

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ И ПАТОФИЗИОЛОГИИ**

На правах рукописи

ТАРАСОВА МАРГАРИТА ВАЛЕРЬЕВНА

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

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация

На соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители —
член-корреспондент РАН,
профессор, доктор медицинских наук
Морозов С.Г.

профессор, доктор медицинских наук
Волкова Е.Н.

Москва — 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	11
1.1. Эпидемиология, патогенетическая концепция атопического дерматита	11
1.2. Иммунные изменения при atopическом дерматите	13
1.3. Роль нейтрофилов и их сериновых протеаз в патогенезе атопического дерматита	19
Глава 2. Материалы и методы исследования	35
2.1. Клинические методы исследования	35
2.2. Дерматологические методы исследования	36
2.3. Определение содержания провоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных atopическим дерматитом	37
2.4. Определение активности лейкоцитарной эластазы	38
2.5. Определение активности α_1 протеиназного ингибитора	39
2.6. Выделение клеток крови	41
2.7. Разделение клеток крови на градиенте плотности Перколла	42
2.8. Оценка спонтанной и индуцированной хемилюминесценции	44
2.9. Количественное измерение кислородного взрыва нейтрофилами периферической крови	46
2.10. Определение фагоцитарной активности нейтрофилов методом проточной цитометрии	47
2.11. Изучение экспрессии рецептора TREM-1 в генерации супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови доноров и больных atopическим дерматитом при стимуляции бактериальным пептидом fmlp	49

2.12. Статистическая обработка результатов исследований	49
Глава 3. Клиническая характеристика больных	51
Глава 4. Изучение системы цитокинов у больных атопическим дерматитом	58
Глава 5. Исследование интенсивности деструктивных процессов и активности антидеструктивной системы у больных atopическим дерматитом	66
Глава 6. Исследование функциональной активности нейтрофилов	72
6.1. Хемилюминесценция клеток крови	72
6.2. Количественное измерение уровня генерации супероксидного аниона нейтрофилами при стимуляции fmlp и форболовым эфиром	79
6.3. Измерение фагоцитарной активности нейтрофилов методом проточной цитометрии с использованием штаммов дрожжей <i>Rhodotorula spp</i>	89
6.4 Экспрессия рецепторов нейтрофилов TREM-1 при атопическом дерматите	96
Глава 7. Заключение	99
Выводы	120
Практические рекомендации	122
Перечень сокращений и условных обозначений	123
Библиография	124

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Атопический дерматит (АД) хроническое аллергическое заболевание кожи с наследственной предрасположенностью к атопии, основным клиническим симптомом которого является зуд и с последовательной сменой обострения и ремиссий [1; 3].

АД – заболевание, которое распространено во всех странах, рост заболеваемости увеличивается с каждым годом, значительно преобладает в детском возрасте, но болеют все возрастные группы. По литературным данным распространение в Российской Федерации колеблется в пределах 13 на 1000 человек; чаще болеют женщины (65%), реже – мужчины (35%), у детей, частота встречаемости АД составляет 10-25% [45; 71; 115].

АД, как хроническое рецидивирующее заболевание, в основе патогенеза которого АД лежит атопия. Термин основан на генетической обусловленности к повышенному содержанию IgE [25]. Запускают атопическую реакцию аллергены окружающей среды и иммунные нарушения организма [28; 85].

Основа иммунологических нарушений при АД заключается в разнофазной активации Т-хелперов (Th_1 и Th_2). Во время обострения активируются Th_2 , во время ремиссии и на поздней стадии заболевания Th_1 [3; 119].

Антигены взаимодействуют с антителами IgE на поверхности тучных клеток и базофилов. Доказано наличие двух генов, которые имеют отношение атопии [32].

Патогенез АД основан не только на атопии, АД характеризуется системной иммуносупрессией и снижении клеточного иммунитета в самой коже [3; 14; 37; 111].

Еще предстоит выяснить является ли атопический иммунный ответ и воспаление ответом только на воздействие экзогенных аллергенов или

совместное взаимодействие с эндогенными аутоантигенами [78; 99; 116].

Высвобождающиеся медиаторы воспаления: цитокины, нейропептиды и гистамин поддерживают уже имеющееся аллергическое воспаление [38]. Роль цитокинов заключается в обеспечении согласованного действия иммунной системы, регулирующей направленность иммунного ответа у больных АД.

Известно, что центральную роль в модуляции иммунной реакции при АД играет ИНФ γ , который, как правило, подавляет продукцию IgE [85; 163]. Позитивный эффект ИНФ γ связывают с торможением синтеза IgE и подавлением избыточной активации Т-клеток и секреции ими ИЛ-5 и ИЛ-4. Повышенное количество ИЛ-4 обладает уникальной способностью селективно повышать синтез IgE [144]. Синтез IgE, вызванный ИЛ-4, усиливается ИЛ-6 [108].

ИЛ-12 повышает уровень ИНФ γ , но при АД количество ИЛ-12 снижается и соответственно на уровень ИНФ γ он существенно не влияет [86].

Переключение В-клеток на синтез IgE у больных АД определяется ИЛ-4 и ИЛ-13. Различия в действии на В-клетки ИЛ-13 и ИЛ-4 заключается в том, что ИЛ-4 не действует на клетки находящиеся в покое, а ИЛ-13 имеет более высокую аффинность к своим рецепторам на них и воздействует на В-клетки как в покое, так и при дифференцировке.

В патогенезе АД принимают участие цитокины с противоположным действием, продуцируемые антагонистическими популяциями Th₁ и Th₂ лимфоцитов [3; 14; 37; 111].

Дифференцировку Th₁ поддерживает ИЛ-12, секретируемый макрофагами и нейтрофилами на стадии антигеннезависимого воспаления, опосредованного системой врожденного иммунитета [45; 86]. Активатором Th₁ выступает ИНФ γ . Продуцируемые тучными клетками ИЛ-4 и ИЛ-13 способствуют генезу Th₂, которые способствуют образованию В-лимфоцитами специфических IgE [3]. Установлено, что у больных АД

снижено количество Th₁ и повышено количество Th₂ клеток [137]. Показано, что присутствие ИНФ γ , ИНФ α , 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 ИНФ γ приводят к дифференцировке Th₀ в Th₂ клетки, что и опосредует атопический тип иммунного ответа [34; 79; 116; 120]. Развитию Th₂ фенотипа также способствует ИЛ-1 [13; 26; 120]. Повышенную выработку IgE можно регулировать через трансформацию Th₂ в Th₁. Эта трансформация может быть достигнута введением ИНФ γ , ИЛ-12, либо нейтрализацией ИЛ-4, ИЛ-13 [2; 141].

Таким образом, в патогенез АД вовлечен целый ряд как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов. 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. В то же время нет единой точки зрения, касающейся количественного содержания цитокинов при различных клинических формах и стадиях данного заболевания. Имеющиеся в литературе данные, касающиеся содержания различных цитокинов, достаточно противоречивы [5].

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, в том числе при АД [126]. Повышение активности эластазы может быть вызвано снижением количества ее ингибиторов, в частности α 1-протеиназного ингибитора (α 1-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 [4].

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 [175]. 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 [81]. По другим данным у больных АД функциональная активность нейтрофилов в отношении ответа на рецептор – зависимые стимулы (fmlp, C5a, LTB₄, опсонизированный зимозан) была сопоставимой с данными здоровых людей [10; 129].

Есть связь изменения функциональной активности нейтрофилов при АД с наличием или отсутствием бактериальной инфекции [8]. Если у больных не обнаружено снижение фагоцитарной активности, они, как правило, не имели выраженной бактериальной контаминации. При наличии дефицита хемотаксиса и фагоцитоза у больных АД была выраженная бактериальная контаминация или поражения грибами или системная инфекция [10; 11; 129].

В настоящее время контаминация кожи человека условно патогенными дрожжами изучена недостаточно. Эта проблема в связи с АД начинала разрабатываться в конце прошлого века, когда было проведено сравнение контаминации кожи больных АД со здоровыми людьми [44].

Нейтрофилы играют значимую роль в клиренсе патогенных дрожжей. Нейтрофилы быстро мигрируют в очаг поражения грибковой инфекцией и поглощают патогены. В пораженном грибами организме человека антифунгальная активность нейтрофилов определяется многими факторами, в том числе, уровнем хемокинов, концентрацией цитокинов, расположением

инфильтрата грибов, числом фагоцитов, доступностью пораженного очага. У тех больных, у которых имеется нейтропения или снижение активности нейтрофилов, может развиваться генерализованная грибковая инфекция [47].

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.

Таким образом, на современном этапе существует необходимость дальнейшего изучения иммунопатогенеза АД. Это определило цели и задачи исследования.

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

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- 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 фторболмиристатацетатом (РМА-фторболовый 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

- 1) Впервые проведено комплексное изучение содержания противовоспалительных и провоспалительных цитокинов у пациентов АД при обострении заболевания и во время ремиссии.
- 2) Впервые изучены и определены критерии оценки активности сериновой протеазы нейтрофилов - эластазы в зависимости от тяжести течения АД.
- 3) Впервые изучено изменение активности $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора при АД, который демонстрирует состояние антипротеолитического потенциала.
- 4) Впервые определена зависимость генерации супероксидного аниона нейтрофилами больных АД от тяжести течения заболевания и степени распространённости процесса.
- 5) Впервые 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)
- 6) Впервые выявлены разные уровни активности нейтрофилов в зависимости от наличия или отсутствия у больных АД сопутствующей грибковой или бактериальной контаминации.

Практическая значимость

- 1) Предложен новый метод оценки воспалительных реакций у больных АД путем определения функциональной активности нейтрофилов.
- 2) Определены критерии функциональной активности нейтрофилов в

зависимости от наличия или отсутствия сопутствующей грибковой или бактериальной контаминации у больных АД.

- 3) Показан новый метод определения качества состояния деструктивных процессов у пациентов с АД определяя активность лейкоцитарной эластазы.
- 4) Измеряя активность $\alpha 1$ -ПИ определили критерии работы антипротеолитической (антидеструктивной) системы у больных АД.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликованы 32 работы, в том числе 12 в изданиях, рекомендованных ВАК.

Апробация работы.

Материалы диссертационного исследования были представлены 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.).

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, 7 глав, содержащих обзор литературы, изложение материалов и методов исследования, клиническую характеристику больных с атопическим дерматитом, 3 главы 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эпидемиология, патогенетическая концепция атопического дерматита

АД – это аллергическое заболевание кожи, возникающее в детском возрасте, проявляющееся сильным зудом, хроническим рецидивирующим течением, характерной возрастной локализацией при наличии наследственной предрасположенности [1; 3].

Проблема АД сохраняет актуальность: в последние годы отмечается тенденция к увеличению удельного веса АД в структуре аллергических заболеваний до 50-60%, причем эта цифра неуклонно растет [32]. АД встречается повсеместно в странах Европы, Азии, Северной Америки у лиц обоего пола и в разных возрастных группах [60]. По данным отдельных авторов заболеваемость АД в России варьирует от 6 до 20 на 1000 человек; чаще болеют женщины (до 65%), реже — мужчины (до 35%); заболеваемость у жителей мегаполисов выше, чем у жителей сельской местности; у детей, по данным разных авторов, частота встречаемости АД 10-25% [78; 125].

Среди экзогенных факторов, оказывающих провоцирующее влияние на возникновение и развитие кожного процесса у лиц с генетической предрасположенностью, наибольшее значение имеют пищевые продукты, ингаляционные аллергены, наружные раздражители физического характера, животного и растительного происхождения, стрессовые факторы, метеовоздействие, инсоляция [88].

Пищевые продукты у большинства больных АД и есть ведущий средовой фактор, который участвует в реализации наследственной предрасположенности и проявляется уже в раннем детстве [161]. Пищевые белки как растительного, так и животного происхождения чужеродны для иммунной системы человека. Поступая с пищей, они расщепляются в

пищеварительном тракте человека до полипептидов и аминокислот. Полипептиды частично сохраняют иммуногенность и способны стимулировать иммунную систему. Именно они и являются триггерами аллергических реакций в детском возрасте [18].

Участие генетических факторов в развитии аллергодерматозов подтверждается результатами клинико-генеологического обследования больных. В пользу наследственного характера заболевания свидетельствуют такие факты, как концентрация больных в семьях лиц, страдающих атопией, и значительно более высокая конкордантность монозиготных близнецов (75-80%) по сравнению с дизиготными (20-25%). Отягощенный семейный анамнез по атопии выявляется у 80% детей с АД [1]. Чаще прослеживается взаимосвязь с аллергическими заболеваниями по линии матери – до 60-70%, по линии отца – до 18-22%. Риск развития АД достигает 60-80%, если больны оба родителя, 40-50% - при наличии атопии у одного из родителей [28]. Мнения о типе наследования противоречивы. Высказывались точки зрения о доминантном, рецессивном или полигенном наследовании, однако большинство авторов придерживается мнения о доминантном типе наследования. Обнаружена ассоциация атопических заболеваний с определенными антигенами главного комплекса гистосовместимости (HLA) –A1, A3, A9, A24, B5, B7, B8, B9, B12, B13, B27, B40, D24, DR1, DR2, DR5 и DR7, а также с некоторыми другими маркерами: с антигенами А и В системы АВО, фенотипами JK (a-b+), Inv (1), ACP1-A и ACP1-B эритроцитарной кислой фосфатазы [32]. HLA антигены могут быть ассоциированы не с самим заболеванием, как таковым, а с его клинической формой, тяжестью или длительностью течения [32].

Таким образом, влияние средовых факторов риска при наличии генетически детерминированных факторов («атопии») и запускает механизм развития АД.

1.2. Иммунные изменения при атопическом дерматите

В последние годы наибольшее распространение получила иммунологическая концепция патогенеза АД, базирующаяся на способности организма к выработке повышенного количества IgE ответ на воздействие аллергенов [32]. Выявленные высокие уровни IgE у ряда больных АД подтверждают эту концепцию [24; 25]. В тоже время, исследования роли IgE при АД продолжаются, и повышение IgE не относят к основным признакам АД, так как у больных АД могут быть и нормальные концентрации IgE [154]. Было выявлено, что на поверхности клеток Лангерганса кожи имеются рецепторы к Fc-фрагменту молекулы IgE (FcR), что рассматривается как маркер АД [24].

Клетки Лангерганса - специализированные высокопотентные антиген-презентирующие дендритные клетки костномозгового происхождения. За счет своей формы (в виде продольно вытянутых дендритов) и миграционной способности клетки Лангерганса образуют в межклеточном пространстве равномерную сеть. Под влиянием антигенного стимула они могут покидать типичное базальное место расположения, перемещаться в дистально и проксимально расположенные слои тканей и способствовать развитию первичного и вторичного Т-клеточного ответ на антигены, гаптены и растворимые белки, включая микробные антигены. При этом на мембранах клеток Лангерганса выделены высокочувствительные (FcεRI) и низкочувствительные (FcεRII) IgE-связывающие рецепторы. При антигенном контакте идет определенный каскад событий внутри клеток Лангерганса. Существует предположение, что они преобразуют и изменяют поступающие вещества в гранулах Бирбекка, имеющих характерную форму теннисной ракетки, и уже в этом виде выделяют их на поверхность мембраны. После контакта с антигеном клетки Лангерганса подвергают его ферментативному расщеплению с предоставлением фрагментов антигена на свою внешнюю оболочку [17].

Образуемые комплексы IgE-рецептор-аллерген значительно облегчают взаимодействие с Т-лимфоцитами. При этом экспрессия высокочувствительных рецепторов FcεRI у лиц, предрасположенных к атопии, обеспечивает активную презентацию Т-лимфоцитам даже минимального количества антигена [25; 50; 135]. Наличие рецепторов к Fc-фрагменту IgE является строго специфичным для АД, при этом в биоптатах кожи больных бронхиальной астмой, а также пациентов, не страдающих аллергическими заболеваниями, они отсутствуют. С повышенным уровнем IgE связывают более раннее начало заболевания, высокую частоту бронхиальной астмы и других аллергических проявлений в отличие от лиц с нормальным содержанием IgE.

Определенная роль в патогенезе АД отводится изменениям в системе гуморального иммунитета – дисиммуноглобулинемии, выражающейся в повышении уровня IgG и снижении концентрации IgA и IgM в сыворотке крови.

Неадекватный иммунный ответ также связан с повышением уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) у больных АД [17; 25]. Антигены после их соединения с белками кожи образуют с сывороточными иммуноглобулинами иммунные комплексы. Это приводит к усилению иммунной напряженности. Высокое содержание в сыворотке крови ЦИК приводит к отложению иммунных комплексов в коже, нарушает механизмы гомеостаза, приводя к возникновению здесь клеточно-тканевых повреждений. Одним из биологических эффектов ЦИК является активация системы комплемента. Одновременно активация системы комплемента способствует растворению иммунных комплексов. Первичный или приобретенный дефицит комплемента приводит к персистенции в крови и отложению в тканях ЦИК, поддерживающих хроническое воспаление кожи.

Большое значение в реализации иммунного ответа кожи принадлежит также тучным клеткам, дендритным клеткам, базофилам, кератиноцитам. Нарушаются восприятие антигенной информации и представление ее

лимфоцитам, реализация цитотоксического надзора, оказание влияния на пролиферацию и дифференцировку Т-лимфоцитов [69]. В очагах поражения кожи у больных с АД количество тучных клеток существенно увеличено – соответственно повышено образование медиаторов воспаления, прежде всего гистамина. Повышенная концентрация гистамина выявляется и в видимо здоровой коже больных АД. Легкая высвобождаемость медиаторов из базофильных лейкоцитов и тучных клеток находится во взаимосвязи с изменениями в иммунной системе [17; 38]. С одной стороны, иммунное воспаление сопровождается выходом биологически активных веществ, обуславливая клинические проявления заболевания, а с другой – через H2 рецепторы вызывает угнетение Т-клеточного иммунитета [19]. Разрушение гистамина ослаблено из-за сниженного содержания у больных АД гистамин-связывающих антител. Воспалительная реакция поддерживается не только плохо разрушающимся гистамином, но и повышенным уровнем метаболитов арахидоновой кислоты (простагландина E2, лейкотриенов B4 и C4). Дегрануляция тучных клеток и соответственно выделение важных для аллергического воспаления веществ – серотонина, гистамина, стимулируется ИЛ-4, уровень которого повышен при АД, и нейропептидами, так как тучные клетки расположены вблизи окончаний чувствительных нервов в коже [38].

При этом прослеживается возможность психического влияния на манифестацию обострений АД. Зависимое от стресса обострение АД объясняют и влиянием усиленной секреции катехоламинов, и повышенной концентрацией в коже простагландина E1 [25; 88].

Особенностями состояния Т-клеточной системы иммунитета при АД являются разнонаправленные изменения соотношения показателей супрессорной и хелперной активностей Т-лимфоцитов. Сформирована характеристика 4 иммунологических типов АД. Для первого характерны повышение числа CD8⁺ лимфоцитов при нормальном уровне IgE; для второго – высокое содержание IgE при нормальном количестве CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов; для третьего – вариабельность концентраций IgE при высоком

содержании CD4⁺ лимфоцитов; для четвертого – значительные вариации IgE при снижении CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов [3; 25].

Роль цитокинов заключается в обеспечении согласованного действия иммунной системы, регулирующей направленность иммунного ответа у больных АД.

