

АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ПСОРИАЗЕ

Капулер О.М., Нелюбин Е.В., Каут Д.А.*,
Сибиряк С.В.*

ОАО "Медицинская косметология" МЗ РБ, Уфа;

*Лаборатория иммунофармакологии и иммунотоксикологии института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург - Уфа

Резюме. Обследованы 42 пациента с прогрессирующим вульгарным псориазом (средняя величина PASI равна $19,7 \pm 1,5$) и 40 условно-здоровых доноров. Установлено, что у больных псориазом увеличено количество $CD4^+ CD95^+$ Т-лимфоцитов в периферической крови, содержание которых положительно коррелирует с величиной PASI, и повышен уровень растворимого Fas рецептора (sFas) в сыворотке ($1868,1 \pm 186,8$ пкг/мл против $1281,4 \pm 142,5$ пкг/мл у здоровых доноров, $P_{LSD} = 0.019$). Интенсивность спонтанного апоптоза лимфоцитов и апоптоза, индуцированного антиFas МКА у больных псориазом аналогичны таковым у здоровых доноров, однако чувствительность лимфоцитов к апоптозу, индуцированному "оксидативным стрессом" ($50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, 4 часа) значительно снижается. При параллельной оценке структуры клеточного цикла (метахроматическое окрашивание акридиновым оранжевым), интенсивности апоптоза и экспрессии Fas-рецептора (двухпараметрическое окрашивание AnnV-FITC/антиFas МКА-РЕ) после кратковременной стимуляции митогеном (PHA-P, $5 \mu\text{g}/\text{ml}$, 24 часа) выявлено, что лимфоциты здоровых лиц и больных псориазом существенно не отличаются по митотической активности, интенсивности активационного апоптоза и величине активационно-индуцированной экспрессии Fas-рецептора. В то же время, соотношение между содержанием $AnnV^+ CD95^+$ лимфоцитов и суммарным содержанием $AnnV^+$ ФГА-активированных лимфоцитов при псориазе значительно снижалось, что свидетельствует об уменьшении "доли" Fas-зависимых механизмов апоптоза при активации клеток. Полученные данные подтверждают точку зрения, что в патогенезе псориатического процесса, как и в развитии других аутоиммунных заболеваний, важная роль принадлежит нарушениям "апоптотической реактивности" лимфоцитов.

Ключевые слова: спонтанный и индуцированный апоптоз лимфоцитов, растворимый Fas рецептор, псориаз.

Kapuler O.M., Nelyubin E.V., Kaut D.A., Sibiryak S.V.

LYMPHOCYTE APOPTOSIS IN PSORIASIS

Abstract. Forty-two patients with progressive vulgar psoriasis (PASI = 19.7 ± 1.5) and 40 healthy volunteers were under investigation. Psoriatic patients were characterized by increased number of $CD4^+ CD95^+$ peripheral blood T lymphocytes, which correlates with clinical psoriatic score, and by increased levels of soluble Fas (sFas) in serum, as compared to controls (resp., 1868.1 ± 186.8 pg/ml vs. 1281.4 ± 142.5 pg/ml, $P_{LSD} = 0.019$). The levels of spontaneous lymphocyte apoptosis and anti-Fas (Mab)-induced apoptosis in psoriatic patients did not differ from the controls. However, apoptosis induced by "oxidative stress" ($50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, 4 hrs) was depressed in the patients. Moreover, a simultaneous assessment of cell cycle structure (metachromatic staining with Acridine Orange), apoptosis and Fas receptor expression (AnnV-FITC/antiFas mAbs-PE staining) following a short-term mitogenic stimulation (PHA-P, $5 \mu\text{g}/\text{ml}$, 24 hrs) were performed. We found no marked differences in mitogenic reactivity, activation-induced apoptosis, and activation-induced Fas receptor expression when studying lymphocytes from healthy donors and psoriatic patients. However, PHA-activated lymphocytes from psoriatic patients displayed a significantly decreased ratio of $AnnV^+ CD95^+$ to the total $AnnV^+$ subpopulation, thus suggesting a decreased role of Fas-dependent mechanisms of apoptosis during the cell activation. The data obtained confirm a view, that an abnormal lymphocyte "apoptotic reactivity", which plays a crucial role in the mechanisms of autoimmunity, may also of importance in the pathogenesis of psoriasis. (*Med. Immunol.*, 2006, vol.8, № 4, pp 531-538)

Адрес для переписки:

Сибиряк Сергей Владимирович, д.м.н., проф., зав. лабораторией иммунофармакологии и иммунотоксикологии ИИФ УрО РАН, зав. отделом иммунологии ФГУ "Всероссийский центр глазной и пластической хирургии" Росздрава.
Уфа, 450075, ул. Р. Зорге 67/1, ФГУ ВЦГПХ Росздрава, отдел иммунологии,
Тел.: 3472 - 329-942, 3472 - 517-193,
М.т. 89173490499, 89019524623.
E-mail: srgsib@mail.ru

Введение

Иммунопатогенезу псориаза посвящено множество работ. Это неудивительно, поскольку псориаз, описанный впервые более 2000 лет тому назад, является самым распространенным хроническим дерматозом, – этим заболеванием страдают 2-3 % населения земного шара, а существующие методы терапии не всегда приводят к желаемому эффекту. Псориаз очень часто сопровождается не только поражением кожи, но и артритом, очень сходным по проявлениям с серонегативным ревматоидным артритом (10-30% больных), синдромом Крона [12]. Не случайно поэтому, что ряд авторов считает более правильным характеризовать этот дерматоз, как псориазическую болезнь [4]. В течение многих лет псориаз рассматривали исключительно как патологию кожи, сопутствующие иммунологические нарушения считались вторичными. Сегодня точка зрения изменилась, псориаз рассматривается как Th1-зависимое аутоиммунное заболевание, а иммунологическим нарушениям отводится приоритетная роль в его патогенезе [20].

