

Б.Ф. Синіцин

СПЕЦИФІЧНИЙ АНТИГЕН У ПСОРІАТИЧНИХ СКВАМОЗНИХ ЕЛЕМЕНТАХ ЯК НАСЛІДОК НЕЕФЕКТИВНОСТІ АВТОІМУННИХ ГУМОРАЛЬНИХ РЕАКЦІЙ

Кримський медичний університет ім. С.І. Георгієвського

*Відомо, що з верхніми шарами епідермісу вогнищ псоріатичного запалення зв'язуються тільки IgG-автоантитіла, що може бути наслідком недостатньої деструкції епідермісу, що відторгається. Мета дослідження – вивчення реалізації ефекторної фази автоімунних гуморальних реакцій при механічній гомогенізації псоріатичних сквамозних елементів. З гомогенізованих структур клітин псоріатичних сквамозних елементів автоантитіла елюювались неіонним детергентом і визначалися методом радіальної імунодифузії за Манчіні. З'ясували, що при механічній деструкції псоріатичних сквамозних елементів *in vitro* природні епідермальні автоантигени стають мішенню не тільки IgG-, але й IgM- та IgA-автоантитіл. Отже, *in vivo*, у вогнищах псоріатичного запалення ці автоантигени недоступні, принаймні, для IgM- і IgA-автоантитіл. У зв'язку з цим, повною мірою не реалізується цитотоксична активність автоантитіл, що сприяє збереженню специфічного псоріатичного антигену в псоріатичних сквамозних елементах.*

Ключові слова: псоріаз, специфічний псоріатичний антиген, природні автоантигени.

Ураженість псоріазом складає в середньому 2-4 % населення, досягаючи в деяких районах Землі 10 %. Спостерігається зростання захворюваності на псоріаз з превалюванням тяжких форм [1, 2]. Однак інфекційна теорія псоріазу категорично заперечується, оскільки за всю історію його вивчення не зареєстровані випадки передачі псоріазу від людини до людини [3]. Однак, відсутність контагіозності, характерної для антропонозів, не виключає інфекційної природи псоріазу, оскільки він може належати до зоонозів, при яких людина нерідко виявляється для збудника біологічним тупиком [4]. Разом з тим, відсутність статистично значимого зв'язку псоріазу з антигенами гістосумісності при його виникненні після 30-40 років [5] не дозволяє виключити можливість передачі псоріазу від людини людині. А збільшення

частоти ураженості псоріазом дітей у сім'ях, в яких батьки страждають цим захворюванням, можна розглядати не тільки як результат високої генетичної схильності до псоріазу [1, 2], але і як наслідок великої ймовірності його передачі.

Інфекційна природа псоріазу заперечується й тому, що специфічні, характерні для псоріазу, антигени залишалися не виявленими до теперішнього часу [6-8]. Однак, при опорі на гіпотезу, яка розглядає можливість існування причинних для автоімунних реакцій антигенів інфекційної природи [9], ми припустили, що збудником псоріазу, як і при пріонних хворобах [10], можуть бути інфекційні білки, стійкі до травних ферментів. У зв'язку з цим, вони передаються іншому організму у складі псоріатичних сквамозних елементів аліментарним шляхом.

В результаті нам вдалося солюбілілізувати пепсином зі структур псоріатичних сквамозних елементів антиген, який виявився стійким до ферментів підшлункової залози. Він ідентичний антигену, який в нормі дислокується тільки за межами структур епідермісу, який відторгається. У складі цього антигену виявлені специфічні антигенні детермінанти, які не виявлялись таким методом в епідермісі, що відторгається у здорових людей і у вогнищах запалення при сонячному опіку і еритематозно-бульозній формі бешихи. Антигенні детермінанти преципітуються з утворенням окремої лінії і, отже, являють собою специфічний псоріатичний антиген [11-13].

Поява в структурах відторгнених псоріатичних епідермоцитів специфічного псоріатичного антигену поєднується з експресією із цих структур природних епідермальних автоантигенів (ПЕАА, що визначаються в роговому шарі епідермісу здорових людей) [14]. Тим самим створюються умови для взаємодії ПЕАА з антигенпрезентуючими клітинами і запуск, а в подальшому підтримання автоімунних реакцій при псоріазі, на що вказують фіксовані на експресованих автоантигенах IgM-, IgG-, IgA-автоантитіла.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Однак виникає питання: чому при розвитку повноцінної відповіді з боку гуморального імунітету на експресовані природні епідермальні автоантигени не спостерігається антитілозалежної деструкції епідермоцитів, які є носіями псоріатичного антигену, що сприяє його збереженню в псоріатичних сквамозних елементах?