Важную роль при АД играет ИНФγ, который, как правило, подавляет продукцию IgE [85; 116; 178], регулирует экспрессию молекул основного комплекса гистосовместимости на клетках Лангерганса, кератиноцитов, эндотелиальных клетках, а также увеличивает экспрессию на них различных молекул адгезии.

Отдельными авторами установлено значительное снижение ИНФγ у больных АД [95]. Экспериментально показано, что введение человеческого ИНФγ больным с тяжелым течением АД приводило к разрешению клинических симптомов заболевания. Позитивный эффект препарата связывают с торможением синтеза IgE и подавлением избыточной активации Т-клеток и секреции ими ИЛ-5 и ИЛ-4.

Имеются публикации о том, что у пациентов с АД наблюдается повышение продукции ИЛ-4 мононуклеарными клетками периферической крови в ответ на *Staphylococcus aureus* и его эндотоксин. Повышенное количество ИЛ-4 обладает уникальной способностью селективно повышать синтез IgE [145]. Синтез IgE, вызванный ИЛ-4, усиливается ИЛ-6 [109]. Установлено, что у пациентов с АД наряду с высокими концентрациями ИЛ-4 наблюдаются низкие уровни ИНФγ в ответ на присутствие *Staphylococcus aureus*, который, персистируя в коже, рассматривается как потенциальный воспалительный аллергенный стимулятор, вызывающий Т-клеточную активацию с освобождением провоспалительных медиаторов [79; 180].

ИЛ-12 повышает уровень ИНФγ, но при АД количество ИЛ-12 снижается и соответственно на уровень ИНФγ он существенно не влияет [86].

Переключение В-клеток на синтез IgE определяется регуляцией ИЛ-4 и ИЛ-13. Различия в действии на В-клетки ИЛ-13 и ИЛ-4 заключается в том, что ИЛ-4 не действует на клетки находящиеся в покое, а ИЛ-13 имеет более высокий аффинитет связывания и воздействует на них как в покое, так и при дифференцировке. Имеются данные о повышенной продукции ИЛ-13 при АД [136; 172]. Усиливая синтез IgE, вызванный ИЛ-4, ИЛ-5, он индуцирует функциональные рецепторы ИЛ-2 на В-клетках. Являясь костимулятором синтеза IgE, ИЛ-2 способствует секреции В-клетками IgE. Отмечается повышение содержания ИЛ-5 в сыворотке крови больных АД [17; 159].

В патогенезе АД принимают участие цитокины с противоположным действием, продуцируемые антагонистическими популяциями Th₁ и Th₂ лимфоцитов [3; 14; 37; 111].

Дифференцировку Th₁ поддерживает ИЛ-12, секретируемый макрофагами и нейтрофилами на стадии антиген-независимого воспаления, опосредованного системой врожденного иммунитета [45; 86]. Кофактором развития Th₁ выступает ИНФγ, продуцируемый на этой стадии НК-клетками. Ингибирует активность Th₁ цитокин ИЛ-10 [37; 133]. Лимфоциты Th₁ – типа преимущественно продуцируют ИЛ-2, ИНФγ, ФНОα и ассоциированы с клеточным антителонезависимым иммунным ответом при взаимодействии с клетками партнерами – макрофагами [17; 165]. Th₁ усиливают воспалительный процесс за счет активации макрофагов, способствуют уничтожению внутриклеточных патогенов [165].

Продуцируемые тучными клетками ИЛ-4 и ИЛ-13 способствуют иммуногенезу Th₂. Th₂ высвобождают в частности, ИЛ-5, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-4, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-7 [111, 159, 166]. Функция Th₂ – поддержание гуморального иммунитета, эозинофильного иммунного воспаления при взаимодействии с клетками партнерами – В-лимфоцитами, эозинофилами, посредством антител с фагоцитами, тучными клетками. Th₂ способствуют образованию В-лимфоцитами специфических IgE [3]. Установлено, что у больных АД снижено количество Th₁ и повышено количество Th₂ клеток

[137]. Связывание IgE с тучными клетками и базофилами приводит к активации этих клеток и секреции преформированных медиаторов гистамина, серотонина, триптазы, простагландинов и других. Показано, что в процессе развития АД первоначально активируется субпопуляция Т-лимфоцитов хелперов Th₂, а начальная активация Th₂ затем сменяется активацией Th₁ с преимущественной выработкой ИНФγ и развитием кожных поражений [52; 116]. ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-13, ИНФγ регулируют дифференцировку Th₀ клеток в Th₁ и Th₂ тип лимфоцитов [2, 34]. Фенотип будущей клеточной популяции зависит от условий, в которых происходит поляризация иммунного ответа. Показано, что присутствие ИНФγ, ИНФα, ИЛ-12 или анти-ИЛ-4 АТ 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 [34; 78]. Развитию Th₂ типа клеток могут также способствовать ИЛ-10, ИЛ-1 и прогестерон [13; 26; 120]. Повышенную выработку IgE можно регулировать через трансформацию Th₂ в Th₁. Эта трансформация может быть достигнута введением ИНФγ, ИЛ-12, либо нейтрализацией ИЛ-4, ИЛ-13 [2; 141].

Таким образом, наличие рецепторов Fc-фрагментов к IgE на клетках Лангерганса облегчает взаимодействие комплексов IgE – рецептор-аллерген с Т-лимфоцитами. Кроме того, иммунная напряженность у больных АД повышена в связи с повышением уровня ЦИК. Значительное количество тучных клеток в патологических очагах кожи больных АД определяют повышенное содержание гистамина. Установлено, что при АД снижено количество Th₁ и повышено количество Th₂ клеток, которые пролиферируют в присутствии ИЛ-4, ИЛ-5 и в отсутствии ИНФγ приводят к гиперпродукции IgE, что и опосредует атопический тип иммунного ответа [56; 120]. Изученные иммунные изменения – это огромный вклад в изучение патогенеза АД. Однако ряд вопросов остаются неясными и требуют дальнейшего изучения.

1.3. Роль нейтрофилов и их сериновых протеаз в патогенезе атопического дерматита.

Название «нейтрофилы» гранулярные клетки крови получили благодаря нейтральному бледно-розовому цвету при окраске гематоксилин–эозином (при этом эозинофилы окрашены в яркий красный цвет, а базофилы – в темный синий цвет).

Нейтрофилы имеют костномозговое происхождение. Иммигрировавшие из костного мозга вновь образованные нейтрофилы направляются в ткани и в очаги инфекции. У человека нейтрофилы являются первыми клетками, которые проникают в очаг воспаления после появления соответствующего стимула [170]. Если они не получили дополнительного стимула, то живут в течение 12–36 ч. При стимуляции продолжительность жизни нейтрофилов в тканях составляет 5–6 дней.

По мере созревания нейтрофилов их ядра теряют ядрышки, становятся сегментированными и содержат конденсированные массы хроматина, окруженные ядерной мембраной. Когда хотя бы одна область в ядре превращается в тонкий филамент, клетки считаются достигшими финальной стадии созревания и могут быть названы нейтрофилами или сегментированными полиморфноядерными клетками [59]. Во время созревания в нейтрофилах формируются секреторные гранулы и везикулы, содержащие белки, участвующие в антимикробной защите.

Гранулы нейтрофилов разделяются на три группы – первичные (азурофильные), вторичные (специфические) и третичные (желатиназные). Маркер азурофильных гранул нейтрофилов – CD63, маркер вторичных специфических гранул – CD66b. Фактор транскрипции CCAAT/enhancerbindingprotein-epsilon (C/EBPε) специфически регулирует гранулы нейтрофилов [169]. Дефект в мобилизации гранул нейтрофилов приводит к недостаточной активности в отношении киллинга бактерий, особенно грамотрицательных (*E.coli*), что зависит от снижения NADP-

оксидазной активности [181].

Сериновые протеазы – эластаза, катепсин G, протеиназа 3 (PR3) и нейтрофильная сериновая протеаза-4 (NSP4), накапливаются в азурофильных гранулах и активируются дипептидил-пептидазой-1 при созревании нейтрофилов. Все протеазы одновременно высвобождаются из гранул при активации нейтрофилов и регулируют воспаление и иммунный ответ в месте воспаления.

Эластаза – это фермент в группе сериновых протеаз, обладающий широкой субстратной специфичностью [4]. Как правило, эластаза разрушает связи с карбоксильной стороны аланина и валина при более выраженной специфичности к первому. Устройство активного центра характерно для сериновых протеаз и включает в себя остатки гистидина, аспартата и серина. Эластаза обладает выраженным антибактериальным действием. Фермент способен разрушать эластин, коллаген 3 и 4 типов, а также пептидогликаны и другие белки, являющиеся компонентами клеток бактерий, ядов насекомых и т.д. Однако, очевидно, что эластаза способна также разрушать те же самые компоненты, входящие в состав кожи человека. В работах отдельных авторов, например, показано, что эластаза обладает активностью по отношению к человеческому кератину [4; 15; 158]. В процессе фагоцитоза чужеродных веществ эластаза также частично секретируется в окружающее пространство. При этом как в плазме, так и тканях присутствуют белки-ингибиторы эластазной активности. Однако эластаза, выделяемая полиморфноядерными лейкоцитами, обнаруживается в очагах воспаления даже при наличии ингибиторов в плазме и ткани. Так, активная эластаза определяется на поверхности кожи при хронически протекающих дерматозах (АД, псориазе). При этом её количество коррелирует с активностью воспалительного процесса, уменьшаясь при соответствующем лечении [4; 126; 128]. В последнее время всё больше внимания уделяется роли лейкоцитарных сериновых протеаз в целом и эластазы в частности при различных заболеваниях кожи, в том числе при АД [4; 126].

Важной представляется роль эластазы как регулятора воспаления, причем в разных ситуациях она может выступать и как провоспалительный, и как противовоспалительный агент. Известна литическая активность эластазы в отношении многих растворимых белков, в том числе цитокинов воспаления ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-6, ФНО α [4; 73]. Описана её способность *invitro* блокировать 1-й и 3-й рецепторы комплемента, что снижает миграцию Т-лимфоцитов и нейтрофилов в очаг воспаления, подавляет их адгезивные свойства. Кроме того, доказано, что эластаза расщепляет рецепторы липополисахаридов (ЛПС) CD14, что приводит к уменьшению экспрессии ИЛ-8 и ФНО α в ответ на стимуляцию ЛПС, являющимся главным компонентом бактериальной стенки. Таким образом, эластаза снижает воспалительный ответ на внедрение микроорганизмов. Похожее действие описано в отношении фосфатидилсериновых рецепторов макрофагов, ответственных за удаление погибших в зоне воспаления клеток путем запуска фагоцитарных механизмов. Таким образом, эластаза может выступать в качестве фактора торможения фагоцитоза. Блокирование нейтрофильной эластазой рецептора комплемента CR3 имеет еще одно противовоспалительное следствие - нарушение связывания с ним таких лигандов, как фибриноген и молекула межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) [4; 164]. Выступая в качестве их конкурента, эластаза препятствует адгезии нейтрофилов к поверхности эндотелия и миграции в ткани [4].

Противоположным описанным выше противовоспалительным эффектом эластазы является ее способность усиливать воспалительные реакции. Описано индуцирующее влияние эластазы на продукцию ИЛ-6, ИЛ-8, колониестимулирующего фактора. Взаимодействуя с α 1-ПИ, эластаза фрагментирует α 1-ПИ на хемоаттрактанты, увеличивающие приток нейтрофилов к месту реакции [4; 164]. Сериновые протеазы, прежде всего эластаза, вносят свой вклад и в деградацию сурфактантного протеина-А-кофактора местной противовоспалительной и антимикробной защиты [4; 73].

Выделение эластазы из нейтрофилов в экстрацеллюлярное

пространство происходит под влиянием различных субстанций: цитокинов (ФНО α , ИЛ-8), ЛПС, фрагментов бактериальной стенки [4; 39]. Инактивация эластазы осуществляется преимущественно α 1-антитрипсином (он же α 1-ПИ) и частично α 2-макроглобулином, а также менее изученными секреторным лейкоцитарным протеазным ингибитором, элафином и эглином С, относящимися к семейству серпинов (от «serine protease inhibitor») [4; 55].

Наиболее изученные ингибиторы эластазы: ингибитор секреторных лейкоцитарных эластаз (SLPI/MPI), антилейкопротеаза (SKALP), бикунин (Bikunin), лимфо-эпителиальный ингибитор (LEKTI). Как правило, они обладают ингибиторной активностью не только к эластазе, но и к протеиназе 3, трипсину, катепсину G и т.п. Снижение содержания данных ингибиторов при АД и псориазе клинически доказано [4; 93; 127; 142].

В эпидермальных кератиноцитах цитокины Th1 и ФНО α индуцируют экспрессию ингибитора сериновой протеазы LEKTI, и это может привести к подавлению увеличения активности сериновой протеазы при воспалении [4; 156].

Несмотря на значительные антипротеазные резервы, имеющиеся в любом организме, существуют механизмы, помогающие нейтрофилам реализовать свой деструктивный потенциал. Во-первых, нейтрофилы способны создавать вокруг себя так называемое «рабочее защищенное пространство», недоступное для ингибиторов. Во-вторых, нейтрофилы выделяют оксиданты, окисляющие активный центр α 1-ПИ, делая его функционально неактивным [4; 168]. В-третьих, связавшись с эластином экстрацеллюлярного матрикса, эластаза становится неуязвимой для серпинов [4].

Как уже упоминалось, активность эластазы регулируется с помощью α 1-ПИ. Чрезмерное высвобождение эластазы, однако, может превысить ингибирующие возможности α 1-ПИ. Таким образом, активность эластазы, вместе с одновременно образующимися оксидантами (O_2 -радикалы, H_2O_2 , O -радикалы), может быть причиной локального повреждения ткани. α 1-ПИ

формирует комплексы с эластазой, ингибируя её активность. Увеличение концентрации протеаз в целом и эластазы в частности по сравнению с ингибиторами приводит не только к непосредственному разрушению тканей, но и целому ряду опосредованных эффектов. В ряде работ продемонстрировано, что соединения, полученные из выделений тараканов и клещей домашней пыли – самый распространенный аллерген, способный вызывать у генетически предрасположенных людей симптомы от АД до бронхиальной астмы, резко снижают скорость восстановления барьерной функции эпидермиса [4; 70; 153]. Известно, что эта функция, являющаяся ключевой в поддержании движения через кожу воды и электролитов, нарушена у больных АД [4; 110]. При этом нарушения распространяются как на пораженные участки кожи, так и на участки без видимых проявлений АД [4; 69]. Исследования проводились как на мышах, так и на людях. Показано, что воздействие аллергенов приводит к активации протеаза-зависимого рецептора PAR-2, что, в свою очередь, вызывает значительное снижение скорости восстановления барьерной функции эпидермиса. Добавление ингибиторов протеаз или антагонистов PAR-2 приводило к нормализации данного параметра у пациентов [4].

Эластаза нейтрофилов имеет широкий спектр функций, в частности, катализирует окисление метионина в субстратах, что требуется для проведения сигналов в клетке [107]. Мутации в гене, кодирующем эластазу нейтрофилов, обуславливают развитие нейтропении [108]. ИЛ-8 активирует нейтрофилы через G-протеин сопряженный рецептор CXCR1. Эластаза расщепляет этот рецептор, что может ослаблять сигналы и антибактериальную защиту [72]. В нейтрофилах человека показана ко-локализация α - и γ -секретаз, рецепторов PAR-2 и CXCR1, которые физически взаимодействуют и вовлечены в регуляторную сеть. Эластаза нейтрофилов регулирует активность этой сигнальной сети [46].

В работах ряда авторов показано увеличение активности эластазы в острой фазе АД [4, 99].

Какую же именно роль играет эластаза в развитии проявлений АД? С одной стороны, активация может быть вызвана уменьшением количества ее ингибиторов в тканях. С другой стороны, начав деструктивную деятельность в тканях, она воздействует на элементы защитной системы организма (в первую очередь, PAR), вызывая не только усиление иммунной реакции, но и замедляя процесс восстановления тканей. Это определяет актуальность исследования содержания эластазы у больных АД [4].

Протеиназа-3 (PR3) связана с мембраной на поверхности нейтрофилов, при связывании с лигандами запускается сигнальный путь, включающий ROS, что приводит к секреции гранулярных протеиназ в экстраклеточный матрикс (ECM) [103]. PR3 ассоциирована с α -дефенсинами и их олигомерами, которые контролируют активность гранул в нейтрофилах человека [97]. При дифференцировке клеток в костном мозге некоторая часть PR3 не поступает в гранулы промиелоцитов и связывается с плазматической мембраной. Это показано для зрелых нейтрофилов. Мембранно-ассоциированная PR3 представлена в виде активного фермента, а также в виде неактивного профермента [91].

Нейтрофильная сериновая протеаза-4 (NSP4) имеет 39% гомологии с эластазой нейтрофилов и PR3. Содержание NSP4 в 20 раз меньше по сравнению с катепсином G [139]. Наибольший уровень мРНК NSP4 обнаружен в миелобластах и промиелоцитах. В нейтрофилах NSP4 полностью процессирована и содержится в азурофильных гранулах в активированном состоянии, готовом к немедленному действию. Катепсин G является активатором NSP4 [140]. NSP4 обладает трипсин-подобной активностью в отношении последовательностей субстратов после аргинина, однако, в отношении последовательностей в активном сайте белков NSP4 обладает эластазоподобной активностью [115].

Миелопероксидаза (МПО) относится к суперсемейству геммпероксидаз и циклоксигеназ. МПО экспрессирована в циркулирующих нейтрофилах, моноцитах и тканевых макрофагах, в том числе, микроглии.

МПО играет роль в антимикробной и противовирусной защите. МПО накапливается в первичных гранулах нейтрофилов. В ранних предшественниках нейтрофилов МПО синтезируется в ограниченных количествах, но увеличивается по мере созревания нейтрофилов. Промиелопероксидаза (90 кДа) – предшественник МПО, синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме. Большая часть профермента протеолитически расщепляется проконвертазой с образованием активного фермента МПО, однако, часть профермента постоянно секретируется из клетки в ЕСМ костного мозга, при этом она ограничена в возможности генерировать гипохлорную кислоту [124].

При фагоцитозе азурофильные гранулы нейтрофилов высвобождают сериновые протеазы вместе с МПО в фагосомы. Кроме того, МПО секретируется в ЕСМ, что вызывает повреждение тканей. МПО также является вторичным мессенджером сигнальных путей провоспалительных факторов [106]. Классическое представление о функциональной активности МПО связано с фагоцитозом и кислород–зависимым киллингом бактерий в фагосомах нейтрофилов. МПО также работает как эффектор в природном иммунитете. Однако существует множество сайтов действия МПО вне клеток, в том числе в составе NETs [143].

Микробоцидная активность МПО определяется её способностью катализировать окисление ионов Cl^- , Br^- , I^- и SCN^- перекисью водорода (H_2O_2), что приводит к синтезу соответствующих гипогаловых кислот. При распознавании инфекционного агента нейтрофилы запускают программу киллинга, которая включает фагоцитоз частиц и их дальнейшее переваривание, выброс реактивных метаболитов кислорода за счёт активации NADPH оксидазы. Эффективный киллинг бактерий фагоцитированных бактерий в нейтрофилах человека, главным образом, зависит от активности гипохлорной кислоты (HOCl) – одного из компонентов фагосом нейтрофилов. NADPH оксидаза продуцирует H_2O_2 , затем МПО выходит из азурофильных гранул и катализирует H_2O_2 – зависимое окисление иона хлора

в НОСІ. Транспорт иона хлора из цитоплазмы в фагосомы осуществляется через хлоридные каналы, включающие ц-АМФ–активированные хлоридные каналы CFTR. Из всех LAMP-1(lysosomal associated membrane protein 1)–положительных фагосом, 95–99% также экспрессируют CFTR [182].