Программированная смерть клеток путем апоптоза является одним из основных механизмов регуляции клеточного гомеостаза. Множество исследований свидетельствуют о нарушении терминальной дифференцировки и снижении апоптоза кератиноцитов при псориазе, – в кератиноцитах псориазической бляшки увеличивается экспрессия антиапоптогенных белков, снижается экспрессия проапоптогенных белков и чувствительность кератиноцитов к апоптогенным сигналам [1, 5, 20, 26]. Адекватный баланс между позитивной активацией лимфоцитов (пролиферацией, клональной экспансией) и их “негативной” активацией (апоптозом) является основным принципом функционирования иммунной системы [3, 6, 16]. Нарушения апоптотической регуляции выявляются при многих аутоиммунных заболеваниях, – системной волчанке, ревматоидном артрите, рассеянном склерозе и пр., однако исследования, посвященные нарушениям апоптоза лимфоцитов при псориазе, довольно малочисленны [4, 7, 23].

В настоящей работе представлены результаты оценки экспрессии Fas-рецептора на CD4⁺ Т-лимфоцитах периферической крови, уровень сывороточного Fas-рецептора (sFas), спонтанный апоптоз и чувствительность лимфоцитов периферической крови к индуцированному апоптозу, характер активационного апоптоза у пациентов с прогрессирующим вульгарным псориазом.

Материалы и методы

Иммунологическое исследование проведено у 42 больных вульгарным псориазом (прогрессирующая стадия, среднетяжелое течение) и 40 условно-здо-

ровых доноров. Группа больных псориазом состояла из 70% мужчин и 30% женщин, средний возраст $41,2 \pm 2,3$ года. У 12 пациентов (28,5%) диагностирован псориазический артрит. Средняя величина псориазического индекса (PASI – psoriasis area and severity index) составила $19,7 \pm 1,5$. Группа условно-здоровых доноров (контрольная группа) состояла из 60% мужчин и 40% женщин, средний возраст – $40,1 \pm 1,8$ лет. Группа включала лиц, которые на момент обследования не страдали острыми инфекционными заболеваниями и у которых, судя по анамнестическим данным, не выявлялись инфекционный, аутоиммунный и лимфопролиферативный синдромы. 14% доноров отмечали в анамнезе аллергические реакции на пищевые продукты и лекарства.

Взятие крови для иммунологического обследования (пункция локтевой вены) осуществляли в утренние часы строго натощак, – 2 мл крови помещали в пробирку VACUTAINER, содержащую динатриевую соль ЭДТА (BD) для иммунофенотипирования, 5 мл крови помещали в пробирку VACUTAINER, содержащую литиевую соль гепарина, для последующего выделения мононуклеаров и оценки апоптоза в краткосрочных культурах. Иммунологическое обследование проводилось незамедлительно после поступления пациента в стационар, до начала терапии.

Оценку содержания CD4⁺CD95⁺ лимфоцитов в периферической крови осуществляли стандартным методом прямого двухпараметрического иммунофлюоресцентного окрашивания. Использовали FITC-меченные МКА против CD4 (анти CD4-FITC, IgG2a, Caltag Lbs.) и меченные PE антитела против CD95, (анти CD95-PE, IgG1, Caltag Lbs.). Контрольные пробы инкубировали с FITC- или PE-меченными иммуноглобулинами соответствующего изотипа (мышинные IgG2a – FITC и мышинные IgG1-PE, Caltag Lbs.). Цитофлюориметрию осуществляли на проточном цитометре FACSCalibur (BD), при этом регистрировали суммарно не менее 10.000 событий. Полученные данные анализировали в рамках программы CellQuest.

Мононуклеары периферической крови выделяли стандартным методом градиентного центрифугирования (HISTOPAQUE-1077, Sigma, St. Louis).

