

На правах рукописи

ТАРАСОВА МАРГАРИТА ВАЛЕРЬЕВНА

**МЕДИАТОРЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И АКТИВНОСТЬ
НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ.**

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Научные руководители:

Морозов Сергей Георгиевич - доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, заведующий лабораторией общей и перинатальной нейроиммунопатологии, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Волкова Елена Николаевна - доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции репаративных процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Официальные оппоненты:

Лямина Светлана Владимировна - доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической физиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова»

Масюкова Светлана Андреевна - доктор медицинских наук, профессор кафедры кожных и венерических болезней с курсом косметологии Медицинского института непрерывного образования Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств»

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2020 года в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 001.003.01 Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»
по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д.8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП». Диссертация размещена на сайте института ФГБНУ «НИИОПП» www.niiorp.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2020 года

И. о. ученого секретаря
Диссертационного совета Д 001.003.01
доктор биологических наук

Крупина Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Основа иммунологических нарушений при АД заключается в разнофазной активации Т-хелперов (Th₁ и Th₂). Во время обострения активируются Th₂, во время ремиссии заболевания Th₁ [Machura E. et al., 2006].

Высвобождающиеся медиаторы воспаления: цитокины, нейропептиды и гистамин поддерживают уже имеющееся аллергическое воспаление [Akdis M. et al., 2005]. Важным звеном в патогенезе этого заболевания является сдвиг Th₁/Th₂-цитокинового профиля в сторону Th₂, сопровождающийся повышенной секрецией IgE, и даже в периоды «внешнего благополучия» в коже сохраняется Т-лимфоцитарная инфильтрация с усиленной экспрессией цитокинов клеток Th₂. Дифференцировку Th₁ поддерживает ИЛ-12, секретируемый макрофагами и нейтрофилами на стадии антигеннезависимого воспаления, опосредованного системой врожденного иммунитета [Vacchetta R. et al., 2005]. Активатором Th₁ выступает ИНФγ. Продуцируемые тучными клетками ИЛ-4 и ИЛ-13 способствуют генезу Th₂, которые способствуют образованию В-лимфоцитами специфических Ig E. Показано, что присутствие ИНФγ, ИНФα, ИЛ-12 или антител (АТ) к ИЛ-4 и отсутствие ИЛ-4 сдвигает дифференцировку Т-лимфоцитов в Th₁ фенотип. Напротив, присутствие ИЛ-4, ИЛ-13 и малые количества ИНФγ приводят к дифференцировке Th₀ в Th₂ клетки, что и опосредует атопический тип иммунного ответа [Шарова Н. И. и др. 2002; Elias P.M. et al., 2018]. Развитию Th₂ фенотипа также способствует ИЛ-1 [Mamessier E. et al., 2005]. Повышенную выработку Ig E можно регулировать через трансформацию Th₂ в Th₁. Эта трансформация может быть достигнута введением ИНФγ, ИЛ-12, либо нейтрализацией ИЛ-4, ИЛ-13 [Бурместер Г.Р. и др., 2007; Phipps S. et al., 2002]. В то же время нет единой точки зрения, касающейся количественного содержания цитокинов при различных клинических формах и стадиях данного заболевания.

Не вызывает сомнения факт наличия деструктивных изменений при АД. В последнее время большое внимание уделяется роли лейкоцитарных сериновых протеаз в целом, и эластазы в частности, при различных заболеваниях кожи [Meyer–Hoffert U., 2009]. Повышение активности эластазы может быть вызвано снижением количества ее ингибиторов, в частности α1-протеиназного ингибитора (α1-ПИ), что приводит к непосредственному повреждению тканей. С другой стороны, она воздействует на элементы защитной системы организма (в первую очередь, на протеазазависимый рецептор PAR), вызывая не только усиление иммунной реакции, но и замедляя процесс восстановления тканей. Это определяет актуальность исследования содержания эластазы и ее регуляторов у больных АД.

Нет единой точки зрения, касающейся функциональной активности нейтрофилов при АД. Имеются данные о нарушении функциональной активности нейтрофилов у больных АД: нарушение хемотаксиса – у 16,6%, изменение продукции супероксида – у 6%, нарушение бактерицидной активности – у 24,5% больных [Wolach B. et al., 2012]. У больных АД средней степени тяжести и с тяжелым течением показано существенное снижение фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови, а также ослабление хемотаксической активности в ответ на зимозан [Forte W.C. et al., 2009]. Есть связь изменения функциональной активности нейтрофилов при АД с наличием или отсутствием бактериальной инфекции [Елистратова Е.В. и др., 2016]. Если у больных не обнаружено снижение фагоцитарной активности, они, как правило, не имели выраженной бактериальной контаминации. У тех больных, у которых имеется нейтропения или снижение активности нейтрофилов, может развиваться генерализованная грибковая инфекция [Bain J. et al., 2015]. Дальнейшее изучение функциональной активности нейтрофилов в развитии и течении АД, получение новых данных об активности нейтрофилов (в том числе активность кислородного взрыва и фагоцитоза) в зависимости

от наличия или отсутствия сопутствующей грибковой или бактериальной контаминации у больных АД в настоящее время представляет большую актуальность.

Цель исследования: определить роль системы циркулирующих цитокинов и функциональную активность нейтрофилов в патогенетических механизмах АД.

Задачи исследования:

- 1) Изучить особенности системы циркулирующих цитокинов у больных АД.
- 2) Выявить объективные критерии интенсивности деструктивных процессов и активности антипротеолитической системы крови при АД.
- 3) Изучить функциональную активность нейтрофилов посредством люминол–зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у больных АД.
- 4) Измерить уровни генерации супероксидного аниона нейтрофилами при стимуляции их рецептор–зависимым стимулятором фермента нейтрофилов NADPH оксидазы N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fmlp), а также растворимым фармакологическим активатором фермента нейтрофилов NADPH оксидазы форболмиристатацетатом (РМА-форболовый эфир) у больных АД;
- 5) Оценить функциональную активность нейтрофилов в зависимости от наличия или отсутствия сопутствующей грибковой или бактериальной контаминации при АД;
- 6) Измерить уровень экспрессии TREM-1 на нейтрофилах периферической крови пациентов с АД в зависимости от активности процесса и уровня генерации супероксидного аниона.

Научная новизна работы

Проведено комплексное изучение содержания противовоспалительных и провоспалительных цитокинов у пациентов АД при обострении заболевания и во время ремиссии.

Впервые изучены и определены критерии оценки активности сериновой протеазы нейтрофилов - эластазы в зависимости от тяжести течения АД. Изучено изменение активности α 1-протеиназного ингибитора при АД, который демонстрирует состояние антипротеолитического потенциала.

Впервые определена зависимость генерации супероксидного аниона нейтрофилами больных АД от тяжести течения заболевания и степени распространённости процесса. Измерен уровень генерации супероксидного аниона нейтрофилов у больных АД под действием рецепторзависимого стимула (fMLP) и в ответ на прямой активатор кислородного взрыва – форболовый эфир (РМА)

Впервые выявлены разные уровни активности нейтрофилов в зависимости от наличия или отсутствия у больных АД сопутствующей грибковой или бактериальной контаминации.

Практическая значимость

Предложен новый метод оценки воспалительных реакций у больных АД путем определения функциональной активности нейтрофилов.

Определены критерии функциональной активности нейтрофилов в зависимости от наличия или отсутствия сопутствующей грибковой или бактериальной контаминации у больных АД.

Показан новый метод определения качества состояния деструктивных процессов у пациентов с АД определяя активность лейкоцитарной эластазы.

Измеряя активность α 1-ПИ определили критерии работы антипротеолитической (антидеструктивной) системы у больных АД.

Основные положения, выносимые на защиту

При АД происходит дисрегуляция реципрокных отношений Th1- и Th2- субпопуляций лимфоцитов, что подтверждается повышением во время обострения уровня противовоспалительных цитокинов ИЛ-4, -6, -10, -13, а во время ремиссии повышением уровня провоспалительных цитокинов ИНФ γ , ФНО α , ИЛ-12.

Активность протеолитического фермента лейкоцитарной эластазы и α_1 -ПИ коррелируют с тяжестью течения АД. У пациентов с легкой степенью тяжести АД наблюдается положительная корреляция между индексом SCORAD и активностью α_1 -ПИ в сыворотке крови, у пациентов с тяжёлым течением АД наблюдается отрицательная корреляционная связь между индексом SCORAD и активностью α_1 -ПИ.

Функциональная активность нейтрофилов при изучении люминол-зависимой хемилюминесценции клеток крови больных АД имеет тенденцию к снижению при тяжелом течении АД и при бактериальной и микотической контаминации кожи; при легком течении АД функциональная активность нейтрофилов возрастает.

