

ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ КЛАРИТРОМИЦИНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПСОРИАЗА

Рыбкина В.Л.

Научно-исследовательский кожно-венерологический институт МЗ Республики Казахстан

Резюме. Изучено влияние кларитромицина на процессы пролиферации и дифференцировки кератиноцитов, экспрессию кластеров дифференцировки и пролиферативную активность лимфоцитов больных псориазом *in vitro*. Установлено, что в культуре кларитромицин в дозе 2 мкг/мл угнетал пролиферацию кератиноцитов больных псориазом и увеличивал степень их дифференцировки. Влияние этого препарата было опосредованным, оно осуществлялось через CD4⁺ лимфоциты. Кроме того, кларитромицин *in vitro* уменьшал количество CD25⁺ лимфоцитов и снижал спонтанную и ФГА - индуцированную пролиферацию лимфоцитов больных псориазом. Полученные данные создают предпосылки для включения этого препарата в схему лечения псориаза.

Ключевые слова: псориаз, лечение, кларитромицин, кератиноциты, лимфоциты.

Rybkina V.L.

THE GROUNDS OF CLARITROMYCIN USE IN THE TREATMENT OF PSORIASIS

Abstract. Claritromycin influence on the keratinocytes proliferation and differentiation and lymphocytes proliferation and clusters of differentiation expression *in vitro* was investigated. It was established that claritromycin in dose 2 mkg/ml inhibited psoriatic keratinocytes proliferation and increased its differentiation degree in culture. Claritromycin influence was mediated by CD4⁺ lymphocytes. Furthermore, claritromycin *in vitro* decreased the number of CD25⁺ lymphocytes and spontaneous and PHA-induced lymphocytes proliferation for psoriatic patients. These data allow to include claritromycin in the treatment regimen of psoriasis. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 4, pp 405-410)

Введение

Проблема поиска препаратов, целенаправленно подавляющих активность определенных регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов при псориазе остается актуальной. Большинство применяемых в настоящее время средств для лечения этой патологии (глюкокортикоиды, иммунодепрессанты) обладают мощным иммуносупрессивным эффектом, но они направлены практически на все звенья иммунитета, вызывая осложнения и побочные эффекты [11]. В последние годы пристальное внимание исследователей в качестве пре-

паратов, способных подавлять функции некоторых иммунокомпетентных клеток, привлекли антибиотики макролидного ряда. Данные исследователей свидетельствуют об их способности подавлять продукцию тех цитокинов, которые задействованы в патогенезе псориаза и, по мнению большинства авторов, приводят к усилению пролиферации и нарушению дифференцировки кератиноцитов, а также к возникновению воспалительных явлений. Такими цитокинами являются IL-1, IL-2, IL-8, TNF α . Кроме того, они подавляют активацию и хемотаксис полинуклеаров, при этом увеличивая синтез противовоспалительного интерлейкина 10, усиливают поглотительную и переваривающую способность нейтрофилов и макрофагов и активность естественных киллеров [8, 9, 12]. Такие свойства макролидов и кларитромицина в частности могут оказать положительный эффект при лечении псориаза, поскольку воздей-

Адрес для переписки:

Рыбкиной Валентине Львовне.
456787, Челябинская обл. г. Озерск,
пр. Карла Маркса 23, кв. 106.
Тел: (35171) 7-71-71 (дом), 7-46-08 (раб).
E-mail: valenta5@rambler.ru

ствуют на основные звенья развития псориазического процесса.

Целью данного исследования явилось изучение влияния кларитромицина на пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов и на пролиферативную активность и экспрессию кластеров дифференцировки лимфоцитов *in vitro* у больных псориазом.