Для оценки спонтанного и индуцированного апоптоза лимфоцитов периферической крови, выделенные мононуклеары ресуспендировали в среде RPMI-1640 (Sigma, St. Louis) без добавления сыворотки и инкубировали 4 часа (37°C, 5% CO₂) с антиFas МКА (мышинные IgM МКА против Fas-рецептора человека, 500 нг/10⁶кл, BD) или перекисью водорода (конечная концентрация 50 мкМ). Инкубацию осуществляли в пробирках для проточной цитометрии (Falcon). Через 4 часа оценивали апоптоз лимфоцитов с помощью стандартного метода окрашивания FITC-меченным Аннексином

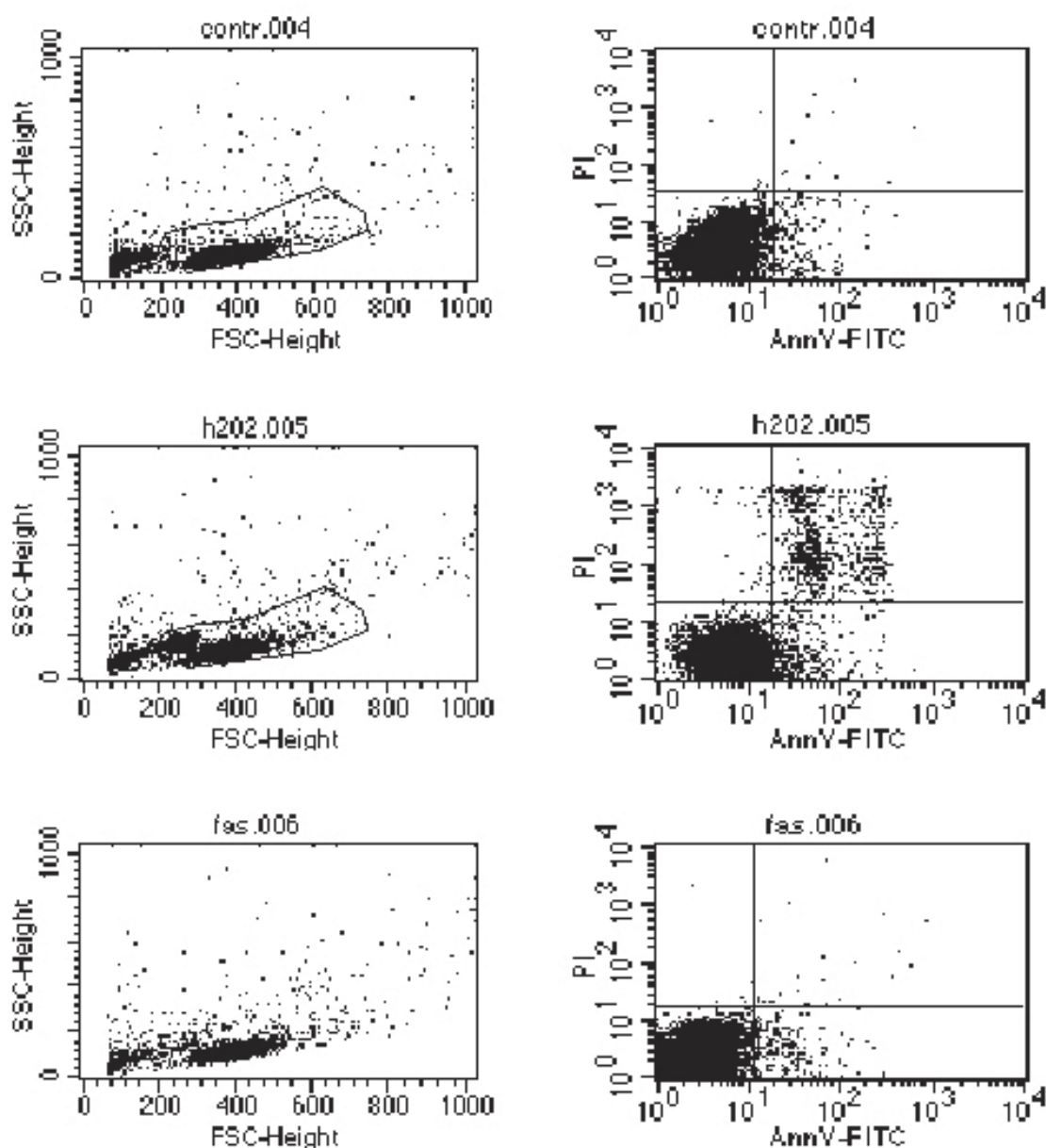


Рис. 1. Цитофлюорограммы, иллюстрирующие апоптоз лимфоцитов периферической крови донора, индуцированного пероксидом (конечная концентрация 50 μ M) (средний ряд) и мышинными IgM-МКА против Fas-рецептора человека (нижний ряд). Верхний ряд - контрольные культуры.

V (FITC-AnnV, Caltag Lbs.) и йодистым пропидием (PI, Applechem) [15]. При установке калибровочных параметров и величин компенсации осуществляли цитометрию неокрашенных клеток, клеток, окрашенных только Ann V и клеток, окрашенных только йодистым пропидием. Полученные данные анализировали в рамках программы CellQuest. Типичную цитофлюорограмму иллюстрирует рисунок 1.

