланса. Выявлено также противовоспалительное влияние заместительной терапии витамином D [8, 9, 10, 11, 7]. Существенным шагом вперед в понимании этой проблемы явились исследования, посвященные расшифровке метаболизма витамина D на уровне кожи [12, 13, 14, 15].

Таким образом, можно предположить, что сочетанное течение псориаза и дефицита витамина D может явиться «фактором взаимного отягощения» развития субклинического генерализованного неспе-

цифического воспаления и, как следствие, клинических проявлений как системных, так и локальных (на уровне кожи) эффектов указанных патологических состояний.

В свете вышеизложенного дальнейшее изучение патогенетической сущности D-дефицит-опосредованных механизмов прогрессирования псориаза в осенне-зимний период представляется нам весьма перспективным направлением, ибо оно является базисом для разработки новых путей дифференцированной санаторно-курортной реабилитации их сочетанного течения.

Основной целью исследования явилось научное обоснование целесообразности использования и оценка клинической эффективности сочетанного применения УФ-радиации и заместительной терапии витамином D в условиях санаторно-курортной реабилитации больных псориазом с дефицитом витамина D для коррекции дисбаланса цитокинового гомеостаза. В настоящей работе нами *in vitro* исследовалось влияние витамина D на уровень провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α в культуральной

среде клеточной культуры кератиноцитов больных псориазом с D-дефицитом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением состоял 31 больной кожными формами псориаза – жители Крымского региона. Исследование проводилось в осенне-зимний период (октябрь-февраль) среди больных, поступающих на санаторно-курортное лечение. 1-ю группу составили 14 больных псориазом с физиологическим уровнем $25(\text{OH})\text{D}_3 > 40$ нг/мл, 2-ю группу – 17 больных псориазом с D-дефицитом – $25(\text{OH})\text{D}_3 < 10$ нг/мл.

Определение содержания $25(\text{OH})\text{D}_3$ в сыворотке крови проводилось с использованием набора для определения витамина D 25-ОН в плазме и сыворотке ELISA (Immunodiagnostik, Bensheim, Германия) согласно инструкции изготовителя.

Для выделения первичных культур кератиноцитов использовались лоскуты кожи (0,5 мм), взятые в стерильных условиях с использованием дерматома у больных псориазом из очага поражения и лоскуты кожи от здоровых людей (использовались образцы тканей, иссекаемых *intraoperationem* при операциях грыжесечения) по методу Rheinwald J.G. (1980) [1], модифицированному Юдинцевой Н.М. и соавт. (1999) [2].

Кусочки кожи в течение ночи инкубировали в растворе диспазы II (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Германия) в концентрации 0,5 % и коллагеназы (ОАО «Технология», Санкт-Петербург) в концентрации 0,2 % при 4 °С, после чего можно было

механически отделить эпидермис от дермы. Для получения суспензии клеток эпидермис помещали в раствор трипсина в концентрации 0,125 % и версена в концентрации 0,02 % («Биолот», Санкт-Петербург) на 10 мин при 37 °С. Действие фермента ингибировали добавлением сыворотки. Полученную суспензию клеток осаждали при 1000 g в течение 35 мин, удаляли супернатант, затем осадок ресуспендировали в смеси сред DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) и F 12 (3:1).

Проводилось исследование влияния витамина D (использовался химический аналог $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ – $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Sigma-Aldrich, США), растворенный в этаноле [3]) на индуцированный эпидермальным фактором роста (EGF) человека (Sigma-Aldrich, США) синтез кератиноцитами больных псориазом цитокинов IL-1 β и TNF- α . Для определения уровня TNF- α были использованы тест-системы ProCon TOO «Протеиновый контур» (Россия), уровня IL-1 β – тест-системы TOO «Цитокин» (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования влияния витамина D (использовался химический аналог $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ – $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Sigma-Aldrich, США), растворенный в этаноле [3]) на индуцированный эпидермальным фактором роста (EGF) человека (Sigma-Aldrich, США) синтез кератиноцитами больных псориазом с D-дефицитом IL-1 β в культуральной экспериментальной модели представлены в табл. 1.