Материалы и методы

Объектом исследования были кератиноциты пораженной (РР) и не пораженной (РН) кожи 140 больных псориазом и 100 клинически здоровых людей (НН), а также лимфоциты их периферической крови. Культивирование кератиноцитов проводилось по методу [10]. Пролиферативная активность кератиноцитов оценивалась прямым подсчетом клеток, митотической активности, определением содержания ДНК [6, 7]. Метаболическая активность оценивалась по включению H^3 -тимидина (Sigma, США) с помощью β -счетчика. Степень дифференцировки кератиноцитов определяли по способности кератиноцитов экспрессировать инволюктин [1]. Процент живых клеток определялся с помощью трипанового синего (Sigma, США), он составил 95%. Чистоту выделения субпопуляций проверяли с помощью реакции непрямой мембранной иммуофлуоресценции с помощью моноклональных антител против кластеров дифференцировки $CD4^+$ -лимфоцитов (Sigma, США). Она приближалась к 90-95%. Каждый вариант опыта дублировался в 3-х лунках. В контрольных лунках инкубировались только кератиноциты (вариант а), в опытных - кератиноциты с добавлением $CD4^+$ -лимфоцитов (вариант б) и кератиноциты с добавлением $CD4^+$ лимфоцитов и кларитромицина (вариант в). Концентрация лимфоцитов в лунках составила 2×10^6 кл/мкл, кератиноцитов - 3×10^2 кл/мкл. Соотношение эпителиальных и лимфоидных клеток в культуре соответствовало их соотношению в пораженных участках кожи больных псориазом в прогрессирующей стадии [3]. Объем смешанной культуры составлял 200 мкл. Инкубация проводилась в течение 3-х суток при $37^\circ C$ в атмосфере, содержащей 5% CO_2 . Для того, чтобы исключить увеличение включения радиоактивной метки за счет лимфоцитов в отдельных лунках инкубировались $CD4^+$ -лимфоциты с предварительно обработанными митомицином С (Sigma, США) аутологичными кератиноцитами. Аутологичные кератиноциты из пораженных и непораженных участков кожи получали из биоптатов путем механической обработки и трипсинизации (трипсин фирмы Sigma, США) эпидермиса с последующей инкубацией их в течение 30 мин при $37^\circ C$ митомицином С в концентрации 50 мкг/мл.

Накануне определения в лунки добавляли 3H -тимидин (Sigma, США) 5,0 мкКи/мл. Радиоактивность определялась на β -счетчике. При оценке митотической активности кератиноцитов под влиянием $CD4^+$ лимфоцитов из показателей радиоактивности смешанной культуры лимфоцитов и кератиноцитов вычитали показатели радиоактивности лимфоцитов и убитых кератиноцитов. Аналогичная процедура проводилась и при определении ДНК в культурах клеток. Исследовалось влияние 2-х концентраций кларитромицина, соответствующих концентрациям этого препарата в сыворотке крови при применении 250 и 500 мг кларитромицина - 1 и 2 мкг/мл [8]. Проводилось 2 варианта опыта: один для изучения прямого влияния кларитромицина на процессы пролиферации и дифференцировки кератиноцитов и второй для выявления опосредованного $CD4^+$ лимфоцитами влияния этого препарата. В опыте в качестве фактора, опосредующего влияние кларитромицина, использовались $CD4^+$ лимфоциты, поскольку именно они признаются триггерным фактором в развитии псориазического процесса [2, 3].

Поскольку концентрация кларитромицина 1 мкг/мл не оказывала существенного влияния на процессы пролиферации и дифференцировки кератиноцитов, данные по ее исследованию не приводятся, и все указанные в статье результаты получены при исследовании концентрации 2 мкг/мл.

При изучении влияния кларитромицина на пролиферативную активность лимфоцитов и экспрессию ими кластеров дифференцировки лимфоциты выделяли из крови по методу [4] и инкубировали в RPMI 1640 (Sigma, США) с добавлением 10% ЭТС (Sigma, США) и 2 мкг/мл кларитромицина в течение суток. Контрольную пробу инкубировали в аналогичной среде без добавления кларитромицина. Затем исследовали пролиферативную активность лимфоцитов в ответ на ФГА (Murex Biotech LTD, Великобритания) и экспрессию кластеров дифференцировки лимфоцитов с использованием моноклональных антител фирмы Sigma (США) в опытных и контрольных пробах по методу [1].