GTPаза Ral регулирует активацию и дегрануляцию нейтрофилов. Ral ассоциирована с плазматической мембраной в покоящихся нейтрофилах и перемещается во вторичные гранулы после стимуляции хемоаттрактантами по эндоцитозным путям. Ral контролирует секрецию белков из вторичных гранул при ответе нейтрофилов на хемоаттрактанты [61].

NGAL – липокалин, ассоциированный с желатинозными гранулами нейтрофилов, его концентрация в плазме крови положительно ассоциирована с другими показателями воспаления (СРБ, повышенное содержание лейкоцитов и повышенный процент нейтрофилов) [114].

Ольфактомедин-4 (OLFM4) – это продукт гена, активирующегося в клетках под действием G-CSF, который ко-локализован с NGAL. При стимуляции форболовым эфиром (PMA) оба белка высвобождаются вместе [41]. Все предшественники нейтрофилов содержат OLFM4, но он экспрессируется только на 20–25% периферических нейтрофилов, что указывает на наличие гетерогенных популяций нейтрофилов [68].

Металлопротеиназа ADAM9 накапливается в желатинозных и специфических гранулах, а также в секреторных везикулах нейтрофилов человека. При активации нейтрофилов через 15 мин ADAM9 появляется на поверхности нейтрофилов. Несмотря на небольшой уровень секреции, ADAM9 расщепляет многие белки ECM, включая фибронектин, энтактин, ламинин, нерастворимый эластин, то есть действует как MMP-9, кроме коллагена I, III, IV [146].

В генерации супероксидного аниона принимает участие NADPH оксидаза (EC 1.6.99.6), состоящая из пяти компонентов – двух мембранно-связанных белков (gp91^{phox} и p22^{phox}, формирующих оксидазу флавоцитохром b558), трех цитозольных субъединиц (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, которые

перемещаются к мембране при активации), а также двух малых GTPаз – Rap1 и Rac, участвующих в регуляции NADPH оксидазного комплекса. Флавоцитохром b – это окислительно-восстановительный центр фермента, который активируется при связывании субъединиц $p47^{phox}$ и $p67^{phox}$, что вместе даёт структуру, необходимую для образования супероксида. GTP-связанная форма Rac непосредственно взаимодействует с субъединицей $p67^{phox}$ и имеет ещё, как минимум, один сайт связывания на NADPH оксидазе. Активация нейтрофилов фторболовыми эфирами или fmlp стимулирует связывание белков Rac и GTPаз. У человека на нейтрофилах преимущественно экспрессируется киназа Rac2, которая в сигнальной цепи следует после PI3K. Для сигналов от опсонизированного зимозана на NADPH оксидазу не требуется участия Rac2, тогда как fmlp или комплекс IgG с антигеном требуют участия Rac2 для осуществления кислородного взрыва. При активации через fmlp сигнальный путь включает $p42/p44$ и MAPK киназу $p38$ [100].

NADPH оксидаза катализирует перенос электронов через мембраны и формирование супероксидного радикала. Активность фермента требует поддержания баланса pH. В нейтрофилах человека pH вакуолей возрастает до 9, что оптимально для действия нейтральных протеаз – эластазы и катепсина G, а pH цитозоля остается слабо закисленным [112].

Активность NADPH оксидазы нейтрофилов регулирует шаперон PDI (протеиндисульфидизомераза). Окисленный PDI повышает активность, а редуцированный PDI - снижает активность NADPH оксидазного комплекса. PDI ассоциирован с мембранными субъединицами комплекса и с $p47^{phox}$ в цитозольной фракции. При стимуляции PMA, PDI мобилизуется из азурофильных гранул в цитозоль. В клетках есть предшествующая ассоциация редуцированного PDI с субъединицей $p47^{phox}$ в цитозоле [74].

Белок теплового шока HSP90 необходим для продукции супероксидного аниона, но не перекиси водорода. HSP90 регулирует активность NADPH оксидазы-5 за счёт связывания с С-концевым доменом и

обеспечивает стабильность фермента [62]. Действие HSP90 противоположно эффектам HSP70 и CHIP, которые способствуют убиквитинированию и деградации NADPH оксидазы, снижая, таким образом, продукцию реактивных метаболитов кислорода. Ингибирование HSP90 повышает экспрессию HSP70, связывающего NADPH оксидазы 2 и 5, что способствует их деградации [63].

В покоящихся фагоцитах NADPH оксидазный комплекс находится в виде отдельных субъединиц. При активации нейтрофилов (связыванием Fc рецептора, рецептора комплемента, рецепторов хемокинов или прямым воздействием на сигнальный каскад) начинается индуцибельная сборка NADPH оксидазы и перенос электронов, что, в конечном счёте, приводит к редукции одного электрона на молекулярном кислороде и образованию супероксидного радикала. Опсонизированный зимозан взаимодействует с $\beta 2$ интегрином CR3 рецептора. PMA вызывает фосфорилирование RRK1/2 и MAPK p38 в течение 2 минут, и далее происходит увеличение активности на протяжении 10 мин. Fmlp вызывает фосфорилирование ERK1/2 и p38 с пиком на 2-й минуте и далее в течение 5 минут происходит снижение активации. При рецепторном взаимодействии нейтрофилов с эритроцитами барана, покрытыми IgG, фосфорилирование p38 начинает определяться через 5 мин и продолжается в течение 60 мин. При этом фосфорилирование ERK1/2 не регистрируется. Для агонист-индуцированного фосфорилирования MAPK киназы временные периоды – 2 минуты для fMLP, 10 минут – для PMA, 3- минут – для опсонизированного зимозана. Как fmlp, так и PMA функционально сопряжены с активностью NADPH оксидазы [100].

PMA и fmlp вызывают окислительный взрыв в клетках HL-60, что требует наличия активного HSP90 [Vrba J.&Modriansky M., 2004]. Fmlp связывается с рецептором FPR на клетках и работает как хемоаттрактант для нейтрофилов. Адренэргические агонисты (изопротерено, сальбутамол, прокатерол, эпинефрин) ингибируют генерацию супероксидного аниона (от

70 до 40% объема, стимулированного fmlp или опсонизированным зимозаном), они ослабляют передачу сигнала от рецептора fmlp на уровне РКС или фосфолипазы A2 [160].

При отсутствии инфекционного агента или воспаления нейтрофилы погибают за счёт спонтанного апоптоза. Апоптоз нейтрофилов необходим для завершения программы воспаления, так как долгое пребывание нейтрофилов в тканях не только поддерживает воспаление, но и создает морфологические предпосылки для клинического проявления заболевания. Удаление нейтрофилов из тканей критично для завершения острого воспаления, чтобы предотвратить неконтролируемое высвобождение провоспалительных цитокинов.

В норме нейтрофилы первыми проникают в ткани и убивают бактерии, пока не приходят макрофаги. Нейтрофилы должны погибнуть и быть поглощенными макрофагами, что является терминальной фазой развития воспаления и предотвращает дальнейшее поступление активных ферментов из нейтрофилов. Поглощение апоптотных нейтрофилов ингибирует продукцию провоспалительных медиаторов макрофагами.

Мономерные IgE способствуют замедлению спонтанного апоптоза нейтрофилов у больных атопией.

В патогенезе АД нейтрофилы отвечают повышенной генерацией метаболитов в ответ на рецептор – специфические стимулы, цитокины ИЛ-3, ИЛ-8, которые поддерживают острое и хроническое воспаление у больных АД. Лейкотриены экспрессируются в коже при воспалительных заболеваниях, в том числе, при АД. Лейкотриен B₄ работает как хемоаттрактант и привлекает в кожу нейтрофилы и Th2-лимфоциты [147]. У больных АД повышена экспрессия генов, кодирующих хемоаттрактанты для нейтрофилов [66]. У больных АД происходит спонтанная генерация лейкотриенов нейтрофилами в три раза выше по сравнению со здоровыми лицами. Кроме того, повышается индуцированная секреция LTB₄ и LTC₄ из нейтрофилов атопиков под воздействием компонента комплемента C5a, а

также ИЛ-3 и ИЛ-8 [132].

При АД нарушение хемотаксиса нейтрофилов обнаружено у 16,6% больных, изменение продукции супероксида – у 6%, нарушение бактерицидной активности – у 24,5% больных. Нарушения хемотаксиса коррелировали с инфекцией верхних дыхательных путей и стоматитом. Нарушение продукции супероксида коррелировало с наличием абсцессов и инфекцией в центральной нервной системе [175].

По некоторым данным у больных АД снижена фагоцитарная активность в отношении *Klebsiellapneumoniae*. У больных АД средней степени тяжести и тяжелого течения показано существенное снижение фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови, а также ослабление хемотаксической активности в ответ на зимозан [81].

Из 19 детей в возрасте от 2 до 12 лет, больных АД, у 36% были нарушения фагоцитоза, у 16% – нарушения хемотаксиса мононуклеаров, у 5% – одновременно дефицит хемотаксиса нейтрофилов и фагоцитоза, у 5% – дефицит хемотаксиса мононуклеаров, нарушения фагоцитоза нейтрофилов и их хемотаксиса. В 26% случаев не отмечено никаких нарушений фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов [10; 81].

По другим данным, у больных АД функциональная активность нейтрофилов в отношении ответа на рецептор–зависимые стимулы (fmlp, C5a, LTB₄, опсонизированный зимозан) была сопоставимой с данными здоровых людей. У больных АД с высоким уровнем контаминации бактериальной инфекцией хемотаксис нейтрофилов и моноцитов был снижен в течение трех дней от начала заболевания. В начале заболевания показано снижение генерации супероксидного аниона нейтрофилами. Авторы связывают изменение функциональной активности нейтрофилов при АД с наличием или отсутствием бактериальной инфекции. Если у больных не обнаружено снижения фагоцитарной активности, они, как правило, не имели выраженной бактериальной контаминации. При наличии дефицита хемотаксиса и фагоцитоза у больных были повторы выраженной

бактериальной контаминации и поражения грибами или системная инфекция [10; 129].

На поверхности плазматической мембраны нейтрофилов описан целый ряд рецепторов, распознающих патогены, в том числе G-протеин–сопряженные рецепторы хемокинов и хемоаттрактантов, Fc-рецепторы, рецепторы адгезии (селектины, лиганды селектинов, интегрины), рецепторы цитокинов, рецепторы, сопряженные с природным иммунитетом (TLR, лектины С-типа). Разнообразие этих рецепторов позволяет инициировать различные сигнальные пути в клетке, включающие активацию G-протеинов, кальциевые сигналы, протеинкиназы, липидные киназы, адаптерные белки, белки цитоскелета и т.д. [29; 80; 84].

В настоящее время интерес ученых вызывают рецепторы TREM (triggeringreceptorexpressedonmonocytes), которые экспрессируются на нейтрофилах и моноцитах периферической крови [48]. TREM-1 – это гликопротеины суперсемейства иммуноглобулинов (Ig), стимулируют секрецию провоспалительных цитокинов, амплифицируют воспалительные сигналы и играют роль в системных инфекциях [36]. У человека известны две изоформы TREM-1 – это мембранный рецептор, ассоциированный с адаптером DAP12, а также растворимый рецептор sTREM-1, экспрессия которого повышается при инфекции; sTREM-1 работает как контррегуляторная молекула, он ослабляет активность воспалительного процесса и повышает выживаемость организма [29; 57].

В нейтрофилах человека также идентифицирован сплайсинговый вариант изоформы TREM-1 (TREM-1sv) массой 15-kDa, который обнаружен в первичных азурофильных гранулах и во вторичных специфических гранулах. При распознавании нейтрофилами бактериального ЛПС или бактерий *Pseudomonas aeruginosa* происходит дегрануляция и высвобождение TREM-1sv. Экзогенный TREM-1sv ингибирует TREM-1–зависимую продукцию провоспалительных цитокинов [29; 48].

При распознавании TREM-1 и активации нейтрофилов происходит кислородный взрыв, дегрануляция, секреция цитокинов. TREM-1 амплифицирует воспаление за счет активации NLRP3 инфламмасом (участвуют в развитии острого воспаления) [118]. Мембранный рецептор TREM-1 участвует в трансэпителиальной миграции нейтрофилов в зону воспаления, при этом он работает синергично с рецепторами TLR и их сигнальными путями [101; 177]. TREM-1 регулирует хемотаксис нейтрофилов путем стимуляции продукции супероксидного аниона под влиянием NADPH оксидазы. У дефицитных по TREM-1 нейтрофилов есть дефект миграции в ответ на зимозан или бактериальный пептид fmlp, а также снижение активации протеинкиназы (PK)B/Akt (то есть нарушения в сигнальном пути рецептора TREM-1) по сравнению с нормальными нейтрофилами [29, 49].

При активации рецептора TREM-1 на нейтрофилах сначала происходит быстрая реорганизация плазматической мембраны вокруг TREM-1, его кластеризация, затем эктодомен рецептора TREM-1 гомоолигомеризуется. Степень агрегации рецептора TREM-1 коррелирует с повышением уровня внутриклеточного кальция, высвобождением ROS и продукцией цитокинов. Так как отсутствует собственный сигнальный мотив у рецептора TREM-1, он постоянно ассоциирован с адаптерным белком DAP12 для проведения внутриклеточных сигналов. DAP12 стабилизирует TREM-1 на поверхности мембраны в мультимеризованном состоянии, инактивация DAP12 ингибирует активацию TREM-1 [58]. После связывания рецептора TREM-1 тирозины DAP12 и его ингибиторный ITAM мотив фосфорилируются, что необходимо для продукции хемокинов и цитокинов нейтрофилами [64]. Далее активируется тирозинкиназа Syk; в сигнальном пути также участвуют фосфоинозитол-3-киназа (PI3K), PKB/AKT, ERK, MAPK [43]. TREM-1 также может перекрестно связывать сигнальные пути рецепторов TLRs и NLRs (оба относятся к PRRs – pattern recognition receptors) [29, 43].

По данным Mrowietz U.У. с соавторами, у больных АД ответ нейтрофилов на рецепторзависимые стимуляторы был нормальным, как при наличии бактериальной инфекции, так и без неё [129].

Число нейтрофилов в коже больных АД не меньше, чем у больных псориазом [66]. Сравнительный транскриптомный анализ АД и псориаза выявил общие моменты нейтрофильного воспаления, включая экспрессию генов. Однако по другим данным, при АД ослаблен приток нейтрофилов в ткани [73]. По некоторым данным нейтрофилы признаны ключевыми инициаторами зуда у больных АД и истощение нейтрофилов значительно ослабляло зуд [171].

У больных экземой уровень сывороточного IgE и эозинофилов достоверно выше, чем в контроле. Уровень IgE, IgA, IgG, нейтрофилов, эозинофилов и лимфоцитов коррелирует с тяжестью заболевания по шкале SCORAD [92].

Одним из способов подавления функции нейтрофилов бактериями является продукция скавенджеров, захватывающих продуцируемые нейтрофилами реактивные метаболиты кислорода. Микробы могут не столько стимулировать нейтрофилы, сколько примировать их к продукции супероксида.

Одним из интересных феноменов является фактическая десенсибилизация, обусловленная связыванием G-протеин-сопряженных рецепторов хемотаксическими пептидами, привлекающими нейтрофилы в очаг воспаления, так как эти рецепторы становятся недоступными для других лигандов, в частности, для fmlp. Это показано при стимуляции fmlp нейтрофилами с целью генерации супероксидного аниона [94]. Определенный супрессивный эффект оказывает гистамин, который ингибирует дегрануляцию нейтрофилов под действием fmlp [76].

На функциональную активность нейтрофилов оказывает влияние нервная система. Нейропептиды – субстанция Р и соматостатин, высвобождаемые периферическими сенсорными нейронами, оказывают

непосредственное действие на клетки. Субстанция Р работает как хемоаттрактант, сравнимый по эффективности с fmlp, она также стимулирует GTPазную активность в плазматической мембране нейтрофилов. Соматостатин выступает в роли селективного антагониста субстанции Р, он ингибирует хемотаксис нейтрофилов и их GTPазную активность, индуцированную субстанцией Р [102].

Психологический стресс вызывает нарушения барьерной функции кожи, в частности, за счет повышения уровня эндогенных глюкокортикоидов. Снижается пролиферация эпидермальных клеток, нарушается процесс их дифференцировки, снижается плотность и размер корнеодесмосом, что сопряжено с деградацией их белков (десмоглеин 1). Снижается продукция и секреция ламеллярных телец, что сопряжено с нарушением синтеза эпидермальных комплексных церамидов и свободных жирных кислот [65]. Острый ментальный стресс обуславливает снижение продукции супероксидного аниона нейтрофилами [98].

Таким образом, нет единой точки зрения, касающейся функциональной активности нейтрофилов при АД, в частности выраженности генерации супероксидного аниона очищенной популяцией нейтрофилов у больных АД. Недостаточно данных по уровню активности нейтрофилов (то есть активность кислородного взрыва и фагоцитоза) в зависимости от наличия или отсутствия сопутствующей грибковой или бактериальной контаминации. Все это свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения роли нейтрофилов в развитии и хроническом течении АД.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Клинические методы исследования

Обследование больных АД проводили по общепринятой методике: сбор анамнеза, общий осмотр, оценка объективного состояния органов и систем. При постановке диагноза АД учитывалось наличие обязательных и дополнительных критериев.

1. Обязательные критерии: зуд кожных покровов; характерная возрастная динамика высыпаний на коже (клинические проявления у больных АД в грудном возрасте имеют свои особенности); атопия в анамнезе или наследственная предрасположенность к атопии; хроническое рецидивирующее течение.

2. Дополнительные критерии:

2а. Клинические: сезонность обострений; ксероз (сухость) кожных покровов; ладонный ихтиоз; начало заболевания в раннем детском возрасте; складки Денье-Моргана (суборбитальные складки); гиперпигментация кожи периорбитальных областей; кератоконус (коническое выпячивание роговицы); восприимчивость к инфекционным поражениям кожи; локализация кожного процесса на кистях и стопах; хейлит; трещины за ушами; белый дермографизм.

2б. Лабораторные: высокий уровень IgE в сыворотке крови; реакция немедленного типа при кожном тестировании с аллергенами; эозинофилия.

Для постановки диагноза необходимо наличие не менее 3-х главных критериев, а также 3-х и более дополнительных.

При сборе анамнеза у больного или родителей детей обращалось внимание на:

- наличие аллергических заболеваний у родителей и родственников 2-3-ей линии родства;
- возраст начала первых клинических проявлений, их характер и

локализацию;

- длительность заболевания, частоту обострений;
- наличие других аллергических симптомов (зуд век, слезотечение, чихание, переходящая заложенность носа, кашель, одышка, приступы удушья);
- связь ухудшения состояния пациента с введением новых продуктов, приемом медикаментов,
- эффективность ранее проводимой медикаментозной терапии;
- жилищно-бытовые условия больного.

Больным АД проводили лабораторные исследования:

- Определение уровня общего IgE в сыворотке крови иммуноферментным методом.
- Аллергологическое исследование сыворотки крови – определение специфических IgE/IgG4-антител к пищевым, бытовым антигенам, антигенам растительного, животного и химического происхождения.
- Кожные пробы – скарификационный метод или prick-тест проводятся вне обострения кожного процесса.