Таблица 1
Влияние витамина D ($24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) на уровень провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α в супернатанте культуральной среды культуры кератиноцитов (индуцированных EGF) больных псориазом с D-дефицитом в эксперименте *in vitro* при поступлении, пг/мл

Группы	Этапы эксперимента	Статистический показатель	IL-1 β	TNF- α
1-я группа (больные псориазом с физиологическим уровнем $25(\text{OH})\text{D}_3 > 40$ нг/мл)	Опыт 1 (уровень цитокина в супернатанте культуральной среды культуры клеток)	M \pm m n p	26,3 \pm 1,4 14 –	18,4 \pm 1,2 14 –
	Опыт 2 (с введением в культуральную среду $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)	M \pm m n p	25,8 \pm 1,3 14 > 0,5	18,1 \pm 1,4 14 > 0,5
2-я группа (больные псориазом с D-дефицитом – $25(\text{OH})\text{D}_3 < 10$ нг/мл)	Опыт 1 (уровень цитокина в супернатанте культуральной среды культуры клеток)	M \pm m n p p ₁	41,7 \pm 2,2 17 – < 0,001	49,4 \pm 2,4 17 – < 0,001
	Опыт 2 (с введением в культуральную среду $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)	M \pm m n p p ₁	33,1 \pm 2,0 17 < 0,01 < 0,01	36,5 \pm 2,2 17 < 0,001 < 0,001

Примечание: p – достоверность различий в сравнении с показателем в опыте 1 в той же группе больных, p₁ – достоверность различий в сравнении с показателем у больных 1-й группы в соответствующем опыте.

Мы установили (табл. 1), что наличие D-дефицита у больных псориазом характеризуется статистически значимо большим синтезом провоспалительного цитокина IL-1 β культурой кератиноцитов (на 58,6 %, $p_1 < 0,001$, опыт 1), а также TNF- α (на 168,5 %, $p_1 < 0,001$, опыт 1).

Установлено также, что под влиянием преинкубационных кератиноцитов с 24,25(OH) $_2$ D $_3$ уровень IL-1 β в супернатанте культуры клеток у больных 1-й группы существенно не меняется, а у больных 2-й группы – достоверно снижается на 20,6 % ($p_1 < 0,01$). Уровень TNF- α в супернатанте культуры клеток под влиянием преинкубационных кератиноцитов с 24,25(OH) $_2$ D $_3$ у больных 1-й группы существенно не меняется, а у больных 2-й группы – достоверно снижается на 26,1 % ($p_1 < 0,001$).

Таким образом, нами установлено, что D-дефицит у больных псориазом формирует условия для повышенного синтеза кератиноцитами провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α . В условиях витрального культурального эксперимента также выявлено витамин D-индуцированное влияние на функциональную (синтез цитокинов IL-1 β и TNF- α) активность кератиноцитов.

Указанные научные факты позволяют утверждать, что важным механизмом повышения местного (на уровне кожи) цитокинового потенциала (уровень провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α) у больных псориазом является витамин D-дефицит. Можно утверждать, что использование у больных псориазом с D-дефицитом терапевтических стратегий, направленных на восстановление уровня витамина D в системном кровотоке патофизиологически обосновано.

ВЫВОДЫ

1. D-дефицит у больных псориазом в осенне-зимний период (октябрь-февраль) является фактором риска нарастания дисбаланса местного (на уровне кожи) цитокинового потенциала (IL-1 β и TNF- α), характеризующегося повышением синтеза цитокинов IL-1 β и TNF- α индуцированными кератиноцитами.

2. Выявлено дифференцированное влияние витамина D (24,25(OH) $_2$ D $_3$) на синтез цитокинов IL-1 β и TNF- α у больных псориазом, зависящее от уровня 25(OH)D $_3$ в системном кровотоке и достигающее статистически значимых значений у больных с уровнем 25(OH)D $_3$ в сыворотке крови < 10 нг/мл (D-дефицитом).