Відомо, що у вогнищах псоріатичного запалення в природних умовах [16, 17] з верхніми шарами епідермісу зв'язуються тільки IgG-автоантитіла. Отже не виключено, що при повноцінній імунній відповіді на експресовані ПЕАА, останні в епідермоцитах залишаються недоступними, принаймні, для IgA- і IgM-автоантитіл, що сприяє збереженню структурної цілісності епідермоцитів на такому рівні, яким забезпечується перебування (персистенція) псоріатичного антигену в псоріатичних сквамозних елементах. У зв'язку з цим виникають питання: чи присутні ПЕАА в епідермісі, який відторгається у вогнищах псоріатичного запалення? Чи можуть вони виявитися мішенню не тільки IgG-, але і IgA-, а також IgM-автоантитіл запального ексудату при більш вираженій деструкції сквамозних елементів? Щоб відповісти на ці питання, метою даного дослідження стало встановлення присутності ПЕАА у псоріатичних сквамозних елементах і виявлення можливості їх становлення мішенню не тільки IgG-, але і IgA- і IgM-автоантитіл *in vitro* після механічної гомогенізації сквамозних елементів.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження служили псоріатичні сквамозні елементи хворих з поширеним псоріазом у стадії загострення до їх лікування в умовах стаціонару. В якості об'єктів порівняння використовувалися сквамозні елементи з області запалення у людей з еритематозно-бульозною формою бешихи, а також сквамозні елементи з ділянки сонячного опіку у людей, які не хворіють на псоріаз, і роговий шар епідермісу, який відторгається у здорових людей і був знятий з п'ят металевою теркою.

Субстрати для дослідження отримані шляхом заморожування сквамозних елементів при -20°C і відтавання, механічної гомогенізації у фізіологічному розчині NaCl зі склом і поділом гомогенату на дві фракції центрифугуванням при 1500 g 20 хвилин.

З клітинних структур, що опинилися в щільному осаді після центрифугування (зруйновані клітинні оболонки, елементи цитоскелету і ядер [18, 19]) елюювалися неіонним детергентом дезінтегроном-О [20] фіксовані до них імуноглобуліни [21], які визначалися в елюаті методом радіальної імунодифузії за Манчіні (РІД) [18]. Для виконання РІД розплавлені на фізіологічно-

му розчині NaCl 3 %-й агар розливався на предметні скла в об'ємі 3 мл. Після застигання на гель агару рівномірно наносилася моноспецифічна сироватка проти імуноглобулінів людини в такій кількості, щоб після дифузії в агар її титр виявився в два рази вище робочого, що припустимо для підвищення чутливості методу при збереженні здатності антисироватки утворювати лінії преципітації [22]. Через добу в гелі агару вирізалися лунки діаметром 4,5 мм. Досліджувані проби вносилися в лунки по 20 мкл двічі.

Специфічність елююваних імуноглобулінів-автоантитіл до ПЕАА виявлялася шляхом їх абсорбції (виснаження) [18] гомогенату епідермісу, який відторгається у здорових людей.

Абсорбуючий ПЕАА – 500 мг рогових лусочок гомогенізувалися у фізіологічному розчині натрію хлориду, центрифугувалися при 1500 g 20 хвилин, осад відмивали ізотонічним розчином NaCl, декантіруванням і висушували. У цей абсорбент входять дезінтегровані структури епідермісу, який відторгається у здорових людей, а також пов'язані з ними IgG-автоантитіла.

Абсорбція імуноглобулінів-автоантитіл, елююваних зі структур сквамозних елементів, здійснювалася в ході постановки РІД. В лунки вносилися по 4 мг сухого абсорбенту, потім елюат імуноглобулінів. Таким чином, автоантиген абсорбенту виступав як конкуруюча мішень. Реалізація конкуренції відбивалася у зменшенні радіусу кільця преципітації імуноглобуліну.

Статистична обробка даних проводилася загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Використовувався статистичний пакет обробки даних – Statistika V.6.

Результати досліджень та їх обговорення

Результати досліджень наведені в таблиці 1.