2.2. Дерматологические методы исследования

За основу оценки степени тяжести АД принят индекс SCORAD (многокомпонентный индекс тяжести течения АД) [140].

SCORAD включает 6 объективных (эритема, отек/папулы, корки/мокнутие, эскориации, лихенификация, сухость кожи) и 2 субъективных (зуд и нарушение сна) критерия. Интенсивность объективных симптомов оценивается по 3-бальной шкале: 0 – отсутствие, 1 – слабая, 2 – умеренная, 3 – сильная (баллы суммируются).

Индекс SCORAD рассчитывается по формуле:

$$\text{SCORAD} = A/5 + 7B/2 + C$$

где: А – площадь пораженной кожи (рассчитывается в %, согласно «правилу 9», где за 1 принята площадь ладонной поверхности кисти взрослого человека – соответствует 1% всей поверхности кожи);
 В – сумма баллов интенсивности проявлений клинических симптомов АД;
 С – сумма баллов субъективных симптомов по 10-балльной шкале (0–20 баллов).

Характеристика АД по степени тяжести:

- легкое течение – локализованные проявления кожного процесса; незначительно выраженный кожный зуд; частота обострений 1-2 раза в год; хороший эффект от проводимой терапии; продолжительность ремиссий - 8-10 месяцев;
- средней степени тяжести – распространенный характер поражения; частота обострений 3-4 раза в год; длительность ремиссий – 2-3 месяца; процесс приобретает упорное течение с недостаточно выраженным эффектом от проводимой терапии;
- тяжелый – кожный процесс носит распространенный или диффузный характер; частота обострений – 5 и более раз в год; ремиссия непродолжительная неполная от 1-1,5 месяцев; в крайне тяжелых случаях может протекать без ремиссий; лечение с незначительным эффектом либо без такового.

Для оценки выраженности зуда при АД использовали разработанную на кафедре кожных и венерических болезней ММА им. И.М.Сеченова 10-балльную шкалу. Выраженность зуда от 0 до 3 баллов расценивали как легкую, от 4 до 6 баллов – средней интенсивности и от 7 до 10 баллов – сильно выраженный зуд.

2.3. Определение содержания провоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных атопическим дерматитом

Все определения проводили в образцах крови, взятой из вены в сухие пластиковые пробирки. После образования кровяного сгустка образец крови центрифугировали при 2,5 тыс.об./мин в течении 10 мин, отбирали с помощью автоматической пипетки сыворотку, которую использовали для анализа (сыворотка может быть также заморожена и храниться до проведения анализа в течение месяца при t° от -18°C до -24°C) [22].

Определение содержания провоспалительных цитокинов (ИЛ- 1β , -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) [22].

2.4. Определение активности лейкоцитарной эластазы.

Определение активности лейкоцитарной эластазы (ЛЭ) проводили спектрофотометрическим энзиматическим методом с помощью дуолучевого 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 [7]. Использовали набор реагентов «ЭЛАСТАЗА» (ООО «Биофарм-тест», Россия), включающий хромогенный субстрат N-терт-бутоксикарбонил-аланин-p-нитрофениловый эфир (BOC-Ala-ONp), ацетонитрил и фосфатный буфер, pH 6,5 [22].

ЛЭ находится в сыворотке крови в комплексе с α_1 -ПИ. В присутствии ацетонитрила и при определенном составе буферного раствора происходит разрыхление комплекса, приводящее к оттеснению ингибитора и проникновению BOC-Ala-ONp к активному центру фермента [22].

Ход проведения анализа:

- флакон с буферным раствором помещали в термостат при температуре $+25^{\circ}\text{C}$ на 15 минут;
- непосредственно перед использованием в пробирку с навеской BOC-Ala-

ONp вносили 500 мкл ацетонитрила и тщательно перемешивали.

Подготовленные реагенты можно использовать только в течение рабочего дня.

- в кювету спектрофотометра, предварительно нагретую до +25°C, вносили 480 мкл нагретого до +25°C буферного раствора, добавляли 20 мкл раствора субстрата BOC-Ala-ONp, 5 мкл анализируемой сыворотки и тщательно перемешивали;
- параллельно готовили контрольную пробу: 480 мкл буферного раствора +20 мкл ацетонитрила;
- измеряли оптическую плотность опытной пробы против контрольной 4 раза с интервалом времени 1 минута (точно!) при длине волны 347,5 нм;
- рассчитывали изменение оптической плотности анализируемой пробы за 1 минуту ($\Delta E/\text{мин}$) по формуле:

$$\Delta E/\text{мин} = \Delta E_n/t$$

где: ΔE_n - изменение оптической плотности анализируемой пробы, ед. опт.плотн.;

t—интервал времени между определениями, мин [22].

Активность ЛЭ в анализируемом образце сыворотки определяли по формуле:

$$A = \Delta E/\text{мин} \times 0,108 / 0,005,$$

где: 0,108 - пересчетный коэффициент, учитывающий объем пробы (0,5 мл) и коэффициент молярной экстинкции субстрата ($4,6 \text{ мл} \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$)

0,005 - объем внесенной в кювету сыворотки (в мл) [22].

Измерение активности ЛЭ каждого образца сыворотки проводили 3 раза, после чего рассчитывать среднее арифметическое значение активности ЛЭ [22].

2.5. 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 pH 8,0 и раствор для разведения трипсина. Кинетику реакции определяли при длине волны 253 нм [22].

Метод основан на взаимодействии α_1 -ПИ в сыворотке крови с трипсином при использовании в качестве субстрата БАЭЭ: α_1 -ПИ сыворотки крови образует с трипсином комплекс, не расщепляющий БАЭЭ. Поэтому активность α_1 -ПИ определяется по степени торможения расщепления трипсином низкомолекулярного субстрата [22].

Ход проведения анализа:

- вскрывали флакон с буферным раствором, переносили его содержимое в мерный цилиндр и добавляли дистиллированную воду до отметки 100 мл;
- растворяли содержимое пробирки с БАЭЭ в 60 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивали. Выдерживали оба раствора в термостате при +25°C в течение не менее 15 мин;
- переносили раствор для разведения трипсина в пробирку с трипсином и аккуратно перемешивали покачиванием.

Все приготовленные для анализа реагенты можно хранить при температуре +2-8°C не более 2-х недель.

- исследуемые образцы сыворотки разводили физиологическим раствором в соотношении 1:50;
- в кювету спектрофотометра, предварительно нагретую до +25°C, вносили 2,0 мл буферного раствора и 0,01 мл раствора трипсина, перемешивали и инкубировали в кювете в течение 5 мин при +25°C;
- добавляли в кювету 1,0 мл раствора субстрата, перемешивали и измеряли оптическую плотность 4 раза с интервалом в 1 минуту (точно!) при длине волны 253 нм (контрольная проба);

- рассчитывали изменение оптической плотности контрольной пробы за 1 минуту ($\Delta E/\text{мин}_{\text{контроль}}$) по формуле:

$$\Delta E/\text{мин}_{\text{контроль}} = \Delta E_K / t$$

где: ΔE_K - изменение оптической плотности контрольной пробы,
ед.опт.плотн.,

t- интервал времени между определениями, мин.

- затем в предварительно нагретую до $+25^\circ\text{C}$ кювету вносили 1,9 мл буферного раствора, 0,01 мл раствора трипсина и 0,1 мл предварительно разведенного 1:50 образца анализируемой сыворотки крови, перемешивали и инкубировали в кювете в течение 5 минут при $+25^\circ\text{C}$;
- добавляли в кювету 1,0 мл раствора субстрата, перемешивали и измеряли оптическую плотность 4 раза с интервалом в 1 минуту (точно!) при длине волны 253 нм (исследуемая проба);
- рассчитывали изменение оптической плотности пробы за 1 минуту по формуле:

$$\Delta E/\text{мин}_{\text{проба}} = \Delta E_n / t,$$

где: ΔE_n - изменение оптической плотности исследуемой пробы
сыворотки крови, ед. опт.плотн.

t- интервал времени между определениями, мин.

- вычисляли разность изменения оптической плотности контрольной и исследуемой пробы (ΔE) по формуле:

$$\Delta E = \Delta E/\text{мин}_{\text{контроль}} - \Delta E/\text{мин}_{\text{проба}} ;$$

активность αI -ПИ в исследуемой пробе определить по формуле:

$$A = \Delta E \times F,$$

где: A - активность αI -ПИ, ИЕ/мл,

ΔE - разность изменения оптической плотности контрольной
и исследуемой пробы, ед. опт.плотн,

F- фактор пересчета (указывается в паспорте на набор) [22].

2.6. Выделение клеток крови

Работа с кровью людей проводилась по международным правилам работы с биологическим материалом. Кровь брали натошак из локтевой вены в пробирку с ЭДТА. Для получения лейкоцитарной взвеси к 500 мкл крови добавляли 15 мл лизирующей жидкости (на 1 литр H_2O : NH_4Cl 8,3г; $KHCO_3$ 1г; $Na_2-EDTA-2H_2O$ 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 1×10^6 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 1×10^6 клеток/мл. Очищенную популяцию нейтрофилов получали на приготовленном *ex temporo* градиенте Перколла [9].

2.7. Разделение клеток крови на градиенте плотности Перколла

Чистую популяцию нейтрофилов периферической крови человека выделяли на градиенте плотности Перколла (Percoll, Sigma-Aldrich, USA). Все работы с градиентами проводили *ex temporo* при комнатной температуре во избежание формирования микрочастиц под действием низких температур и изменения седиментационных свойств растворов.

Для приготовления градиента растворов Перколла использовали фосфатный буфер без кальция и магния (PBS ϕ), чтобы избежать образования конгломератов клеток, а также для исключения влияния кальция на генерацию супероксидного аниона клетками. Для приготовления 10-кратного буфера на 1 литр H_2O добавляли NaCl 77,5г; KH_2PO_4 2,0г; K_2HPO_4 15,0г. Для

приготовления однократного буфера на 1 литр H_2O добавляли NaCl 7,75г; KH_2PO_4 0,2г; K_2HPO_4 1,5г. Полученные растворы доводили до pH 7,0 и фильтровали через одноразовые фильтры ($d = 22$ микрона) в стерильные колбы.

Изотонический раствор Перколлы (90%) получали из 27 мл исходного Перколлы и 3 мл 10-кратного PBS ϕ , его использовали для получения остальных ступеней градиента. Для приготовления 81% раствора 1,9 мл однократного PBS ϕ добавляли к 8,1 мл 90% изотонического раствора Перколлы (реальный процент Перколлы в этом слое составлял 72,9%). Для приготовления 70% раствора 3 мл однократного PBS ϕ добавляли к 7 мл 90% Перколлы. Для приготовления 60% раствора 4 мл однократного PBS ϕ добавляли к 6 мл 90% Перколлы. Для приготовления 55% раствора 4,5 мл однократного PBS ϕ добавляли к 5,5 мл 90% Перколлы [11]. Процентный состав растворов для градиента соответствовал средней плотности клеток крови, известной из литературных источников (Рисунок 1).

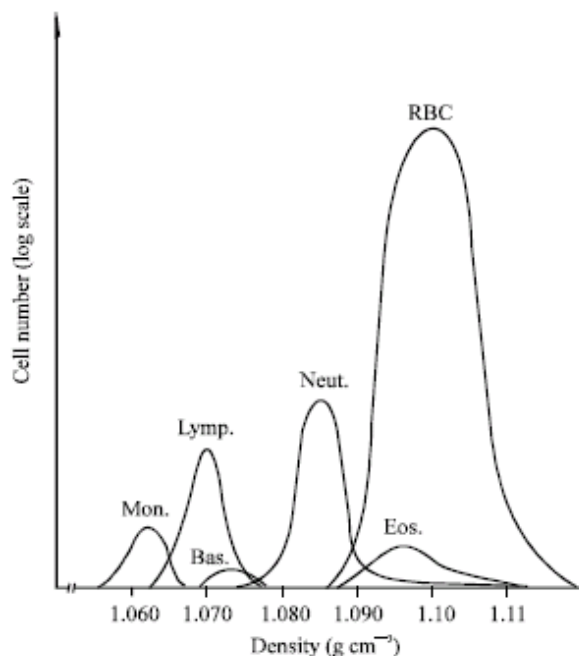


Рисунок 1. Гауссово распределение плотности клеток крови (г/см^3) (Bøyum A. et al., Scand. J. Immunol., 1991, V.34, N6, P.697-712).

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 натошак в вакутейнере с ЭДТА, разведенную 1:1 стерильным физиологическим раствором. Градиенты центрифугировали 20 минут при $t^0+22^0\text{C}$ при ускорении 500g [9].

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 $\sim 100\%$. Каждый слой популяций клеток отбирали пипеткой с наконечником с удлинённым носиком, переносили в центрифужные пробирки с однократным PBS ϕ , отмывали дважды центрифугированием 10 минут при $t^0+22^0\text{C}$ и ускорении 200g [9].

Контроль выделения клеток проводили как морфологически (по окраске гематоксилин – эозином с последующим анализом в световом микроскопе), так и методом проточной цитометрии по наличию гейта соответствующей популяции клеток. 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 $1,5\text{--}5,2 \times 10^6$ клеток [9]. Все дальнейшие эксперименты *ex vivo* с выделенными нейтрофилами проводились в течение ближайших 6 ч для исключения падения функциональной активности клеток и получения ложноотрицательных результатов.

2.8. Оценка спонтанной и индуцированной хемилюминесценции

Для приготовления 30 mM раствора разводили 0,5 г люминола в 94,05 мл 1 mM 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 $+37^{\circ}\text{C}$. На каждую точку ставили по три параллельные пробирки. 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 [10]. 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 [10].

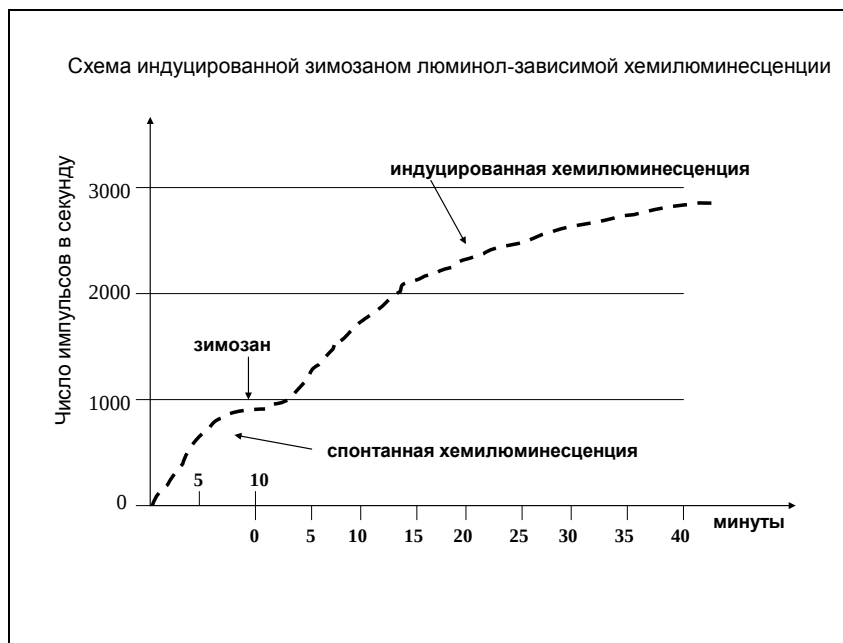


Рисунок 2. Схема измерения люминол–зависимой хемилюминесценции.

2.9. 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 форболмиристат-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. Программа компьютера определяла концентрацию наномолей супероксидного аниона,

высвобождаемого в среду одним миллионом клеток [176]. Для каждого больного ставили подряд три повтора. Данные по всем экспериментам представлены как $M \pm m$.

2.10. 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 $10 \times 10^6/\text{мл}$ и культивировали в присутствии тестовых штаммов дрожжей *Rhodotorulaspp.* в течение 30 мин при $t^0 +37^0\text{C}$ и 5% CO_2 . Далее клетки отмывали центрифугированием, фиксировали 1% параформальдегидом, окрашивали пропидиумом иодидом в гипотоническом буфере и анализировали на проточном цитометре FASCCalibur (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 диплоидного клеток.

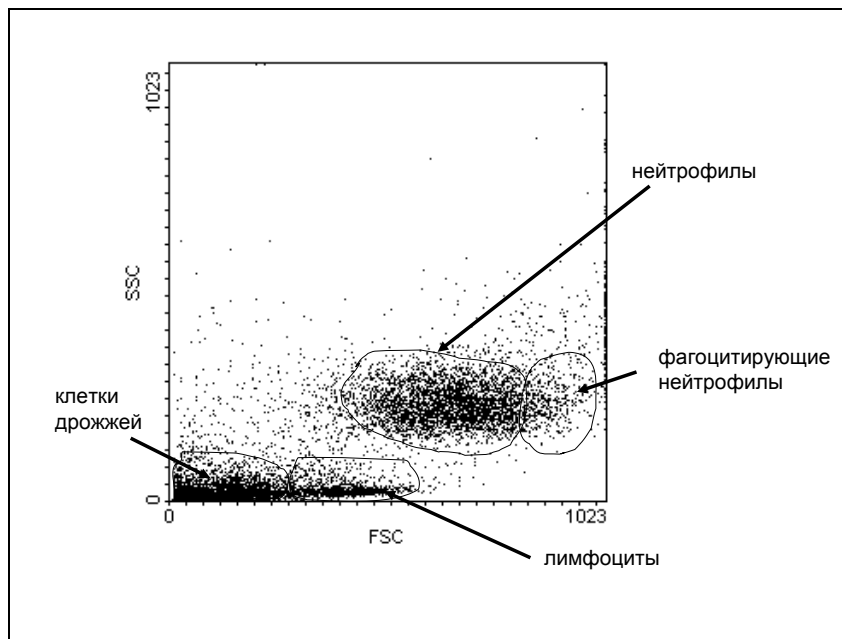


Рисунок 3. Примеры распределения клеток при измерении процента нейтрофилов периферической крови человека, фагоцитировавших клетки дрожжей *Rhodotorula spp.*

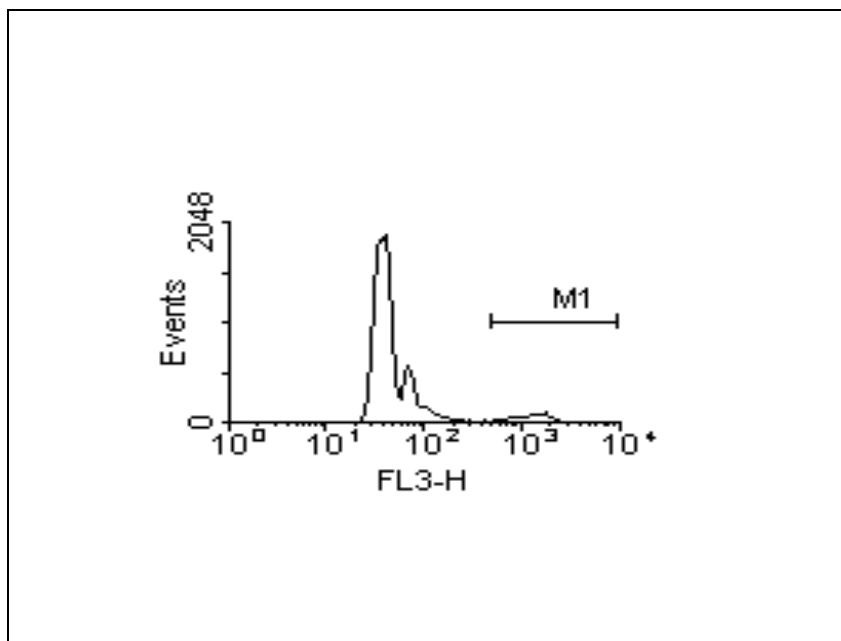


Рисунок 4. Пример гистограммы, полученной при анализе флуоресценции

клеток на канале FL3-H после окраски пропидиумом иодидом. Курсор M1 обозначает пик, соответствующий популяции фагоцитировавших клеток.

