

Черношей Д. А.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск*

Адамович Т. А.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск*

Хватова Л. А.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск*

Сыманович О. Ю.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск*

РЕАКТИВНОСТЬ CLA+ ЛИМФОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ С ПСОРИАЗОМ К КОМПОНЕНТАМ НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ

CLA+клетки представляют собой субпопуляцию Т-лимфоцитов, несущих на своей поверхности гликопротеин CLA (Cutaneous lymphocyte antigen — кожный лимфоцит-ассоциированный антиген), который является молекулой адгезии (лиганд — E-селектин) и хоуминга лимфоцитов в кожу. CLA представляет собой маркер активных кожных Т-лимфоцитов и соответствующих клеток памяти. CLA+Т-лимфоциты составляют 10–15 % от циркулирующих Т-лимфоцитов, могут быть CD4+ или CD8+ и часто несут на себе CD45RO антиген.

В настоящее время фенотип CLA+ лимфоцитов и их функциональная активность являются предметом интенсивных исследований. Получены данные о корреляции количества и фенотипа CLA+ лимфоцитов, а также профиля синтезируемых ими цитокинов с показателями тяжести хронического псориаза.

Определенную роль играет применение CLA+ лимфоцитов для изучения патогенеза псориаза *in vitro*. CLA+ лимфоциты являются относительно доступным источником лимфоцитов кожи, что позволяет строить различные модельные системы с использованием кератиноцитов, фибробластов, дендритных клеток и изучать роль межклеточных взаимодействий в патогенезе псориаза.

Целью настоящего исследования явилось получение и исследование функциональной активности CLA+ лимфоцитов при псориазе.

Материалы и методы. Выделение CLA+ лимфоцитов периферической крови осуществляли методом пэннинга с применением поликлональных антител (Flarebio, КНР):

Вкратце, полученные в результате градиентного центрифугирования мононуклеары периферической крови вносили в подготовленный 12 луночный культуральный планшет с сорбированными на дне лунок антителами. Инкубировали 40 минут при +4 °С. Несвязавшиеся клетки удаляли с помощью однократной отмывки с 0,2 % HSAв PBS. Далее в лунки вносили питательную среду RPMI-1640 (Gibco, США).

CLA+ лимфоциты стимулировали супернатантами бактериальных культур или митогенами в течение 4 часов при 37 °С во влажном термостате с 5 % CO₂.

РНК лимфоцитов выделяли с применением наборов «Рибо-золь-А» (Amplisens, РФ) согласно инструкции производителя. Выделенную РНК немедленно подвергали обратной транскрипции с применением набора «РЕВЕРТА» (Amplisens, РФ) согласно инструкции производителя.

Количественную ПЦР проводили с праймерами производства «Праймтех», РБ (табл. 1). Результаты нормировали по экспрессии гена бета-актина. Для анализа использовали показатели относительной экспрессии.

Таблица 1

Праймеры, примененные в исследовании

Ген	Праймер	Ген	Праймер
IL17	F: 5'-TCAACCCGATTGTCCACCAT-3' R: 5'-AGTTTAGTCCGAAATGAGGCTG-3'	Vb2	F: 5'-GAGTCTCATGCTGATGGCAACT-3' R: 5'-TCTCGACGCCTTGCTCGTAT-3'
IL22	F: 5'-GCAGGCTTGACAAGTCCAAC-3' R: 5'-GCCTCCTTAGCCAGCATGAA-3'	Vb3	F: 5'-TCCTCTGTCTGTGGCCTTT-3' R: 5'-TCTCGAGCTCTGGGTTACTTTCA-3'
IFNg	F: 5'-TCAGCTCTGCATCGTTTTGG-3' R: 5'-GTTCCATTATCCGCTACATCTGAA	Vb6	F: 5'-GGCAGGGCCAGAGTTTC-3' R: 5'-GGGCAGCCCTGAGTCATCT-3'
b-actin	F: 5'-TGACGGGGTCAACCCACACTGTG-3' R: 5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGA-3'	Vb14	F: 5'-GCTCCTTGGCTATGTGGTCC-3' R: 5'-TTGGGTTCTGGGTCACTTGG-3'

Результаты и обсуждение. Изучение CLA+ лимфоцитов пациентов с псориазом и здоровых лиц позволило выявить отличия в экспрессии отдельных переменных генов бета цепи ТКР. В частности, относительная экспрессия генов, нормированная по бета-актину, значительно превышала показатели группы контроля (практически здоровые лица) для Vb3 и Vb14 ($p < 0,05$).