Виявилось, що з гомогенізованих структур епідермісу, який відторгається у здорових людей, елюювали IgG-автоантитіла, а кільця їх преципітації практично зникали при виснаженні елююваних автоантитіл абсорбувальним ПЕАА. При цьому з цих структур не виділяли IgM-, та IgA-автоантитіла. Отже, структури рогового шару епідермісу, який відторгається у здорових людей, в умовах проведеного дослідження є мішенню тільки IgG-автоантитіл, що говорить про їх приналежність до конститутивних автоантитіл, так як при адаптивній імунній відповіді синтезуються і IgA-автоантитіла [9]. Проте, проведені дослідження показали, що носіями ПЕАА є структури рогового шару епідермісу, який відторгається у здорових людей. Разом з тим, оскільки на гістологічних зрізах фіксовані до рогового шару IgG-автоантитіла не встановлені [16, 17], але визначені як циркулюючі у крові здорових людей [11], то в наших дослідженнях взаємодія

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Таблиця 1

Елюювані IgG-, IgM-, IgA-автоантитіла та їх виснаження абсорбуючими ПЕАА. Діаметри кілець преципітації в мм ($M \pm m$)

Сквамозні елементи	IgG до виснаження	IgG після виснаження ПЕАА	IgM до виснаження	IgM після виснаження ПЕАА	IgA до виснаження	IgA після виснаження ПЕАА
у нормі (n=10)	6,59 ±0,07	сліди	–	–	–	–
бешиха (n=12)	9,42±0,84	6,56±0,05	7,15±0,09	5,95±0,02	7,41±0,10	6,23±0,09
достовірність відмінностей		графи 2 і 3 p<0,05		графи 4 і 5 p<0,05		графи 6 і 7 p<0,05
сонячний опік (n=10)	7,19±0,06	6,31±0,07	7,70±0,21	5,90±0,03	8,91±0,43	6,24±0,05
достовірність відмінностей		графи 2 і 3 p<0,05		графи 4 і 5 p<0,05		графи 6 і 7 p<0,05
псоріаз (n=10)	9,79±0,17	8,55±0,08	7,63±0,10	сліди	7,68±0,10	5,77±0,03
Достовірність відмінностей		графи 2 і 3 p<0,05		графи 4 і 5 p<0,05		графи 6 і 7 p<0,05

між IgG-автоантитілами тканинної рідини і ПЕАА відбувається в ході гомогенізації епідермісу. Отже, в нормі ПЕАА недоступні для конститутивних автоантитіл міжклітинної тканинної рідини. А їх взаємодія відбувається при досить вираженій деструкції клітин, що, по всій видимості, сприяє елімінації пошкоджених клітин *in vivo*.

З гомогенізованих структур епідермісу, який відторгається у вогнищах запалення при еритематозно-бульозній формі бешихи, елюювали детергентом як IgG-, так і IgM-, і IgA-автоантитіла. При цьому вони виснажуються абсорбувальним ПЕАА, на що вказує зменшення діаметра кілець їх преципітації після виснаження. Отже, по-перше, ПЕАА присутні в епідермісі, що відторгається у вогнищах запалення при еритематозно-бульозній формі бешихи, оскільки в умовах проведеного дослідження вони стають мішенню ефекторних реакцій адаптивного гуморального імунітету. По-друге, цілком імовірно, що, оскільки при еритематозно-бульозній формі бешихи спостерігається некроз відторгненого епідермісу [1], то взаємодія між IgG-, IgM-, IgA-автоантитілами і ПЕАА відбувається і *in vivo*. Тобто спостережуване відторгнення некротизованого епідермісу, разом з присутніми в ньому мікроорганізмами і токсинами, відбувається за участю автоантитіл зі специфічністю до ПЕАА.

З структур гомогенізованого епідермісу, який відторгається у вогнищах запалення при сонячному опіку у людей, які не хворіють на псоріаз, елюювали детергентом як IgG-, так і IgM-, і IgA-автоантитіла. При цьому вони виснажуються абсорбувальним ПЕАА, на що вказує зменшення діаметра кілець їх преципі-

тації після виснаження цим автоантигеном. Отже, і в цьому випадку, сквамозні елементи є носіями ПЕАА, а спостережуване відторгнення епідермісу, підданого некротичним процесам [23], відбувається за участю IgG-, IgM- і IgA-автоантитіл зі специфічністю до ПЕАА.