Активность нейтрофилов (по уровню генерации супероксидного аниона в ответ на рецептор-зависимые стимулы (fmlp) и в ответ на прямой активатор кислородного взрыва – форболовый эфир (PMA)) изменяется в зависимости от степени тяжести: у больных АД легкой степени тяжести в начале периода обострения повышена, у больных со средней степенью тяжести достоверно снижена ($P < 0,05$).

Наличие сопутствующей грибковой контаминации дрожжами *Rhodotorula spp.* у больных АД снижает фагоцитарную активность нейтрофилов.

Уровень продукции супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови достоверно повышен ($P < 0,05$), показатели генерации супероксидного аниона имеют достоверно ($P < 0,05$) положительную корреляцию (коэффициент корреляции 0,76) с изменением уровня экспрессии рецептора TREM-1 на нейтрофилах крови.

Апробация работы проведена на межлабораторной конференции в ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии». Основные положения диссертации были доложены на международных научных конференциях и конгрессах, в том числе на Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2019 г.), V Национальном конгрессе бактериологов (Москва, 2019 г.), 3-й Международной конференции "Инфекции и противоинфекционный контроль в дерматологии" (Москва, 2019 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 23 работы, в том числе 11 в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, глав, содержащих обзор литературы, изложение материалов и методов исследования, клиническую характеристику больных с атопическим дерматитом, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и библиографии, содержащей 35 отечественных и 149 иностранных источника. Материалы диссертации изложены на 145 страницах компьютерного текста, иллюстрированы 16 таблицами и 13 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследование больных АД проводили по общепринятой методике: сбор анамнеза, общий осмотр, оценка объективного состояния органов и систем. За основу оценки степени тяжести АД принят индекс SCORAD.

Определение содержания провоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных атопическим дерматитом

Определение содержания провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , -4, -6, -8, -10, -12, -13, ФНО α , ИНФ γ) в сыворотке крови проводили с помощью коммерческих иммуноферментных тест-систем производства "Amersham" (США). Для определения ИЛ-12 применялись тест-системы фирмы R&D (Миннеаполис, США).

Определение активности лейкоцитарной эластазы

Определение активности лейкоцитарной эластазы (ЛЭ) проводили спектрофотометрическим энзиматическим методом с помощью двулучевого спектрофотометра с термостатируемыми кварцевыми кюветами с длиной оптического пути 10 мм, позволяющего измерить кинетику ферментативных реакций при длине волны 347,5 \pm 0,5 нм. Использовали набор реагентов «ЭЛАСТАЗА» (ООО «Биофарм-тест», Россия), включающий хромогенный субстрат N-терт-бутоксикарбонил-аланин-р-нитрофениловый эфир (BOC-Ala-ONp), ацетонитрил и фосфатный буфер, рН 6,5.

Определение активности α_1 протеиназного ингибитора

Определение активности α_1 -ПИ проводили с помощью того же оборудования, что и ЛЭ. Использовали набор реагентов «АЛЬФА 1-ПИ», (ООО «Биофарм-тест», Россия), включающий низкомолекулярный субстрат N- α -бензоил-L-аргинин этилового эфира (БАЭЭ) (30,8 мг), трипсин, буферный раствор рН 8,0 и раствор для разведения трипсина. Кинетику реакции определяли при длине волны 253 нм.

Выделение клеток крови

Для получения лейкоцитарной взвеси к 500 мкл крови добавляли 15 мл лизирующей жидкости (на 1 литр H₂O: NH₄Cl 8,3г; KHCO₃ 1г; Na₂-EDTA-2H₂O 0,04г; BSA 2,5г), инкубировали 5 минут при комнатной температуре, затем центрифугировали 10 минут при 200g. Супернатант удаляли, осадок встряхивали, суспензию клеток отмывали центрифугированием. Подсчитывали число клеток в камере Горяева и доводили их концентрацию до 1x10⁶ клеток в 1 мл среды 199. Для получения мононуклеаров крови лейкоцитарную взвесь разводили фосфатным буфером 1:1 и по 2 мл наслаивали на свежеприготовленный градиент плотности Фиколла-Верографина (плотность 1,078 г/л). Градиенты центрифугировали 20 мин при 2000 g. Мононуклеары отбирали из интерфазы градиента, отмывали средой 199 и доводили до концентрации 1x10⁶ клеток/мл. Очищенную популяцию нейтрофилов получали на подготовленном *ex tempore* градиенте Перколла.

Разделение клеток крови на градиенте плотности Перколла

Чистую популяцию нейтрофилов периферической крови человека выделяли на градиенте плотности Перколла (Percoll, Sigma-Aldrich, USA). Для приготовления градиента растворов Перколла использовали фосфатный буфер без кальция и магния (PBS ζ), чтобы избежать образования конгломератов клеток, а также для исключения влияния кальция на генерацию супероксидного аниона клетками. Для приготовления 10-кратного буфера на 1 литр H₂O добавляли NaCl 77,5г; KH₂PO₄ 2,0г; K₂HPO₄ 15,0г. Для приготовления однократного буфера на 1 литр H₂O добавляли NaCl 7,75г; KH₂PO₄ 0,2г; K₂HPO₄ 1,5г. Полученные растворы доводили до рН 7,0 и фильтровали через одноразовые фильтры (d = 22 микрона) в стерильные колбы.

Изотонический раствор Перколла (90%) получали из 27 мл исходного Перколла и 3 мл 10-кратного PBS ζ , его использовали для получения остальных ступеней градиента. Для приготовления 81% раствора 1,9 мл однократного PBS ζ добавляли к 8,1 мл 90% изотонического раствора Перколла (реальный процент Перколла в этом слое составлял 72,9%). Для приготовления 70% раствора 3 мл однократного PBS ζ добавляли к 7 мл 90%

Перколла. Для приготовления 60% раствора 4 мл однократного PBSϕ добавляли к 6 мл 90% Перколла. Для приготовления 55% раствора 4,5 мл однократного PBSϕ добавляли к 5,5 мл 90% Перколла. Процентный состав растворов для градиента соответствовал средней плотности клеток крови, известной из литературных источников (Рисунок 1).

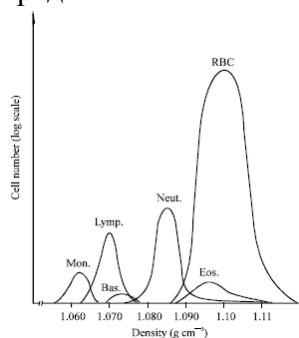


Рисунок 1. Гауссово распределение плотности клеток крови (г/см^3) (Bøyum A. et al., Scand. J. Immunol., 1991, V.34, N6, P.697-712).

Для приготовления градиента на дно 50-мл конической центрифужной пробирки наливали 3 мл изотонического раствора Перколла, сверху наслаивали 3 мл 81% раствора, поверх наслаивали 3 мл 70% раствора, на который наслаивали слой 60% Перколла и на него – 55% Перколла. Затем наслаивали цельную кровь (максимально 5 мл на 1 градиент), полученную в день исследования утром натощак в вакутейнере с ЭДТА, разведенную 1:1 стерильным физиологическим раствором. Градиенты центрифугировали 20 минут при $t^0+22^0\text{C}$ при ускорении 500g.

После центрифугирования на дне пробирки концентрировались эритроциты. Нейтрофилы выделялись в интерфазе между слоями Перколла плотностью 81% и 70%; лимфоциты концентрировались между 70% и 60% слоями Перколла, на поверхности первого слоя градиента выделялись тромбоциты с чистотой ~100%. Каждый слой популяций клеток отбирали пипеткой с наконечником с удлинённым носиком, переносили в центрифужные пробирки с однократным PBSϕ, отмывали дважды центрифугированием 10 минут при $t^0+22^0\text{C}$ и ускорении 200g.

Затем клетки окрашивали моноклональными антителами для определения процента выделенных клеток в гейте. Чистота выделенных популяций клеток составляла $94 \pm 3\%$. Выход нейтрофилов из 1 мл крови составлял $1,5-5,2 \times 10^6$ клеток.

Оценка спонтанной и индуцированной хемилюминесценции

Для приготовления 30 мМ раствора разводили 0,5 г люминола в 94,05 мл 1 мМ NaOH, хранили при $t^0+4^0\text{C}$. Непосредственно перед работой разводили 1 мл 30 мМ раствора в 9 мл PBS и доводили pH до 7,3. При постановке реакции к венозной крови, взятой в пробирку с ЭДТА, добавляли буфер для лизиса эритроцитов (см. выше), инкубировали в течение 5 мин, центрифугировали 10 мин при 200 g, осадок отмывали средой 199 и ресуспендировали в растворе люминола. Концентрацию клеток доводили до 1×10^6 клеток на 100 мкл буфера. По 100 мкл суспензии переносили в пробирки люминографа и термостатировали при $+37^0\text{C}$. Динамику хемилюминесценции измеряли на хемилюминографе Диалог (Москва). Спонтанную хемилюминесценцию измеряли до выхода кривой числа импульсов на плато (10 ± 2 минуты). Затем добавляли 5 мкл 1% раствора опсонизированного зимозана и в течение 40 минут измеряли индуцированную хемилюминесценцию. В качестве индуктора хемилюминесценции также использовали фактор некроза опухолей альфа (TNF- α , 1мкМ) и дрожжи *Candida tropicalis* (20 мкл раствора дрожжей по 50×10^3 клеток на пробу). Схема проведения измерений представлена на Рисунке 2. Результаты измеряли по максимальным значениям кинетической кривой и

выражали в виде среднего числа импульсов в минуту на 100 мкл клеток и в пересчете на 1×10^6 клеток по сумме трех измерений на каждую пробу.