Митогенез и активационный апоптоз оценивали в краткосрочных 24-часовых культурах лимфоцитов. Культивирование клеток осуществляли в плоскостных 24-луночных планшетах (Costar) при следующих условиях - среда RPMI-1640 (Sigma St.Louis), ЭТС - 5% (Sigma St.Louis), 37°C, 5% CO₂,

1,0 - 1,5 x 10⁶ кл/мл, общий объем 1 мл. В качестве митогена использован ФГА (РНА-Р, Difco, 5 мкг/мл). После культивирования часть клеток (0,5 мл) использовали для оценки митогенеза клеток методом метакроматического окрашивания акридиновым оранжевым [11]. Другую часть клеток однократно отмывали раствором CellWash с добавлением 2% бычьего сывороточного альбумина (Sigma) и затем ресуспендировали в 200 мкл этого же раствора. Клетки окрашивали PE мечеными МКА против CD95 в течение 15 мин, однократно отмывали раствором CellWash, затем ресуспендировали в "связывающем" буфере (10 mM HEPES-Na, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH=7,4), содержащим FITC-

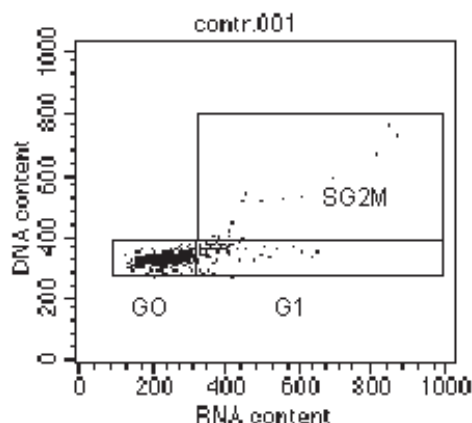
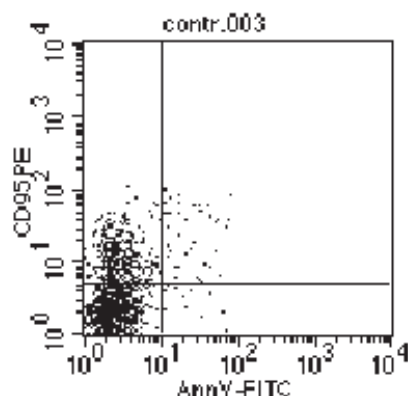
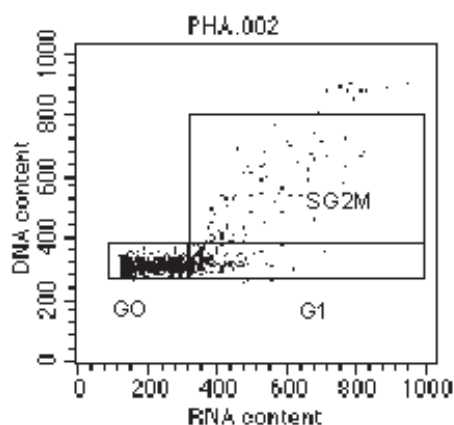
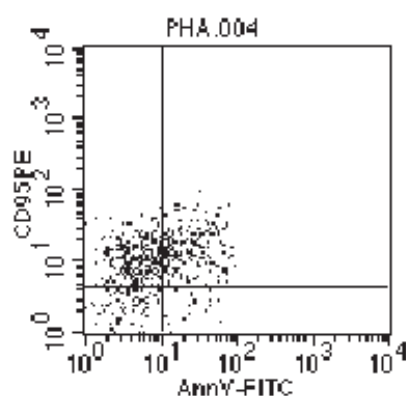
Контрольные культуры**Клеточный цикл****Апоптоз / экспрессия CD95****ФГА-Р 5 мкг/мл****Клеточный цикл****Апоптоз / экспрессия CD95**

Рис.2. Типичная цитофлюорограмма (здоровый донор), иллюстрирующая митогенез лимфоцитов периферической крови в краткосрочной культуре (метахроматическое окрашивание акридиновым оранжевым, по оси ординат - относительное содержание ДНК, по оси абсцисс - относительное содержание РНК), апоптоз и экспрессию Fas-рецептора. Верхний ряд - контрольные культуры; нижний ряд - ФГА-Р, 5 мкг/мл.

Ann V (1 мкг/мл), и через 5 мин осуществляли цитофлюорометрию. Контролем служили клетки, инкубированные с мечеными изотипическими мышиными иммуноглобулинами (IgG1- PE, Caltag Lbs.) и клетки, инкубированные с иммуноглобулинами и FITC- Ann V. Типичные цитофлюорограммы, полученные при оценке клеточного цикла, активационного апоптоза и экспрессии CD95, иллюстрирует рисунок 2.

Оценку содержания сывороточного растворимого Fas-рецептора (sFas) проводили иммуноферментным методом с использованием стандартной тест-системы human sAPO-1/Fas ELISA BMS245 (Bender MedSystems). При проведении ИФА руководствовались рекомендациями фирмы-производителя.

ИФА осуществляли на анализаторе Multiscan Plus (Labsystems).

Поставка реактивов, моноклональных антител и тест-систем осуществлялась ЗАО "БиохимМак" (Москва), ООО "БиоЛайн" (Санкт-Петербург), ООО "Диаэм" (Москва).

Статистическая обработка результатов произведена в рамках программного обеспечения Statistica для Windows (версия 6.0). Различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$. В процессе статистической обработки использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), для сравнения значимости различий между группами применяли LSD-критерий (P_{LSD}), а для сравнения внутригрупповых различий - непараметрический критерий Вилкоксона (P_w).

