

На правах рукописи

Мельников Антон Павлович

**НАРУШЕНИЯ СИСТЕМЫ Th1- и Th2-ЦИТОКИНОВ
ПРИ ПАРАНОИДНОЙ ШИЗОФРЕНИИ**

14.00.16 – патологическая физиология

14.00.18 – психиатрия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2008

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научные консультанты:

доктор медицинских наук,
профессор

Рязанцева
Наталья Владимировна

доктор медицинских наук

Агарков
Александр Прокопьевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор

Агафонов
Владимир Иванович

доктор медицинских наук,
профессор

Семке
Аркадий Валентинович

Ведущая организация:

ГОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия Росздрава»

Защита состоится «___» _____ 2008 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (643050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета

Автореферат разослан «___» _____ 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Суханова Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В течение длительного времени изучение биологических основ развития психических расстройств было сосредоточено в основном на выявлении структурно-функциональных особенностей мозговой ткани. Это позволило накопить многочисленные данные, указывающие на наличие нейроанатомических, нейрохимических, нейрофизиологических и нейроинтегративных нарушений при шизофрении и других психопатологических состояниях [Аганова Э.А., Уранова Н.А., 1990; Powchick P. et al., 1998; Тиганов А.С., 1999; Yao J.K. et al., 2000; Sperner-Unterweger B., 2005; Lang U.E. et al., 2007]. Вместе с тем в настоящее время основой стратегии поиска и идентификации биологических детерминант психических расстройств является изучение системных взаимоотношений. Стало ясно, что при шизофрении в патологический процесс вовлекается не только нервная система, на уровне которой разворачиваются структурно-функциональные нарушения. В последние годы особое внимание исследователей привлечено к состоянию иммунной системы при психических расстройствах [Ветлугина Т.П., 2000; Muller N., 2002; Семке В.Я. и соавт., 2003; Schwarz M.J., 2003; Андросова Л.В. и соавт., 2004; Коляскина Г.И. и соавт., 2004; Ветлугина Т.П. и соавт., 2006; Strous R.D., Shoenfeld Y., 2006].

К настоящему времени накоплено достаточное количество фактических данных относительно особенностей функционирования клеточного и гуморального звеньев иммунной системы при шизофрении. Новые перспективы исследований иммунного дисбаланса при шизофреническом процессе появились благодаря успехам фундаментальной иммунологии, в частности после открытия мессенджеров иммунных реакций – цитокинов [Ярилин А.А., 1997; Фрейдлин И.С., 1999; Ройт А. и соавт., 2000; Симбирцев А.С., 2004; Drzyzga L. et al., 2006]. Нарушения цитокиновой сети ведут к формированию дизрегуляции иммунной системы [Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Владимирская Е.Б., 2002; Ebrinc C. et al., 2002; Zhang X.Y. et al., 2003].

Интерес к оценке состояния системы цитокинов у больных психическими расстройствами продиктован тем фактом, что интерлейкины включены в процессы взаимодействия нервной и иммунной систем: IL2 регулирует освобождение дофамина из нейронов полосатого тела [Lapchak P.A., 1992; Коляскина Г.И. и соавт., 2004]. Клетки мозговой ткани (нейроны и глия) имеют на своей плазматической мембране рецепторы для IL1, IL2 и IL6, а также могут сами продуцировать эти интерлейкины [Zalzman S., 1994]. В литературе

встречаются сообщения, демонстрирующие противоречивость результатов исследования Th1- и Th2-цитокинов у больных шизофренией. Так, ряд исследователей сообщают, что содержание IL2, IL4 и TNF α в сыворотке крови, полученной у больных параноидной шизофренией, не изменялось либо увеличивалось по сравнению с таковым у здоровых людей [Schwartz M., 2000; Cazzullo C.L. et al., 2001; Kaminska T. et al., 2001; Ebrinc C. et al., 2002]. Другие авторы представили данные о снижении продукции Th1- и Th2-цитокинов мононуклеарными лейкоцитами крови [Kowalski J. et al., 2000; Zhang X.Y. et al., 2002; Mahendran R., Chan Y.H., 2004; Avgustin B. et al., 2005]. При проведении этих исследований принимается во внимание и то обстоятельство, что для лечения больных используются антипсихотические средства – классические и атипичные нейролептики, которые способны модулировать иммунный ответ [Raparport M.H. et al., 2001; Pae C.U. et al., 2006].

Несмотря на пристальное внимание исследователей к данной проблеме, до сих пор остаются нерешенными ряд вопросов: предшествуют ли изменения в иммунной системе, в частности – в цитокиновой сети, манифестации заболевания или являются следствием возникшего патологического процесса: осуществляют ли они защитную функцию или обладают «агрессивными» свойствами, способствуя возникновению психопатологии [Андросова Л.В. и соавт., 2004; Коляскина Г.И. и соавт., 2004; Ветлугина Т.П. и соавт., 2006].

Комплексное исследование продукции и рецепции иммунорегуляторных Th1- и Th2-цитокинов мононуклеарными лейкоцитами крови у больных параноидной шизофренией представит возможность приблизиться к разрешению дискуссионного вопроса фундаментального характера о патогенезе иммунных нарушений при шизофреническом процессе, что в свою очередь позволит обосновать новые патогенетически оправданные способы диагностики и коррекции дисрегуляции иммунной системы при данной патологии.

Цель исследования: установить особенности продукции и рецепции мононуклеарными лейкоцитами крови Th1- и Th2-цитокинов при параноидной шизофрении.

Предпринятое исследование было сосредоточено на решении следующих основных *задач*:

1. Установить особенности продукции IL2, IL4 и TNF α мононуклеарными лейкоцитами крови у больных параноидной шизофренией.
2. Оценить состояние рецепторного аппарата к IL2, IL4 и TNF α мононуклеарных лейкоцитов крови у больных параноидной шизофренией.

3. Установить роль изменений апоптотической гибели иммунокомпетентных клеток крови в механизмах нарушения их цитокинопосредованной кооперации у больных параноидной шизофренией.
4. Выявить клинко-иммунологические параллели состояния системы Th1- и Th2-цитокинов (IL2, IL4 и TNF α) и их рецепторов у больных параноидной шизофренией в зависимости от активности, характера и длительности течения патологического процесса, до и в процессе проведения психофармакокоррекции.