Математическая обработка полученных результатов проводилась методами параметрической статистики на персональном компьютере с использованием программы «Statistica 5,0». Значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты

Из приведенных в таблице 1 данных видно, что добавление кларитромицина к чистой культуре кератиноцитов не приводило к изменению их пролиферации и дифференцировки. При инкубации кератиноцитов пораженной и не пораженной кожи

больных псориазом совместно с CD4⁺ лимфоцитами резко повышалась их пролиферативная активность и снижалась степень их дифференцировки. В контрольных лунках, где инкубировались кератиноциты и CD4⁺ лимфоциты здоровых людей изменений в пролиферативной активности и степени дифференцировки кератиноцитов не произош-

ло. В тех лунках, в которых к культуре эпидермальных кератиноцитов и CD4⁺-лимфоцитов больных псориазом был добавлен кларитромицин, снизилось число кератиноцитов, содержание ДНК, число митозов, что свидетельствует об ингибирующем влиянии кларитромицина на пролиферацию кератиноцитов в этом варианте опыта. Снижалась так-

Табл. 1. ВЛИЯНИЕ КЛАРИТРОМИЦИНА НА ПРОЦЕССЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЕРАТИНОЦИТОВ, ИНКУБИРОВАВШИХСЯ С АУТОЛОГИЧНЫМИ CD4⁺-ЛИМФОЦИТАМИ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

Критерии оценки пролиферации и дифференцировки кератиноцитов	NN (n=100)	PN (n=240)	PP (n=240)
1.Количество кератиноцитов в культуре $\times 10^4$ клеток	а) 15,0 \pm 1,6	32,4 \pm 2,5	24,3 \pm 1,9
	б) 15,9 \pm 1,4	33,1 \pm 1,9	25,0 \pm 1,7
	в) 17,9 \pm 1,9	156 \pm 13*	161 \pm 14*
	г) 16,6 \pm 2,0	37,2 \pm 2,5**	29,4 \pm 3,0**
2.Включение радиоактивной метки, имп/мин	а) 89 \pm 7	81 \pm 8	94 \pm 8
	б) 87 \pm 9	84 \pm 9	92 \pm 9
	в) 93 \pm 8	160 \pm 9*	233 \pm 19*
	г) 89 \pm 7	88 \pm 8**	90 \pm 9**
3.Количество ДНК μ г/лунку	а) 5,6 \pm 0,4	6,9 \pm 0,5	7,8 \pm 0,5
	б) 6,1 \pm 0,5	7,0 \pm 0,7	7,9 \pm 0,7
	в) 5,9 \pm 0,6	52,8 \pm 0,9*	83,6 \pm 1,7*
	г) 6,2 \pm 0,7	8,3 \pm 0,8**	8,7 \pm 0,9**
4.Число митозов S/1000 кл	а) 21 \pm 2	28 \pm 2	34 \pm 3
	б) 23 \pm 2	31 \pm 3	35 \pm 4
	в) 25 \pm 3	43 \pm 3*	59 \pm 4*
	г) 24 \pm 5	30 \pm 3**	33 \pm 3**
5.Число инволюкрин-положительных клеток на 100кл	а) 41 \pm 3	33 \pm 2	27 \pm 3
	б) 42 \pm 2	32 \pm 3	29 \pm 3
	в) 40 \pm 3	21 \pm 1*	18 \pm 2*
	г) 45 \pm 4	32 \pm 3**	28 \pm 3**

Примечание:

NN – кератиноциты кожи здоровых людей,

PN – кератиноциты непораженных участков кожи больных псориазом,

PP-кератиноциты пораженных участков кожи больных псориазом.

Графа а - данные культур клеток без добавления лимфоцитов,

б - данные культур клеток с добавлением кларитромицина,

в - данные культур клеток с добавлением лимфоцитов,

г - данные культур клеток с добавлением лимфоцитов и кларитромицина.