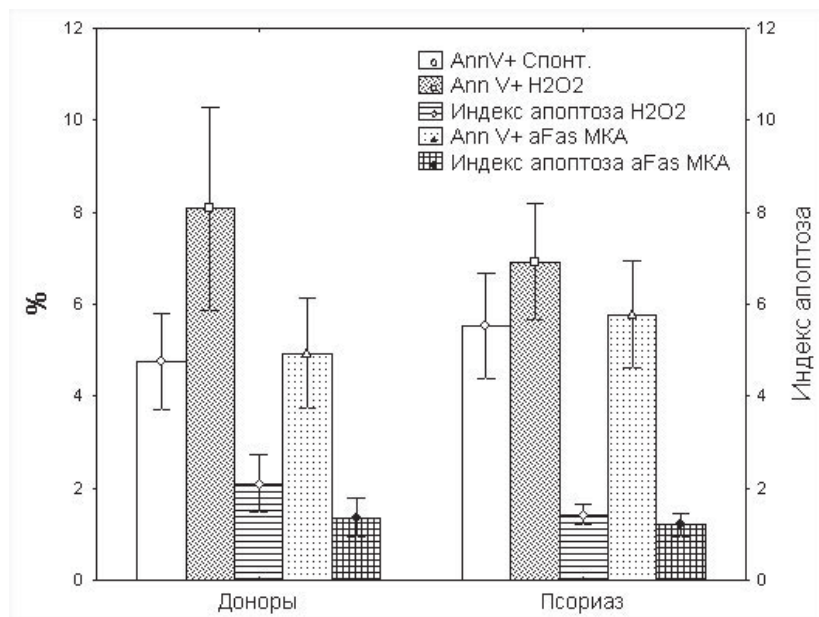


Рис. 3. Спонтанный уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови, апоптоз лимфоцитов индуцированный пероксидом (H_2O_2 , конечная концентрация $50 \mu M$) и мышиными IgM-МКА против Fas-рецептора человека у здоровых доноров и больных псориазом. Данные представлены, как $M \pm$ доверительный интервал для $\beta = 0,95$

Результаты

Экспрессия Fas-рецептора на лимфоцитах периферической крови и уровень sFas рецептора в сыворотке крови у больных псориазом

Содержание $CD4^+$ лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецептор ($CD4^+CD95^+$) в периферической крови и содержание растворимого Fas-рецептора в сыворотке у пациентов с псориазом и у здоровых доноров иллюстрирует таблица 1. В группе пациентов с псориазом среди $CD4^+$ Т лимфоцитов, статистически значимо возрастала доля лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецептор - содержание $CD4^+CD95^+$ лимфоцитов на 19% превышало такое в донорской группе. Была установлена слабая, но статистически значимая ($R_{\text{Спирмана}} = + 0,22$, $P = 0,044$) непараметрическая корреляция между величиной PASI и содержанием $CD4^+CD95^+$ лимфоцитов.

Уровень sFas в группе больных псориазом был значимо выше, нежели в группе доноров; корреляции между этим показателем и величиной псориазического индекса установлено не было.

Спонтанный апоптоз лимфоцитов периферической крови и их чувствительность к апоптозу, индуцированному антиFas МКА и пероксидом у больных псориазом

Интенсивность спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с прогрес-

сирующим псориазом и у здоровых доноров значимо не различалась (рис. 3). 4-часовая инкубация лимфоцитов периферической крови доноров с aFas МКА практически не изменяла содержания апоптотизирующих клеток, - индекс индукции апоптоза (отношение числа апоптотизирующих лимфоцитов в культурах с индуктором, к таковому в контрольных культурах) составил $1,36 \pm 0,80$. Аналогичная картина наблюдалась и в группе пациентов с псориазом, - после добавления aFas МКА значимого возрастания числа апоптотизирующих лимфоцитов не было. Добавление пероксида приводило к индукции апоптоза лимфоцитов; в культурах лимфоцитов здоровых доноров в среде, содержащей $50 \mu M H_2O_2$, содержание Ann V⁺ клеток возрастало практически в 2 раза, в сравнении с контрольными культурами ($P_w = 0,0002$), индекс апоптоза составил $2,10 \pm 0,30$. У больных псориазом пероксид также индуцировал апоптоз ($P_w = 0,011$), однако чувствительность клеток к апоптозу, индуцированному оксидативным стрессом, и величина индекса апоптоза были статистически значимо ниже, чем у доноров ($P_{\text{LSD}} = 0,01$).

Активационный апоптоз лимфоцитов периферической крови у больных псориазом

Стимуляция клеток ФГА вызывала активацию митогенеза лимфоцитов, причем статистически значимых межгрупповых различий в показателях митогенеза выявлено не было (табл. 2). Следует отметить, однако, тенденцию к снижению доли покоя-

Табл. 1. СОДЕРЖАНИЕ CD4⁺CD95⁺ ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И УРОВЕНЬ РАСТВОРИМОГО Fas РЕЦЕПТОРА У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ С ПРОГРЕССИРУЮЩЕЙ СТАДИЕЙ ВУЛЬГАРНОГО ПСОРИАЗА

Группа	Содержание CD4 ⁺ CD95 ⁺ лимфоцитов, %	Уровень sFas, пкг / мл
Здоровые доноры	24,5 ± 0,9	1281,4 ± 142,5
Псориаз	29,1 ± 1,4 P _{LSD} = 0,007	1868,1 ± 186,8 P _{LSD} = 0,019