З гомогенізованих структур клітин псоріатичних сквамозних елементів елюювали детергентом як IgG-, так і IgM- і IgA-автоантитіла. При цьому вони виснажуються абсорбуючими ПЕАА, на що вказує зменшення діаметра кілець їх преципітації після виснаження. Оскільки у вогнищах псоріатичного запалення некроз епідермісу відсутній [24], то взаємодія між ПЕАА і IgG-, а також IgM- і IgA-автоантитілами запального ексудату відбувається в результаті механічної гомогенізації псоріатичних сквамозних елементів.

З гомогенізованих структур клітин псоріатичних сквамозних елементів елюювали детергентом як IgG-, так і IgM-, і IgA-автоантитіла. При цьому вони виснажуються абсорбуючими ПЕАА, на що вказує зменшення діаметра кілець їх преципітації після виснаження. Оскільки у вогнищах псоріатичного запалення некроз епідермісу відсутній [24], то, отже, у проведених нами дослідженнях взаємодія між ПЕАА і IgG-, а також IgM- і IgA-автоантитілами запального ексудату відбувається в результаті механічної гомогенізації псоріатичних сквамозних елементів.

Таким чином, і при псоріазі, і при еритематозно-бульозній формі бешихи, і при сонячному опіку специфічна взаємодія IgG-, IgM-, IgA-автоантитіл з ПЕАА гомогенізованих структур сквамозних елементів вказує на гуморальну імунну відповідь на ці автоантигени

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

як на неспецифічний компонент у системі підтримки антигенного і структурного гомеостазу епідермісу.

Однак, за даними літератури, у вогнищах псоріатичного запалення в природних умовах [16, 17] спостерігаються відкладення тільки IgG-автоантитіл і тільки у верхніх шарах епідермісу. При цьому, як показали наші дослідження, при механічній деструкції псоріатичних сквамозних елементів з ПЕАА зв'язуються не тільки IgG-, але й IgA- і IgM-автоантитіла. Отже, деструкція епідермоцитів пов'язана з присутністю в їх клітинних структурах специфічного псоріатичного антигену, що виражається в експресії з цих структур ПЕАА [15]; запальний процес у відповідь на цю деструкцію при псоріазі формується таким чином, що ПЕАА епідермоцитів стають екранованими від автоантитіл, що виробляються в ході адаптивної імунної відповіді. У результаті вони не приймають участь у деструкції та елімінації уражених псоріатичним антигеном клітин. У силу цього в відторгнутому епідермісі зберігається специфічний псоріатичний антиген, що є одним з факторів, що обумовлюють не тільки хронічний перебіг псоріазу, а й можливість його передачі іншому організму.

Висновки

1. Природні епідермальні автоантигени присутні в епідермісі, що відторгається в ділянці запалення при сонячному опіку, еритематозно-бульозній формі бешихи і псоріазі. На них вказують IgG-, IgM- та IgA-автоантитіла, що фіксуються *in vitro* до цих автоантигенів при механічній деструкції сквамозних елементів, які утворюються у вогнищах запалення.

2. Однак, *in vivo* природні автоантигени епідермоцитів, відторгнених у вогнищах псоріатичного запалення, є недоступними, принаймні, для IgM- і IgA-автоантитіл, що сприяє збереженню специфічного псоріатичного антигену в псоріатичних сквамозних елементах.

Література

1. Терлецкий О.В. Псориаз / О.В. Терлецкий. – СПб: ДЕАН, 2007. – 510 с.
2. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence / R. Parisi, D.P. Symmons, C.E. Griffiths, D.M. Ashcroft // J. Invest. Dermatol. – 2013. – Vol. 133, N 2. – P. 377-385.
3. Crow J.M. Psoriasis uncovered / J.M. Crow // Nature. – 2012. – Vol. 492, N 7429. – P. 50-51.
4. Покровский В.И. Специфика эпидемиологии инфекционных болезней / В.И. Покровский, Б.Л. Черкасский // Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней: под ред. В.И. Покровского. – Москва: «Медицина», 1993. – Т. I. – С. 5-24.
5. Stratification by age of onset with 30 years as age limit is an effective means of identifying PSORS1-associated psoriasis in

patients with psoriatic arthritis / [R. Queiro, S. Alonso, M. Alperi et al.] // Joint Bone Spine. – 2011. – Vol. 78, N 6. – P. 581-583.