Научная новизна. Впервые проведено сравнительное исследование способности мононуклеарных лейкоцитов крови продуцировать цитокины с провоспалительными (IL2, TNF α) и противовоспалительными (IL4) эффектами и комплементарных им рецепторов у больных параноидной шизофренией в зависимости от активности, характера и длительности течения патологического процесса, до и в процессе психофармакокоррекции. Установлены увеличение базальной продукции мононуклеарными лейкоцитами крови IL2, снижение секреции IL4 у пациентов с параноидной шизофренией, нарушение презентации в интактной и митоген-стимулированных культурах мононуклеарных лейкоцитов крови мембрано-ассоциированных форм рецепторов к IL2 и IL4. Получены новые данные, свидетельствующие о том, что при обострении параноидной шизофрении имеют место повышение базальной продукции TNF α и его растворимого рецептора; в период редукции психопатологической симптоматики (после проведения психофармакотерапии) нарушена продукция мембраносвязанной и растворимой форм рецептора к TNF α на фоне снижения содержания TNF α в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови. Выявлено, что нарушение реализации апоптоза лимфоцитов при параноидной шизофрении (стимулирование апоптоза лимфоцитов при обострении заболевания, угнетение программированной гибели лимфоцитарных клеток у пациентов на фоне проведения психонейролептикотерапии) сопряжено с дисфункцией TNF α -индуцированного пути регуляции программированной гибели лимфоцитов. Получены приоритетные данные, свидетельствующие, о том, что продукция и рецепция иммунорегуляторных цитокинов (IL2, IL4, TNF α) в зависимости от типа течения параноидной шизофрении (непрерывное, эпизодическое течение) характеризуются однонаправленными, разной степени выраженности изменениями и не зависят от продолжительности заболевания.

Теоретическая и практическая значимость. Выявленные закономерности нарушения системы иммунорегуляторных Th1/Th2 цитокинов

(IL2, IL4, TNF α) и рецепторов к ним у больных параноидной шизофренией раскрывают новые патофизиологические аспекты шизофренического процесса. Результаты исследования могут быть положены в основу разработки патогенетически обоснованных подходов к прогнозированию клинического течения шизофрении, а также способов предупреждения и коррекции дизрегуляции иммунной системы при шизофреническом процессе.

Положения, выносимые на защиту:

1. У больных параноидной шизофренией имеет место дисбаланс продукции и рецепции моноклеарными лейкоцитами крови IL2, IL4 и TNF α , характер и степень выраженности которого определяется активностью и особенностью течения шизофренического процесса.
2. При параноидной шизофрении нарушена реализация запрограммированной гибели лимфоцитов крови.

Апробация и реализация работы. Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на научно-практической конференции «Развитие биопсихосоциального подхода в сфере охраны психического здоровья» (Томск, 2005), Всероссийской научно-практической конференции «Современные принципы терапии и реабилитации психически больных» (Москва, 2006), Межрегиональной научно-практической конференции «Вопросы охраны психического здоровья, обеспечения доступности и качества оказания психиатрической помощи» (Барнаул, 2007), II международной научной конференции «Фундаментальные исследования в биологии и медицине» (Черногория, Бечичи, 2007), IV международной научной конференции «Современные медицинские технологии (диагностика, терапия, реабилитация и профилактика)» (Хорватия, Пула, 2007).

Основные результаты диссертационного исследования включены в лекционный курс по патологической физиологии (разделы «Патофизиология иммунной системы») для студентов лечебного и педиатрического факультетов ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, внедрены в учебный процесс кафедры фундаментальных основ клинической медицины в разделы «Клиническая патофизиология реактивности организма», «Молекулярные основы патологии», кафедры психиатрии, наркологии и психотерапии ФПК и ППС в раздел «Шизофрения, шизотипические и бредовые расстройства».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ, из которых 2 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов

и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 19 рисунками и 26 таблицами. Библиографический указатель включает 417 источников (94 отечественных и 323 иностранных).

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе приведены результаты комплексного клинико-лабораторного обследования 80 больных параноидной шизофренией мужского пола в возрасте от 19 до 53 лет (средний возраст составил 33 ± 1 года), проводившегося на базе стационарных отделений Томской областной клинической психиатрической больницы (главный врач – Заслуженный врач РФ, д-р мед. наук А.П. Агарков).

Диагностическая оценка и клиническая верификация психических расстройств проводились в соответствии с Международной Классификацией Болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). Комплексному исследованию функциональных свойств мононуклеарных лейкоцитов крови предшествовали катamnестический анализ каждого случая, а также оценка психического статуса пациентов. Критериями исключения из исследования являлись наличие инфекционных заболеваний, обострений хронических соматических, неврологических заболеваний, алкогольной и наркотической зависимости пациентов.

Диагноз был верифицирован в ходе настоящей и предыдущих госпитализаций в психиатрический стационар. Обязательной явилась процедура ретроспективного анализа динамики шизофренического процесса путем изучения архивных историй болезни, а также амбулаторных карт. При их детальном анализе оказалось, что у большинства больных заболевание начиналось в возрасте от 20 до 30 лет (в среднем - 23 ± 1 года). Между тем среди обследованных душевнобольных встречались пациенты с манифестацией шизофрении как в 16 лет, так и в 34 года. Средняя давность заболевания, определявшаяся по данным психиатрического учета, оказалась равной $8,7\pm 0,6$ лет.

С учетом характера течения, темпа прогрессивности и длительности шизофренического процесса, особенностей проведения психофармакокоррекции, а также ведущих продуктивных и негативных расстройств были выделены следующие группы больных шизофренией.

Обследование 46 пациентов проводилось на фоне клинически выраженного обострения шизофренического процесса непосредственно при

госпитализации в психиатрический стационар до назначения психофармакокоррекции. Основными критериями включения больных в исследование являлись: наличие брегово-галлюцинаторной симптоматики; удовлетворительное соматическое состояние, подтвержденное впоследствии результатами лабораторного (общий анализ крови, общий анализ мочи) и инструментального (электрокардиография, рентгенография и др.) методов исследования; отсутствие сведений о применении психотропных лекарственных средств в течение 6 и более месяцев, предшествовавших госпитализации. Отсутствие поддерживающей терапии было обусловлено тем, что у пациентов либо отмечалась стойкая ремиссия заболевания длительностью более 6 месяцев, не требующая психофармакокоррекции, либо больные самостоятельно прекратили прием нейролептиков.

Клиническая картина была представлена острой параноидной симптоматикой с выраженной аффективной напряженностью, псевдогаллюцинациями, бредовыми идеями воздействия, отношения, преследования, явлениями психического автоматизма, актуальными болезненными переживаниями и др. Повторное обследование этих больных проводилось через 1,5-2 месяца при выписке из стационара в момент регресса психопатологической симптоматики в состоянии неполной терапевтической ремиссии, полученной в результате проведения традиционной психофармакокоррекции (аминазин, галоперидол, азалептин, трифтазин, амитриптилин и др.).

Отдельную категорию обследованных больных составили 34 пациента с параноидной шизофренией, у которых проведение нейролептической терапии не приводило к полной редукции продуктивной психопатологической симптоматики. Все пациенты получали психофармакотерапию, характеристики которой (спектр и дозировки препаратов, темпы наращивания, способы введения) отвечали современным принципам адекватности лечения. В зависимости от особенностей психического и сомато-неврологического статуса больных, особенностей их реагирования на препараты терапия своевременно корректировалась.