Показатели представлены, как M ± m

Табл. 2. ФГА-ИНДУЦИРОВАННЫЙ МИТОГЕНЕЗ, АКТИВАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННАЯ ЭКСПРЕССИЯ Fas (CD95) РЕЦЕПТОРА И Fas-ЗАВИСИМЫЙ АПОПТОЗ В 24-ЧАСОВОЙ КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

Группа	Митогенез (относительное содержание клеток, %)						Экспрессия Fas (CD95+) лимфоциты, %		Апоптоз			
	Спонт.			ФГА-индуц.			Спонт.	ФГА-индуц.	Ann V+ лимфоциты, %		Ann V+CD95+ лимфоциты, %	
	G0	G1	SG2 M	G0	G1	SG2 M			Спонт.	ФГА-индуц.	Спонт.	ФГА-индуц.
Здоровые доноры	83,3 ± 1,2	3,8 ± 0,4	0,94 ± 0,10	58,1 ± 1,4	18,9 ± 1,4	3,85 ± 0,33	22,0 ± 3,7	44,9 ± 5,5 P _w = 0,001	10,5 ± 1,0	37,3 ± 4,8 P _w = 0,001	5,8 ± 1,0	22,8 ± 3,7 P _w = 0,001
Псориаз	79,2 ± 1,6	3,2 ± 0,4	1,07 ± 0,1	57,7 ± 1,6	17,4 ± 1,6	3,56 ± 0,30	15,6 ± 3,6	30,8 ± 5,3 P _w = 0,006 P _{LSD} = 0,07	10,4 ± 1,1	36,6 ± 3,5 P _w = 0,001	3,6 ± 0,7	16,6 ± 3,1 P _w = 0,001

P_w - в сравнении с показателями в нестимулированных культурах; P_{LSD} - межгрупповые различия

щихся G0-лимфоцитов в культурах лимфоцитов больных псориазом и, как следствие, тенденцию к снижению митотического потенциала клеток. Активация лимфоцитов доноров ФГА закономерно усиливала экспрессию CD95 – содержание Fas-экспрессирующих лимфоцитов в культуре возрастало в 2 раза (P_w = 0,001). Более чем трехкратно нарастало и содержание клеток, находящихся в ранней фазе апоптоза (P_w = 0,001), причем большая часть апоптотирующих клеток экспрессировали Fas-рецептор, - отношение числа Ann V⁺CD95⁺ лимфоцитов ко всем апоптотирующим клеткам составило в группе доноров 0,62 ± 0,05 (более 60%), а отношение числа Ann V⁺CD95⁺ лимфоцитов ко всем Fas-позитивным лимфоцитам составило 0,55 ± 0,06 (55%). У пациентов с псориазом спонтанная и индуцированная ФГА экспрессия Fas была несколько ниже, чем у здоровых лиц, однако статистически значимых различий выявлено не было. Спонтанное и индуцированное активацией содержание апоптотирующих лимфоцитов было аналогично таковым у здоровых лиц. Содержание AnnV⁺CD95⁺ лимфоцитов, как в неиндуцированных ФГА, так и в индуцированных ФГА культурах было несколько снижено и поэтому отношение числа этих клеток к общему числу Fas-эксп-

рессирующих клеток было таким же, как у доноров - 0,59 ± 0,05. В то же время, отношение содержания AnnV⁺CD95⁺ лимфоцитов ко всем апоптотирующим клеткам было статистически значимо ниже, нежели в донорской группе и составило 0,42 ± 0,05 (P_{LSD} = 0,02).

Обсуждение

В настоящее время патогенез большинства аутоиммунных расстройств интерпретируется в контексте нарушений апоптотической регуляции. Программированная клеточная смерть путем апоптоза играет ключевую роль как в элиминации аутореактивных клонов в процессе онтогенеза, так и обеспечения периферической толерантности. Дефекты апоптоза активированных лимфоцитов, в основном, Fas-зависимых механизмов выявлены при многих аутоиммунных заболеваниях. Эти нарушения могут быть сопряжены с генетическим дефектом Fas и FasL, ингибиторов апоптоза (с-FLIP), повышением уровня sFas, нарушением элиминации апоптотных телец (дефект C1q) с последующей презентацией аутоантигенов дендритными клетками и пр. Во всех случаях неконтролируемая активация и