Для каждого больного ставили подряд три повтора. Данные по всем экспериментам представлены как $M \pm m$.

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

Кровь брали из локтевой вены натощак в пробирки с ЭДТА. 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 (у.е.) [29].

Для измерения уровня супероксидного аниона лейкоциты были фракционированы на градиенте Перколл, выделены нейтрофилы с чистотой 98%, отмыты, восстановлены в полной среде в течение 2 ч, отмыты, 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 двухлучевом спектрофотометре Hitachi [29].

2.12. 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 $p < 0,05$. Для показателей, определяющих качественные признаки в клинической характеристике больных, указывалось абсолютное число и относительная величина в процентах. Библиографический поиск проведен по базам данных MEDLINE, UpToDate, PubMed и др. за период с 2008 по 2020 год.

ГЛАВА 3. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ

Под наблюдением находилось 144 больных АД. Пациенты получали амбулаторное и стационарное лечение на базах кафедр дерматовенерологии лечебного и Московского факультетов ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И.Пирогова Минздрава России г. Москвы.

Группу обследованных составили 30,6% (n=44) женщин и 69,4% (n=100) мужчин в возрасте от 18 до 56 лет (Таблица 1).

Таблица 1

**Распределение больных атопическим дерматитом
по полу и возрасту (n=144)**

Возрастная группа	Пол		Количество больных	
	мужчины	женщины	абс.	%
18-22	24	-	24	16,7
23-27	60	10	70	48,6
28-32	16	16	32	22,2
33-56	-	18	18	12,5
Всего	100	44	144	100

Как видно из таблицы №1, среди обследованных преобладали мужчины – 69,4 % (n=100) в возрасте от 23 до 27 лет.

При изучении наследственности у 20,8% (n= 30) больных был выявлен АД у близких родственников. При этом наличие диагноза по одной ветви родства отмечалось в 14% случаев (n=20), у обоих родителей – в 7% (n=10). В остальных наблюдениях наличие у родственников подобных состояний отрицалось.

У 4,2% (n=6) пациентов выявлен отягощенный семейный анамнез по atopическим заболеваниям (поллиноз, бронхиальная астма) у родственников первой и второй степени родства.

Данные опроса показали, что аллергологический анамнез отягощен у 65% (n=94), причем отмечалось развитие аллергических реакций на продукты питания, средства декоративной косметики, медикаменты, домашнюю пыль, бытовые моющие средства. Обострение процесса при нарушении питания было выявлено – у 52 % (n=49) пациентов, при контакте с ингаляционными аллергенами – у 15% (n=14); после перенесенных вирусных заболеваний – у 11% (n=10); на фоне приема лекарственных средств – у 26% (n=24); при метеовоздействии – у 6% (n=6); связь обострений со стрессом отмечали 35% (n=33) обследованных.

У большинства пациентов основные жалобы сводились к мучительному зуду, раздражительности, быстрой утомляемости, плохому аппетиту, нарушению сна, кожным высыпаниям. Зуд отличался различной интенсивностью: интенсивный зуд (7-10 баллов) отмечался у 24,6% (n=34), средней интенсивности (4-6 баллов) – у 60,2% (n=83), слабый (1-3 балла) – у 15,2% (n=21).

По формам клинического течения АД больные были распределены следующим образом (Таблица 2).

Таблица 2

**Распределение больных atopическим дерматитом
по клиническим формам (n=144)**

Формы atopического дерматита	Число больных (n)	
	абс.	%
Эритематозно-сквамозная	44	30,6
Эритематозно-сквамозная с лихенизацией	80	55,5
Лихеноидная	18	12,5

Пруригинозная	2	1,4
Всего	144	100

Из данных Таблицы 2 следует, что преобладали больные эритематозно-сквамозной формой с лихенизацией – у 55,5% (n=80) и эритематозно-сквамозной – у 30,6% (n=44).

По распространенности кожного процесса больные АД были распределены таким образом: локализованный - площадь поражения не превышает 10% кожного покрова; распространенный - площадь поражения от 10% до 50% кожного покрова; диффузный - площадь поражения более 50% кожного покрова.

Распределение больных по распространенности поражений представлено в таблице 3.

Таблица 3

Распределение больных атопическим дерматитом по распространенности патологического кожного процесса (n=144)

Распространенность процесса	Число больных (n=144)	
	абс.	%
Локализованный	70	48,6
Распространенный	64	44,4
Диффузный	10	6,9
Всего	144	100

Из представленных в таблице 3 данных видно, что преобладали локализованный – у 48,6% (n=70) больных и распространенный – у 44,4% (n=64) характер поражения.

По степени тяжести и с учетом значения индекса SCORAD (iSc) больные были распределены по группам (Рисунок 5).

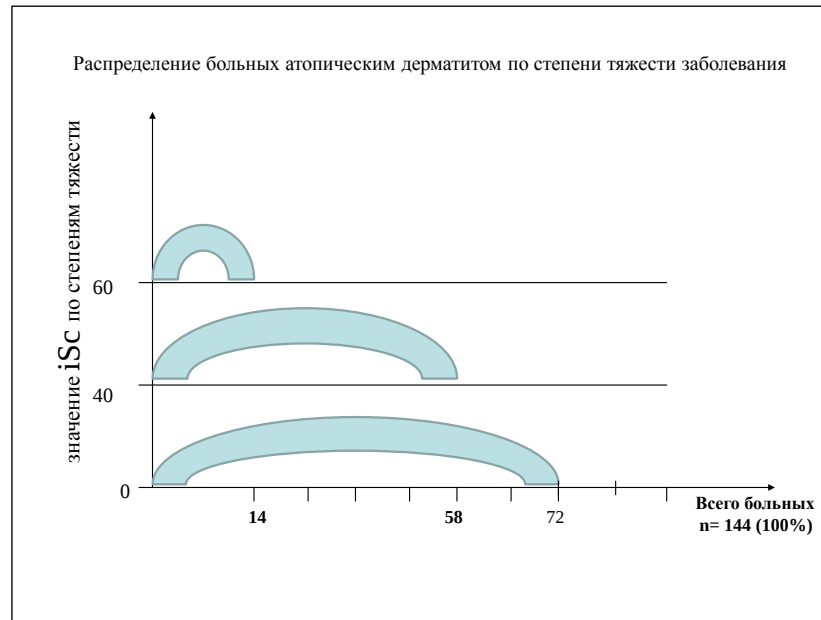


Рисунок 5. Распределение больных атопическим дерматитом по степени тяжести в зависимости от значения индекса SCORAD

Как показано на Рисунке 5, у 50% (n=72) больных диагностирована легкая степень (iSc<40), у 40,3% (n=58), средняя (iSc – 40-60); у - 9,7% (n=14)- тяжелая (iSc > 60).

У больных с легким течением (с учетом iSc) патологический кожный процесс локализовался в основном на лице, сгибательных поверхностях локтевых, лучезапястных суставов, носил ограниченный характер, чаще встречались эритематозно–сквамозная форма заболевания – у 30,6% (n=44), у 19,4% (n=28) больных – эритематозно-сквамозная с лихенизацией, при этом симметрично локализованные эритематозные пятна сочеталась с мелкопластинчатым шелушением, встречались единичные папулы, точечные и линейные эксфолиации, ксероз, геморрагические корочки. Обострения заболевания регистрировались 1-2 раза в год, преимущественно

в осенне-весенний период, продолжительность рецидива составляла до 3-4 нед.

У больных со среднетяжелым течением высыпания локализовались на лице, шее, в локтевых и коленных сгибах с тенденцией к распространению на гладкую кожу конечностей, грудь и спину. У больных отмечались эритематозно-сквамозная форма с лихенизацией – у 31,3% (n=45) и лихеноидная – у 9% (n=13). Клиническая картина была представлена эритемой с большим количеством лентикулярных папул, лихенизацией, иногда обширной, превышающей 8-10 см в диаметре, множественными точечными и линейными эксфолиациями, ксерозом, шелушением. Частота обострений составляла до 2-4 в год, продолжительность рецидива – до 1-1,5 мес.

У больных с тяжелым течением заболевания отмечался диффузный характер поражения кожи. Больные предъявляли жалобы на интенсивный зуд и нарушения сна (бессонница, поверхностный «заячий» сон), невротические расстройства. Клинически преобладали эритематозно-сквамозная формой с лихенизацией – у 4,9% (n=7), лихеноидная – у 3,5% (n=5) и пруригинозная – у 1,4% (n=2). Очаги поражения носили распространенный характер, были представлены многочисленными папулами на фоне островоспалительной эритемы, эксфолиациями, серозно-геморрагическими корочками, трещинами, обширными участками с выраженной инфильтрацией и лихенификацией. Частота обострений в среднем 3-5 и более раз в год, продолжительность рецидива 1-1,5 мес.

Иммунологическое обследование провели 44,4% (n=64) пациентам: из них с легким течением АД – 18,8% (n=12) (iSc33,5±3,29); со среднетяжелым течением – 62,4% (n=40) (iSc47,4±5,23); с тяжелым течением – 18,8% (n=12) (iSc64,9±2,82) (Таблица 4).

Таблица 4.

**Сравнительная характеристика показателей клеточного иммунитета
у больных атопическим дерматитом (n=64)**

Иммуноло- гические показатели	Группы			
	1 (n=12)	2 (n=40)	3 (n=12)	4 (n=25)
CD3+, %	58,83±12,41	45,62±17,56*	40,42±16,23*	58±2,8
CD4+, %	35,19±5,96	33,5±8.06	29±7.05*	41,0±4,01
CD8+, %	27.56±7,36*	21,17±4,83	17.51±4,13	17±1,4
CD4+/CD8+	1,03±0,23	1,34±0,27	1,68±0,1	1,48±0,23
CD19+, %	11,88±5,84	15,32±5,57	10,86±5,17	11,9±1,39

Примечание: * - достоверные различия; $p < 0,05$;

Где: 1 группа – с легкой степенью тяжести;

2 группа – со средней степенью тяжести;

3 группа – с тяжелым течением;

4 группа – здоровые добровольцы – контрольная.

При анализе представленных в таблице 4 данных выявлено, что в группе больных с легким течением АД отмечается тенденция к снижению Т-хелперов (CD4+) до 35,19±5,96. Соответственно изменился индекс CD4+/CD8+ – до 1,03±0,23. В группе со средней степенью тяжести у пациентов с АД общее количество Т-лимфоцитов (CD3+) статистически значимо снижено – до 45,62±17,56, при этом отмечалась тенденция к снижению Т-хелперов (CD4+) – до 33,5±8.06 и повышение количества Т-супрессоров (CD8+) и В-лимфоцитов – до 21,17±4,83 и до 15,32±5,57 (соответственно). Индекс CD4+/CD8+ не изменился. В группе с тяжелым течением статистически значимо были снижены показатели Т-хелперов (CD4+) и всех Т-лимфоцитов (CD3+) – до 29±7,05 и 40,42±16,23 (соответственно), отмечалась тенденция к снижению В-лимфоцитов – до 10,86±5,17. Индекс CD4+/CD8+ был выше нормы – 1,68±0,1.

Таким образом, результаты клинического обследования больных АД выявили: разнообразие форм клинического течения, разноплановые изменения показателей клеточного иммунитета, отягощенность аллергологического анамнеза, различную степень тяжести АД.

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.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ СИСТЕМЫ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

Одна из основных задач настоящего исследования состояла в поиске показателей неспецифического иммунитета, по которым можно было бы судить о степени активности патологического процесса при АД, прогнозировать течение данного заболевания и осуществлять мониторинг проводимой терапии. С этой целью было решено исследовать в образцах сыворотки крови обследуемых пациентов содержание различных цитокинов.

Известно, что патогенез АД связан с патологическими иммунными реакциями, медиаторами которых являются цитокины, инициирующие и поддерживающие воспалительный процесс в коже. Показано, что при АД отмечаются иммунные нарушения регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов и в патогенез данного заболевания вовлечен целый ряд как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов. Важным звеном в патогенезе этого заболевания является сдвиг Th_1/Th_2 -цитокинового профиля. Ряд авторов указывают, что этот сдвиг имеет направление в сторону Th_2 , сопровождается повышенной секрецией IgE, и даже в периоды «внешнего благополучия» в коже сохраняется Т-лимфоцитарная инфильтрация с усиленной экспрессией цитокинов 2 типа – ИЛ-4 и ИЛ-13. Дизрегуляцию соотношения Th_1/Th_2 связывают с генетической предрасположенностью [5]. В то же время нет единой точки зрения, касающейся содержания ряда цитокинов, например, таких как ФНО α , ИЛ-6, при различных клинических формах и стадиях данного заболевания. Имеющиеся в литературе данные, касающиеся содержания различных цитокинов, достаточно противоречивы [5].

Учитывая изложенное, было проведено комплексное исследование содержания в сыворотке крови ряда различных цитокинов у пациентов с АД. Для того, чтобы более детально изучить их роль в биологических

механизмах, которые лежат в основе патологического процесса при данном заболевании, их уровень исследовали у пациентов с различной тяжестью течения АД во время обострения и ремиссии.

В зависимости от значения индекса SCORAD обследованных пациентов разделили на 3 группы: <40 – легкая степень тяжести (группа1); от 40 до 60 – средняя степень тяжести (группа2); >60 – тяжелая форма (группа 3), группа контроля (4-я) состояла из 23 человек (Таблица 5).

Таблица 5.

**Характеристика обследованных больных
атопическим дерматитом (n=72)**

Номер группы	Индекс SCORAD (iSc)	Число обследованных (n=72)
1	21,4±2,1	27
2	40,4±3,7	31
3	64,3±7,2	14
4	-	23

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 6.

Таблица 6.

**Содержание цитокинов в сыворотке крови
больных атопическим дерматитом ($M \pm m$) (n=72)**

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

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

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

Где: x^* - $p < 0,05$; x^{**} - $p < 0,01$ по сравнению с группой сравнения (группа 4);
 $x^{\square 3}$ - $p < 0,05$ по сравнению с группой 3;
 $x^{\square \square 2}$ - $p < 0,01$ по сравнению с группой 2.

Известно, что одним из основных провоспалительных цитокинов является ИНФ γ , который продуцируется активированными Th $_1$ -лимфоцитами, макрофагами и натуральными киллерами. Как видно из представленных данных в таблице 6, его содержание при средней степени тяжести и тяжелой форме отличалось от контрольных значений, причем в зависимости от фазы

заболевания – обострение или ремиссия – изменения носили противоположный характер. При обострении его уровень достоверно снижался, а во время ремиссии, превышал контрольные значения, причем при средней степени тяжести достигал максимума [5].

Сходная картина наблюдалась с содержанием ИЛ-12, который оказывает стимулирующее влияние на формирование Th₁ фенотипа при экспрессии его макрофагами, дендроцитами и эозинофилами. Рецепторы ИЛ-12 содержатся только на Th₁ клетках и отсутствуют на Th₂-лимфоцитах [5].

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. Причем, как и в случае с ИНФγ, максимальные значения его уровня наблюдались у пациентов во время ремиссии при среднетяжелой форме заболевания [5].

В настоящее время доказано, что клетки, имеющие фенотип Th₁, начинают продуцировать ИНФγ под действием ИЛ-12 и вызывают повреждение кератиноцитов [86]. Причинами индукции ИНФγ-зависимых реакций может быть влияние разных микробных антигенов и суперантигенов [90]. К гуморальным факторам среды, подавляющим синтез ИНФγ относят прежде всего ИЛ-10 и простагландин E₂ [5].

Изменения сывороточного содержания другого важнейшего провоспалительного цитокина – ФНОα не носили столь определенного и выраженного характера в зависимости от стадии процесса. Достоверное его увеличение наблюдалось при тяжелой форме АД как при обострении, так и во время ремиссии, а также во время ремиссии при среднетяжелой форме. При легкой форме его уровни не отличались от контрольных значений [5].

Исследуемый ИЛ-1β относят к провоспалительным цитокинам, т.к. он выступает в качестве одного из главных медиаторов, ответственных за формирование местной воспалительной реакции и острофазного ответа при инфекционном поражении. Однако, следует иметь в виду, что одним из главных механизмов его действия является индукция синтеза ИЛ-2 и ИЛ-4.

Кроме того, ИЛ-1 усиливает экспрессию рецепторов к ИЛ-2 и ИЛ-4, что создает условия для аутокринной регуляции пролиферации Т-хелперов. Наибольшая стимулирующая активность ИЛ-1 связана с теми Т-хелперами, которые продуцируют ИЛ-4, т.е. Th₂. Вероятно, этим и объясняется результат его определения при АД: достоверное повышение при тяжелой и среднетяжелой формах при обострении. При разрешении клинических проявлений заболевания значимые изменения его уровня отсутствовали [5].

Как видно из Таблицы 6 изменения содержания противовоспалительных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-13 во многом были схожи. Степень их высвобождения во многом зависела от распространенности и степени тяжести процесса при АД. Наибольшие их концентрации отмечались во время обострения при тяжёлом и среднетяжёлом течении заболевания, а также при распространенном и диффузном поражении [5].

Следует отметить, что ИЛ-4 и ИНФγ являются ключевыми цитокинами, определяющими путь дальнейшей дифференцировки наивных CD4 Т-клеток [51]. Показано, что при отсутствии гена ИНФγ нарушается иммунный ответ по клеточному типу, поддерживаемый Th₁, а элиминация ИЛ-4 блокирует Th₂-зависимый ответ. Дифференцировка наивных CD4 Т-клеток в направлении Th₂ приводит к синтезу цитокинов ИЛ-4, ИЛ-10, которые подавляют активность ИЛ-12, а также ИЛ-1, которые могут индуцировать рецепторы и синтез Т-клетками ИЛ-2 и ИНФγ [15; 39]. Таким образом, ИЛ-4 подавляет образование Th₁ и провоспалительных цитокинов, сдвигая баланс Th₁ и Th₂ в сторону Th₂ [5].

Как известно, Th₁ и Th₂ субпопуляции лимфоцитов находятся в реципрокных отношениях, и, продуцируя противоположные по эффекту цитокины, каждая из субпопуляций подавляет дифференцировку полярной группы, тем самым снижая продукцию альтернативных цитокинов [5; 14; 111].

Такие реципрокные отношения субпопуляций цитокинов наглядно прослеживаются при комплексном анализе полученных результатов у пациентов с АД. 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 [5].