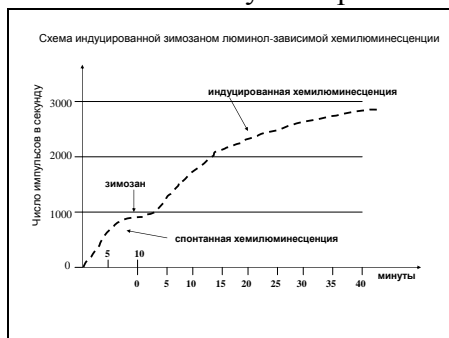


Рисунок 2. Схема измерения люминол-зависимой хемилюминесценции.

Количественное измерение кислородного взрыва нейтрофилами периферической крови

Нейтрофилы получали на градиенте плотности Перколла, дважды отмывали PBS, доводили концентрацию клеток до 1×10^6 /мл. По одному мл взвеси клеток помещали в термостатируемую при $+37^{\circ}\text{C}$ кювету спектрофотометра UV-3000 (Shimadzu Corp., Japan) с программным управлением. Через 5 мин вносили 2 мкл [0,54 мг/мл] цитохрома *c* (Sigma). Через 10 сек вносили 10 мкл форболмиририлат-ацетата (PMA) [0,1 мкМ] или N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fmlp) [5 мкМ] (Sigma) и в течение 30 мин измеряли образование супероксидного аниона в режиме реального времени при двух длинах волн — 549 нм и 492 нм.

Определение фагоцитарной активности нейтрофилов методом проточной цитометрии

Нейтрофилы получали на градиенте плотности Перколла, дважды отмывали в среде RPMI 1640 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), доводили концентрацию клеток до 10×10^6 /мл и культивировали в присутствии тестовых штаммов дрожжей *Rhodotorulaspp.* в течение 30 мин при $t^{\circ} +37^{\circ}\text{C}$ и 5% CO_2 . Далее клетки отмывали центрифугированием, фиксировали 1% параформальдегидом, окрашивали пропидиумом иодидом в гипотоническом буфере и анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (BectonDickensonCo., USA).

При проведении проточной цитометрии сначала на каналах FSC/SSC выделяли гейт нейтрофилов по интактному контролю, затем проводили измерение пробы, фагоцитировавшие клетки перемещались из гейта вправо и выделялись в отдельный гейт (Рисунок 3). Далее оценивали уровень флуоресценции на канале FL3-H и анализировали гистограмму событий. На Рисунке 4 представлен пример измерения процента фагоцитировавших клеток (курсор M1), пик которых расположен справа от пика диплоидногклеток.

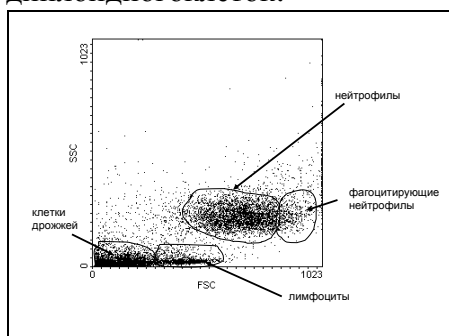


Рисунок 3. Примеры распределения клеток при измерении процента нейтрофилов периферической крови человека, фагоцитировавших клетки дрожжей *Rhodotorula spp.*

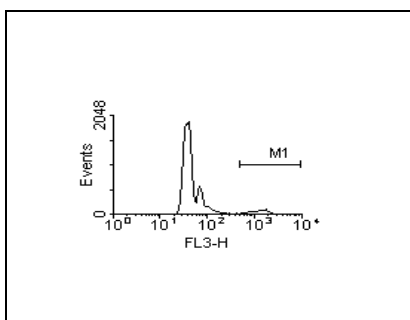


Рисунок 4. Пример гистограммы, полученной при анализе флуоресценции клеток на канале FL3-H после окраски пропидиумом иодидом. Курсор M1 обозначает пик, соответствующий популяции фагоцитировавших клеток.

Изучение экспрессии рецептора TREM-1 в генерации супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови доноров и больных атопическим дерматитом при стимуляции бактериальным пептидом fmlp

Лейкоциты крови получали после удаления эритроцитов лизирующим буфером, отмывали, окрашивали моноклональными антителами к рецептору TREM-1 (Abcam) и анализировали на проточном цитометре FACSCalibur. Экспрессию рецептора TREM-1 измеряли в гейте нейтрофилов на канале FL-1A, определяли процент антиген-положительных клеток и интенсивность флуоресценции в условных единицах (y.e.).

Для измерения уровня супероксидного аниона лейкоциты были фракционированы на градиенте Перколла, выделены нейтрофилы с чистотой 98%, отмывы, восстановлены в полной среде в течение 2 ч, отмывы, переведены в буфер. Генерацию супероксидного аниона измеряли на базальном уровне и после стимуляции нейтрофилов бактериальным пептидом fmlp (formyl-methionine-leucine-phenile) [в концентрации 10нМ] на двулучевом спектрофотометре Hitachi.

Статистическая обработка результатов исследований

Статистическую обработку данных проводили по алгоритму пакета программ «Statisticaforwindows7.0». Проверку нормальности распределения количественных показателей определяли с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. При нормальности распределения количественных признаков оценку различий проводили с помощью парного t-критерия Стьюдента. Проверку достоверности различий при ненормальности распределения в сравниваемых группах проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни, в случае множественных независимых совокупностей – критерия Краскала-Уоллиса. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – средняя арифметическая величина, m – ошибка среднего. Для выявления зависимостей между изучаемыми параметрами проводили корреляционный анализ с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена, для проверки статистической значимости изменения показателей. Достоверность различий между величинами считалась установленной при $p < 0,05$. Библиографический поиск проведен по базам данных MEDLINE, UpToDate, PubMed и др. за период с 2008 по 2020 год.

КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ

Под наблюдением находилось 144 больных АД. Группу обследованных составили 30,6% (n=44) женщин и 69,4% (n=100) мужчин в возрасте от 18 до 56 лет, среди обследованных преобладали мужчины – 69,4 % (n=100) в возрасте от 23 до 27 лет.

Преобладали больные эритематозно-сквамозной формой с лихенизацией – у 55,5% (n=80) и эритематозно-сквамозной – у 30,6% (n=44). По распространенности кожного процесса: преобладали локализованный – у 48,6% (n=70) больных и распространенный – у 44,4% (n=64) характер поражения. У больных диагностирована легкая степень (iSc<40), у 40,3% (n=58), средняя (iSc – 40-60); у - 9,7% (n=14)- тяжелая (iSc> 60). В контрольную группу (25 мужчин и 7 женщин) были включены пациенты, проходившие медицинское обследование для получения медицинских книжек, справок для бассейна, при оформлении санаторно-курортной карты, а также молодые мужчины, проходившие обследование для зачисления на службу. Критерии включения в контрольную группу: возраст старше 18 лет, заключение дерматолога "здоров", отсутствие хронических соматических заболеваний.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. ИЗУЧЕНИЕ СИСТЕМЫ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

Известно, что патогенез АД связан с патологическими иммунными реакциями, медиаторами которых являются цитокины, инициирующие и поддерживающие воспалительный процесс в коже. Важным звеном в патогенезе этого заболевания является сдвиг Th₁/Th₂-цитокينوвого профиля.

В сыворотке крови больных АД исследовали уровни провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, а именно: ИНФγ, ФНОα, ИЛ-1β, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-8, ИЛ-13. Результаты исследования представлены в Таблице 1.

Таблица 1.