Таблица 2

Относительная экспрессия некоторых переменных генов бета цепи ТКР CLA+ лимфоцитами практически здоровых лиц и пациентов с псориазом

Ген	Практически здоровые лица				Пациенты с псориазом			
	Vb2	Vb3	Vb6	Vb14	Vb2	Vb3	Vb6	Vb14
Относительная экспрессия	0,94 ±0,30	1,69 ±0,63	0,73 ±0,16	60,49 ±4,78	2,68 ±0,43	1,01 ±0,30	1,84 ±0,40	428,24 ±17,15

Стимуляция CLA+ лимфоцитов суперантигенами приводит к заметному усилению экспрессии некоторых эффекторных цитокинов. Различия по экспрессии IL22 и IFNg статистически значимы ($p < 0,05$) несмотря на небольшое количество исследованных образцов ($n = 5$).

Таблица 3

Относительная экспрессия генов некоторых эффекторных цитокинов CLA+ лимфоцитами практически здоровых лиц и пациентов с псориазом

Ген	Практически здоровые лица			Пациенты с псориазом				
	IL17	IL22	IFNg	IL17	IL22	IFNg	KGF	IL10
Относительная экспрессия	1,85 ±0,30	1,48 ±0,16	8,06 ±0,86	37,64 ±1,71	9,03 ±2,60	41,94 ±3,28	76,28 ±3,28	3,84 ±0,87

Обращает на себя внимание повышенная экспрессия провоспалительных цитокинов (IL17, IFNg) при низкой экспрессии иммунорегуляторного IL10. Также CLA+ лимфоциты пациентов с псориазом характеризуются повышенной экспрессией дифференцировочных и ростовых факторов, которые могут иметь отношение к патогенезу заболевания ($76,28 \pm 3,28$ и $9,03 \pm 2,60$ для KGF и IL22, соответственно).

При изучении результатов воздействия микробных компонентов была выявлена существенная гетерогенность экспрессии целевых генов. В зависимости от ответа лимфоцитов по IFNg и IL22 образцы были разделены на две группы отвечающие (относительная экспрессия > 100) и не отвечающие, соответственно (табл. 4).

Таблица 4

Относительная экспрессия некоторых генов CLA+ лимфоцитами пациентов с псориазом при стимуляции микробными компонентами

Ген	Без стимуляции (n = 9)		Не отвечающие (n = 5)		Отвечающие (n = 6)	
	М	±m	М	±m	М	±m
KGF	76,28	3,28	1342,72	119,12	2761,96	791,96
IFNg	41,94	1,71	71,03	14,49	4356,16	2852,24
IL10	3,84	0,87	11,64	10,34	143,86	115,33
IL17	37,64	2,60	364,02	55,18	505,90	179,29
IL22	9,03	1,63	331,38	1,75	456,79	167,58
Vb2	2,67	0,43	0,52	0,18	1,88	1,33
Vb3	1,01	0,30	1,92	0,94	3,28	1,17
Vb6	1,85	0,40	4,84	4,39	2,27	0,98
Vb14	428,24	17,16	3365,43	63,22	4793,02	1412,05

Стимуляция CLA+лимфоцитов пациентов с псориазом микробными компонентами приводит к существенному возрастанию экспрессии KGF, IFNg, IL17 IL22 ($p < 0,05$). Различия по экспрессии IL10 с группой без стимуляции не достоверны. Средние величины экспрессии для группы отвечающих значительно превышают таковые для не отвечающих по всем исследованным генам.

Культивирование CLA+ лимфоцитов пациентов с псориазом с микробными компонентами приводит к дальнейшему повышению экспрессии Vb14, различия с группой без стимуляции достоверны ($p < 0,05$).

К сожалению, индивидуальный разброс показателей относительной экспрессии не позволил получить достоверные различия ($p > 0,05$) между группами отвечающих и не отвечающих ($p > 0,05$). Тем не менее, полученные результаты являют-

ся перспективными для разработки метода оценки сенсibilизации лимфоцитов кожи к микробным компонентам нормальной микрофлоры.

Заключение. Изучены функциональные параметры CLA+ лимфоцитов практически здоровых лиц и пациентов с псориазом.

Выявлены значимые различия функции CLA+ лимфоцитов практически здоровых лиц и пациентов с псориазом.

Установлен профиль экспрессии генов цитокинов CLA+ лимфоцитами при стимуляции продуктами микроорганизмов микрофлоры.

Изучена экспрессия некоторых генов бета цепи ТКР CLA+ лимфоцитами практически здоровых лиц и пациентов с псориазом. Выявлен сдвиг использования генов бета цепи ТКР, характерный для стимуляции лимфоцитов определенными суперантигенами стафилококков и стрептококков.

Репозиторий БГМУ