Выделяют разные причины, обуславливающие сдвиг иммунологических реакций в сторону Th₂ звена при АД. Прежде всего, это наследственные факторы. Так, известно около 20 генов, ассоциируемых с atopической предрасположенностью. Особый интерес заслуживает область на 5 хромосоме (5q31-33), содержащая кластер генов ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 (цитокины, характеризующие Th₂ профиль). Установлены ассоциации аллергических заболеваний с участком, кодирующим ИЛ-4 этого кластера [122]. Полиморфизм по промотору ИЛ-4 связан с высоким содержанием IgE [145]. Кроме того, большое значение имеют местные факторы, обуславливающие дифференцировку Th₀ клеток в Th₂, включающие цитокиновое окружение, тип антигена и костимуляции, воздействие разных гуморальных компонентов. Моноциты больных АД отличаются повышенной активностью с АМР-фосфодиэстеразы, способствующей продукции ИЛ-4, ИЛ-10, простагландина E₂ и IgE [5, 89].

Что касается содержания в сыворотке ИЛ-8, то его уровни были повышены по сравнению с контролем в разных группах в 64-79% образцов и мало зависели от клинической картины заболевания, несмотря на то, что основное его свойство – обеспечение хемотаксиса в зону воспаления

различных типов клеток – нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов, Т-клеток [5].

Были определены коэффициенты корреляции между величиной индекса SCORAD и уровнями определяемых цитокинов во время обострения АД. Полученные результаты представлены в Таблице 7 [5].

Таблица 7.

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

Показатель	SCORAD
ИНФ γ	–0,07
ФНО α	0,44*
ИЛ-1 β	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

Где: x* - $p < 0,05$

Из представленной таблицы 7 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 [5].

Подводя итог проведенному исследованию сывороточного содержания комплекса цитокинов у пациентов с АД различной степени

тяжести, можно сделать вывод о том, что прослеживается тенденция к повышенной продукции противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13) при обострении заболевания и повышению синтеза провоспалительных цитокинов (ИНФ γ , ФНО α , ИЛ-12) во время ремиссии. В то же время уровни указанных цитокинов очень слабо коррелируют с тяжестью течения АД [5]. Для мониторинга течения данного заболевания, оценки тяжести и степени активности аллергического воспаления целесообразно провести поиск иммунологических или биохимических параметров, среди которых могут быть иные показатели неспецифического иммунитета.

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ДЕСТРУКТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ И АКТИВНОСТИ АНТИДЕСТРУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

В ответ на любой антиген, попадающий в организм, развивается воспалительная реакция с участием полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) [6; 14], которые в борьбе с бактериями пользуются богатым набором методов: фагоцитоз, образование свободных кислородных радикалов и секреция различных ферментов деградации. Нейтрофилы обеспечивают основную защиту от пиогенных (гноеродных) бактерий и могут существовать в анаэробных условиях. Лизис патогенов в ПМЯЛ осуществляется протеиназами [4; 131].

Человеческая лейкоцитарная эластаза (ЛЭ), являясь протеиназой, локализуется в основном в азурофильных гранулах внутри нейтрофильного лейкоцита в высокой концентрации [4; 15], в незначительной концентрации - в ядерной мембране, центре Гольджи, сети эндоплазматического ретикулума и митохондриях. Доказано, что на последних этапах развития нейтрофильного ответа лизосомные азурофильные гранулы подвергаются дегрануляции, выбрасывают во внеклеточную среду мощные деструктурные протеиназы, в том числе ЛЭ, высвобождение которой в экстрацеллюлярный матрикс происходит в случае гибели клетки, неполного закрытия фагосомы, а также под воздействием стимуляторов дегрануляции-компонентов комплемента, хемотаксических веществ, эндотоксинов, иммунных комплексов, цитокинов (TNF α , ИЛ-8), ЛПС, фрагментов бактериальной стенки [4; 39].

Характерной особенностью ЛЭ является ускоренный гидролиз самых разных белков в связи с широкой субстратной специфичностью, поэтому она

вовлекается в деструкцию различных тканей (кожа и т.д.) [15; 58]. Стоит заметить, что нарушения при этом локализуются не только на видимых пораженных участках кожи при АД, но и на участках без видимых проявлений АД [69].

ЛЭ считают маркером хронических и острых воспалительных заболеваний, это показатель секреторной дегрануляции и активации нейтрофильных лейкоцитов. В процессе фагоцитоза ЛЭ частично секретируется в окружающее пространство, поэтому обнаруживается в очагах воспаления даже при наличии ингибиторов в плазме и ткани [4]. В норме ЛЭ, которая освободилась при воспалении, немедленно связывается двумя своими главными ингибиторами - с эпителиальным ингибитором протеиназ элафином (SKALP) и $\alpha 1$ -ПИ, частично – с $\alpha 2$ -макроглобулином. Снижение содержания данных ингибиторов при АД и псориазе клинически доказано [4, 93, 128, 142]. Повышенное высвобождение эластазы в некоторых случаях может превысить способности ингибиторов, что станет причиной местного повреждения ткани. Так, в работе [99] при АД показано увеличение активности эластазы в острой фазе заболевания на примере 31 биопсии.

Таким образом, можно предположить важную роль ЛЭ в развитии проявлений АД. Активация воспалительного процесса во многом связана с уменьшением количества ингибиторов ЛЭ в тканях. При этом интересно не только само усиление иммунной реакции, но и замедление процесса восстановления тканей. Все это определяет актуальность исследования содержания ЛЭ у больных АД [4].

Активность ЛЭ в зависимости от тяжести течения АД представлена в Таблице 8. Согласно инструкции фирмы-производителя, активность ЧЛЭ 200-250 нмоль/мл*мин соответствует текущему деструктивному процессу низкой интенсивности, 250-300 нмоль/мл*мин – средней, а при показаниях выше 300 нмоль/мл*мин – высокой [4].

Таблица 8.

**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±9*×	202±10×
2 (n=31)	259±13*×	224±9*×
3 (n=14)	299±19*°	263±12*»
4 (n=23)	191±8	

где: * $p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой,
 × $p < 0,05$, в группе при сравнении обострения/ремиссии
 ° $p < 0,05$, по сравнению с группой 1 (обострение)
 » $p < 0,05$, по сравнению с группой 1 и 2 (ремиссия)

Как видно из Таблицы 8, 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 группах 2 (средне-тяжелое течение) 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. Обладая мощным деструктивным потенциалом, именно ЛЭ во многом определяет

выраженность клинических проявлений АД, что согласуется с данными литературы [4].

Поскольку активность эластазы регулируется с помощью $\alpha 1$ -ПИ, то определяли ее содержание у больных АД (Таблица 9).

Таблица 9.

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

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

где: * $p < 0,05$, по сравнению с контрольной группой

Как видно из данных таблицы 9, в контрольной группе активность $\alpha 1$ -ПИ не превышала норму (25-36 нмоль/мл*мин), а при обострении в группе 1 и 2 отмечалось достоверное увеличение активности $\alpha 1$ -ПИ по сравнению с контрольной группой, соответствующее увеличенной активности ЛЭ. В группах 2 и 3 у части больных активность $\alpha 1$ -ПИ была недостаточной для повышенной активности ЛЭ.

Повышение активности $\alpha 1$ -ПИ при возрастающей активности в сыворотке ЛЭ можно отметить 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 $\alpha 1$ -ПИ снижалась по сравнению с нормой, что расценивалось нами как «истощение

компенсаторного антипротеолитического потенциала». По мере усиления тяжести заболевания у части больных наблюдалось отсутствие адекватного повышения активности $\alpha 1$ -ПИ [4].

Отсутствие адекватного повышения активности ингибиторов эластазы можно объяснить тем, что при АД отмечается увеличение протеолитических ферментов и антипротеаз. Дисбаланс может быть результатом активации макрофагов, нейтрофилов и эпителиальных клеток, которые выделяют протеолитические ферменты, или связан с уменьшением антипротеазной активности из-за оксидативного стресса (вследствие воспаления) и инактивации данных белков свободными радикалами, образующимися в ходе воспаления [4].

Таким образом, $\alpha 1$ -ПИ играет важную роль в регуляции противовоспалительного ответа. В Таблице 10 представлены корреляционные связи между такими параметрами, как активности ЛЭ, $\alpha 1$ -ПИ и SCORAD при обострении АД разной степени тяжести.

Таблица 10.

Корреляционные связи между активностью ЛЭ, $\alpha 1$ -ПИ и SCORAD при обострении АД разной степени тяжести.

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

где: : * $p < 0,05$

С одной стороны, может быть, было бы логичным оценить взаимосвязь между ЛЭ и $\alpha 1$ -ПИ в целом, у всех пациентов, не разделяя их на группы. Но мы исходили из того, что эта взаимосвязь при различной степени тяжести может быть неоднозначна. Так, из таблицы 10 мы видим, что по мере утяжеления состояния пациентов наблюдаемая достоверная

положительная корреляция у пациентов с легкой степенью тяжести АД постепенно ослабевает. Это означает, что наблюдаемое повышение активности сывороточной ЛЭ по мере утяжеления состояния пациентов (предыдущие данные, а также положительная корреляция между активностью ЛЭ и SCORAD во всех группах, табл. 10) не сопровождается адекватным повышением активности $\alpha 1$ -ПИ.

И, наконец, принципиально важный результат был получен при изучении взаимосвязи между активностью $\alpha 1$ -ПИ и SCORAD при различной степени тяжести АД. Наблюдаемая у пациентов с легкой степенью положительная достоверная связь у пациентов со средней степенью тяжести превращается в тенденцию, а у тяжелых пациентов наблюдается инверсия наблюдаемой зависимости. Так, если, как мы наблюдали ранее (табл. 9), средние значения активности $\alpha 1$ -ПИ возрастали по мере утяжеления состояния пациентов, то если взять отдельно группу тяжелых пациентов, то внутри нее наблюдалась достоверная отрицательная корреляция между SCORAD и $\alpha 1$ -ПИ, т.е. чем более выражена тяжесть АД, тем менее активен $\alpha 1$ -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 $\alpha 1$ -ПИ сыворотки крови отражает интенсивность деструктивных процессов и состояние антипротеолитического (компенсаторного) потенциала организма: однонаправленное с ЛЭ увеличение активности $\alpha 1$ -ПИ призвано ограничить деструкцию и характеризует сохранность антипротеолитического потенциала. Однако сниженная активность $\alpha 1$ -ПИ говорит о прогрессировании деструктивного воспаления и, вероятно, является неблагоприятным прогностическим признаком течения АД [4].

В связи со всем вышеописанным определение активности ЛЭ и ее ингибитора в сыворотке крови представляются важными показателями оценки интенсивности воспалительных/деструктивных процессов при АД.

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ

6.1. 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.

Для стимуляции люминол–зависимой хемилюминесценции был использован опсонизированный зимозан, который распознается рецепторами FcγRIIa и FcγRIIb (CD32a и CD16b), экспрессированными вместе на мембране нейтрофилов и необходимыми для адекватного ответа на IgG–зависимые стимулы и продукции супероксидного аниона. В состоянии покоя аффинность связывания этих рецепторов для Fc-фрагмента мономерного IgG человека относительно низка, при активации клеток повышается их экспрессия, а также возрастает аффинность связывания [10; 121].

В таблице 11 представлены результаты спонтанной и индуцированной зимозаном хемилюминесценции клеток крови больных АД в зависимости от тяжести клинического течения согласно индексу SCORAD [10].

Таблица 11.

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 хемилюми- несценция	963 ± 71	1210 ± 141	982 ± 113	$729 \pm 122^*$
Индукцированная хемилюминесценция				
Зимозан	3136 ± 244	3482 ± 201	3017 ± 324	$2921 \pm 306^*$
<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 ($P < 0,05$) [10].

Данные по уровню спонтанной и индуцированной хемилюминесценции лейкоцитарной взвеси периферической крови в зависимости от степени распространенности процесса представлены в Таблице 12.

Таблица 12.

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

Хемилю- минесценция	Доноры (n = 32)	Больные atopическим дерматитом Типы распространённости процесса		
		Ограниченно- локализованный (n = 41)	Распростра- нённый (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 ограничено-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 ограничено-локализованным и диффузным процессом [10].

Для определения динамики изменения функциональной активности клеток крови больных АД, был проведен анализ полученных результатов в зависимости от длительности течения настоящего обострения. Среди больных, которые обратились в поликлинику в течение первой недели текущего обострения (в первого по шестой день включительно) (n = 74), выделена группа лиц, у которых имелась лабораторно подтвержденная

контаминация бактериальной или грибковой инфекцией. Анализ данных по этим группам больным проведен отдельно. Для этих выделенных групп больных были подобраны доноры соответствующего возраста [10].

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 13).

Таблица 13.

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 хемилюминес- ценция	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 13) [10].

В данной работе был получен высокий ответ на стимуляцию клеток крови добавлением взвеси дрожжей *Candida tropicalis*. Дрожжи *Candida tropicalis* являются условно патогенными, однако, при наличии сопутствующего нарушения иммунитета или тяжелой соматической патологии, их присутствие на коже человека имеет выраженный патологический характер. Высокий уровень ответа на стимуляцию дрожжами *Candida tropicalis ex vivo*, скорее всего, можно объяснить различием в линейной специфичности внутри одного рода. То есть контаминация больных могла быть дрожжами не идентичной принадлежности.

Среди больных, обратившихся в поликлинику в первую неделю обострения, у которых подтверждена контаминация кожи бактериями (42 больных), выделена группа лиц, контаминированных золотистым стафилококком ($n=20$). У 3-х больных с тяжелой формой АД была микст – инфекция, у 2-х – сочетанное поражения грибами и бактериями. В этой группе больных имела тенденция к снижению уровня хемилюминесценции по мере усиления тяжести заболевания (Таблица 14).

Индукцированная 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 14). Таким образом, контаминация кожи бактериальной инфекцией при АД обуславливает снижение хемилюминесценции клеток крови, как спонтанной, так и индуцированной зимозаном или дрожжами рода *Candida tropicalis* [10].

Таблица 14.

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 хемилюми- несценция	1083 ± 124	921 ± 109	887 ± 126	862 ± 148
Индукцированная 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

По имеющимся литературным данным у больных с тяжелой формой АД и бактериальной контаминацией показано снижение функциональной активности нейтрофилов, которое связано в некоторых случаях с нарушением рецепторного аппарата клеток [10]. Рецепторы TLR4 распознают бактериальный ЛПС грамотрицательных бактерий, а рецепторы TLR2 распознают грам-положительные бактерии, бактериальные пептиды и дрожжи. Кроме того, гранулоцитарно-макрофагальный колонии стимулирующий фактор (GM-CSF) повышает экспрессию рецепторов TLR2 и связывание их с лигандами. Поэтому дефицит GM-CSF также может вызывать нарушение антибактериальной функции нейтрофилов. Наиболее клинически значимыми контаминантами кожи при АД являются: *Malassezia*

spp., *Candida spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Dermatophagoides pteronyssinus* [151; 167]. Однако, по нашим данным, контаминация кожи условно патогенными дрожжами *Candida tropicalis* у больных АД легкой степени тяжести не приводила к подавлению хемилюминесценции, ни спонтанной, ни индуцированной. Более того, в первую неделю начала обострения уровень хемилюминесценции был повышен по сравнению с донорами. Учитывая очень малую выборку в данном случае можно говорить только о тенденции. Для больных тяжелой формой АД все определяемые показатели были достоверно снижены, что вполне соответствует литературным данным [10; 129; 132; 175].

Значение полученных результатов определяется тем, что показана стимуляция генерации супероксидного аниона клетками крови больных АД в первые дни обострения заболевания при легкой степени тяжести и ограниченно-локализованном типе процесса. Повышение генерации супероксидного аниона в тканях влечёт за собой повышение уровня гидроксильного радикала, который является более мощным окислителем. Кроме того, при взаимодействии супероксидного аниона с молекулой окиси азота образуются реактивные метаболиты азота, высокая концентрация которых способствует развитию патологических изменений в тканях. Контаминация кожи условно патогенными дрожжами *Candida tropicalis* повышает как спонтанную, так и индуцированную хемилюминесценцию клеток крови больных АД. Таким образом, как нормальная, так и повышенная активность нейтрофилов в первые дни заболевания может приводить к порочному кругу, когда средства антибактериальной защиты являются причиной развития патологических изменений в коже.

При тяжелой форме АД функциональная активность нейтрофилов достоверно снижена, что согласуется с рядом публикаций зарубежных авторов [10; 129; 132; 175].

Подводя итог проведенному исследованию можно утверждать, что генерация супероксидного аниона клетками крови больных АД зависит от тяжести течения заболевания и степени распространённости процесса. У больных легкой степенью АД или при ограниченно-локализованном типе процесса показано небольшое повышение спонтанной и индуцированной хемилюминесценции. Контаминация кожи условно патогенными дрожжами *Candida tropicalis* сопряжена с повышением спонтанной и индуцированной хемилюминесценции клеток крови больных АД в первые дни обострения заболевания при легкой степени процесса [10].

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

В данном разделе работы представлены результаты обследования больных АД, приходивших для контроля лечения, в стадии ремиссии (n=16), а также больных в начальной стадии обострения АД (n=36). Для проведения этого исследования были отобраны только мужчины с целью исключения влияния гормональных колебаний на показатели активности нейтрофилов. Возраст лиц, участвовавших в исследовании, был от 18 до 27 лет для унификации возрастных изменений метаболизма. Донорами были молодые здоровые мужчины в возрасте 18–27 лет (n = 22), проходившие обследование для зачисления на службу, все участвовали в проведении данного эксперимента добровольно [11]. Всем больным проведены биохимические исследования, показатели внутри групп имели минимальный разброс. У всех больных АД с раннего детства, длительность заболевания от 12 до 14 лет. Тяжесть состояния больных оценивали по индексу SCORAD [11].

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. Таким образом, забор крови осуществлён четыре раза у каждого больного и донора [11].

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 (PMA) [105]. PMA и fmlp активируют разные сигнальные пути в нейтрофилах: fmlp катализирует фосфорилирование Lyn киназы, перемещение адаптера Tec из цитозоля ко внутренней поверхности плазматической мембраны, далее происходит фосфорилирование киназ AKT, p38 MAPK, фосфолипазы PLC γ 2, протеинкиназы C и затем сигнал передаётся на мембранно-связанную субъединицу NADPH оксидазы p47phox, что приводит к активации фермента [113]. Действие fmlp на нейтрофилы зависит от концентрации, в больших дозах он действует как агонист кальциевых каналов TRPV1 и стимулирует развитие стресса в клетке. PMA активирует сигнальные пути киназ p38 MAPK и ERK, что является предшествующими событиями при активации NADPH оксидазы и генерации супероксидного аниона [11; 97].

Известно, что PMA может стимулировать как NADH, так и NADPH, что, соответственно, даёт продукцию NAD(P)⁺ или супероксида. В связи с локализацией NADPH оксидазы в плазматической мембране нейтрофилов, её активность может регулироваться локальным изменением концентрации pH. Оптимальным для стимуляции NADPH является pH 7,0, при котором активность NADH снижена [11; 157]. Поэтому при проведении измерений все растворы были доведены до pH 7,0.

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 6) [11].