Содержание цитокинов в сыворотке крови больных атопическим дерматитом (M±m) (n=72)

Номер группы	ИНФγ		ФНОα		ИЛ-1β	
	Обострение	Ремиссия	Обострение	Ремиссия	Обострение	Ремиссия
1	26,5±5,4	30,6±4,4 ^{□2}	42,1±2,8 ^{□2,3}	59±5,0* ^{□3}	59±7,0 ^{□2,3}	59±7,8
2	21,2±3,0*	44,7±7,8*	52±4,3	54±6,2* ^{□3}	75±9,5**	55±5,8
3	21,0±3,1*	39,9±9,0*	60±6,7*	76±9,4**	75±11,9**	64±9,9
4	32,3±4,2		43,4±4,7		54±8,4	

Номер группы	ИЛ-4		ИЛ-6		ИЛ-10	
	Обострение	Ремиссия	Обострение	Ремиссия	Обострение	Ремиссия
1	13±3,5 ^{□2,3}	13±4,8	55±9,5* ^{□2,3}	22±4,1 ^{□2,3}	55±8,7* ^{□3}	45±5,0 ^{□□3}
2	35±13,3**	14±4,7	76±14,0**	40±10,2*	56±7,0*	44±5,9 ^{□□3}
3	39±11,9**	14±3,7	67±14,2**	39±8,1*	70±13,2**	67±11,3**
4	11±3,1		20±4,8		37±6,7	

Номер группы	ИЛ-12		ИЛ-8		ИЛ-13	
	Обострение	Ремиссия	Обострение	Ремиссия	Обострение	Ремиссия
1	31±3,9	47±7,7*□ ²	79±12,4**	65±9,8	48±7,3*□ ³	34±4,9□□ ³
2	41±7,0	67±14,6**	71±14,3**	64±12,0	48±8,5*□ ³	37±9,9□□ ³
3	39±6,8	60±14,1**	86±16,2**	76±7,7**	71±10,1**	69±8,0**
4	31±6,7		51±6,7		35±8,6	

x* - p<0,05;

x** - p<0,01 по сравнению с группой сравнения (группа 4);

x□³ - p<0,05 по сравнению с группой 3;

x□□² - p<0,01 по сравнению с группой 2.

При обострении уровень ИНФγ достоверно снижался, а во время ремиссии, превышал контрольные значения, причем при средней степени тяжести достигал максимума. Во всех обследуемых группах больных содержание ИЛ-12 достоверно возрастало лишь в неактивную фазу АД, а во время обострения процесса достоверно не отличалось от данных контроля. Максимальные значения уровня ИНФγ наблюдались у пациентов во время ремиссии при среднетяжелой форме заболевания. Достоверное увеличение ФНОα наблюдалось при тяжелой форме АД, как при обострении, так и во время ремиссии, а также во время ремиссии при среднетяжелой форме. Результат определения ИЛ-1β при АД: достоверное повышение при тяжелой и среднетяжелой формах при обострении. Содержания противовоспалительных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-13 во многом были схожи. Наибольшие их концентрации отмечались во время обострения при тяжёлом и среднетяжёлом течении заболевания, а также при распространённом и диффузном поражении. Наблюдающаяся, в целом, тенденция к повышению уровней ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-13 в период обострения может свидетельствовать о подавлении функциональной активности Th₁-звена иммунитета на фоне повышения функциональной активности Th₂-лимфоцитов. Во время ремиссии мы наблюдаем обратную картину – повышение содержания в сыворотке провоспалительных цитокинов – ИНФγ, ФНОα, ИЛ-12, что свидетельствует о повышении функциональной активности Th1-лимфоцитов. В целом все эти данные косвенно свидетельствуют о дисбалансе этих субпопуляций Т-хелперов при АД.

Были определены коэффициенты корреляции между величиной индекса SCORAD и уровнями определяемых цитокинов во время обострения АД. Полученные результаты представлены в Таблице 2.

Таблица 2.

Коэффициент корреляции между индексом SCORAD и содержанием цитокинов в сыворотке крови у больных атопическим дерматитом

Показатель	SCORAD
ИНФγ	-0,07
ФНОα	0,44*
ИЛ-1β	0,23
ИЛ-4	0,51*
ИЛ-6	0,04
ИЛ-10	0,39
ИЛ-12	0,05
ИЛ-8	0,02
ИЛ-13	0,30

x* - p<0,05

Из представленной таблицы 2 видно, что только уровни ФНО α и ИЛ-4 достоверно коррелировали с тяжестью заболевания с учетом индекса SCORAD. Несмотря на то, что повышение ФНО α было более характерно для ремиссии, во время обострения заболевания его уровни все равно коррелировали с тяжестью течения. Однако наблюдаемые корреляции не были выраженными.

2. ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ДЕСТРУКТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ И АКТИВНОСТИ АНТИДЕСТРУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

Активация воспалительного процесса у больных АД связана с уменьшением количества ингибиторов ЛЭ в тканях. Активность ЛЭ в зависимости от тяжести течения АД представлена в Таблице 3.

Таблица 3.
Сравнительная активность человеческой лейкоцитарной эластазы сыворотки крови при различных формах атопического дерматита в стадиях обострения и ремиссии (n=72)

Группа больных (n)	Активность ЛЭ, нмоль/мл*мин	
	Обострение	ремиссия
1 (n=27)	234 \pm 9* \times	202 \pm 10 \times
2 (n=31)	259 \pm 13* \times	224 \pm 9* \times
3 (n=14)	299 \pm 19* $^{\circ}$	263 \pm 12* $^{\circ}$
4 (n=23)	191 \pm 8	

*p<0,05, по сравнению с контрольной группой;

\times p<0,05, в группе при сравнении обострения/ремиссии;

$^{\circ}$ p<0,05, по сравнению с группой 1 (обострение);

\gg p<0,05, по сравнению с группой 1 и 2 (ремиссия).

Как видно из Таблицы 3, достоверные отличия (p<0,05) по сравнению с контрольной группой были у всех обследованных. У больных АД в пределах фазы обострения заболевания было выявлено достоверное повышение активности ЛЭ, имевшее корреляцию с тяжестью клинического процесса. Так, в период обострения её активность в 1,7; 1,4 и 1,3 раза была выше в группах 3-1 соответственно, чем в контрольной группе. Стоит отметить, что в период ремиссии нормализация активности ЛЭ отмечена лишь в группе 1 с лёгким течением АД. В со среднетяжелым течением она уменьшилась в 1,2 раза по сравнению с периодом обострения, однако все равно превышала показатели контрольной группы в 1,2 раза. В группе 3 - в 1,2 и 1,5 раза соответственно. Таким образом, даже в период ремиссии нормализации активности ЛЭ в группах 2 и 3 не отмечалось. По всей видимости, увеличение активности ЛЭ является следствием повышенной дегрануляции активированных нейтрофилов. Поскольку активность эластазы регулируется с помощью α 1-ПИ, то определяли ее содержание у больных АД (Таблица 4).

Таблица 4.

Сравнительная антитриптическая активность сыворотки крови при различной форме тяжести атопического дерматита в стадии обострения и ремиссии (n=72)

Группы больных (n)	Активность α 1-ПИ, нмоль/мл*мин	
	Обострение	Ремиссия
1 (n=27)	39 \pm 5*	31 \pm 4
2 (n=31)	43 \pm 7*	34 \pm 4
3 (n=14)	50 \pm 13*	38 \pm 6
4 (n=23)	26 \pm 3	

*p<0,05, по сравнению с контрольной группой

Как видно из данных таблицы 4, в контрольной группе активность α 1-ПИ не превышала, а при обострении в группе 1 и 2 отмечалось достоверное увеличение активности α 1-ПИ по сравнению с контрольной группой, соответствующее увеличенной активности ЛЭ. В группах 2 и 3 у части больных активность α 1-ПИ была недостаточной для повышенной активности ЛЭ. Повышение активности α 1-ПИ при возрастающей активности в сыворотке ЛЭ можно оценить как «компенсаторное повышение» в ответ на выделение медиаторов при дегрануляции нейтрофилов. Данное проявление свидетельствует об ограничении деструктивной реакции и сохранности антипротеолитического потенциала. У ряда больных активность α 1-ПИ снижалась по сравнению с нормой, что расценивалось нами как «истощение компенсаторного антипротеолитического потенциала».

В Таблице 5 представлены корреляционные связи между такими параметрами, как активности ЛЭ, α 1-ПИ и SCORAD при обострении АД разной степени тяжести.

Таблица 5.

Корреляционные связи между активностью ЛЭ, α 1-ПИ и SCORAD при обострении АД разной степени тяжести

Корреляция	Степень тяжести обострения АД		
	Легкая	Средняя	Тяжелая
ЛЭ и α 1-ПИ	+0,65*	+0,34	-0,16
SCORAD и ЛЭ	+0,55*	+0,65*	+0,45*
SCORAD и α 1-ПИ	+0,56*	+0,26	-0,37*

*p<0,05

Во всех группах наблюдалась положительная корреляция между активностью ЛЭ и SCORAD. Однако активность α 1-ПИ изменялась при этом не однозначно.