элиминация лимфоцитов приводит к аутоагрессии. Можно ли рассматривать псориаз в числе других аутоиммунных заболеваний как “патологию апоптоза лимфоцитов”? Обнаруженное повышение содержания в $CD4^+$ Т-хелперов, экспрессирующих CD95, в периферической крови больных псориазом, описано неоднократно и другими исследователями [4], является закономерным проявлением активации иммунной системы и характерно для многих иммуновоспалительных процессов. Fas рецептор, который, безусловно, является основным “апоптогенным” рецептором, появляется на мембране лимфоцитов на ранних этапах их активации и необходим как для реализации программы рецепторного апоптоза, так и для митогенеза клеток [8]. Дальнейшая судьба Fas-экспрессирующих клеток зависит от многих факторов (цитокинового микроокружения, наличия ко-стимулирующих сигналов, экспрессии внутриклеточных про- и антиапоптогенных белков и т.д.) [16]. Именно поэтому, несмотря на количественное увеличение содержания $CD4^+CD95^+$ лимфоцитов у пациентов с псориазом, мы не обнаружили ни усиления спонтанного апоптоза лимфоцитов, ни повышения их чувствительности к Fas-индуцированному апоптозу в системе *in vitro*. В то же время в группе больных наблюдалось отчетливое повышение уровня сывороточного растворимого Fas-рецептора. Этот результат согласуется с данными Seshima и соавторов [23], которые обнаружили повышение уровня sFas у пациентов с пустулезным псориазом, однако в этой работе отмечалась корреляция уровня sFas с тяжестью процесса. sFas является продуктом альтернативного сплайсинга mRNA Fas рецептор и протеолитического отщепления трансмембранного Fas рецептора [9]. Повышение уровня sFas обнаружено и при других аутоиммунных заболеваниях: СКВ, ревматоидном артрите, дерматомиозите, системном склерозе, синдроме Сьегрена, ANCA-позитивном системном васкулите, гломерулонефрите [10, 19, 21, 24]. Существует точка зрения, что sFas ингибирует апоптоз и элиминацию активированных лимфоцитов, что способствует формированию аутоагрессивных клонов [22]. Есть, однако, мнение, отрицающее патогенетическую роль sFas при аутоиммунных процессах [14]. Как бы то ни было, нарушение механизмов Fas-зависимого апоптоза при псориазе, скорее всего, присутствует. В модельной системе *in vitro*, при активации ФГА, у больных псориазом не было значимых изменений структуры клеточного цикла и суммарной интенсивности активационного апоптоза, но “доля” Fas-зависимого апоптоза лимфоцитов значимо снижалась. Есть данные, что в псориазической бляшке снижается интенсивность Fas-зависимой апоптотической гибели мигрирующих в кожу активированных $CD95^+$ лимфоцитов, что, однако, связывается с гипоэкспрессией Fas лиганда кератиноцитами [7].

Об измененной апоптотической реактивности лимфоцитов при псориазе свидетельствует и увеличение резистентности лимфоцитов к апоптозу, индуцированному H_2O_2 , в реализации которого, как известно, принимают участие редокс-чувствительные регуляторные белки и мембранные стресс-киназы [13, 27]. Интересно, что в последние годы важная роль в формировании псориазической бляшки отводится мигрирующим в кожу $CD4^+CD45RO^+$ $CXR3^+$ Т лимфоцитам, содержание которых в периферической крови больных псориазом, как по нашим данным [2], так и по данным других исследователей [18, 25], существенно возрастает. Известно, что $CD45RO^+$ Т лимфоциты характеризуются высокой внутриклеточной экспрессией γ -глутамилтранспептидазы и поэтому малочувствительны к оксидативному стрессу и H_2O_2 [17].

В конце 90-х годов прошлого века была сформулирована концепция “апоптотического иммунодефицита” [3], в которой впервые иммунопатологические состояния рассматривались с позиций нарушения баланса между “позитивной” и “негативной” активацией. В контексте этой концепции любые проявления аутоагрессии рассматривались как дефицит “негативной активации”. Проведенное исследование свидетельствует, что псориаз не является исключением из правила и подтверждает наличие неких универсальных, типовых механизмов формирования аутоагрессии.

Выводы

1. Прогрессирующая стадия вульгарного псориаза сопровождается увеличением количества $CD4^+CD95^+$ Т лимфоцитов в периферической крови, содержание которых коррелирует с тяжестью процесса, но не сопровождается увеличением интенсивности спонтанного апоптоза и апоптоза, индуцированного анти Fas МКА.

2. В прогрессирующей стадии вульгарного псориаза выявляется повышение уровня продукта альтернативного сплайсинга mRNA Fas рецептора - растворимого Fas рецептора (sFas) в сыворотке крови, содержание которого не зависит от тяжести процесса.

3. При вульгарном псориазе выявляются нарушения “апоптотической реактивности” лимфоцитов периферической крови, которые выражаются в снижении чувствительности лимфоцитов к апоптозу, индуцированному оксидативным стрессом и снижением “доли” Fas-опосредованных механизмов апоптоза при активации лимфоцитов.

Благодарности

Авторы статьи выражают благодарность канд. биол. наук Н.Н. Курчатовой и канд. биол. наук

Р.Ш. Юсуповой за помощь при выполнении исследования.

