

УДК 616.517+616.39+575.174.015.3+616.155.33

© Э.Ю. Бекирова, 2013.

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА D НА СИНТЕЗ ЦИТОКИНОВ ИНДУЦИРОВАННЫМИ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ С D-ДЕФИЦИТОМ

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

THE EFFECT OF VITAMIN D ON CYTOKINE SYNTHESIS BY INDUCED MONONUCLEAR LEUKOCYTES IN PATIENTS WITH PSORIASIS HAVING D-DEFICIENCY

E. Yu. Bekirova

SUMMARY

We have studied the effect of vitamin D on the levels of cytokines IL-1 β and TNF- α in the medium of cell cultures of mononuclear leukocytes in patients with skin psoriasis having D-deficiency among the inhabitants of the Crimean region. We have revealed a differentiated effect of vitamin D (24,25 (OH)₂D₃) on the synthesis of cytokines IL-1 β and TNF- α , this synthesis being produced by mononuclear cells, that depends on the level of 25 (OH) D₃ and reaches statistically significant values in patients with D-deficiency. In the culture-medium experiment in vitro, we have established in psoriasis patients with D-deficiency a vitamin-D-dependent decrease of cytokines IL-1 β and TNF- α synthesized by mononuclear cells. We regard these facts as a pathophysiological rationale for therapeutic correction of D-deficiency to reduce the cytokine imbalance in patients with psoriasis at the autumn-and-winter period (since October to February) under the conditions of sanatorium rehabilitation.

ВПЛИВ ВИТАМІНУ D НА СИНТЕЗ ЦИТОКИНОВ ІНДУКОВАНИМИ МОНОНУКЛЕАРНИМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ У ХВОРИХ ПСОРИАЗОМ З D-ДЕФІЦИТОМ

Е.Ю. Бекирова

РЕЗЮМЕ

У мешканців Кримського регіону, що страждають шкірними формами псоріазу й мають D-дефіцит, досліджувався вплив вітаміну D на рівень цитокінів IL-1 β і TNF- α у культуральній середовищі клітинної культури мононуклеарних лейкоцитів. Виявлено диференційований вплив вітаміну D (24,25(OH)₂D₃) на синтез цитокінів IL-1 β і TNF- α мононуклеарами у хворих псоріазом, що залежить від рівня 25(OH)D₃ і сягає статистично значимих значень у хворих з D-Дефіцитом. У хворих псоріазом з D-Дефіцитом у культуральному витральному експерименті виявлений вітамін D-Залежне зниження синтезу цитокінів IL-1 β і TNF- α мононуклеарними клітками. Ми розглядаємо ці факти як патофізіологічне обґрунтування доцільності лікувальної корекції D-Дефіциту для зменшення цитокінового дисбалансу у хворих псоріазом в осінньо-зимовий період (жовтень-лютий) в умовах санаторно-курортної реабілітації.

Ключевые слова: дефицит витамина D, цитокины, мононуклеарные лейкоциты, псориаз.

Известно, что дефицит витамина D, в частности, приводит к повышенному риску развития псориаза, инфекционных, аутоиммунных заболеваний, сахарного диабета, бронхиальной астмы и других заболеваний [4, 11]. В рамках современного учения о псориазе в последние годы указанный дерматоз стали все чаще относить к заболеваниям, развитие которых ассоциировано с дефицитом витамина D. Существенным шагом вперед в понимании этой проблемы явились исследования, посвященные расшифровке метаболизма витамина D на уровне кожи [6, 7, 10, 11].

К центральному механизмам, лежащим в основе системных проявлений как псориаза, так и дефицита витамина D, относят низкоактивное генерализованное неспецифическое воспаление [11, 13]. Так, накоплено много научных фактов, свидетельствующих о возрастании уровня маркеров системного воспаления и формировании глубокого иммунного дисбаланса при дефиците витамина D, а также об

антивоспалительном влиянии заместительной терапии витамином D [7, 11]. При этом важное значение в патофизиологии псориаза играют активированные T-клетки и антигенпрезентирующие клетки, которые синтезируют различные хемокины и цитокины, включающие IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, INF- α , TNF- α , а также гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор [6].

