

УДК 616

© Аль Касем Амин, 2013.

## ВЛИЯНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ЛЕПТИНА НА СИНТЕЗ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРОЙ КЕРАТИНОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ С ИЗБЫТОЧНОЙ МАССОЙ ТЕЛА ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА

Аль Касем Амин

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

### EFFECT OF RECOMBINANT HUMAN LEPTIN ON SYNTHESIS OF TRANSFORMING FACTOR OF GROWTH IN THE CELLULAR CULTURE OF KERATINOCYTES IN PSORIASIS OVERWEIGHT PATIENTS Al Kasem Amin

#### SUMMARY

The effect of recombinant human leptin on the level of the active form of TGF- $\beta$ 1 in the growth medium of the cell culture of keratinocytes in psoriasis patients with normal and excessive weight has been studied. It has been established that hyperleptinemia can be an important mechanism of increasing the local (skin) level of the active form of TGF- $\beta$ 1 in psoriasis patients with obesity. The use of therapeutic strategies in psoriasis overweight patients aimed at reducing the level of leptin in the blood serum is pathophysiologically justified.

### ВПЛИВ ЛЮДСЬКОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ЛЕПТИНА НА СИНТЕЗ КЛІТИННОЮ КУЛЬТУРОЮ КЕРАТИНОЦІТІВ ХВОРИХ НА ПСОРИАЗ З НАДМІРНОЮ МАСОЮ ТІЛА ТРАНСФОРМУЮЧОГО ЧИННИКА ЗРОСТАННЯ

Аль Касем Амін

#### РЕЗЮМЕ

Вивчений вплив людського рекомбінантного лептина на рівень активної форми TGF- $\beta$ 1 в ростовому середовищі клітинної культури кератиноцитів хворих на псоріаз з нормальною і надмірною масою тіла. Встановлено, що гіперлептемія може виступати важливим механізмом підвищення місцевого (на рівні шкіри) рівня активної форми TGF- $\beta$ 1 у хворих на псоріаз з ожирінням. Використання у хворих на псоріаз з надмірною масою тіла терапевтичних стратегій, направлених на зниження рівня лептина в сироватці крові, патофізіологічно обґрунтовано.

**Ключевые слова:** лептин, кератиноциты, псориаз, избыточная масса тела, трансформирование фактора роста.

Учение о псориазе в последнее десятилетие существенно дополнилось научными фактами, документирующими зависимость между ожирением и нарушениями функции кожи, включая физиологию кожи, а также повышенным риском развития широкого спектра дерматологических заболеваний (включая псориаз) [20]. При этом развитие негативных системных эффектов ожирения реализуется прежде всего за счёт повышения уровня различных (адипо-) цитокинов и воспалительных маркеров, а также развития инсулинорезистентности и окислительного напряжения [13, 19].

Так, выявлено более тяжёлое течение псориаза у лиц с повышенным индексом массы тела (BMI), достоверно более высокий риск развития псориаза у больных с избыточной массой тела, а также высокая частота ожирения у больных псориазом (встречается у 46% больных с умеренным и тяжёлым клиническим течением заболевания) [7, 16]. Доказана клиническая эффективность использования у больных псориазом низкокалорийной диеты [18].

Проблема псориаза и ожирения отражена в научной концепции, согласно которой формирование особой патофизиологически обоснованной стратегии лечения дерматологических заболеваний, ассоциированных с ожирением и инсулинорезистентностью, отнесены к важной проблеме клинической дерматологии [6, 7]. Так, Европейская Академия дерматологии (2006) важной задачей современной клинической дерматологии считает изучение терапевтического влияния на течение псориаза различных схем системной терапии больных с ожирением [17]. В развитии этой идеи в докладе междисциплинарной конференции (Родос, Греция, 2006), проводимой под эгидой Европейской Академии дерматологии и венерологии, указывалось, что лечение псориаза у больных с ожирением врач-дерматолог должен проводить при участии врачей других специальностей – кардиологов, гепатологов, эндокринологов, фармакологов и ревматологов, что может действовать повышению эффективности дифференцированной терапии псориаза [4, 17].

Вместе с тем причинно-следственная связь между ожирением и псориазом в настоящее время окончательно не расшифрована; ожирение же может возникать и как следствие развития псориаза, может выступать фактором риска развития псориаза, может являться фактором отягощения тяжести заболевания, либо быть производным от общей патофизиологии этих патологических состояний [9]. Все это является весомым научным аргументом в пользу продолжения научного поиска по указанной проблематике.

Цель настоящей работы – определение влияния человеческого рекомбинантного лептина на уровень активной формы трансформирующего фактора роста (TGF- $\beta$ 1) в культуральной среде культуры кератиноцитов больных псориазом с нормальной и избыточной массой тела.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под нашим наблюдением находились 25 больных женского пола, страдающих кожными формами псориаза и разделённых на три группы. 1-ю группу составили 11 больных псориазом и индексом массы тела (BMI) < 25,0, 2-ю – 14 больных псориазом, у которых BMI  $\geq$  30,0.