Непрерывное течение параноидной шизофрении (по МКБ-10 рубрика F20.00) было диагностировано у 33 больных, эпизодическое (по МКБ-10 рубрика F20.01-03) – у 47 пациентов.

В зависимости от длительности заболевания пациенты были разделены на три группы: заболевание с длительностью от 1-го до 5-ти лет было выявлено у 28 (35,0%) человек, от 5-ти до 10-ти лет - у 31 пациента (38,75%), более 10 лет

– у 21 (26,25%) больного.

Контрольную группу составили 35 практически здоровых доноров мужского пола, не предъявлявших на момент обследования жалоб соматического и психического профиля, выполнявших полный объем профессиональных обязанностей и ведущих привычный образ жизни.

У пациентов с параноидной шизофренией и здоровых доноров проводили комплексное исследование концентрации цитокинов (IL2, IL4 и TNF α) и растворимого рецептора TNF α (sTNFR1) в супернатантах интактной, фитогемагглютинин (ФГА)- и липополисахарид (ЛПС)-стимулированных культур мононуклеарных лейкоцитов, количества лимфоцитов крови, презентующие соответствующие мембраносвязанные рецепторы (IL2R, IL4R, TNFR1), а также вступивших в апоптоз (табл.).

Выделение мононуклеарных лейкоцитов крови осуществляли с использованием Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция). Для получения супернатантов выделенные мононуклеарные лейкоциты ресуспендировали в полной питательной среде, состоящей из 90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», Новосибирск), 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Санкт-Петербург), 0,3 мг/мл L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина. Для стимуляции секреторной способности мононуклеарных клеток в пробы вносили 10 мкг/мл ФГА или ЛПС («Difco», Германия). Определение содержания лимфоцитов в суспензии и их жизнеспособности проводили в счетной камере Горяева. Процедуру определения уровня IL2, IL4, растворимого рецептора TNF α (sTNF-R1) в супернатантах интактной, ФГА- и ЛПС-стимулированных культур мононуклеарных лейкоцитов крови проводили с использованием метода иммуноферментного анализа по инструкции, предлагаемой производителем тест-систем («Procon», Россия; «Cytimmun», США).

Оценку количества лимфоцитов крови, презентующих мембраносвязанные формы рецепторов к IL2, IL4 и TNF α и вступивших в апоптоз, проводили методом проточной лазерной двухцветной цитометрии с использованием моноклональных антител к цитокиновым рецепторам и FITC-меченного аннексина V, соответственно [Van England et al., 1998]. Регистрацию презентации цитокиновых рецепторов на лимфоцитах проводили согласно протоколу фирмы производителя («R&D Systems», США). Анализ образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитометре Epics XL («Beckman Coulter», Франция) с применением автоматического программного обеспечения и методов сбора и анализа данных с высоким разрешением (1024 канала) (рис. 1).

Распределение обследованных лиц по клиническим группам в соответствии с использованными методами исследования

Методы исследования	Характеристика обследованных								
	Здоровые доноры	Больные параноидной шизофренией							
		Активность шизофренического процесса		Резистентные к психотерапии	Характер течения шизофрении		Длительность течения шизофрении		
		обострение	редукция		непрерывный	эпизодический	от 1 до 5 лет	от 5 до 10 лет	более 10 лет
Определение содержания цитокинов (IL2, IL4 и TNF α) в супернатантах интактных, ФГА- и ЛПС-стимулированных мононуклеарных лейкоцитов крови с использованием иммуноферментного анализа	21	45	37	21	20	17	15	24	21
Оценка количества интактных, ФГА- и ЛПС-стимулированных лимфоцитов крови, презентующих цитокиновые рецепторы (IL2R, IL4R, TNFRI), методом лазерной проточной цитометрии	20	31	30	19	16	14	11	23	16
Определение содержания растворимого рецептора TNF α в супернатантах мононуклеарных лейкоцитов крови с использованием иммуноферментного анализа	19	28	27	20	15	12	10	21	17
Цитофлуориметрическая оценка спонтанного и активационного апоптоза общей популяции лимфоцитов крови в аннексиновом тесте	12	21	21	15	11	10	9	15	12

Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез. Для всех имеющихся выборок данных проверяли гипотезу нормальности распределения по критерию Колмагорова-Смирнова. Проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента, критериев Манна-

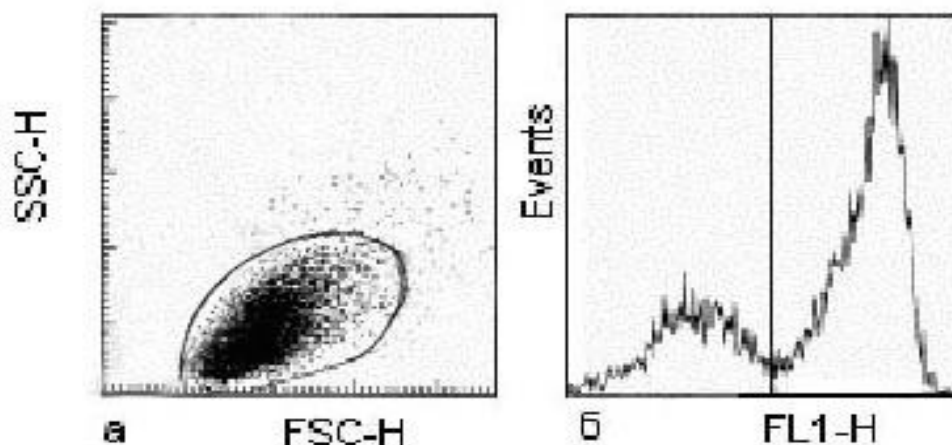


Рис. 1. Гистограмма распределения лимфоцитов по интенсивности флуоресценции в FL1-канале (оценка содержания $TNFR1^+$ -клеток, меченных FITC, в гейте лимфоцитарных клеток):

а – принцип автоматического выделения гейта лимфоцитов по показателям малоуглового (FS) и бокового (SS) светорассеивания;

б – одномерная гистограмма интенсивности флуоресценции в гейте лимфоцитарных клеток по FL1-каналу (слева от оси – несветящиеся клетки, справа – FITC-положительные лимфоциты)

Уитни и Вилкоксона. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости $p < 0,05$. С целью обнаружения связи между исследованными показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r) [Лакин Г.Ф., 1980; Бронштейн И.Н., 1986; Гланц С., 1999; Боровиков В.П., 2001].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Существенная распространенность шизофрении в структуре психических расстройств, исключительный полиморфизм клинической картины, сложность механизмов развития патологического процесса обуславливают интерес к исследованию биологических аспектов этого заболевания. Актуальным направлением становится исследование состояния иммунной системы при психических расстройствах [Морковкин В.М., Картелишев А.В., 1988; Языков

К.С., 2000; Коляскина Г.И. и соавт., 2004; Ветлугина Т.П. и соавт., 2006; Strous R.D., Shoenfeld Y., 2006].