Список литературы

1. Казанцева И. А. Апоптоз и его роль в патологии кожи // Российский журнал кожных и венерических болезней - 2000. - №4. - С. 17-22.
2. Капулер О.М., Каут Д.А., Сибиряк С.В. Субпопуляционная структура лимфоцитов при псориазе // Иммунология Урала (Материалы IV конф. Иммунологов Урала). - 2005. - № 1(4) - С. 61-62.
3. Ковальчук Л.В., Чередеев А.Н. Новые иммунопатогенетические взгляды: апоптотические иммунодефициты // Иммунология. - 1998. - № 6. - С. 17-18.
4. Кунгуров Н.В., Филимонкова Н.Н., Тузанкина И.А. Псориатическая болезнь. - Екатеринбург: Изд-во Урал. Ун-та, 2002. - 200 с.
5. Новиков А.И., Кононов А.В., Охлопков В.А., Правдина О.В. и др. Иммунохимические исследования при псориазе // Вестн. дерматол. венерол. - 2003. - № 3. - С. 26-28.
6. Ярилин А.А. Апоптоз и его место в иммунных процессах // Иммунология. - 1996. - № 6. - С. 10 - 23.
7. Arnold R., Seifert M., Asadullah Kh., Dieter H. et al. Crosstalk between keratinocytes and T lymphocytes via Fas/Fas ligand Interaction: Modulation by Cytokines processes // J. Immunol. - 1999. - Vol. 162. - P.7140-7147.
8. Budd R. Death receptors couple both cell proliferation and apoptosis // J. Clin. Invest. - 2002. - Vol. 109. - P.437-450.
9. Cheng J., Zhou T., Liu C., Shapiro J. et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule // Science - 1994. - Vol. 263. - P. 1759-1762.
10. Christensson M., Pettersson E., Eneslatt K. et al. Serum sFAS levels are elevated in ANCA-positive vasculitis compared with other autoimmune diseases // J. Clin Immunol. - 2002. - Vol. 22. - P. 220-227.
11. Darzynkiewicz Z. Simultaneous analysis of cellular RNA and DNA content // Meth. Cell Biol. - 1994. - Vol. 41. - P. 401-420.
12. Gladman D. Discussion: Clinical features, epidemiology, classification criteria, and quality of life in psoriasis and psoriatic arthritis // Ann. Rheum. Dis. - 2005. - Vol.64. - P.24-25.
13. Hildeman D., Mitchell Th., Kappler J., Marrack Ph. T cell apoptosis and reactive oxygen species // J. Clin. Invest. - 2003. - Vol. 111. - P. 575-581.
14. Knipping E., Krammer P., Onel K. et al. Levels of soluble Fas/APO-1/CD95 in systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis // Arthritis Rheum. - 1995. - Vol. 38. - P. 1735-1737.
15. Koopman G., Reuterlingsperger C., Kijten G., Keehnen R. et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression of B cells undergoing apoptosis // Blood. - 1994. - Vol. 84. - P. 1415 - 1420.
16. Krammer P. CD95's deadly mission in the immune system // Nature. - 2000. - Vol. 407. - P. 789 - 795.
17. Lahdenpohja N., Naive H. (CD45RA+) T lymphocytes are more sensitive to oxidative stress-induced signals than memory (CD45RO+) cells // Cell Immunol. - 1996. - Vol. 173. - P. 282-286.
18. Lecewicz-Torun B., Pietrzak A., Rolinski J., Brzozowski W. The peripheral blood lymphocyte pattern in psoriasis preceded by an infection // Med. Sci. Monit. - 2001. - Vol.7. - P. 889-893.
19. Lorenz H., Grunke M., Hieronymus T. et al. *In vitro* apoptosis and expression of apoptosis-related molecules in lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases // Arthritis Rheum. - 1997. - Vol. 40. - P. 306-317.
20. Nickoloff B., Nestle O. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities // J. Clin. Invest. - 2004. - Vol. 113. - P.1664-1675.
21. Nozawa K., Kayagaki N., Tokano Y. Et al. Soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic diseases // Arthritis Rheum. - 1997. - Vol. 40. - P. 1126-1129.
22. Papoff G., Cascino I., Eramo A. et al. An N-terminal domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death *in vitro* // J. Immunol. - 1996. - Vol. 156. - P. 4622-4630.
23. Seishima M., Seishima M., Takemura M., Saito K. et al. Increased serum soluble Fas, tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 concentrations in generalized pustular psoriasis // Dermatology. - 1998. - Vol. 196. - P.371-372.
24. Van der Linden M., T Van Lopik T., L A Aarden L. et al. Soluble CD95 concentrations are increased in patients with severe systemic lupus erythematosus, but not in their first degree relatives // Ann. Rheum. Dis. - Vol. 2001. - Vol. 60. - P. 237-241.
25. Vissers W., Arndtz C., Muys L., Van Erp P. et al. Memory effector (CD45RO+) and cytotoxic (CD8+) T cells appear early in the margin zone of spreading psoriatic lesions in contrast to cells expressing natural killer receptors, which appear late // Br. J. Dermatol. - 2004. - Vol. 150. - P. 852-859.
26. Wrone-Smith T., Johnson T., Nelson B., Boise L. et al. Discordant expression of Bcl-x and Bcl-2 by keratinocytes *in vitro* and psoriatic keratinocytes *in vivo* // Amer. J. Pathol. - 1995. - Vol. 146. - P.1079 -1088.
27. Zhuang Sh, Demirs J., Kochevar I. p38 Mitogen-activated Protein Kinase Mediates Bid Cleavage, Mitochondrial Dysfunction, and Caspase-3 Activation during Apoptosis Induced by Singlet Oxygen but Not by Hydrogen Peroxide // J. Biol. Chem. - 2000. - Vol. 275. - P. 25939-25948.

поступила в редакцию 20.01.2006
принята к печати 02.02.2006