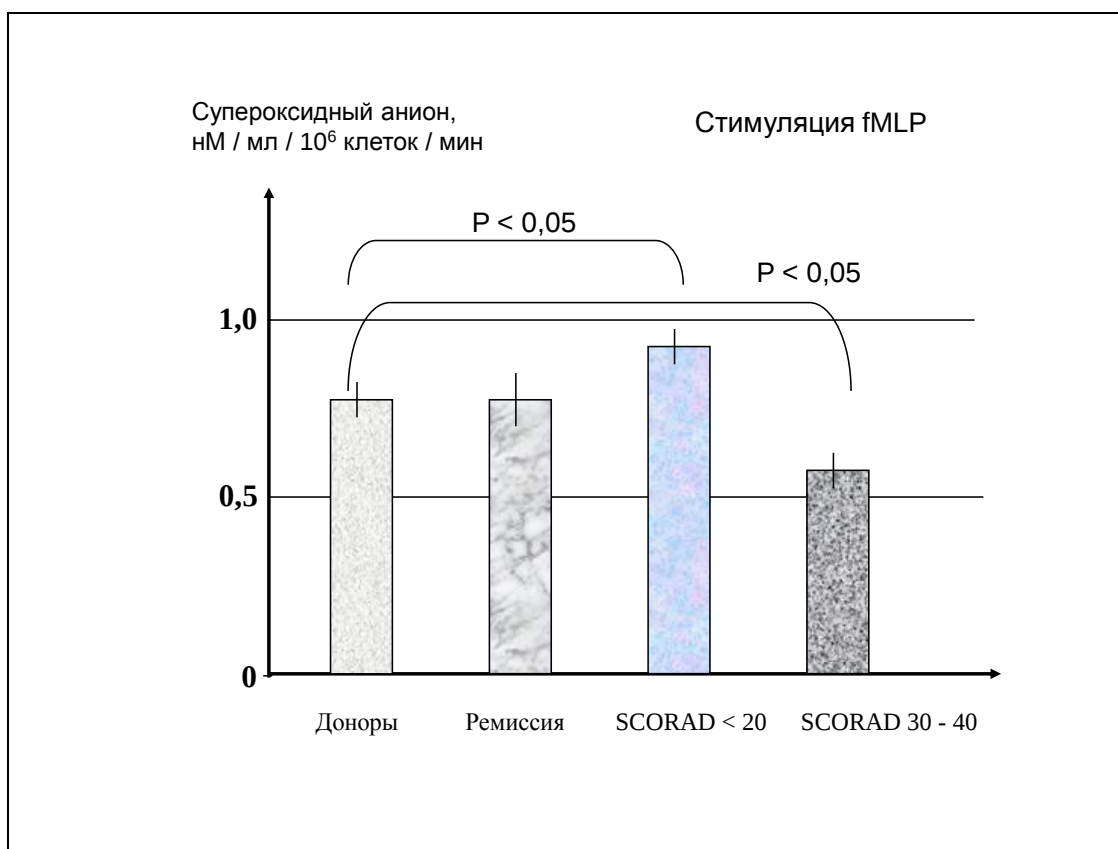


Рисунок 6. Стимулированная fmlp продукция супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови больных атопическим дерматитом в стадиях обострения и ремиссии по сравнению со здоровыми донорами.

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, $P < 0,05$) [11].

Активация NADPH оксидазы нейтрофилов может быть обусловлена не только связыванием рецепторов, в том числе рецепторов для fmlp, но и непосредственным действием на фермент, что имеет место при добавлении форболового эфира (PMA). Уровень генерации супероксидного аниона при стимуляции PMA 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 15) [11].

Таблица 15.

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

	Доноры (n = 22)	Больные атопическим дерматитом Классификация по индексу SCORAD		
		Ремиссия (n = 16)	Легкая степень (n = 15)	Средняя тяжесть (n = 21)
Уровень $O_2^{\bullet-}$	$1,21 \pm 0,12$	$1,33 \pm 0,21$	$1,77 \pm 0,17$	$0,93 \pm 0,11$
$P < 0,05$ (по отношению к донорам)			+	+

Практически все литературные источники представляют результаты исследования нейтрофилов крови, взятой натощак. Однако функционирование клеток происходит при разных физиологических состояниях, в том числе после приема пищи. В этом случае нейтрофилы подвергаются дополнительному воздействию липопротеидов и различных компонентов пищи. Для изучения динамики активности нейтрофилов крови больных АД был проведен физиологический эксперимент с приемом стандартного завтрака, после которого осуществлен почасовой забор крови.

На Рисунке 7 представлены результаты обследования доноров [11].

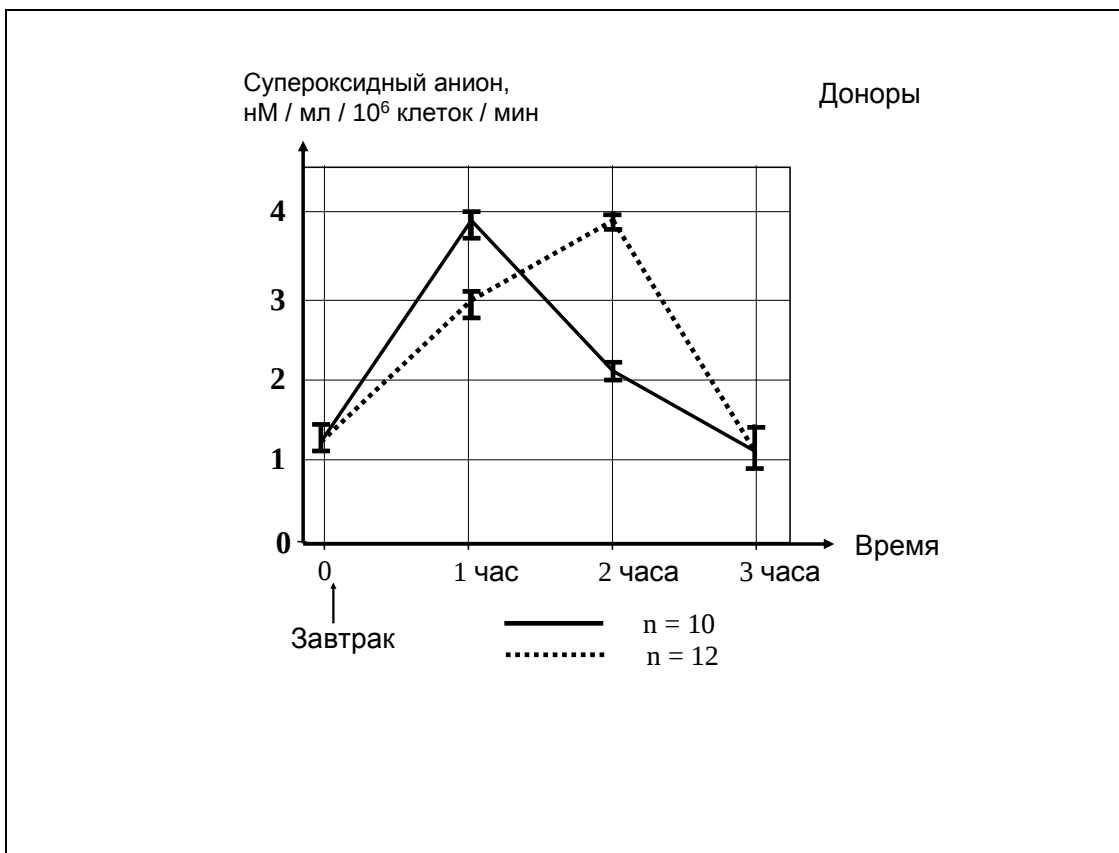


Рисунок 7. Динамика генерации супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови доноров при стимуляции форболовым эфиром (РМА). Измерения проведены натощак и каждый час после приёма стандартного завтрака.

Несмотря на однородность группы доноров по возрасту, полу и биохимическим показателям, среди них четко выделялись две подгруппы. В одной из них пик активности нейтрофилов приходился на первый час после приема завтрака, тогда как другая подгруппа доноров реагировала с замедлением пика активности до второго часа после завтрака. Однако у всех обследованных лиц концентрация высвобождаемого супероксидного аниона приходила к первоначальному уровню через 3 ч после завтрака [11].

По сравнению с донорами больные АД в стадии ремиссии отвечали более однородно (Рисунок 8), 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 [11].

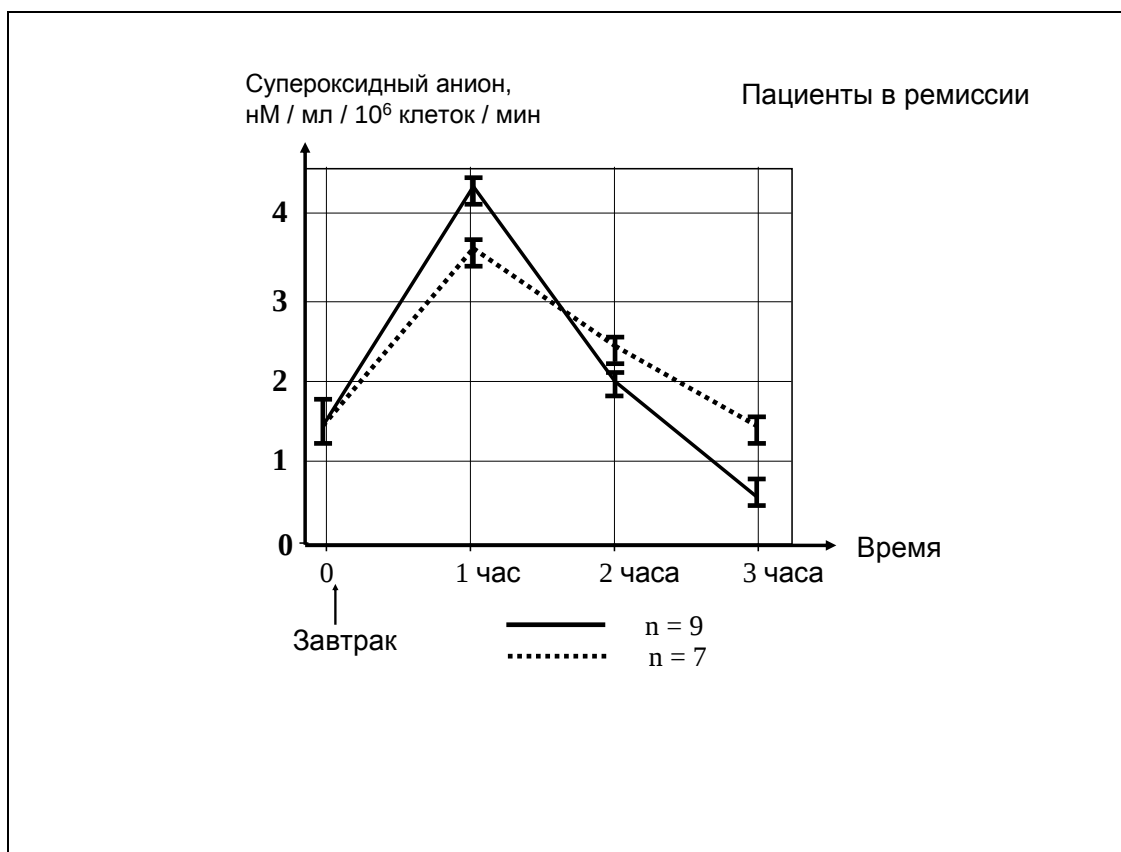


Рисунок 8. Динамика РМА – стимулированной генерации супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови больных атопическим дерматитом в стадии ремиссии.

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 9 и Рисунок 10), 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 [11]. Имеются существенные различия в форме кривой, отражающей динамику генерации супероксидного аниона нейтрофилами, для больных АД в разные периоды течения заболевания.

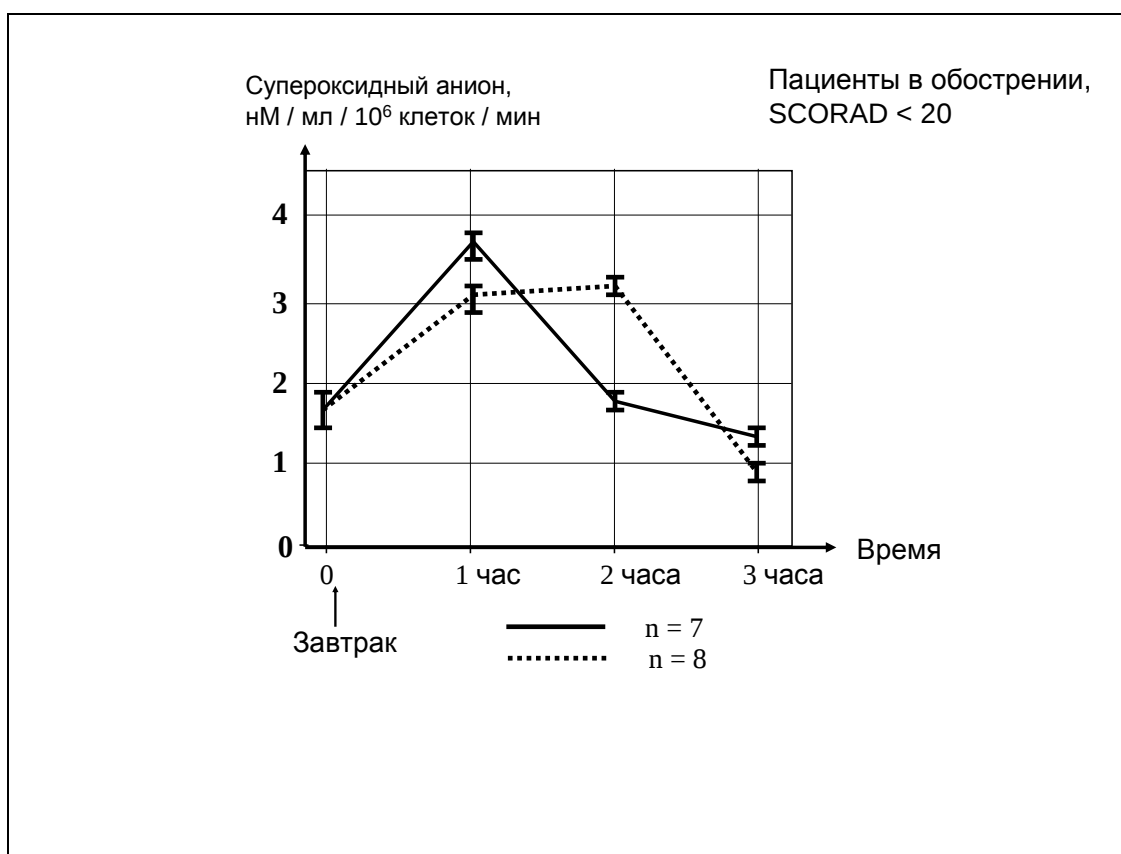


Рисунок 9. Динамика РМА – стимулированной генерации супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови больных в начале обострения АД при легком течении заболевания.

Измерения проведены натощак и каждый час после приёма стандартного завтрака.

Ингибирование функции нейтрофилов может быть за счёт ряда

факторов, связанных, в том числе, с наличием бактериальной инфекции. Некоторые бактерии выделяют вещества, работающие как скавенджеры реактивных метаболитов кислорода, а также синтезируют тромболитические агенты, подавляющие активность нейтрофилов и запускающие сигналы апоптоза. Повышение уровня гистамина у больных аллергией также ингибирует дегрануляцию нейтрофилов под действием fmlp [76].

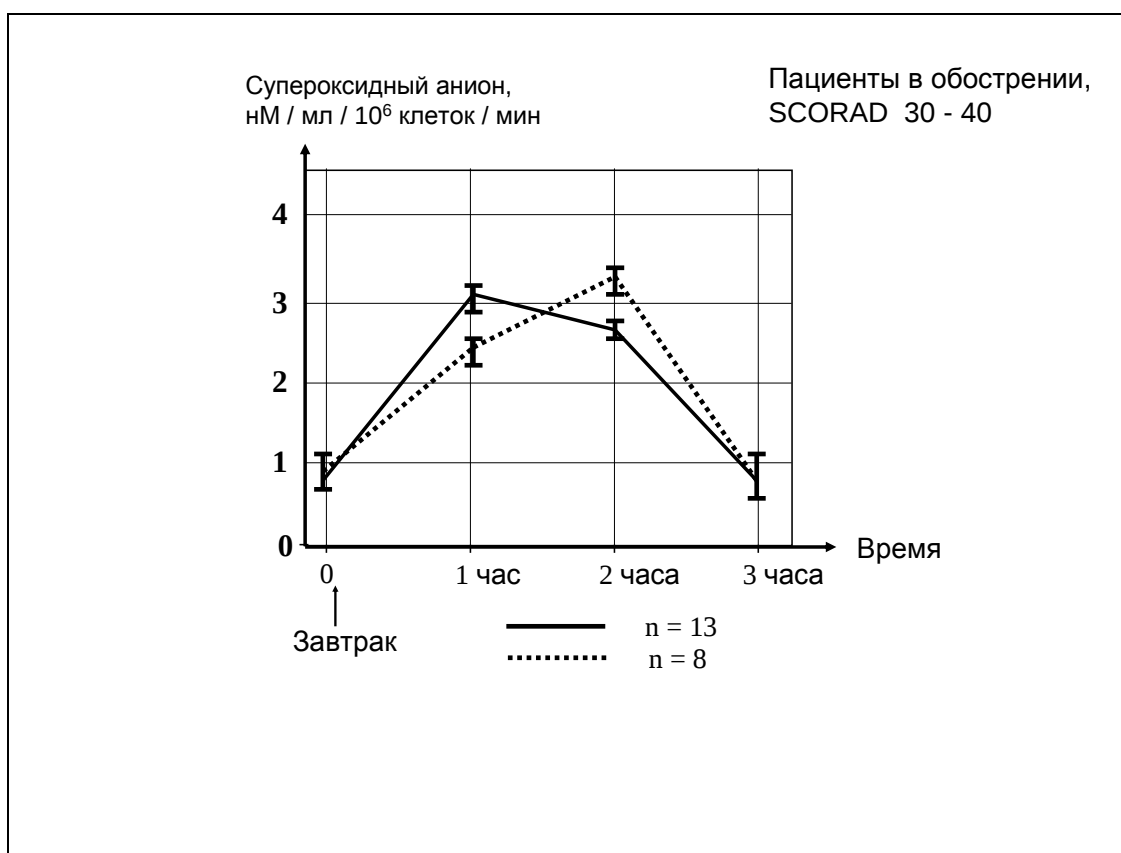


Рисунок 10. Динамика РМА–стимулированной генерации супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови больных АД в начале обострения при средней степени активности процесса.

Измерения проведены натощак и каждый час после приёма стандартного завтрака.

В настоящее время принято считать, что если у больных АД нет снижения активности нейтрофилов, то они не имеют выраженной бактериальной контаминации. В нашем исследовании в группе с легкой

степенью АД не было больных с достоверной бактериальной инфекцией [10]. Однако у большей части больных со средней тяжестью течения заболевания была выраженная бактериальная контаминация, что могло оказать влияние на результаты исследования.

Ингибирование функциональной активности нейтрофилов может быть также за счёт психологического стресса [65], который испытывают больные при обострении заболевания [11]. Острый ментальный стресс обуславливает снижение продукции супероксидного аниона нейтрофилами [98].

Исследование выделенной популяции нейтрофилов (с чистотой более 92% клеток в суспензии), которые поддерживают в течение нескольких часов оптимальную функциональную активность, позволяет проводить сравнительные исследования влияния разных факторов для одного и того же больного [11]. В данной работе было установлено, что нейтрофилы больных существенно различаются по уровню генерации супероксидного аниона в ответ на рецепторзависимые стимулы (fmlp) и в ответ на прямой активатор кислородного взрыва – форболовый эфир (РМА). Известно, что действие fmlp на нейтрофилы зависит от концентрации, при 1 мкМ он индуцирует поляризацию клеток и дегрануляцию с выходом лактоферрина [76]. В нашей работе fmlp оказывал достоверно менее выраженный эффект на генерацию супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови. По данным литературы, одним из феноменов воспаления является фактическая десенсибилизация, обусловленная связыванием G-протеин сопряженных рецепторов хемотаксическими пептидами, привлекающими нейтрофилы в очаг воспаления, так как эти рецепторы становятся недоступными для других лигандов, в частности, для fmlp. Это показано при стимуляции fmlp нейтрофилами с целью генерации супероксидного аниона [11; 94].