Таким образом, можно предположить, что сочетанное течение псориаза и дефицита витамина D может явиться «фактором взаимного отягощения» развития субклинического генерализованного неспецифического воспаления и, как следствие, манифестации 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 цитокинов IL-1 β и TNF- α в культуральной среде клеточной культуры мононуклеарных лейкоцитов больных псориазом с D-дефицитом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением состояли 54 больной кожными формами псориаза – жителями Крымского региона. Исследование проводилось в осенне-зимний период (октябрь-февраль) среди больных, поступающих на санаторно-курортное лечение. Первую группу составили 21 больной псориазом с физиологическим уровнем 25(OH)D₃ – > 40 нг/мл, вторую группу – 33 больных псориазом с D-дефицитом –

25(OH)D₃ < 10 нг/мл.

Определение содержания 25(OH)D₃ в сыворотке крови при формировании групп сравнения проводилось с использованием набора для определения витамина D 25-OH в биологических средах ELISA (Immunodiagnostik, Bensheim, Германия) согласно инструкции изготовителя.

Проводилось исследование влияния витамина D (использовался химический аналог 1,25 (OH)₂D₃ – 24,25(OH)₂D₃ (Sigma-Aldrich, США), растворенный в этаноле) на индуцированный липополисахаридом (LPS, 1 мкг/мл) синтез мононуклеарными лейкоцитами 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). Оптическую плотность конечного продукта ферментативной реакции определяли фотометрически.

Для культивации мононуклеарных лейкоцитов использован метод краткосрочных органных культур по Лурия Е.А. [3], обеспечивающий культивирование клеток *in vitro*. Культивация проводилась в присутствии антибиотиков (бензилпенициллина натриевой соли 1000 ЕД и стрептомицина сульфата 0,01 г на 1 мл культуральной среды). Моно-

Таблица 1

Влияние витамина D (24,25(OH)₂D₃) на уровень провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 β в супернатанте культуральной среды культуры мононуклеаров больных псориазом с D-дефицитом в эксперименте *in vitro* при поступлении, пг/мл.

Группы	Этапы эксперимента	Стат. показ.	TNF- α	IL-1 β
1-я группа (больные псориазом с физиологическим уровнем 25(OH)D ₃ – > 40 нг/мл)	Опыт 1 (уровень цитокина в супернатанте культуральной среды культуры клеток)	M \pm m n p	16,5 \pm 0,5 21 –	14,1 \pm 0,6 21 –
	Опыт 2 (с введением в культуральную среду 24,25(OH) ₂ D ₃)	M \pm m n p	15,1 \pm 0,4 21 < 0,05	12,9 \pm 0,5 21 < 0,2
2-я группа (больные псориазом с D-дефицитом – 25(OH)D ₃ < 10 нг/мл)	Опыт 1 (уровень цитокина в супернатанте культуральной среды культуры клеток)	M \pm m n p p ₁	24,7 \pm 0,6 33 – < 0,001	21,5 \pm 0,7 33 – < 0,001
	Опыт 2 (с введением в культуральную среду 24,25(OH) ₂ D ₃)	M \pm m n p p ₁	17,0 \pm 0,5 33 < 0,001 < 0,01	13,8 \pm 0,6 33 < 0,001 < 0,5

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.

нуклеарные лейкоциты выделяли из гепаринизированной крови центрифугированием на градиенте плотности фикокол-верографина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования влияния витамина D на индуцированный LPS) синтез мононуклеарными лейкоцитами больных псориазом с D-дефицитом цитокинов IL-1 β и TNF- α в культуральной экспериментальной модели представлены в таблице.