Наблюдалась достоверная отрицательная корреляция между SCORAD и α 1-ПИ у тяжелых пациентов. В целом, чем более выражена тяжесть АД, тем менее активен α 1-ПИ. Это напрямую свидетельствует о том, что при тяжелом течении наблюдается истощение антипротеолитического потенциала, что не может не способствовать утяжелению состояния больного. Таким образом, активность ЛЭ и α 1-ПИ сыворотки крови отражает интенсивность деструктивных процессов и состояние антипротеолитического (компенсаторного) потенциала организма: однонаправленное с ЛЭ увеличение активности

α 1-ПИ призвано ограничить деструкцию и характеризует сохранность антипротеолитического потенциала. Однако сниженная активность α 1-ПИ говорит о прогрессировании деструктивного воспаления и, вероятно, является неблагоприятным прогностическим признаком течения АД.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ

3.1. Хемилюминесценция клеток крови

В связи с тем, что нет единой точки зрения, касающейся уровня функциональной активности нейтрофилов при АД, в этом разделе была поставлена задача изучения люминол-зависимой хемилюминесценции клеток крови больных АД и анализа полученных данных в зависимости от стадии заболевания и тяжести клинической картины.

В таблице 6 представлены результаты спонтанной и индуцированной зимозаном хемилюминесценции клеток крови больных АД в зависимости от тяжести клинического течения согласно индексу SCORAD.

Таблица 6.

Хемилюминесценция (импульсы в секунду) на 1×10^6 клеток крови доноров и больных АД при различной степени тяжести клинического течения (Фон составил 300 импульсов в секунду)

	Доноры (n = 32)	Больные атопическим дерматитом Классификация по индексу SCORAD		
		Легкое течение (n = 48)	Средней тяжести (n = 76)	Тяжелое течение (n = 22)
Спонтанная хемилюминесценция	963 ± 71	1210 ± 141	982 ± 113	729 ± 122*
Индуцированная хемилюминесценция				
Зимозан	3136 ± 244	3482 ± 201	3017 ± 324	2921 ± 306*
<i>Candida tropicalis</i>	2905 ± 298	2988 ± 265	2794 ± 302	2521 ± 287

* - $p < 0,05$ по сравнению с больными с легким течением

Повышение спонтанной и индуцированной хемилюминесценции при легкой степени АД по сравнению со здоровыми донорами статистически недостоверно. При сравнении результатов больных тяжелой степенью АД и легкой степенью имеется достоверное различие ($P < 0,05$).

Данные по уровню спонтанной и индуцированной хемилюминесценции лейкоцитарной взвеси периферической крови в зависимости от степени распространенности процесса представлены в Таблице 7.

Таблица 7.

Хемилюминесценция (импульсы в секунду) на 1×10^6 клеток крови доноров и больных атопическим дерматитом при различной площади поражения кожи (Фон составил 300 импульсов в секунду)

Хемилюминесценция	Доноры (n = 32)	Больные атопическим дерматитом Типы распространённости процесса		
		Ограниченно-локализованный (n = 41)	Распространённый (n = 77)	Диффузный (n = 28)
Спонтанная	963 ± 71	1113 ± 134	950 ± 128	821 ± 136
Индукцированная				
Зимозан	3136 ± 244	3294 ± 222*	2983 ± 265	2611 ± 362*
<i>Candida tropicalis</i>	2905 ± 298	3008 ± 261	2865 ± 303	2617 ± 381

* - $p < 0,05$ между больными с ограниченно-локализованным и диффузным процессом.

Некоторое повышение спонтанной и индуцированной хемилюминесценции при ограниченной локализации процесса по сравнению со здоровыми донорами не является статистически достоверной. Показано достоверное различие ($P < 0,05$) между уровнем индуцированной зимозаном хемилюминесценции у больных ограниченно-локализованным и диффузным процессом.

При контаминации кожи условно патогенными дрожжами рода *Candida tropicalis* (18 больных) показана более высокая спонтанная хемилюминесценция по сравнению со средними показателями для общей группы больных (Таблица 8).

Таблица 8.

Хемилюминесценция (импульсы в секунду) на 1×10^6 клеток крови доноров и больных атопическим дерматитом, контаминированных дрожжами *Candida tropicalis*, при различной степени тяжести клинического течения в первую неделю обострения (Фон составил 300 импульсов в секунду)

	Доноры (n = 12)	Больные атопическим дерматитом Классификация по индексу SCORAD		
		Легкое течение (n = 7)	Средней тяжести (n = 7)	Тяжелое течение (n = 4)
Спонтанная хемилюминесценция	1202 ± 95	1351 ± 124	1196 ± 133	801 ± 57*
Индукцированная хемилюминесценция				
Зимозан	3341 ± 195	3556 ± 201*	3198 ± 227	2980 ± 166
<i>Candida tropicalis</i>	3220 ± 169	3301 ± 244	3012 ± 295	2891 ± 306

* - $p < 0,05$ по сравнению с тяжелой формой заболевания

У 4-х больных с тяжелым течением заболевания была смешанная контаминация дрожжами и бактериальной инфекцией, при этом спонтанная хемилюминесценция была достоверно снижена по сравнению со здоровыми донорами и по сравнению с легкой

степенью заболевания ($P < 0,05$). Имелась тенденция к повышению уровня индуцированной зимозаном хемилюминесценции при легкой степени АД по сравнению с донорами, но достоверно повышена по сравнению с тяжелой формой заболевания ($P < 0,05$) (Таблица 8).

Индуцированная зимозаном хемилюминесценция клеток крови больных тяжелой формой АД с бактериальной контаминацией достоверно снижена ($P < 0,05$) по сравнению с донорами и больными легкой формой заболевания. Уровень хемилюминесценции, стимулированной дрожжами *Candida tropicalis*, ниже показателей для общей когорты больных АД, и достоверно ниже у больных тяжелой формой АД ($P < 0,05$) по сравнению с донорами и с больными легкой формой заболевания (Таблица 9). Таким образом, контаминация кожи бактериальной инфекцией при АД обуславливает снижение хемилюминесценции клеток крови, как спонтанной, так и индуцированной зимозаном или дрожжами рода *Candida tropicalis*.

Таблица 9.

Хемилюминесценция (импульсы в секунду) на 1×10^6 клеток крови доноров и больных атопическим дерматитом, контаминированных *Staphylococcus aureus*, при различной степени тяжести клинического течения в первую неделю обострения (Фон составил 300 импульсов в секунду)

	Доноры (n = 14)	Больные атопическим дерматитом Классификация по индексу SCORAD		
		Легкое течение (n = 4)	Средней тяжести (n = 11)	Тяжелое течение (n = 5)
Спонтанная хемилюминесценция	1083 ± 124	921 ± 109	887 ± 126	862 ± 148
Индуцированная хемилюминесценция				
Зимозан	3012 ± 222	2986 ± 213	2598 ± 283	2401 ± 254*
<i>Candida tropicalis</i>	2998 ± 182	2750 ± 205	2434 ± 237	2216 ± 321*

* - $p < 0,05$ по сравнению с донорами и больными с легким течением

Для больных тяжелой формой АД все определяемые показатели были достоверно снижены. Контаминация кожи условно патогенными дрожжами *Candida tropicalis* повышает как спонтанную, так и индуцированную хемилюминесценцию клеток крови больных АД. При тяжелой форме АД функциональная активность нейтрофилов достоверно снижена.

3.2. Количественное измерение уровня генерации супероксидного аниона нейтрофилами при стимуляции fmlp и форболовым эфиром

Для количественного измерения генерации супероксидного аниона очищенной популяцией нейтрофилов, выделенных из периферической крови, были использованы два стимулятора NADPH оксидазы – это рецепторзависимый N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fmlp), а также растворимый фармакологический активатор NADPH оксидазы форболмиристатацетат (РМА).

У всех обследованных лиц брали кровь натощак, затем все получали стандартный завтрак (200 мл молока, нормированного по 3,2% жирности, 50 граммов хлеба «Бородинского» и вареное куриное яйцо стандартного размера). После завтрака кровь

брали три раза с интервалов в один час.

В нейтрофилах, выделенных из крови, взятой перед началом эксперимента натошак, генерация супероксидного аниона под действием fmlp, практически не отличалась от концентрации супероксида, высвобождаемого нейтрофилами доноров ($0,75 \pm 0,14$ vs $0,76 \pm 0,09$ нМ/мл/ 10^6 клеток). При сравнении уровня высвобождаемого супероксидного аниона из стимулированных fmlp нейтрофилов больных АД в стадии обострения, обнаружено достоверное различие в зависимости от степени тяжести течения заболевания (Рисунок 5).

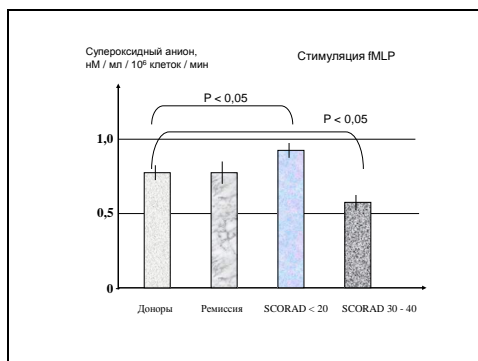


Рисунок 5. Стимулированная fmlp продукция супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови больных атопическим дерматитом в стадиях обострения и ремиссии по сравнению со здоровыми донорами.