3. У больных псориазом с D-дефицитом в культуральном витральном эксперименте выявлено витамин D-зависимое снижение синтеза провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α кератиноцитами. Эти факты расцениваются нами как патофизиологическое обоснование целесообразности лечебной коррекции D-дефицита для уменьшения местного (ткани кожи) цитокинового дисбаланса у больных псориазом в осенне-зимний период (октябрь-февраль) в условиях санаторно-курортной реабилитации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Трансплантация аллогенных эпителиальных пластов на ожоговые раны / Н. М. Юдинцева, Ю. В. Горелик, И. А. Дьяконов [с соавт.] // Цитология. – 1999. – Т. 41. – С. 328.
2. Comparison of the effects of vitamin D products in a psoriasis plaque test and a murine psoriasis xenograft model / P.H. Kvist, L. Svensson, O. Hagberg [et al.] // J. Transl. Med. – 2009. – Vol. 7. – P. 107.
3. Conversion of vitamin D $_3$ to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$ in human skin equivalents / Lehmann B., Rudolph T., Pietzsch J., Meurer M. // Exp. Dermatol. – 2000. – Vol. 9. – P. 97-103.
4. Correale J. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis / J. Correale, M. C. Ysraelit, M. I. Gaitan // Brain. – 2009. – Vol. 132, N. 5. – P. 1146-1160.
5. Correale J. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis / J. Correale, M. C. Ysraelit, M. I. Gaitan // Brain. – 2009. – Vol. 132, N. 5. – P. 1146-1160.
6. Cutaneous formation of vitamin D in psoriasis / Matsuoka L. Y., Wortsman J., Haddad J. G., Hollis B. W. // Arch. Dermatol. – 1990. – Vol. 126. – P. 1107 – 1108.
7. Griffiths C.E. Pathogenesis and clinical features of psoriasis / Griffiths C.E., Barker J.N. // Lancet. – 2007. – Vol. 370, N. 9583. – P. 263-271.
8. Holick M.F. Sunlight, UV-radiation, vitamin D and skin cancer: how much sunlight do we need? / M.F. Holick // Adv. Exp. Med. Biol. – 2008. – Vol. 624. – P. 1-15.
9. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector cell lineages / C.T. Weaver, R.D. Hatton, P.R. Mangan, L.E. Harrington // Ann. Rev. Immunol. – 2007. – Vol. 25. – P. 821-852.
10. Peterson C.A. Serum tumor necrosis factor-alpha concentrations are negatively correlated with serum 25(OH)D concentrations in healthy women / C.A. Peterson, M.E. Heffernan // J. Inflamm. Lond. – 2008. – Vol. 24. – P. 10.
11. Reichrath J. Vitamin D and the skin: an ancient friend revisited / J. Reichrath // Exp. Dermatol. – 2007. – Vol. 16. – P. 618-625.
12. Rheinwald J.G. Serial cultivation of normal epidermal keratinocytes / J.G. Rheinwald // Meth. Cell. Biol. – 1980. – Vol. 21. – P. 229-254.
13. Skin is an autonomous organ in synthesis, two-step activation and degradation of vitamin D $_3$: CYP27 in epidermis completes the set of essential vitamin D $_3$ -hydroxylases / Schuessler M., Astecker N., Herzig G. [et al.] // Steroids. – 2001. – Vol. 66. – P. 399-408.
14. UVB-induced conversion of 7-dehydrocholesterol to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$ in an in vitro human skin equivalent model / Lehmann B., Genehr T., Knuschke P. [et al.] // J. Invest. Dermatol. – 2001. – Vol. 117. – P. 1179-1185.
15. UVB-induced production of 1,25(OH) $_2$ D $_3$ production and vitamin D activity in human keratinocytes pretreated with a sterol delta 7 reductase inhibitor / Vantieghem K., Kissmeyer A.M., De Haes P. [et al.] // J. Cell. Biochem. – 2006. – Vol. 98. – P. 81-92.