Одним из основных аспектов характеристики иммунного ответа является состояние межклеточной кооперации иммунокомпетентных клеток крови. Для полного анализа функционального статуса последних при каком-либо патологическом процессе необходима комплексная оценка системы цитокинов, поскольку характер иммунного ответа во многом обуславливается особенностями продукции и рецепции регуляторных цитокинов, являющихся важнейшими медиаторами межклеточного взаимодействия [Kurushita N. et al., 1997; Хайтов Р.М. и соавт., 2000; Черешнев В.А., Гусев Е.Ю., 2001; Ярилин А.А., 2001; Cazzullo C.L. et al., 2002; Ebrinc C. et al., 2002; Zhang X.Y. et al., 2003; Симбирцев А.С., 2004].

В связи с этим наше исследование было направлено на получение новых знаний фундаментального характера об особенностях функционирования системы иммунорегуляторных Th1- и Th2-цитокинов при параноидной шизофрении.

При этом мы руководствовались концепцией, что продуцируемые соответственно Th1- и Th2-лимфоцитами, оказывают взаимное влияние [Ярилин А.А., 1997; Симбирцев А.С., 1998; Петров Р.В., Хайтов Р.М., 2001; Фрейдлин И.С., 2001; Walker D. et al., 2002; Кадагидзе З.Г., 2003; King N.J. et al., 2003].

В ходе настоящего исследования было установлено, что у больных параноидной шизофренией, обследованных как в период обострения заболевания (до проведения психофармакотерапии), так при редукции психопатологической симптоматики (после проведения психофармакотерапии), а также у пациентов, резистентных к проведению нейрорепаративной терапии, в супернатантах интактных культур мононуклеарных лейкоцитов содержание IL2 увеличивалось относительно аналогичного показателя у здоровых доноров (рис. 2, А). Данный факт демонстрирует повышение потенциала иммунокомпетентных клеток синтезировать данный провоспалительный цитокин. Однако при оценке ФГА- и ЛПС-стимулированных *in vitro* культур мононуклеаров, полученных у больных параноидной шизофренией, мы выявляли иные результаты: у пациентов, обследованных в острый период и при редукции психопатологической симптоматики, содержание IL2 оказалось сниженным по сравнению с подобным у здоровых людей, однако, у больных шизофренией, резистентной к психофармакотерапии, концентрация изученного цитокина определялась на уровне контрольных значений. В свете данного

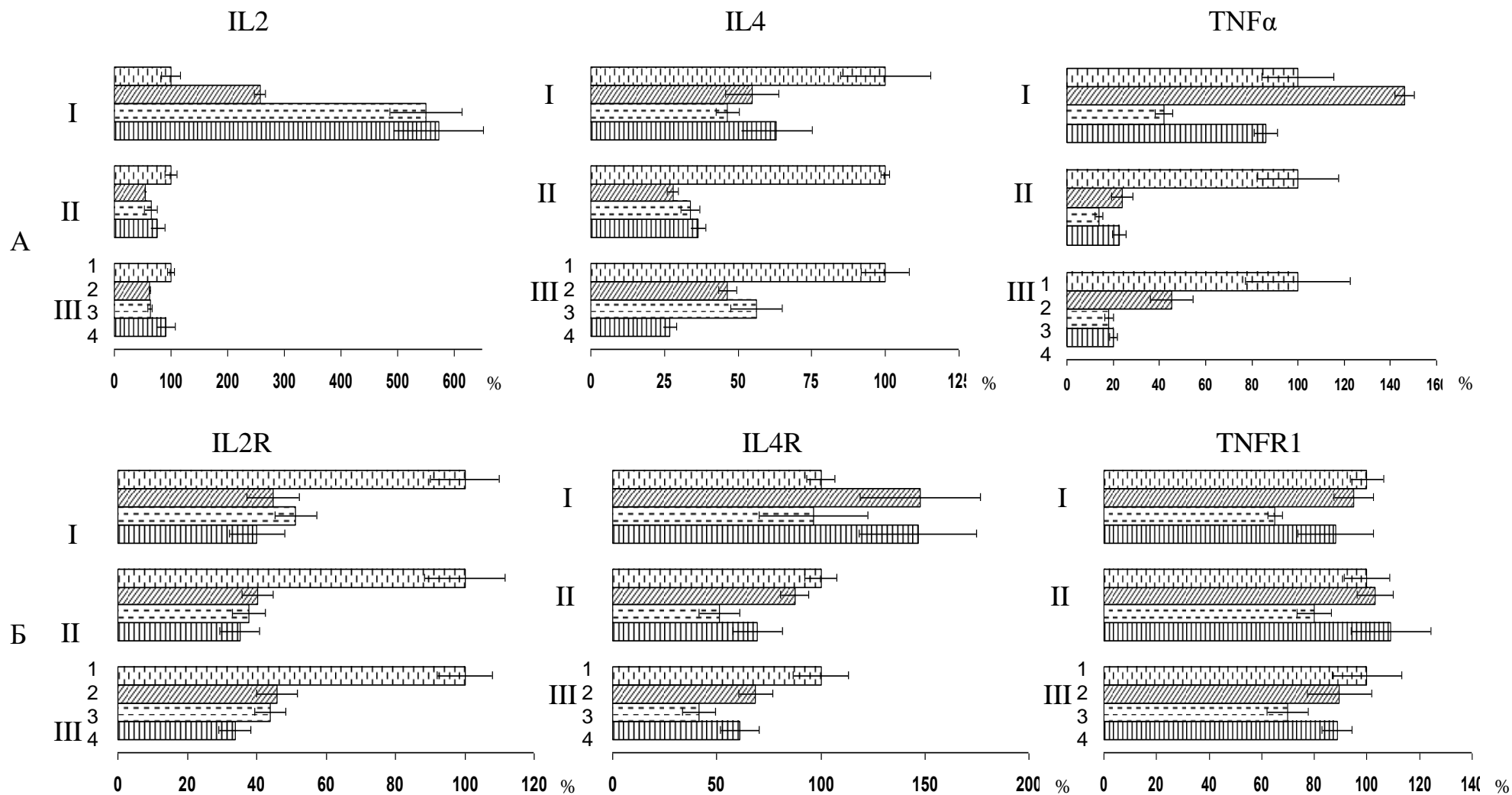


Рис. 2. Содержание цитокинов (IL2, IL4, TNFα) в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови (А) и количество лимфоцитов крови, несущих комплементарные мембранассоциированные рецепторы (Б), у больных параноидной шизофренией: 1 – у здоровых доноров, 2 - у больных параноидной шизофренией в период обострения (до проведения психофармакотерапии), 3 – у больных параноидной шизофренией в период редукции психопатологической симптоматики (после проведения психофармакотерапии), 4 - у больных параноидной шизофренией, резистентной к психофармакотерапии; I – в интактных культурах клеток, II – ФГА-стимулированных культурах клеток, III – в ЛПС-стимулированных культурах клеток

положения, на наш взгляд, возможно констатировать факт напряжения функционирования Т-клеточного звена иммунитета. Соответствующие изменения могут, во-первых, способствовать некоторой активации Th1-пути иммунного ответа, во-вторых, учитывая активационную роль IL2 в усилении пролиферации активированных В-клеток в присутствии IL4, являться причиной изменения реактивности антителопродуцирующей компоненты иммунитета.