У больных легкой степенью АД в начале обострения активность нейтрофилов повышается (концентрация супероксида $0,92 \pm 0,11$ нМ/мл/ 10^6 клеток). При средней степени тяжести и распространенном процессе нейтрофилы генерируют супероксидный анион в концентрациях, достоверно меньшей по сравнению с донорами и с легкой степенью АД ($0,61 \pm 0,10$ нМ/мл/ 10^6 клеток, $P < 0,05$).

Уровень генерации супероксидного аниона при стимуляции РМА значительно выше, чем под действием fmlp, однако имеется та же тенденция, то есть наблюдается повышение концентрации супероксида при легкой степени заболевания и снижение его уровня при более тяжелом течении (Таблица 10).

Таблица 10.

Генерация супероксидного аниона (нМ/мл/ 10^6 клеток) нейтрофилами периферической крови доноров и больных АД при стимуляции РМА.

	Доноры (n = 22)	Больные атопическим дерматитом Классификация по индексу SCORAD		
		Ремиссия (n = 16)	Легкая степень (n = 15)	Средняя тяжесть (n = 21)
Уровень O ₂ •-	$1,21 \pm 0,12$	$1,33 \pm 0,21$	$1,77 \pm 0,17$	$0,93 \pm 0,11$
P < 0,05 (по отношению к донорам)			+	+

На Рисунке 6 представлены результаты обследования доноров.

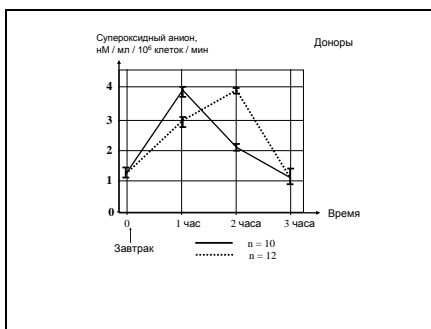


Рисунок 6. Динамика генерации супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови доноров при стимуляции форболовым эфиром (РМА). (Измерения проведены натощак и каждый час после приёма стандартного завтрака).

У всех обследованных лиц концентрация высвобождаемого супероксидного аниона приходила к первоначальному уровню через 3 ч после завтрака.

По сравнению с донорами больные АД в стадии ремиссии отвечали более однородно (Рисунок 7), пик активности нейтрофилов приходился на первый час после завтрака, однако часть больных имела достоверно более высокие значения концентрации супероксида в течение первого часа. У этой категории больных было достоверно более существенное снижение концентрации выделяемого супероксида через 3 часа после завтрака, то есть в тот период, когда у доноров происходило восстановление показателей.

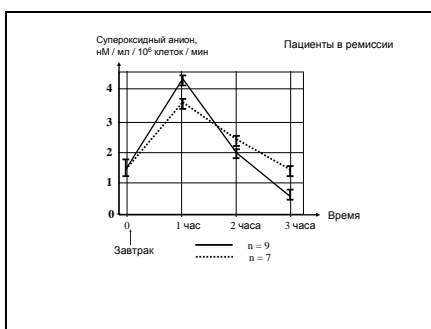


Рисунок 7. Динамика РМА – стимулированной генерации супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови больных атопическим дерматитом в стадии ремиссии. (Измерения проведены натощак и каждый час после приёма стандартного завтрака).

При сравнении динамики генерации супероксидного аниона нейтрофилами крови больных АД в стадии обострения обращает на себя внимание изменение формы кривой (Рисунок 8 и Рисунок 9), что особенно выражено при средней степени тяжести течения заболевания. В этой группе больных не только достоверно снижена концентрация супероксидного аниона в пробе крови натощак, но и достоверно ($P < 0,05$) ингибирована активность нейтрофилов в первый час после приёма завтрака. Имеются существенные различия в форме кривой, отражающей динамику генерации супероксидного аниона нейтрофилами, для больных АД в разные периоды течения заболевания.

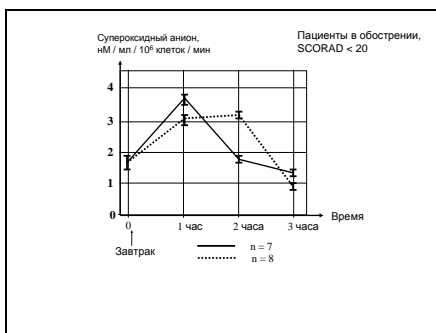


Рисунок 8. Динамика РМА – стимулированной генерации супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови больных в начале обострения АД при легком течении заболевания. (Измерения проведены натощак и каждый час после приёма стандартного завтрака).

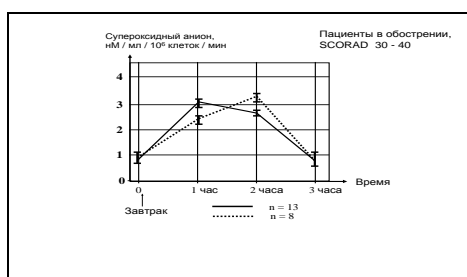


Рисунок 9. Динамика РМА–стимулированной генерации супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови больных АД в начале обострения при средней степени активности процесса. (Измерения проведены натощак и каждый час после приёма стандартного завтрака).

Нейтрофилы больных АД различаются по уровню генерации супероксидного аниона в ответ на рецептор – зависимые стимулы (fmlp) и в ответ на прямой активатор кислородного взрыва – форболовый эфир (РМА); fmlp оказывал достоверно менее выраженный эффект на генерацию супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови. Действие fmlp и РМА в отношении нейтрофилов больных и здоровых доноров показывают сходную тенденцию. У больных АД легкой степени тяжести в начале периода обострения повышена генерация супероксидного аниона нейтрофилами в ответ на стимулы по сравнению со здоровыми донорами. У больных со средней степенью тяжести генерация супероксидного аниона нейтрофилами достоверно снижена ($P < 0,05$). У больных АД изменена кинетика активности нейтрофилов в ответ на физиологические стимулы (приём стандартного завтрака) при почасовом измерении генерации супероксидного аниона.

3.3. Измерение фагоцитарной активности нейтрофилов методом проточной цитометрии с использованием штаммов дрожжей *Rhodotorula spp.*

Мы провели исследование фагоцитарной активности для всех больных и сравнили показатели больных, контаминированных *Rhodotorula spp.*, с показателями больных, у которых или нет достоверного инфицирования кожи или верифицирована бактериальная контаминация.

Фагоцитарная активность очищенной популяции нейтрофилов больных АД, контаминированных *Rhodotorula spp.*, и здоровых доноров приведен на Рисунках 10 и 11.

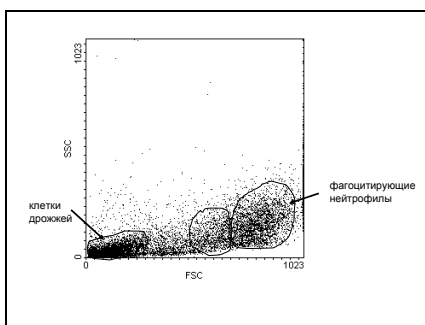


Рисунок 10. Данные проточной цитометрии по измерению процента нейтрофилов (периферической крови доноров), фагоцитировавших клетки дрожжей *Rhodotorula spp.*

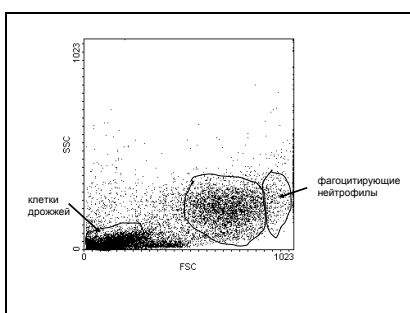


Рисунок 11. Данные проточной цитометрии по измерению процента нейтрофилов (периферической крови больных атопическим дерматитом), фагоцитировавших клетки дрожжей *Rhodotorula spp.*

На Рисунке 12 представлены гистограммы, соответствующие гейтам интактных нейтрофилов и фагоцитирующих клеток. Крайний правый пик соответствует гейту фагоцитировавших нейтрофилов и, на приведенных на рисунке примерах, составляет 21% и 3%, соответственно, для доноров и больных АД, контаминированных *Rhodotorula spp.*

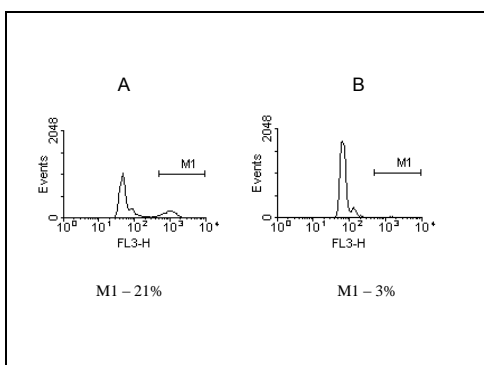


Рисунок 12. Данные проточной цитометрии по измерению процента нейтрофилов периферической крови больных атопическим дерматитом и больных атопическим дерматитом, контаминированных *Rhodotorula spp.*, фагоцитировавших клетки дрожжей *Rhodotorula spp.*

Полученные данные указывают на существенное ослабление фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови больных АД с подтвержденной контаминацией дрожжами рода *Rhodotorula spp.* в отношении этого патогена. По

сравнению с группой больных АД без контаминации дрожжами или бактериями, у которых она снижена незначительно.