* - результаты статистически достоверно отличаются от таковых без добавления лимфоцитов,

** - результаты отличаются от таковых без добавления кларитромицина.

Табл. 2. ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

МоноклонАТ	Псориаз (n=240)		Клинически здоровые люди (n=100)	
	%	абс кл/мкл	%	абс кл/мкл
CD3	а) 57,7±3,2	1731±136*	59,1±3,1	1064±108
	б) 53,9±3,0	1617±111	58,7±3,2	1057±100
CD4	а) 38,2±1,6	1146±94*	38,4±2,9	691±63
	б) 37,5±1,7	1125±100	38,8±2,6	698±61
CD8	а) 20,5±1,3	615±52*	20,8±1,4	374±25
	б) 21,5±1,7	645±51	21,7±1,9	390±20
CD4/CD8	а) 2,0±0,2	2,0±0,2	2,0±0,2	2,0±0,2
	б) 2,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,2
CD20	а) 12,1±1,1*	363±29*	7,0±0,7	126±10
	б) 12,3±1,7	369±31	7,3±0,8	126±11
CD25	а) 4,4±0,7*	132±11*	0,2±0,03	3,6±0,2
	б) 0,3±0,05**	9,0±0,9**	0,2±0,03	3,6±0,1

Примечание: строка

а - результаты без кларитромицина,

б - с кларитромицином,

* - результаты статистически достоверно отличаются от показателей здоровых людей,

** - результаты статистически достоверно отличаются от таковых без воздействия кларитромицина.

Табл. 3. ВЛИЯНИЕ КЛАРИТРОМИЦИНА НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ *IN VITRO*

Условия инкубации	Больные псориазом (n=240)		Клинически здоровые (n=100)	
	Спонтанная	ФГА-индуц.	Спонтанная	ФГА-индуц.
С кларитро-мицином	4,1±0,3**	23,8±0,2**	1,0±0,1**	40,3±0,3**
Без кларитро-мицина	10,6±1,3*	46,3±2,1*	1,8±0,1	68,9±0,5

Примечание:

* - показатель отличается статистически достоверно от такового у клинически здоровых людей,

** - показатель статистически достоверно отличается от такового без добавления кларитромицина

же метаболическая активность этих кератиноцитов, о чем свидетельствовало снижение включения радиоактивной метки. Степень дифференцировки псориазных кератиноцитов в этой системе увеличивалась, как показывают данные по определению количества инволюкрин-положительных кератиноцитов.

В культурах, состоявших из смеси лимфоидных и эпидермальных клеток здоровых людей, изменений от добавления кларитромицина не было.

Результаты, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что в контрольных пробах лимфоцитов больных псориазом относительное

количество CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺- лимфоцитов статистически достоверно не отличалось от показателей клинически здоровых людей, абсолютное их содержание было повышено. Регуляторный индекс у больных псориазом не отличался от такового у клинически здоровых людей. Абсолютное и относительное содержание В-лимфоцитов было повышено. Резко увеличено было абсолютное и относительное содержание активированных лимфоцитов, имеющих рецепторы к IL-2 (CD25⁺).

Приведенные результаты позволяют сделать вывод об отсутствии влияния кларитромицина на экспрессию кластеров дифференцировки CD3,

CD4, CD8, CD20, как у больных псориазом, так и у клинически здоровых людей *in vitro*. После инкубации лимфоцитов больных псориазом с кларитромицином экспрессия CD25⁺ снизилась до показателей клинически здоровых людей. У клинически здоровых людей исследованные показатели не претерпели сколько-нибудь значительных изменений под влиянием кларитромицина.

Установлено, что спонтанная пролиферация лимфоцитов у больных псориазом в контрольной пробе была повышена (табл.3). ФГА-индуцированная пролиферация лимфоцитов у этих больных была снижена. Добавление кларитромицина к культуре лимфоцитов приводило к уменьшению спонтанной и ФГА - индуцированной пролиферации лимфоцитов как у больных псориазом, так и у клинически здоровых людей.

Обсуждение

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что пролиферативная и метаболическая активность кератиноцитов снижалась, а степень дифференцировки увеличивалась под действием кларитромицина. Однако, очевидно, что это влияние было опосредованным, поскольку в чистых культурах кератиноцитов не проявлялось, а сказывалось только в смешанных культурах с CD4⁺ лимфоцитами, где пролиферативная активность кератиноцитов была увеличена, а степень дифференцировки снижена. Механизм влияния кларитромицина на пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов, вероятнее всего, связан с подавлением синтеза цитокинов лимфоидными клетками, что подтверждается исследованиями ряда авторов [8, 9, 11, 12].