Численность иммунокомпетентных клеток, несущих на своей поверхности рецепторы к тому или иному цитокину, также оказывает влияние на изменение выраженности действия цитокина [Hibbert L., Johnston J.A., 2001; Walker D. et al., 2002; Plevy S., 2003]. С целью получения комплексного представления о состоянии системы IL2 нами была проведена оценка относительного количества IL2R-позитивных лимфоцитов у здоровых людей и больных параноидной шизофренией.

На наш взгляд, интересным представляется выявленный нами у больных параноидной шизофренией факт снижения, по сравнению с аналогичным показателем у здоровых людей, содержания IL2R-несущих лимфоцитов крови (рис. 2, Б). В ФГА- и ЛПС-стимулированных культурах лейкоцитов также отмечалась общая тенденция к угнетению экспрессии изученного рецептора у больных параноидной шизофренией (рис. 2, Б). Таким образом, нами был обнаружен факт дисбаланса (разнонаправленного изменения) цитокин-продуцирующей и рецепторэкспрессирующей функции лимфоцитов крови у больных параноидной шизофренией как в период обострения заболевания, так и при редукции психопатологической симптоматики. При этом в ходе проведения корреляционного анализа были выявлены отрицательные функциональные связи между концентрацией в супернатантах интактных культур мононуклеарных клеток крови IL2 и количеством IL2R-позитивных лимфоцитов у больных параноидной шизофренией ($r=-0,73$, $p<0,05$).

Для интерпретации полученных фактических данных нам представилось целесообразным проследить другие клинико-иммунологические закономерности.

Нами был проведен анализ продукции и рецепции IL2 эффекторными клетками крови в зависимости от типа течения заболевания. В результате установлено, что наиболее выраженные изменения продукции IL2 и его рецепции были обнаружены при непрерывном течении шизофренического процесса (рис. 3 А, Б). С целью выявления влияния продолжительности течения шизофренического процесса на изменение продукции и рецепции цитокинов нами был исследован цитокиновый статус у больных параноидной

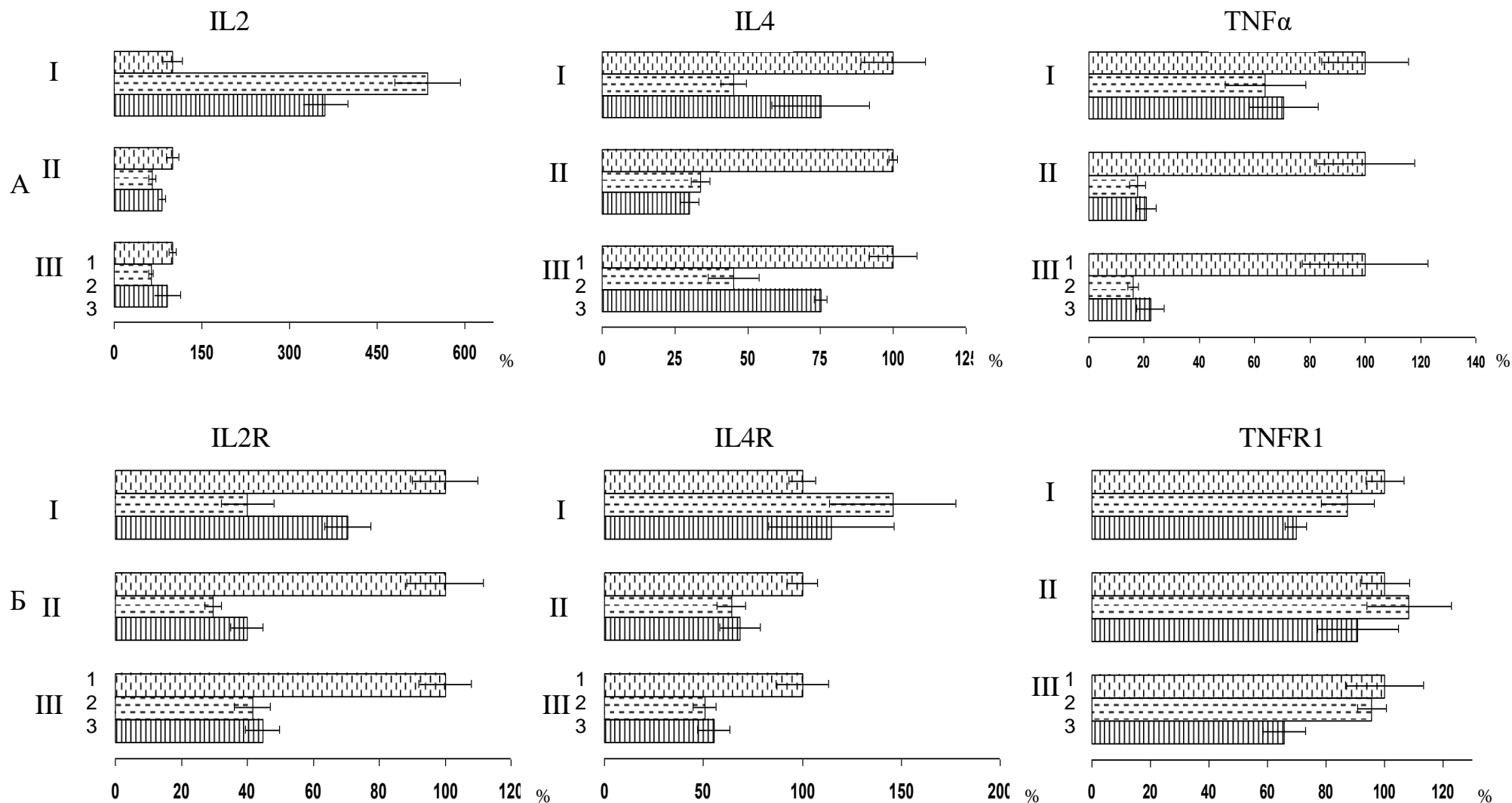


Рис. 3. Содержание цитокинов (IL2, IL4, TNFα) в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови (А) и количество лимфоцитов крови, несущих комплементарные мембранассоциированные рецепторы (Б), у больных параноидной шизофренией в зависимости от типа течения заболевания: 1 – у здоровых доноров, 2 - больные шизофренией с непрерывным типом течения, 3 - больные шизофренией с эпизодическим типом течения; I – в интактных культурах клеток, II – ФГА-стимулированных культурах клеток, III – в ЛПС-стимулированных культурах клеток

шизофренией с различной длительностью заболевания (до 5 лет, от 5 до 10 лет, более 10 лет), не выявивший, однако, каких-либо статистически значимых различий ($p > 0,05$).