4.4 Экспрессия рецепторов нейтрофилов TREM-1 при atopическом дерматите

Уровень экспрессии рецептора TREM-1 на нейтрофилах периферической крови (по интенсивности флуоресценции, отражающей относительную плотность рецепторов на клетках (измеряется в условных единицах)) был достоверно выше у больных АД легкого течения и средней степени тяжести по сравнению со здоровыми донорами (табл.16). У пациентов в состоянии ремиссии уровень экспрессии рецептора TREM-1 имел тенденцию к повышению по сравнению с донорами ($P > 0,05$). У больных АД тяжелого течения уровень экспрессии рецептора TREM-1 выше, чем у доноров, но ниже, чем у больных АД средней степени тяжести.

У больных АД показан достоверно повышенный ($P < 0,05$) уровень продукции супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови при стимуляции бактериальным пептидом fmlp по сравнению со здоровыми донорами крови (табл.16). Показатели генерации супероксидного аниона имели достоверно ($P < 0,05$) положительную корреляцию (коэффициент корреляции 0,76) с изменением уровня экспрессии рецептора TREM-1 на нейтрофилах крови. Эти данные согласуются с механизмом действия рецептора TREM-1 и его сопряжением с секрецией супероксидного аниона.

Таблица 11

Экспрессия рецептора TREM-1 и генерация супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови доноров и больных atopическим дерматитом при стимуляции бактериальным пептидом fmlp.

	Доноры (n = 22)	Больные atopическим дерматитом (классификация по индексу SCORAD)			
		Ремиссия (n = 15)	Легкое течение < 20 (n = 15)	Средней тяжести 30–40 (n = 26)	Тяжелое течение 40–60 (n = 14)
TREM-1, %	85 ± 2	89 ± 3	92 ± 2	95 ± 3	90 ± 3
TREM-1, у.е.	112 ± 7	124 ± 3	138 ± 6	163 ± 5	145 ± 5
$P < 0,05$ (к донорам)			+	+	+
Уровень O ₂ ^{•-} (нМ/мл/10 ⁶ клеток)	1,14 ± 0,12	1,29 ± 0,10	1,54 ± 0,14	1,63 ± 0,18	1,42 ± 0,13
$P < 0,05$ (к донорам)			+	+	+

O₂^{•-} - супероксидный анион; fmlp – formyl-methionine-leucine-phenile (формил-метионин-лейцин-фенил; SCORAD – индекс тяжести течения atopического дерматита у взрослых; у.е. - условные единицы.

Таким образом, мы установили, что при заболевании АД у взрослых имеются изменения в экспрессии рецептора нейтрофилов TREM-1, сопряженного с секрецией азурофильных гранул и генерацией супероксидного аниона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе мы исследовали уровни провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, а именно ИНФ γ , ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-4, 6, 10, 12, 8, 13. В итоге, прослеживается тенденция к повышенной продукции цитокинов: противовоспалительных (ИЛ-4, 6, 10, 13) – при обострении АД и провоспалительных (ИНФ γ , ФНО α , ИЛ-12) – во время ремиссии.

У больных АД в пределах фазы обострения заболевания было выявлено достоверное повышение активности ЛЭ, имевшее корреляцию с тяжестью клинического процесса, даже в период ремиссии нормализации активности ЛЭ не отмечалось. По всей видимости, увеличение активности ЛЭ является следствием повышенной дегрануляции активированных нейтрофилов. Поскольку активность эластазы регулируется с помощью α 1-ПИ, то определяли ее содержание у больных АД. Так, средние значения активности α 1-ПИ возрастали по мере утяжеления состояния пациентов, но в группе тяжелых пациентов наблюдалась достоверная отрицательная корреляция между SCORAD и α 1-ПИ, т.е. чем более выражена тяжесть АД, тем менее активен α 1-ПИ. Таким образом, активность ЛЭ и α 1-ПИ сыворотки крови отражает интенсивность деструктивных процессов и состояние антипротеолитического (компенсаторного) потенциала организма: однонаправленное с ЛЭ увеличение активности α 1-ПИ призвано ограничить деструкцию и характеризует сохранность антипротеолитического потенциала.

В зависимости от степени распространенности процесса достоверное повышение индуцированной зимозаном хемилюминесценции наблюдалось у больных с ограниченно-локализованным и понижение у больных с диффузным процессом. При контаминации кожи условно патогенными дрожжами рода *Candida tropicalis* наблюдали достоверное снижение спонтанной хемилюминесценции клеток крови у больных с тяжелым течением заболевания и достоверное повышение индуцированной зимозаном хемилюминесценции при легкой степени АД. При контаминации кожи золотистым стафилококком имелась тенденция к снижению уровня хемилюминесценции клеток крови. Нейтрофилы больных АД различаются по уровню генерации супероксидного аниона в ответ на рецепторзависимые стимулы и в ответ форболовый эфир; fmlp оказывал достоверно менее выраженный эффект на генерацию супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови. У больных АД легкой степени тяжести в начале периода обострения повышена генерация супероксидного аниона нейтрофилами в ответ на стимулы по сравнению со здоровыми донорами. У больных с более тяжелым течением заболевания генерация супероксидного аниона нейтрофилами достоверно снижена ($P < 0,05$). У больных АД изменена кинетика активности нейтрофилов в ответ на физиологические стимулы (приём стандартного завтрака) при почасовом измерении генерации супероксидного аниона. Полученные данные указывают на существенное ослабление фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови больных АД с подтвержденной контаминацией дрожжами рода *Rhodotorula spp.* в отношении этого патогена. У больных АД установлен достоверно повышенный ($P < 0,05$) уровень продукции супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови при стимуляции бактериальным пептидом fmlp по сравнению со здоровыми донорами, а показатели генерации супероксидного аниона имели достоверно ($P < 0,05$) положительную корреляцию (коэффициент корреляции 0,76) с изменением уровня экспрессии рецептора TREM-1 на нейтрофилах крови.

ВЫВОДЫ

1. Во время обострения АД наблюдается повышение уровня противовоспалительных цитокинов ИЛ-4, -6, -10, -13, а во время ремиссии повышение уровня провоспалительных цитокинов ИНФ γ , ФНО α , ИЛ-12, что свидетельствует и дисрегуляции реципрокных отношений Th1- и Th2-субпопуляций лимфоцитов.

2. Активность протеолитического фермента лейкоцитарной эластазы коррелирует с тяжестью течения АД.

3. У пациентов с легкой степенью тяжести АД наблюдается положительная корреляция между индексом SCORAD и активностью α_1 -ПИ в сыворотке крови, отражающего активацию антипротеолитического потенциала, направленного на ограничение деструктивных процессов. У пациентов с тяжёлым течением АД наблюдается отрицательная корреляционная связь между индексом SCORAD и активностью α_1 -ПИ, что свидетельствует об истощении компенсаторного потенциала.

4. Функциональная активность нейтрофилов при изучении люминол-зависимой хемилюминесценции клеток крови больных АД имеет тенденцию к снижению при тяжелом течении АД и при бактериальной и микотической контаминации кожи; при легком течении АД функциональная активность нейтрофилов возрастает.

5. Выявлена различная активность нейтрофилов (по уровню генерации супероксидного аниона в ответ на рецептор-зависимые стимулы (fmlp) и в ответ на прямой активатор кислородного взрыва – форболовый эфир (PMA)) в зависимости от степени тяжести: у больных АД легкой степени тяжести в начале периода обострения повышена генерация супероксидного аниона нейтрофилами в ответ на стимулы по сравнению со здоровыми донорами. У больных со средней степенью тяжести генерация супероксидного аниона нейтрофилами достоверно снижена ($P < 0,05$).

6. Наличие сопутствующей грибковой контаминации дрожжами *Rhodotorula spp.* у больных АД снижает фагоцитарную активность нейтрофилов.

7. У больных АД установлен достоверно повышенный ($P < 0,05$) уровень продукции супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови при стимуляции бактериальным пептидом fmlp по сравнению со здоровыми донорами, а показатели генерации супероксидного аниона имели достоверно ($P < 0,05$) положительную корреляцию (коэффициент корреляции 0,76) с изменением уровня экспрессии рецептора TREM-1 на нейтрофилах крови.