Изучалось влияние человеческого рекомбинантного лептина (Leptin human, recombinant, Sigma, USA) на индуцированный эпидермальным фактором роста (EGF) человека, рекомбинантный (Epidermal Growth Factor human, recombinant, Sigma, USA) синтез кератиноцитами больных псориазом активной формы TGF- $\beta$ 1 в культуральной экспериментальной модели. Клетки инкубировали с 50 нг/мл лептина. Для выделения первичных культур кератиноцитов использовались лоскуты кожи (0,5 мм), взятые в стерильных условиях с использованием дерматома у больных псориазом из очага поражения по методу Rheinwald J.G. (1980) [15], 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 представлялось возможным 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).

Содержание в культуральной среде активной формы TGF- $\beta$ 1 определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы «TGF $\beta$ 1 E<sub>max</sub><sup>®</sup> ImmunoAssay System» (Promega,

США). Оптическую плотность конечного продукта ферментативной реакции определяли фотометрически.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в последние годы ассоциированная с ожирением гиперлептинемия стала рассматриваться в качестве независимого фактора риска развития и прогрессирования псориаза – иммунопатологического (ассоциированного преимущественно с Т-клеточным иммунитетом) воспалительного заболевания кожи [5, 10, 14]. Выявлено участие лептина в воспалительном процессе путём прямого паракринного или аутокринного действия, а также возможные лептин-ассоциированные механизмы развития хронических дерматозов [3, 11]. Так, доказана возможность лептин-зависимого синтеза кератиноцитами провоспалительных цитокинов непосредственно в коже, а также возможность лептин-зависимого синтеза кератиноцитами эпидермального фактора роста (EGF) и фактора роста кератиноцитов (KGF) [3]. Рецепторы к лептину (Ob-R) обнаружены на кератиноцитах, фибробластах, эндотелиальных клетках и клетках иного гистотипа [8, 12].

Результаты исследования влияния человеческого рекомбинантного лептина на индуцированный EGF синтез кератиноцитами больных псориазом активной формы TGF- $\beta$ 1 в культуральной экспериментальной модели представлены в таблице №1.

Как видно из таблицы, избыточная масса тела (BMI  $\geq$  30,0) у больных псориазом характеризуется статистически значимо большим синтезом активной формы TGF- $\beta$ 1 (на 13,6 %,  $p_1 < 0,01$ , эксперимент 1). Под влиянием преинкубации кератиноцитов с человеческим рекомбинантным лептином уровень активной формы TGF- $\beta$ 1 в супернатанте культуры кератиноцитов также существенно возрастает: на 27,0 % ( $p < 0,001$ ) у больных псориазом с BMI < 25,0 (1-я группа) и на 27,9 % ( $p < 0,001$ ) у больных псориазом с BMI  $\geq$  30,0 (2-я группа).

Таким образом, можно утверждать, что моделируемая в условиях витального культурального эксперимента гиперлептинемия формирует условия для повышенного синтеза кератиноцитами больных псориазом активной формы TGF- $\beta$ 1. При этом у больных псориазом с BMI  $\geq$  30,0 (ожирением различной степени выраженности, 2-я группа) лептин-зависимый синтез кератиноцитами цитокина статистически значимо выше, чем у больных с BMI < 25,0 (1-я группа).

Учитывая, что такие «непрофессиональные» антигенпрезентирующие клетки кожи, как кератиноциты, фибробласты и эндотелиоциты кожных капилляров, ранее считавшиеся «молчаливым большинством», сегодня признаны активными участниками иммунных реакций, происходящих в коже [1], можно утверждать, что важным механизмом повышения местного (на уровне кожи) цитокиново-

го потенциала (уровень активной формы TGF-β1) у больных псориазом с ожирением может являться гиперлептинемия.

Можно также утверждать, что использование у

больных псориазом (прежде всего – с ожирением и повышением BMI ≥ 30,0) терапевтических стратегий, направленных на снижение уровня лептина в сыворотке крови, патофизиологически обосновано.

Таблица №1

Влияние человеческого рекомбинантного лептина на уровень активной формы TGF-β1 в культуральной среде культуры кератиноцитов (индуцированных человеческим рекомбинантным эпидермальным фактором роста человека) больных псориазом с BMI < 25,0 (1-я группа) и с BMI ≥ 30,0 (2-я группа) в эксперименте in vitro при поступлении в стационар, пг/мл.

Группы	Этапы эксперимента	Стат. показатель	Уровень TGF- β1
Больные псориазом с BMI < 25,0 (1-я группа)	Эксперимент 1	M ± m n p	183,18 ± 5,20 11 –
	Эксперимент 2 (+ лептин)	M ± m n p	232,60 ± 6,14 11 < 0,001
Больные псориазом с BMI ≥ 30,0 (2-я группа)	Эксперимент 1	M ± m n p p <sub>1</sub>	208,13 ± 6,07 14 – < 0,01
	Эксперимент 2 (+ лептин)	M ± m n p p <sub>1</sub>	266,30 ± 6,85 14 < 0,001 < 0,001

Примечание: p – достоверность различий в сравнении с показателем в эксперименте 1 в той же группе больных, p<sub>1</sub> – достоверность различий в сравнении с показателем в соответствующем эксперименте у больных 1-й группы.