IL4, обладая выраженными контрвоспалительными свойствами, стимулирует преимущественно гуморальное звено иммунитета, способствуя дифференцировке по Th2 пути иммунного ответа, ингибирует продукцию провоспалительных Th1-цитокинов [Paul W.E., 1991; Лукина Е.А., 1998; Paludan S.R., 1998; Ройт А. и соавт., 2000; Фрейдлин И.С., 2001; Хаитов Р.М., 2001; Lin S.-J. et al., 2003].

По данным проведенного нами исследования, было установлено снижение базальной, ФГА- и ЛПС-стимулированной продукции IL4 мононуклеарными лейкоцитами крови у больных параноидной шизофренией как в период обострения заболевания, так и на фоне проведения психофармакотерапии (рис. 2, А). В качестве одного из возможных механизмов угнетения продукции IL4 мононуклеарными лейкоцитами крови можно предполагать изменение (увеличение) IL2-секреторного потенциала интактных клеток у больных, страдающих параноидной шизофренией [Cazzullo C.L. et al., 2002; Ebrinc C. et al., 2002]. Проведенное нами исследование количества IL4R-положительных лимфоцитов крови у больных параноидной шизофренией выявило тенденцию соответствия доли IL4R-несущих клеток у пациентов с параноидной шизофренией аналогичному показателю у здоровых доноров (рис. 2, Б).

В результате анализа изменения продукции и рецепции IL4 эффекторными клетками крови в зависимости от типа течения заболевания установлено наиболее значимое угнетение продукции цитокина у пациентов с непрерывным течением шизофренического процесса (рис. 3). Следует отметить, что исследование продукции и рецепции IL4 мононуклеарными лейкоцитами крови в зависимости от продолжительности течения шизофренического процесса (до 5 лет, от 5 до 10 лет, более 10 лет) не выявило статистически значимых различий между средними значениями изученных показателей.

Особую роль в регуляции иммунного гомеостаза играет TNF α . Согласно данным литературы, TNF α не только является одним из основных провоспалительных цитокинов, осуществляющих реализацию неспецифического иммунного ответа, но и выступает в качестве индуктора, стимулирующего дифференцировку Th0 в Th1, тем самым, модулируя направление специфического иммунного ответа в сторону преобладания

клеточного звена резистентности [Takizawa T., 1993; Кашкин К.П., 1998; Логинов А.С., 2001; Царегородцева Т.М., Серова Т.И., 2003; Собчак Д.М., Монакова Э.А., 2004]. Сведения о продукции TNF α мононуклеарными лейкоцитами крови у пациентов с параноидной шизофренией весьма противоречивы [Schattner A. et al., 1996; Naudin J. et al., 1997; Haack M. et al., 1999; Hinze-Selch D. et al., 2000; Erbagci A.B. et al., 2001; Kaminska T. et al., 2001; Kowalski J. et al., 2001; Kudoh A. et al., 2001; Theodoropoulou C. et al., 2001; Paterson G.J. et al., 2006; Sacchetti E. et al., 2007].

Анализ продукции TNF α мононуклеарными лейкоцитами крови у пациентов с параноидной шизофренией выявил следующую динамику: увеличение содержания TNF α в супернатантах интактных и снижение в супернатантах стимулированных культур мононуклеарных лейкоцитов у больных параноидной шизофренией в период обострения заболевания до начала применения специфической нейролептикотерапии по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; снижение продукции TNF α у пациентов в процессе применения нейролептикотерапии как при редукции психопатологической симптоматики, так и у больных параноидной шизофренией, резистентной к психофармакотерапии в интактных, ФГА- и ЛПС-стимулированных *in vitro* культурах клеток (рис. 2, А).

Угнетение продукции TNF α мононуклеарами может быть связано с глубокой дизрегуляцией иммунного ответа, как вследствие развития заболевания, так и являться результатом действия нейролептикотерапии. С другой стороны, учитывая провоспалительный эффект цитокина, снижение секреции мононуклеарами можно рассматривать как компенсаторный механизм, который помогает избежать аутоиммунной агрессии и чрезмерного повреждения собственных тканей организма [Собчак Д.М., Монакова Э.А., 2004].

Проведенная нами с помощью проточной цитофлуориметрии оценка рецептор-презентирующих лимфоцитарных клеток крови показала, что количество TNFR1-несущих лимфоцитов у больных параноидной шизофренией, обследованных в период обострения заболевания, и у пациентов, резистентных к специфической нейролептикотерапии, соответствовало таковому у здоровых людей (рис. 2, Б). У больных параноидной шизофренией, обследованных в период редукции психопатологической симптоматики на фоне проведения психофармакотерапии, количество лимфоцитарных клеток, презентующих мембранассоциированный рецептор к TNF α , снижалось (рис. 2, Б).

Рассматривая значение рецепторов в реализации биологической функции TNF α , необходимо отметить роль их растворимых форм (sTNFR). Нами было выявлено увеличение содержания в супернатантах культур моноклеарных лейкоцитов растворимой формы TNFR1 у всех пациентов с параноидной шизофренией ($p < 0,05$). При этом у больных параноидной шизофренией, получавших психофармакотерапию, был установлен факт отрицательной функциональной связи между продукцией TNF α моноклеарами и содержанием sTNFR1 в супернатантах культур лейкоцитов ($r = -0,67$, $p < 0,05$, $r = -0,74$, $p < 0,05$ и $r = -0,72$, $p < 0,05$, соответственно).

Таким образом, изменения продукции TNF α моноклеарными лейкоцитами крови у больных параноидной шизофренией в период редукции симптоматики имели противоположный (по сравнению с таковым у больных в период обострения) характер и выражалось значительным снижением содержания исследуемого цитокина в супернатантах культур клеток. При этом состояние рецепторного аппарата (sTNFR1 и TNFR1) у больных в период редукции психопатологической симптоматики соответствовало таковому у пациентов в период обострения заболевания.

Результаты исследования изменения продукции и рецепции TNF α моноклеарными лейкоцитами крови у больных параноидной шизофренией в зависимости от особенностей течения заболевания обозначили тенденцию к наиболее выраженному изменению секреции цитокина у пациентов с непрерывным течением шизофренического процесса, однако, не позволили констатировать таковую при оценке количества клеток, несущих мембранассоциированный рецептор, и содержания растворимой формы рецептора (рис. 3 А, Б).