Кроме того, кларитромицин *in vitro* снижал экспрессию рецепторов к IL-2 на лимфоцитах больных псориазом, снижал пролиферативную активность лимфоцитов у больных псориазом и клинически здоровых людей. Причиной снижения пролиферативной активности лимфоцитов могло быть снижение синтеза IL-2 лимфоцитами, поскольку кларитромицин способен ингибировать синтез IL-2 как *in vivo*, так и *in vitro* [8, 9, 12].

CD25⁺-лимфоциты - это субпопуляция лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы к IL-2. Это маркер активированных лимфоцитов. Высокий процент активированных CD25⁺DR⁺ - клеток в пораженной коже больных псориазом [3]. Как известно, именно активированные Т-лимфоциты признаются в настоящее время триггерным фактором в развитии псориаза, поэтому снижение их количества у больных псориазом под влиянием кларитромицина *in vitro* можно считать благоприятным явлением. Снижение экспрессии рецепторов к IL-2 прерывает патогенетическую цепь цито-

кинных взаимодействий при псориазе, приводящих к нарушению процессов пролиферации и дифференцировки клеток эпидермиса. Известно, что пролиферация лимфоцитов у больных псориазом в местах поражения усилена [5]. Снижение пролиферативной активности лимфоцитов в очагах поражения больных псориазом при применении кларитромицина также может оказать благоприятное влияние на состояние кожного процесса.

Поскольку кларитромицин оказывает положительное влияние на основные патогенетические звенья псориаза: снижает содержание активированных лимфоцитов, пролиферативную активность лимфоцитов, пролиферативную активность кератиноцитов, повышает степень их дифференцировки *in vitro*, этот препарат может быть включен в схему лечения псориаза.

Список литературы

1. Иммунологические методы / под ред. Г. Фриемеля М.: Медицина, 1987. - 314 с.
2. Adamicova K., Fetisovova Z., Cingel P. Quantitative changes in CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocyte in skin of patients with psoriasis treated with cyclosporine A // Cesc Patol, 2001.-Vol. 37.- №4.- P. 154 - 157.
3. Bos J.D. Immunocompetent cells in psoriasis: in situ immunophenotyping by monoclonal antibodies // Arch Dermatol Res.-1983.- Vol.-275.- P.181-189.
4. Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood // Scand. J. Clin. Lab. Invest. - 1988. - Vol. 2.- N3.- P. 77-89.
5. Chang J.I., Smith L.R., Froning K.J. Persistence of T - cell clones in psoriatic lesions // Arch Dermatol. - 1997. - Vol. 133.- № 6.- P. 703 - 709.
6. Liu S.C., Eaton M.G., Karasek M. Growth characteristics of human epidermal keratinocytes from newborn foreskins in primary and serial cultures // In vitro, 1979.- Vol.15.- P. 813-821.
7. Leyra A., Jr. Kelley W.N. Measurement of DNA in cultured human cells // Anal biochem. -1974. - Vol. 62.- №5. - P. 173-179.
8. MacLeod C.M. Novel claritromycin research // Macrolides in the new Millennium: international consensus conference. - 2000. - P. 35-39.
9. Morikawa C. J. Claritromycin influence on inflammatory cytokines reduction // J. Invest. Dermatol. - 1998. - Vol.13. - N7 P. 14-18.
10. Rheinwald T.G., Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells // Cell. - 1975. - Vol. 6.- № 2. - P. 331 - 344.
11. Spuls PI, Bossuyt PM, van Everling J, Witkamp L, Bos JD The development of practice

guidelines for the treatment of severe plaque form psoriasis// Arch Dermatol. - 1998. -Vol. -134.- P.1591-1596.

12. Takeshita K., Yamagishi I., Harada M. Immu-

nological and anti-inflammatory effects of clarythtomycine: inhibition of interleukin 1 production of murine peritoneal macrophages// Drugs Exp. Clin.Res.-1989. -Vol. 15. -P. 527-533.

поступила в редакцию 26.12.2004

принята к печати 27.01.2005