6. Raut A.S. Psoriasis clinical implications and treatment: a review / A.S. Raut, R.H. Prabhu, V.B. Patravale // Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst. – 2013. – Vol. 30, N 3. – P. 183-216.

7. Bowcock A.M. The genetics of psoriasis and autoimmunity / A.M. Bowcock // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. – 2005. – N 6. – P. 93-122.

8. Malkonen T. What do we know about pathogenesis of psoriasis? / T. Malkonen, S. Suomela // Duodecim. – 2011. – Vol. 127, N 15. – P. 1579-1589.

9. Хаитов Р.М. Иммунология / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатъева, И.Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000. – 430 с.

10. Prusiner S.B. Biology and genetics of prion diseases / S.B. Prusiner // Annu. Rev. Microbiol. – 1994. – N 48. – P. 655-686.

11. Sinitsyn B.F. To the etiology of autoimmune humoral responses while psoriasis / B.F. Sinitsyn // Proceedings of the 1st International Academic Conference, October 27-28, 2012 St. Louis, Missouri, USA, Vol. I. / hosted by the Publishing House «Science and Innovation Center», and the International Journal of Advanced Studies, October 27 – 28, 2012. – St. Louis, Missouri, USA. – P. 45-51.

12. Синицын Б.Ф. Специфический антиген при псориазе / Б.Ф. Синицын // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2012. – Т. 2, № 1. – С. 117-121.

13. Sinitsyn B.F. Soluble antigens of epidermis horn layer while the norm and the psoriasis / B.F. Sinitsyn, E.B. Nemtinova // Eur. Appl. Studies: Modern Approaches in Scientific Researches, 2nd International Scientific Conference: ORT Publishing. – Stuttgart. – 2013. – P. 160-163.

14. Purification of natural antikeratin autoantibodies from normal human serum and their effect on human keratinocytes cultured in vitro / [C.X. Li, Y.H. Wan, S.M. Chi et al.] // Br. J. Dermatol. – 2001. – Vol. 145, N 5. – P. 737-748.

15. Sinitsyn B.F. Natural epidermal self-antigens in autoimmune humoral responses in psoriasis / B.F. Sinitsyn, E.B. Nemtinova // Eur. Appl. Studies: Modern Approaches in Scientific Researches, 3rd International Scientific Conference: ORT Publishing. – Stuttgart. – 2013. – P. 40-42.

16. Humoral autoimmune responses to the squamous cell carcinoma antigen protein family in psoriasis / R.G. El-Rachkidy, H.S. Young, C.E. Griffiths, R.D. Camp // Invest. Dermatol. – 2008. – Vol. 128, N 9. – P. 2219-2224.

17. Autoimmunity in psoriasis. Relation of disease activity and forms of psoriasis to immunofluorescence findings / [S. Yabloncka, T.P. Chorzelski, E.H. Beutner et al.] // Arch. Dermatol. Res. – 1978. – Vol. 261. – P. 135-146.

18. Фримель Х. Иммунологические методы / Х. Фримель. – М.: Медицина, 1987. – 590 с.

19. Методы клеточной биологии [Электронный ресурс] // Клеточная биология [Электронный ресурс]. – Режим доступа к ресурсу : <http://biology-of-cell.narod.ru/subject.html>.

20. Иммунологический анализ гемагглютинина вируса гриппа А (N1N1), выделенного с помощью различных детергентов / Ю.С. Кривошеин, В.А. Шатров, Ю.Л. Криворучченко, И.Б. Андроновская // Микробиол. журн. – 1990. – Т. 52, № 3. – С. 51-54.

21. Патент № 63688 А Україна, МКИ 7 А61В 5/145. Спосіб визначення іммуноглобулінів / Б.Ф. Синицин, Е.Б. Немтінова, І.І. Єлефтеріаді та ін. – Заявка № 2003054930. Заявлено 29.05.2003. Опубл. 15.01.04. Бюл. № 1.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

22. Берзовски Дж.А. Взаимодействие антиген-антитело / Дж.А. Берзовски, А.Дж. Берковер // Иммунология: под ред. У. Пола. – М.: Мир, 1989. – Т.3. – С. 5-88.