При анализе влияния продолжительности течения шизофренического процесса на изменение продукции и рецепции TNF α у больных параноидной шизофренией с различной длительностью заболевания (до 5 лет, от 5 до 10 лет, более 10 лет) был выявлен факт нормализации изученного показателя при одновременном снижении количества лимфоцитов, несущих комплементарный мембраносвязанный рецептор, у больных параноидной шизофренией с длительностью течения заболевания от 5 до 10 лет, при том, что у больных с длительностью шизофренического процесса до 5 лет и более 10 лет было обнаружено снижение синтеза TNF α моноклеарами крови.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о выраженном дисбалансе продукции и рецепции Th1- и Th2-цитокинов у больных параноидной шизофренией. Выявленные изменения, с одной стороны, являются

следствием нарушения иммунологического равновесия, обеспечивающего полноценное функционирование макроорганизма. С другой стороны, указанные изменения сами могут выступать в качестве причины дисрегуляции иммунной системы посредством модуляции функциональной активности лимфоцитов. По существующим представлениям, продукция цитокинов определяется стимулирующими воздействиями, запрограммирована на генном уровне [Фрейдлин И.С., 2001; Кетлинский С.А., 2002; Plevy S., 2003; Schmidt C. et al., 2003; Celec P., 2004].

Одним из фундаментальных механизмов, регулирующих иммунный ответ в норме и при патологии, является апоптоз иммунокомпетентных клеток. В связи с этим мы сочли целесообразным проведение изучения реализации танатогенной программы лимфоцитов у пациентов с параноидной шизофренией.

При исследовании выраженности апоптоза лимфоцитов у больных параноидной шизофренией в период обострения заболевания отмечалось достоверное ($p < 0,05$) увеличение количества аннексин-положительных лимфоцитов в интактной культуре клеток.

У пациентов с параноидной шизофренией в период редукции психопатологической симптоматики (после проведения психофармакотерапии) и у больных параноидной шизофренией, резистентной к психофармакотерапии, установлено статистически значимое ($p < 0,05$) снижение относительного числа лимфоцитов, находящихся на ранних стадиях апоптотической гибели, по сравнению с соответствующими параметрами у лиц контрольной группы.

Оценка апоптоза лимфоцитов у больных параноидной шизофренией, разделенных на группы в зависимости от типа течения заболевания, показала, что средние значения, характеризующие уровень активационного апоптоза лимфоцитарных клеток, достоверно снижались ($p < 0,05$ во всех случаях) относительно аналогичных показателей у здоровых доноров в культуре митоген-стимулированных клеток.

В рассматриваемом аспекте проблемы логично предположить, что выявленный в результате исследования выраженный дисбаланс продукции и экспрессии рецепторов цитокинов с про- (IL2, TNF α) и противовоспалительной (IL4) функциями в условиях длительного течения заболевания вносит существенный вклад в изменение апоптотической реактивности лимфоцитарных клеток крови. Более того, известно, что клетки, подвергающиеся активационному (индуцированному) апоптозу, способны сами секретировать цитокины, способствуя, таким образом, изменению их профиля

[Chen W.J. et al., 2001; Попов Л.С., 2004]. Кроме того, выявленное снижение продукции моноклеарами IL4, вероятно, приводит к предотвращению гибели лимфоцитов [Талалаев В.Ю. и соавт., 2001].

Дискуссионным остается вопрос о том, являются ли выявленные нами изменения продукции и рецепции цитокинов следствием развития шизофренического процесса или результатом влияния психофармакотерапии, поскольку известно, что нейролептические средства обладают иммуномодулирующей активностью [Pae C.U. et al., 2006]. По данным литературы известно, что нейролептические препараты воздействуют *in vitro* на секрецию цитокинов моноклеарными лейкоцитами у животных [Bertini R. et al., 1993; Tarazona R. et al., 1995]. Действие нейролептиков на продукцию и рецепцию цитокинов моноклеарами крови имеет важное значение для терапии по следующим причинам. Во-первых, фармакотерапия может влиять на функционирование иммунной системы при шизофрении; во-вторых, распознавание вызванных лекарствами изменений секреции цитокинов может помочь в понимании побочных эффектов, вызванных нейролепτικο-опосредованной дисрегуляцией иммунной системы (например, клозапин-индуцированная лихорадка, агранулоцитоз) [Pollmacher T. et al., 1996]; в-третьих, цитокины могут опосредовать действия нейролептиков на ЦНС [Pollmacher T. et al., 1995; Pae C.U., 2006].

Выявленные нами изменения (при обследовании пациентов в период обострения шизофренического процесса до назначения психофармакотерапии) подтверждают гипотезу о том, что иммунологические дисфункции могут вносить вклад в патогенез такого мультифакториального заболевания как параноидная шизофрения. Для того, чтобы исключить влияние фармакологических препаратов на достоверность полученных результатов и оценить истинную динамику, направленность и степень выраженности продукции и рецепции основных иммунорегуляторных цитокинов нами были проведены исследования цитокинпродуцирующей и рецепторэкспрессирующей способности иммунокомпетентных клеток крови у больных шизофренией в остром периоде заболевания, а также у тех же больных в период редукции психопатологической симптоматики вследствие проведения специфической психофармакотерапии и у больных параноидной шизофренией, резистентной к нейролептикотерапии.

Учитывая данные литературы и тот факт, что в проведенных нами исследованиях содержание IL2 в супернатантах культур моноклеарных лейкоцитов у больных параноидной шизофренией, получавших

нейролептикотерапию (в основном, галоперидол, аминазин и др.), достоверно превышало аналогичный показатель у тех же пациентов в период обострения заболевания, можно говорить о том, что повышенная продукция IL2 мононуклеарными лейкоцитами крови у больных параноидной шизофренией, по всей видимости, является именно результатом дисфункции иммунной системы при развитии шизофренического процесса, а не побочным эффектом специфических препаратов.

Проведенные нами исследования установили также снижение числа IL2R-несущих лимфоцитов как у проходивших нейролептикотерапию, так и у нелеченых больных параноидной шизофренией. Это позволило высказать предположение о том, что изменение количества лимфоцитов, экспрессирующих рецептор для IL2, является результатом действия шизофренического процесса, а не влияния нейролептикотерапии. Однако для окончательных заключений требуются дальнейшие экспериментальные исследования.