СПИСОК ОСНОВНЫХ НАУЧНЫХ ТРУДОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК

1. **Тарасова М.В.**, Елистратова И.В., Иванченко О.Б., Волкова Е.Н., Морозов С.Г. Активность фагоцитоза у больных атопическим дерматитом с подтверждённой контаминацией кожи дрожжами рода *Candida spp.* // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2020. - №1. - С. 47-53.
2. **Тарасова М. В.**, Елистратова И. В., Морозов С. Г. Экспрессия рецепторов нейтрофилов периферической крови при обострении атопического дерматита у взрослых мужчин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2019. - №3. - С. 29-34.

3. **Тарасова М.В.**, Овсянников М.В., Волкова Е.Н. Активность лейкоцитарной эластазы и альфа-1 протеиназного ингибитора у больных с атопическим дерматитом // Патогенез. – 2018. - №4, - С. 153-156.
4. Елистратова И.В., Морозов С.Г., Захарова И.А., **Тарасова М.В.** Люминол–зависимая хемиллюминесценция лейкоцитов периферической крови больных атопическим дерматитом при различной тяжести течения заболевания // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2015. - №4. - С. 35-40.
5. Елистратова И.В., **Тарасова М.В.**, Морозов С.Г. Динамика генерации супероксидного аниона нейтрофилами крови больных атопическим дерматитом в молодом возрасте // Патогенез. – 2015. - №4. - С. 41-46.
6. Волкова Е.Н., Морозов С.Г., **Тарасова М.В.**, Елистратова И.В., Григорьева А.А. Исследование уровня циркулирующих цитокинов у больных атопическим дерматитом // Вестник дерматологии и венерологии. – 2014. - №2. - С. 26-30.
7. Волкова Е.Н., Родина Ю.А., **Тарасова М.В.**, Ланге Д.А. Опыт и анализ тактических ошибок применения «Адвантана» в комплексной терапии хронических дерматозов // Российский журнал кожных и венерических болезней. - 2011. - №1. - С. 25-29.
8. Волкова Е.Н., Ланге Д.А., **Тарасова М.В.**, Родина Ю.А. Метилпреднизолон ацепонат в комплексной терапии хронических дерматозов: анализ тактических ошибок применения // Клиническая дерматология и венерология. – 2010. - №5. - С. 97-102.
9. Волкова Е.Н., Никитина И.В., **Тарасова М.В.**, Маринина Т.В. Эффективность и безопасность препаратов линии акридерм в лечении детей с хроническими дерматозами: результаты клинического исследования // Клиническая дерматология и венерология. – 2007. - №6. - С. 49-58.
10. Бутов Ю.С., **Тарасова М.В.**, Родина Ю.А. Антигистаминная терапия – основа современного лечения аллергодерматозов // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2005. - №5. - С. 31-33.
11. Бутов Ю.С., Дейгин В.И., **Тарасова М.В.** Клинико-иммунологическая характеристика атопического дерматита и его коррекция // Вестник РГМУ. – 2005. - №6(45). - С.64–68.

Список публикаций в других изданиях

12. **Тарасова М.В.**, Елистратова И.В., Иванченко О.Б., Морозов С.Г. Активность нейтрофилов на фоне контаминации кожи стафилококками при обострении атопического дерматита у взрослых людей // Материалы 3-й Международной конференции "Инфекции и противоинфекционный контроль в дерматологии". Москва, 19-20 сентября 2019 г. - С. 67-68.
13. **Тарасова М.В.**, Елистратова И.В., Морозов С.Г. Бактериальные антигены как активаторы нейтрофилов крови больных атопическим дерматитом // Материалы V Национального конгресса бактериологов. Москва, 16-17 сентября 2019 / Ассоциация

«Национальное научно-практическое общество бактериологов». – Москва, изд-во «Династия», С. 76-77.

14. Родина Ю.А., **Тарасова М.В.** Современные возможности при лечении тяжелых форм атопического дерматита и хронической экземы / XXXIII Научно-практическая конференция с международным участием «Рахмановские чтения: от дерматологии А.И. Поспелова до наших дней – 170 лет», Москва, 29 января 2016, С. 71 -73.

15. Родина Ю.А., **Тарасова М.В.**, Есембиева М.Л. Иммуотропная терапия атопического дерматита / IV Междисциплинарная научно-практическая конференция «Современные методы диагностики, лечения кожных болезней и инфекций, передаваемых половым путем», Казань, 24 марта 2011, С. 112-115.

16. Тарасова М.В., Волкова Е.Н., Родина Ю.А., Есимбиева М.Л. Оптимальная наружная терапия атопического дерматита у детей / XI Международный конгресс «Здоровье и образование в XXI веке» «Научные и прикладные аспекты концепции здоровья и здорового образа жизни», Москва, 8-12 декабря 2010, С. 308-309.

17. **Тарасова М.В.**, Волкова Е.Н., Марина Т.В., Гусева С.Д. Иммуотропная терапия атопического дерматита // Сборник материалов XVI Конгресса «Человек и лекарство», 5-10 апреля 2009 г., Москва, С. 271.

18. **Тарасова М.В.**, Волкова Е.Н., Марина Т.В., Сорокина Е.А., Платонов В.В. Наружная терапия эксудативной формы атопического дерматита у детей раннего возраста / Тезисы конференции «III Российская научно–практическая конференция Санкт-Петербургские Дерматологические чтения», С.-Петербург, 17-18 сентября 2009 г., С. 68.

19. **Тарасова М.В.**, Волкова Е.Н., Марина Т.В., Платонов В.В. Иммунокомплексная терапия атопического дерматита у детей / Тезисы конференции «Актуальные проблемы оказания специализированной медицинской помощи в условиях стационара и применение стационарозамещающих технологий», Москва, 4 декабря 2009, С. 199-200.

20. Никитина И.В., Сорокина Е.А., **Тарасова М.В.** Новые возможности в лечении хронических дерматозов // Русский медицинский журнал. – 2008. - Т.16. - №23. - С. 1547-1550.

21. **Тарасова М.В.**, Марина Т.В., Сорокина Е.А., Волкова Е.Н., Платонов В.В. Целесообразность применения топических комбинированных глюкокортикостероидов в комплексной терапии атопического дерматита // Научные труды IX международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке», Москва, 27-30 ноября 2008 г., С. 497.

22. Бутов Ю.С., Дейгин В.И., **Тарасова М.В.** Комплексная терапия больных атопическим дерматитом // Тезисы к материалам конференции «Вопросы дерматологии, косметологии, клинической микологии и ИППП», Российский государственный медицинский университет, Москва, 2005, С. 8–10.

23. **Тарасова М.В.**, Дейгин В.И. Комплексная терапия больных атопическим дерматитом // IX всероссийский съезд дерматовенерологов. Тезисы научных работ. Москва, 2005, Том 1, С. 38-39.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АД – атопический дерматит;
ИЛ – интерлейкин
ЛПС – липополисахариды
ПМЯЛ – полиморфноядерные лейкоциты
ФНО α – фактор некроза опухолей α
ЦИК – циркулирующих иммунных комплексов
ЛЭ – человеческая лейкоцитарная эластаза
FcEeRI – высокочувствительные IgE-связывающие рецепторы
FcEeRII – низкочувствительные IgE-связывающие рецепторы
fmlp – рецептор-зависимый стимул N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониальный стимулирующий фактор – молекула межклеточной адгезии 1
Ig – иммуноглобулин
ИНФ α – интерферон α
ИНФ γ – интерферон γ
iSc – индекс Scogad
ЛЕКТИ – лимфо-эпителиальный ингибитор
РМА – форболовый эфир
SKALP – форболмиристатацетат-антилейкопротеаза
SLPI /MPI – ингибитор секреторных лейкоцитарных эластаз
 α 1-ПИ – α 1 протеиназный ингибитор
TREM – рецептор (triggering receptor expressed on monocytes), который экспрессируется на нейтрофилах

Immune system mediators and neutrophil activity in atopic dermatitis

Atopic dermatitis is a chronic recurrent skin disease which has a broad impact on the quality of life of the patient. For the first time, it was shown that functional activity of neutrophils in patients with atopic dermatitis depends on the severity of the disease, the degree of its prevalence as well as from the bacterial and mycotic skin contaminations. We have also measured the level of generation of neutrophil superoxide anion in patients with atopic dermatitis under the action of receptor-dependent stimulus (fmlp) and in response to the direct activator of oxygen explosion, forbolic ether (PMA). A new method for determining the activity of destructive processes in patients with atopic dermatitis was developed by measuring the activity of leukocytic elastase and α 1-PI as well as their correlation to the severity of the process. A comprehensive study of the content of anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines in patients with atopic dermatitis during exacerbation and remission was performed.