23. Персина И.С. Иммуная система кожи в норме и патологии / И.С. Персина // Патология кожи / под ред. В.Н. Мордовцева, Г.М. Цветковой. – М.: Медицина, 1993. – Т.1. – С. 162-213.

24. Мордовцев В.Н. Генодерматозы и болезни с наследственным предрасположением / В.Н. Мордовцев, В.И. Альбанова // Патология кожи / под ред. В.Н. Мордовцева, Г.М. Цветковой. – М.: Медицина, 1993. – Т. 2. – С. 3-87.

SPECIFIC ANTIGEN IN PSORIATIC SQUAMOTIC ELEMENTS AS A RESULT OF AUTOIMMUNE HUMORAL REACTIONS INEFFECTIVENESS

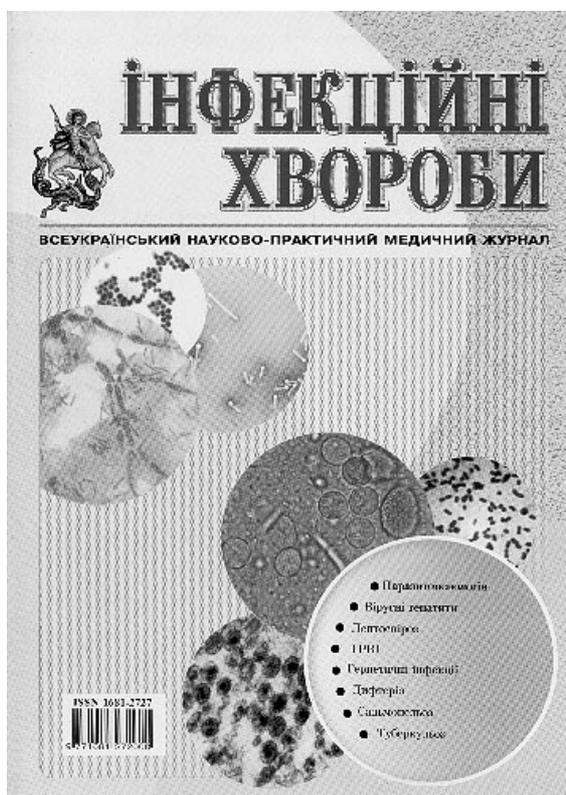
B.F. Synitsyn

SUMMARY. It has been established that only IgG-autoantibodies are binding with the epidermis upper layers in psoriatic inflammation areas, which may be the result of insufficiently expressed destruction of rejected epidermis. The purpose of the research – to study the realization of the autoimmune humoral

reactions' effector phase in the mechanical homogenization of psoriatic squamotic elements. The autoantibodies from the homogenized cell structures of psoriatic squamotic elements have been eluted with nonionic detergent and has been identified with the Mancini method of radial immunodiffusion in the agar. It appeared that in case of mechanical destruction of the psoriatic squamotic elements in vitro the natural epidermal autoantibodies become the target of not only IgG-autoantibodies, but IgM-, and IgA- autoantibodies as well. Therefore, in vivo, in the psoriatic inflammation areas, these autoantigens are impervious at least for IgM- and IgA-autoantibodies. That's why the cytotoxic activity of autoantibodies is not realized in the full extend, and that shows in the presence of the specific antigen in the psoriatic squamotic elements.

Key words: psoriasis, specific psoriatic antigen, natural autoantigens.

Отримано 19.07.2013 р.



Шановні колеги! ПЕРЕДПЛАЧУЙТЕ І ЧИТАЙТЕ щоквартальний всеукраїнський науково-практичний медичний журнал «Інфекційні хвороби»,

що регулярно видається вже 18 років! У кожному номері часопису: передова стаття, оригінальні дослідження, огляди і лекції, дискусії та роздуми, накази МОЗ, методичні матеріали, короткі повідомлення та випадки з практики, інформація про нові лікувальні препарати та методи діагностики, ювілеї і події, рецензії. Журнал адресується для науковців, інфекціоністів, лікарів-лаборантів, інших практикуючих лікарів, а також працівників санітарно-епідеміологічної служби.

Передплатний індекс 22868. Ціна на 3 міс. (один номер) – 47 грн 75 коп., на 6 міс. – 95 грн 50 коп., на 12 міс. – 191 грн 00 коп. Передплата приймається у кожному поштовому відділенні України.

Видавництво «Укрмедкнига»