Данные о влиянии специфической психофармакотерапии на систему продукции и рецепции TNF α у больных параноидной шизофренией немногочисленны и достаточно противоречивы [Pollmacher T. et al., 1996; Kowalski J. et al. 2001; Pae C.U., 2006]. В проведенных нами исследованиях было установлено, что у пациентов с параноидной шизофренией содержание TNF α в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов увеличивалось в период обострения заболевания и угнеталось у пациентов, получавших нейролептикотерапию вне зависимости от наличия или отсутствия эффекта от нейролептикотерапии. Таким образом, нельзя однозначно сказать, является ли снижение ниже контрольных значений продукции TNF α у пациентов, проходивших психофармакотерапию, по сравнению с аналогичным показателем в остром периоде, результатом купирования специфической психопатологической симптоматики, либо влияния нейролептикотерапии. Можно лишь предположить, что поскольку у пациентов с редукцией психопатологической симптоматики выявлялось максимальное угнетение продукции TNF α (по сравнению с больными, как в острый период заболевания, так и пациентами, резистентными к нейролептикотерапии), а также, учитывая провоспалительную роль этого цитокина, именно шизофренический процесс оказывает первостепенное влияние на продукцию TNF α .

Таким образом, антипсихотические средства могут, по крайней мере, частично, модулировать цитокинпродуцирующую функцию иммунокомпетентных клеток при шизофрении. Однако для вскрытия

молекулярных механизмов влияния нейролептиков на продукцию и рецепцию цитокинов мононуклеарными клетками требуются дополнительные экспериментальные исследования *in vitro*.

В итоге, на основании результатов, полученных нами при исследовании цитокиноопосредованной межклеточной кооперации эффекторных иммунокомпетентных клеток крови, были получены данные, свидетельствующие о дисбалансе продукции Th1/Th2 цитокинов с про- (IL2, TNF α) и противовоспалительными функциями (IL4) и количества лимфоцитов, презентующих комплиментарные им рецепторы, нарушении реализации апоптоза лимфоцитов крови у пациентов с параноидной шизофренией. Полученные фактические данные, по нашему мнению, во многом подтверждают представления о функционально значимых взаимодействиях иммунной и нервной систем, реализация которых во многом опосредуется цитокиновыми молекулами.

Учитывая важную роль системы цитокинов в межклеточной кооперации иммунокомпетентных клеток, очевидно, что дальнейшее углубленное изучение молекулярных механизмов нарушения функционирования системы цитокинов позволит расширить фундаментальные знания о нарушении системы иммунитета при шизофрении и получить возможность для поиска современных технологий коррекции шизофренического процесса.

ВЫВОДЫ

1. При параноидной шизофрении имеет место нарушение системы Th1- и Th2-цитокинов и их рецепторов, характер и степень выраженности которых определяется активностью и особенностью течения шизофренического процесса.

2. Дисбаланс продукции и рецепции мононуклеарными лейкоцитами крови IL2 у пациентов с параноидной шизофренией характеризуется увеличением конституциональной и угнетением ФГА-, ЛПС-индуцированной секреции цитокина, снижением количества лимфоцитов, презентующих рецептор к IL2.

3. Параноидная шизофрения сопровождается угнетением продукции IL4 мононуклеарными лейкоцитами крови и снижением количества IL4-рецепторнесущих лимфоцитов.

4. Закономерности нарушения системы TNF α и его рецепторов при шизофреническом процессе определяются активностью заболевания: при

обострении заболевания возрастает конституциональная секреция мононуклеарными лейкоцитами крови $TNF\alpha$ и его растворимого рецептора; период редукции психопатологической симптоматики (после проведения психофармакотерапии) характеризуется угнетением секреции $TNF\alpha$, дисбалансом продукции мембраносвязанной и растворимой форм TNF -рецептора лимфоцитами крови.

5. У больных параноидной шизофренией при обострении заболевания увеличивается численность лимфоцитов, подвергшихся спонтанному апоптозу; на фоне проведения нейрорепродуктивной терапии программированная гибель лимфоцитов угнетается.

6. Дизрегуляция системы Th1- и Th2-цитокинов у больных параноидной шизофренией с непрерывным и эпизодическим типом течения шизофренического процесса характеризуется однонаправленными, но разной степени выраженности изменениями продукции и рецепции IL2, IL4 и $TNF\alpha$.

7. Продукция и рецепция мононуклеарными лейкоцитами крови IL2, IL4 и $TNF\alpha$ у больных параноидной шизофренией не зависят от длительности заболевания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Уровень продукции интерлейкина 2 и его мембранного рецептора у больных параноидной шизофренией / А.П. Мельников, Н.А. Корнетов, Н.В. Рязанцева и др. // Развитие биопсихосоциального подхода в сфере охраны психического здоровья. Сборник научных трудов, выпуск 1. - Томск. - 2005. - С.121-123.

2. Изменение продукции цитокинов при шизофрении / Н.В. Рязанцева, А.П. Мельников, А.П. Зима и др. // Материалы Российской конференции «Современные принципы терапии и реабилитации психически больных», Москва, 11-13 октября 2006 г. - Москва. - 2006. - С. 413-414.

3. Апоптотическая гибель лимфоцитов у больных параноидной шизофренией / А.П. Мельников, Н.В. Рязанцева, А.П. Агарков и др. // Материалы Российской конференции «Современные принципы терапии и реабилитации психически больных», Москва, 11-13 октября 2006 г. - Москва. - 2006. - С. 409.

4. Дисбаланс иммунорегуляторных Th1/Th2 цитокинов у больных параноидной шизофренией / А.П. Мельников, Н.В. Рязанцева, А.П. Агарков и др. // Материалы межрегиональной научно-практической конференции

«Вопросы охраны психического здоровья, обеспечения доступности и качества оказания психиатрической помощи», Барнаул, 29-30 мая 2007г. - Барнаул. - 2007. - С. 277-280.

5. Дисбаланс Th1/Th2 цитокинов у больных параноидной шизофренией / Н.В. Рязанцева, А.П. Мельников, А.П. Агарков и др. // Материалы II научной международной конференции «Фундаментальные исследования в биологии и медицине», Черногория (Бечичи), 8-15 июня 2007г. - Бечичи. - 2007. - С. 62-63.

6. Апоптоз лимфоцитов у больных параноидной шизофренией / Н.В. Рязанцева, А.П. Мельников, А.П. Агарков и др. // Материалы IV научной международной конференции «Современные медицинские технологии (диагностика, терапия, реабилитация и профилактика)», Хорватия (Пула), 7-14 июля 2007г. - Пула. - 2007. - С. 56.

7. Состояние TNF-опосредованного пути регуляции апоптоза лимфоцитов у больных параноидной шизофренией / А.П. Мельников, А.П. Агарков, Н.В. Рязанцева и др. // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. - 2007. - №2. - С. 136-137.

8. Нарушение продукции и рецепции фактора некроза опухолей альфа у больных параноидной шизофренией / А.П. Мельников, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий и др. // Бюллетень СО РАМН. – 2007. - №6. – С. 37-43.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

IL - интерлейкин

ILR - семейство рецепторов для интерлейкина

TNF - фактор некроза опухолей

TNFR – семейство рецепторов для фактора некроза опухолей

sTNFR – растворимый рецептор для фактора некроза опухолей

Th – лимфоцит Т-хелпер