Как видно из табл., уровень цитокина TNF- α в культуральной среде культуры стимулированных LPS мононуклеарных клеток у больных 2-й группы на 49,7 % ($p_1 < 0,001$) выше в сравнении с 1-й группой больных. В опыте 2 у больных как 1-й, так и 2-й группы выявлено достоверное ингибирующее влияние на синтез TNF- α мононуклеарными клетками витамина D (24,25(OH) $_2$ D $_3$): показатель снижается соответственно на 8,5 % ($p < 0,05$) и на 31,2 % ($p < 0,001$).

В исследовании Peterson C.A., Heffernan M.E. (2008) выявлена обратная корреляционная зависимость между сывороточными уровнями 25(OH)D $_3$ и уровнем важнейшего провоспалительного цитокина – TNF- α , что может служить объяснением противовоспалительных биологических эффектов витамина D [12]. В этой связи необходимо еще раз подчеркнуть, что повышения в системном кровотоке уровня провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 и др.), а также CRP – важнейших лабораторных маркеров воспаления при псориазе расценивается как подтверждение системной воспалительной реакции, лежащей в основе развития как локальных (на уровне кожи), так и внекожных поражений в процессе прогрессирования дерматоза [1, 2]. Под влиянием витамина D увеличивается синтез IL-10, подавляющего активность Th1-клеток и снижается уровень TNF- α и IFN- γ [5, 9].

Уровень цитокина IL-1 β в культуральной среде культуры мононуклеарных клеток у больных 1-й группы в опыте 2 под влиянием введения в культуральную среду 24,25(OH) $_2$ D $_3$ существенно не меняется. У больных 2-й группы исходный (в опыте 1) уровень IL-1 β на 52,5 % ($p_1 < 0,001$) выше, чем у больных 1-й группы и статистически значимо снижается под влиянием 24,25(OH) $_2$ D $_3$ (на 35,8 %, $p < 0,001$).

ВЫВОДЫ

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

2. У больных псориазом с D-дефицитом в культуральном витральном эксперименте выявлено ви-

тамин D-зависимое снижение синтеза цитокинов IL-1 β и TNF- α мононуклеарными клетками. Эти факты расцениваются нами как патофизиологическое обоснование целесообразности лечебной коррекции D-дефицита для уменьшения цитокинового дисбаланса у больных псориазом в осенне-зимний период (октябрь-февраль) в условиях санаторно-курортной реабилитации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров В.В. Современные методы лечения псориаза / Владимиров В.В. // *Consilium Medicum: Дерматол.* - Москва, 2006. - С. 23-26.
2. Короткий Н.Г. Современная терапия тяжёлых форм псориаза / Короткий Н.Г., Полякова А.А. // *Consilium medicum.* – 2005. –Т. 7, № 1. – С. 64-67.
3. Лурия Е.А. Органные культуры кроветворной и лимфоидной ткани: автореф. дис. на соиск. науч. степени канд. мед. наук: спец. 03.099 / Е.А. Лурия. – М., 1972. – 37 с.
4. Bouillon R. Vitamin D and health: perspectives from mice and man / Bouillon R., Bischoff-Ferrari H., Willett W. // *J. Bone Miner. Res.* – 2008. – Vol. 23. - P. 974 – 979.
5. Cantorna M.T. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence / Cantorna M.T, Mahon B.D. // *Exp. Biol. Med.* – 2004. – Vol. 229. - P. 1136-1142.
6. Christophers E. Psoriasis – epidemiology and clinical spectrum / Christophers E. // *Clin. Exp Dermatol.* – 2001. – Vol. 26. - P. 314-320.
7. 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.
8. 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.
9. D'Ambrosio D. Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$: involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene / D'Ambrosio D. // *J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 101. - P. 252-262.
10. Griffiths C.E. Pathogenesis and clinical features of psoriasis / Griffiths C.E., Barker J.N. // *Lancet.* – 2007. – Vol. 370, N. 9583. - P. 263-271.
11. Hollick M.F. Medical progress: vitamin D deficiency / Hollick M.F. // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – Vol. 357. - P. 266-281.
12. 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.
13. Reichrath J. Vitamin D and the skin: an ancient friend revisited / J. Reichrath // *Exp. Dermatol.* – 2007. – Vol. 16. – P. 618-625.