#### ВЫВОДЫ

1. Гиперлептинемия может выступать важным механизмом повышения местного (на уровне кожи) цитокинового потенциала (уровень активной формы TGF-β1) у больных псориазом с ожирением.

2. Использование у больных псориазом (прежде всего – с ожирением и повышением BMI ≥ 30,0) терапевтических стратегий, направленных на снижение уровня лептина в сыворотке крови, патофизиологически обосновано.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Казмирчук В.Е. Иммунная система кожи и клинические кожные «маски» иммунодефицитных заболеваний / В.Е. Казмирчук, Д.В. Мальцев // Клини. иммунол. Аллергол. Инфектол. – 2009. – № 1. – С. 45-49.

2. Трансплантация аллогенных эпителиальных пластов на ожоговые раны / Н. М. Юдинцева, Ю. В. Горелик, И. А. Дьяконов [с соавт.] // Цитология. – 1999. – Т. 41. – С. 328.

3. Adiponectin and leptin modulate cell proliferation and cytokine secretion of normal human keratinocytes and T lymphocytes / H. Takahashi [et al.] // J. Dermatol. Sci. – 2010. – Vol. 123, N. 8. – P. 234-246.

4. Biomarkers in Psoriasis and Psoriatic Arthritis: GRAPPA 2008 / C.T. Ritchlin, A.A. Qureshi, K. de Vlam

[et al.] // J. Rheumatol. – 2010. – Vol. 37. – P. 462-467.

5. Christophers E. Psoriasis - epidemiology and clinical spectrum / E. Christophers // Clin. Exp. Dermatol. – 2001. – Vol. 26. – P. 314-320.

6. Chronic inflammation in psoriasis and obesity: implications for therapy / E.A. Hamminga, A.J. van der Lely, H.A. Neumann, H.B. Thio // Med. Hypotheses. – 2006. – Vol. 67, N. 4. – P. 768-773.

7. Cigarette smoking, body mass index, and stressful life events as risk factors for psoriasis: results from an Italian case-control study / L. Naldi, L. Chatenoud, D. Linder [et al.] // J. Invest. Dermatol. – 2005. – Vol. 125. – P. 61-67.

8. Goren I. Determination of leptin signaling pathways in human and murine keratinocytes / I. Goren, J. Pfeilschifter, S. Frank // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – Vol. 303. – P. 1080-1085.

9. Impact of obesity and smoking on psoriasis presentation and management / M.D. Herron, M. Hinckley, M.S. Hoffman [et al.] // Arch. Dermatol. – 2005. – Vol. 141. – P. 1527-1534.

10. Kanda N. Leptin enhances human beta-defensin-2 production in human keratinocytes / N. Kanda, S. Watanabe // Endocrinology. – 2008. – Vol. 149, N. 10. – P. 5189-5198.

11. Leptin surge precedes onset of autoimmune

encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses / V. Sanna, A. Di Giacomo, A. La Cava [et al.] // *J Clin Invest.* – 2003. – Vol. 111, N. 2. – P. 241-250.

12. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions / S. Margetic, C. Gazzola, G.G. Pegg, R.A. Hill // *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* – 2002. – Vol. 26. – P. 1407-1433.

13. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis / A. Peeters, J.J. Barendregt, F. Willekens [et al.] // *Ann. Intern. Med.* – 2003. – Vol. 138. – P. 24- 32.

14. Psoriasis independently associated with hyperleptinemia contributing to metabolic syndrome / Y.J. Chen, C.Y. Wu, J.L. Shen [et al.] // *Arch. Dermatol.* – 2008. – Vol. 144, N. 12. – P. 1571-1575.

15. Rheinwald J.G. Serial cultivation of normal epidermal keratinocytes / J.G. Rheinwald // *Meth. Cell. Biol.* – 1980. – Vol. 21. – P. 229-254.

16. Risk factors for psoriasis: a retrospective study on 501 out patients clinical records / M.G. Marino, I. Carboni, C. De Felice [et al.] // *Ann. Ig.* – 2004. – Vol. 16. – P. 753-758.

17. Sterry W. International Psoriasis Council. Obesity in psoriasis: the metabolic, clinical and therapeutic implications: report of an interdisciplinary conference and review / W. Sterry, B.E. Strober, A. Menter // *Br. J. Dermatol.* – 2007. – Vol. 157, N. 4. – P. 649-655.

18. The role of the low energy diet in psoriasis vulgaris treatment / I. Rucevic, A. Perl, V. Barisic-Drusko [et al.] // *Coll. Antropol.* – 2003. – Vol. 27. – P. 41-48.

19. Van Gaal L.F. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease / L.F. Van Gaal, I.L. Mertens, C.E. De Block // *Nature.* – 2006. – Vol. 444. – P. 875-880.

20. Yosipovitch G. Obesity and the skin: skin physiology and skin manifestations of obesity / Yosipovitch G., DeVore A., Dawn A. // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2007. – Vol. 56, N. 6. – P. 901-916.