Несмотря на различные сигнальные пути, сопряженные с fmlp и РМА в нейтрофилах человека, их эффекты в отношении нейтрофилов больных и здоровых доноров показывают сходную тенденцию [11]. Так, у больных АД

легкой степени тяжести в начале процесса обострения наблюдается повышение уровня генерации супероксидного аниона по сравнению со здоровыми донорами. У больных с более выраженными клиническими признаками заболевания и контаминированных бактериальной инфекцией, генерация супероксидного аниона нейтрофилами достоверно супрессирована и, кроме того, существенно изменена динамика активности клеток в ответ на физиологические воздействия.

В данной работе впервые изучена динамика активности нейтрофилов крови больных АД в физиологических условиях после приёма стандартного завтрака [11]. Эти исследования интересны не только с точки зрения сравнения показателей больных и здоровых людей, но также и для понимания естественных процессов, происходящих в организме. Все люди регулярно принимают пищу, макронутриенты и микронутриенты которой оказывают существенное влияние на активность клеток иммунной системы [11]. Проведенными нами исследованиями установлено, что приём пищи оказывает разное действие на активность нейтрофилов больных и здоровых лиц. Следует подчеркнуть, что для этого эксперимента группы больных подбирались не рандомизировано, а только по идентичности таких показателей, как пол, возраст, но и по состоянию функционирования организма, то есть по здоровью, чтобы минимизировать естественные колебания активности нейтрофилов. Даже при такой выборке имелись различия в пике концентрации супероксидного аниона, который у ряда здоровых доноров приходился на первый час после приёма завтрака, а у других лиц – на второй час. То есть у молодых здоровых людей активность нейтрофилов периферической крови достоверно различается [11].

Ещё в прошлом веке была установлена гетерогенность циркулирующих в кровяном русле нейтрофилов на основании электрического заряда на поверхности клеток и электрофоретической подвижности клеток. Наименее электронегативные клетки генерируют супероксид в два раза больше максимально электронегативных клеток [11;

70]. С точки зрения современных представлений об активности клеток мы предполагаем, что уровень генерации супероксидного аниона определяется, в том числе, активацией сигнальных путей апоптоза. У доноров, не имеющих атопии в анамнезе, могла быть бактериальная инфекция, не выявленная при внешнем осмотре, а при этом нейтрофилы этих лиц отвечали активацией апоптоза, что могло изменить временной характер генерации супероксидного аниона.

Таким образом, показано изменение уровня генерации супероксидного аниона у больных АД под действием fmlp и РМА, а также установлена различная динамика выброса супероксида при активации нейтрофилов РМА. Эти показатели отражают окислительный статус больных. 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 [11].

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

В данном разделе работы представлены результаты обследования 54 больных АД и 18 доноров (все мужчины в возрасте 18–38 лет). Среди больных была выделена группа из 12 человек, у которых при посеве смывов с кожи верифицирована контаминация *Rhodotorula spp.*. Обращает на себя внимание достаточно высокий процент контаминации этим патогеном, хотя обычно принято считать, что преимущественно высевается *Candida albicans*. У 4-х больных из этой группы определен микст – одновременная контаминация двумя вышеуказанными грибами. 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 (18 больных), или верифицирована бактериальная контаминация (24 больных).

В норме процент фагоцитирующих клеток крови составляет от 30 до 52%, однако, этот показатель зависит от использования тест-системы. При исследовании фагоцитарной активности крови больных в модельной системе с использованием дрожжей *Rhodotorula spp* в норме бывает от 20 до 32% фагоцитировавших клеток. Пример фагоцитарной активности очищенной популяции нейтрофилов больных АД, контаминированных *Rhodotorula spp*, и здоровых доноров приведен на Рисунках 11 и 12. При анализе данных следует обратить внимание на различия в гейтах нейтрофилов больных и доноров. У доноров большинство нейтрофилов являются фагоцитирующими, тогда как у больных гейт фагоцитирующих клеток существенно меньше. Числовые значения процента фагоцитоза для доноров составили $25 \pm 3\%$, для больных атопическим дерматитом без верифицированной контаминации кожи $21 \pm 5\%$, для больных с бактериальной контаминацией $18 \pm 6\%$, для больных, контаминированных *Rhodotorula spp.*, $8 \pm 5\%$.

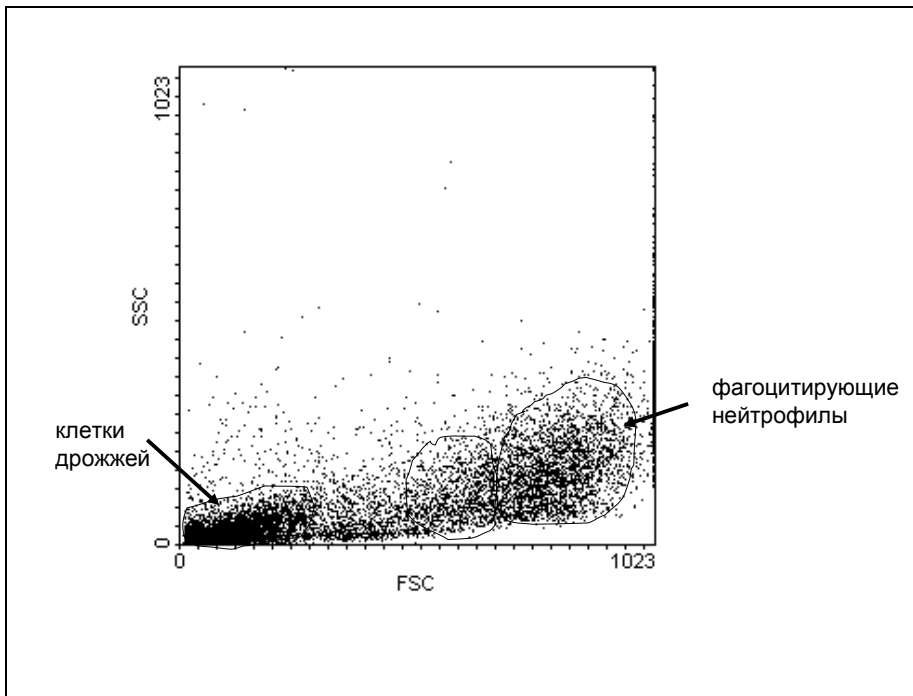


Рисунок 11. Данные проточной цитометрии по измерению процента нейтрофилов (периферической крови доноров), фагоцитировавших клетки дрожжей *Rhodotorula spp.*

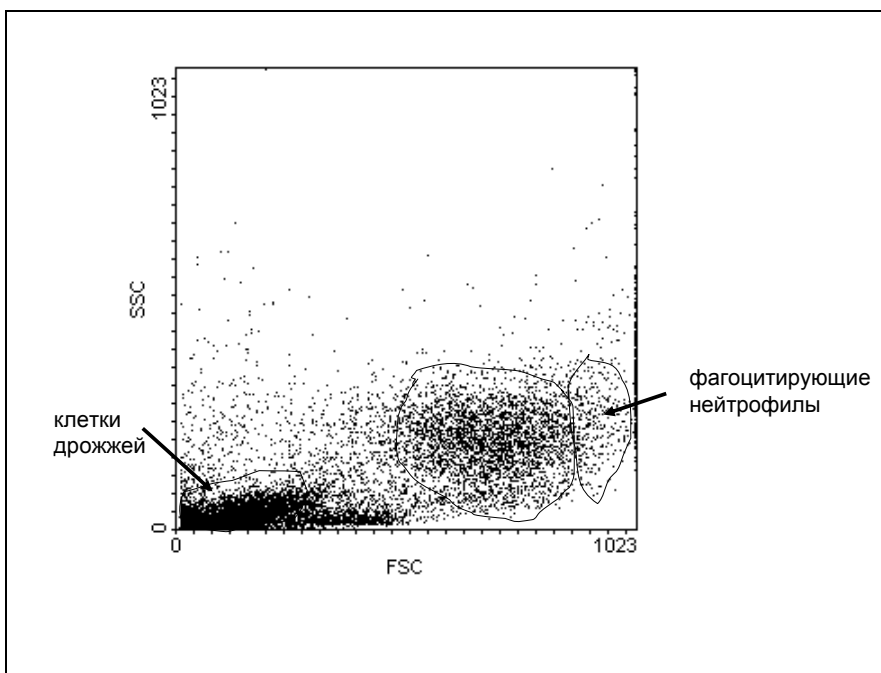


Рисунок 12. Данные проточной цитометрии по измерению процента нейтрофилов (периферической крови больных атопическим дерматитом),

фагоцитировавших клетки дрожжей *Rhodotorula spp.*

На Рисунке 13 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.*.

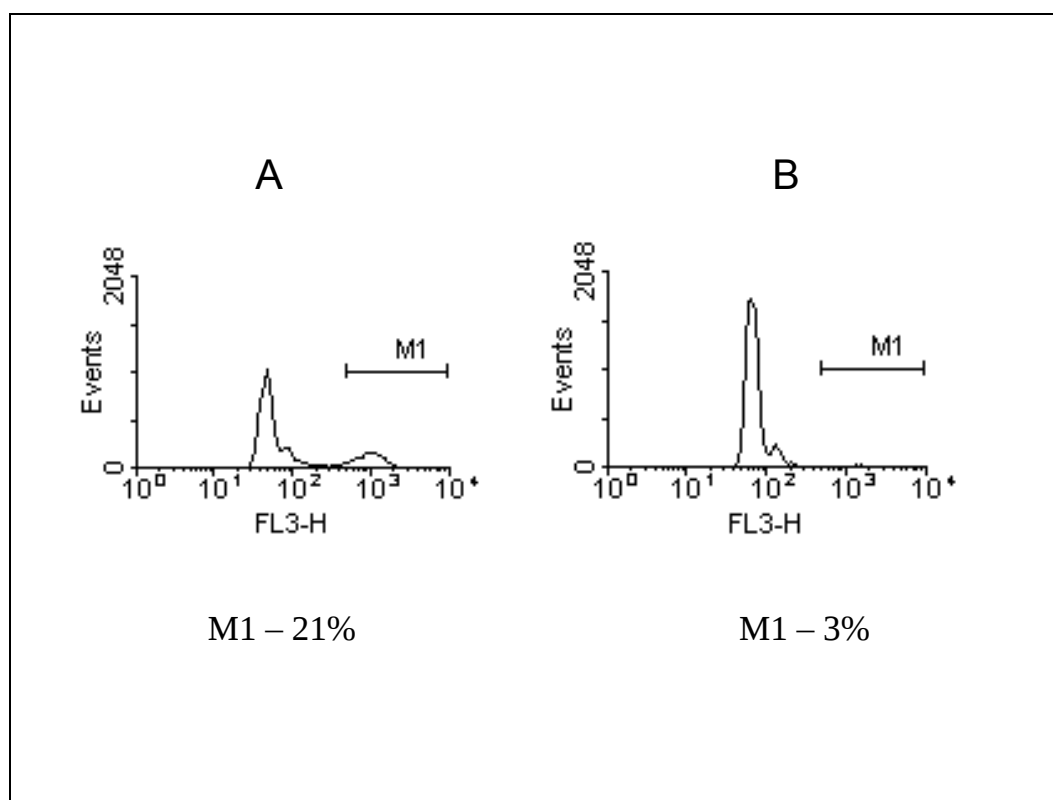


Рисунок 13. Данные проточной цитометрии по измерению процента нейтрофилов периферической крови больных атопическим дерматитом и больных атопическим дерматитом, контаминированных *Rhodotorula spp.*, фагоцитировавших клетки дрожжей *Rhodotorula spp.*

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; в группе больных с контаминацией *Rhodotorula spp.* можно говорить просто о подавлении этой функции нейтрофилов. Поскольку фагоцитоз дрожжей определяется, в том числе, уровнем экспрессии рецепторов, можно говорить, что у данной группы больных АД имеются нарушения рецепторного аппарата фагоцитов и их функциональной активности.

Таким образом, можно сделать вывод об изменении показателей фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови больных АД, которые усугубляются при наличии контаминации кожи микроскопическими плесневыми грибами.

Метод определения процента клеток, фагоцитировавших дрожжи, оказался наиболее оптимальным для анализа на проточном цитометре, так как крупные клетки дрожжей дают четкое облако поглощения, которое можно первоначально оценить без применения красителей. Использование окраски пропидиумом иодидом позволяет количественно измерить процент фагоцитирующих нейтрофилов, что важно для проведения сравнительных исследований.

Значение условно патогенных дрожжей *Rhodotorula spp.* в клинической практике определяется повышением их контагиозности на фоне изменения иммунного статуса организма. Оппортунистический патоген *Rhodotorula spp.* начинает быстро колонизировать пациентов при наличии онкологических заболеваний [174], при рассеянном склерозе [42], при многих кожных заболеваниях, при этом штаммы дрожжей, выделенных из кожи, достаточно устойчивы к антимикотическим средствам [150].

В настоящее время контаминация кожи человека условно патогенными дрожжами изучается недостаточно широко. Эта проблема в связи с АД начала разрабатываться в конце прошлого века, когда было проведено сравнение контаминации кожи больных АД со здоровыми людьми. Было показано, что микологические проблемы кожи встречаются в 2 – 5 раз чаще у лиц с тяжелым течением АД. У 39% больных АД (vs 3%

здоровых доноров) обнаружена контаминация кожи дрожжами [42]. В этой работе *Rhodotorula spp.* высевалась в 21% случаев, хотя позднее было показано, что *Rhodotorula spp.* составляет ~29% от всех азурофильных дрожжей, выделенных из кожи больных АД [44].

В сыворотке больных АД часто выявляют IgE специфические антитела к *Rhodotorula rubra* [183]. Изучался ответ IgA, IgG и IgE на *Candida albicans*, *Candida Utilis*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, а также перекрестная реактивность для этих дрожжей. У больных АД при пробах с введением аллергена (prick test) в 60% случаев выявлена перекрестная реактивность на, как минимум, два из пяти протестированных аллергенов. Больные АД, сенсibilизированные к *Candida albicans*, могут давать аллергические реакции на другие дрожжи, в том числе *Rhodotorula spp.* [149].

Компонентами природного иммунитета к грибковой инфекции являются макрофаги и нейтрофилы, распознающие так называемые «патоген-ассоциированные молекулярные паттерны» (PAMPs), присутствующие на стенках клетки грибов, через рецепторы PRR (паттерн–распознающие рецепторы), которые экспрессируются на плазматической мембране, эндосомах и в цитоплазме фагоцитов. К PRRs относятся рецепторы TLR (Toll-подобные рецепторы), CLR (рецепторы лектина С-типа) и NLR (Nod-подобные рецепторы). Именно благодаря этим рецепторам фагоциты могут поглощать грибы и разрушать их в фагосомах, используя окислительные механизмы и антимикробные пептиды [144].

В процессе взаимодействия клеток патогенов с фагоцитами есть несколько стадий – это миграция, распознавание, поглощение, созревание фагосом и обязательный киллинг патогенна (или фагоцита). Миграция в сторону дрожжей определяется только уровнем гликозилирования стенки дрожжей. Поглощение уже прикрепившихся клеток дрожжей определяется их морфологией – гифы поглощаются медленнее дрожжевых клеток. Макрофаги преимущественно фагоцитируют *Candida albicans* в виде клеток

дрожжей, а не в форме гифов [96]. Подобные взаимодействия между макрофагами и патогенами показаны не только для *C.albicans*, но для других плесневых грибов. Если макрофаг поглотил 4 и более патогенов, он погибает, если менее 4 – то выживает в 50%. Гифы чаще вызывают гибель макрофагов, однако и клетки дрожжей также токсичны для макрофагов, в которых они ингибируют митоз. Для патогенных дрожжей описан феномен нелитического выхода из фагоцитов. При этом происходит латеральный перенос патогена между клетками организма хозяина [47].

Нейтрофилы играют более значимую роль в клиренсе патогенных дрожжей, чем макрофаги. Если в фагосомах макрофагов у дрожжей есть шанс экзоцитоза, то в нейтрофилах его нет за счёт активности миелопероксидазы и α -дефенсинов. Кроме того, за счёт формирования NETs патогенные дрожжи могут быть уничтожены экстраклеточно при незавершенном фагоцитозе [47]. Основным противогрибковым компонентом NETs является кальпротектин, его отсутствие приводит к потере фунгицидной активности. Нейтрофилы быстрее макрофагов мигрируют в очаг поражения грибковой инфекцией и быстрее поглощают патогены. В пораженном грибами организме человека антифунгальная активность нейтрофилов определяется многими факторами, в том числе, уровнем хемокинов, концентрацией цитокинов, расположением инфильтрата грибов, числом фагоцитов, доступностью пораженного очага [47]. Используя прижизненную конфокальную микроскопию, показано, что нейтрофилы эффективно защищают организм только тогда, когда они накапливаются в очаге поражения в первые двое суток после инфицирования, дополнительное привлечение нейтрофилов после того срока не оказывает положительного эффекта. Для нейтрофилов имеется органная специфичность в накоплении в очаге поражения, так как органы имеют разный уровень секреции хемокинов [117]. У тех больных, у которых имеется нейтропения или снижение активности нейтрофилов, может развиваться генерализованная грибковая инфекция.

В ответ на поглощение фагоцитами у патогенных дрожжей происходит синтез каталазы и нескольких супероксиддисмутаз, которые детоксицируют ROS, продуцируемые макрофагами [82]. Благодаря этому патогенные дрожжи оказываются резистентными к фагоцитарной активности макрофагов и персистируют 2 – 3 дня до тех пор, пока окончательно не лизируются новыми макрофагами.

В итоге, у больных АД выявлены разные уровни активности нейтрофилов (то есть активность кислородного взрыва и фагоцитоза) в зависимости от наличия или отсутствия сопутствующей грибковой или бактериальной контаминации. Следует отметить, что имеется некий порочный круг, когда ослабление рецепторного аппарата фагоцитов приводит к первичному накоплению грибов в очаге поражения, а затем активность этих патогенов, уничтожающих макрофаги, обуславливает их генерализованное распространение.

6.4 Экспрессия рецепторов нейтрофилов TREM-1 при атопическом дерматите

В данную часть работы по изучению экспрессии TREM-1 на нейтрофилах периферической крови больных АД в зависимости от активности процесса и уровня генерации супероксидного аниона вошли данные исследования 22 доноров и 70 больных АД (все мужчины в возрасте от 18 до 32 лет), донорами были военнослужащие, проходившие медицинскую комиссию, все добровольно подписывали форму информированного согласия на анонимное участие в данном исследовании [29].

Больные АД были разделены на группы по тяжести течения заболевания согласно индексу SCORAD (< 20 единиц – легкое течение (n=15), 30–40 единиц – течение средней тяжести (n=26), 40–60 – тяжелое течение (n=14)). В состоянии ремиссии находились 15 пациентов. 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 [24].

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 [29].

Таблица 16.

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

	Доноры (n = 22)	Больные атопическим 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 атопического 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 [29].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

АД – это многоэтиологическое заболевание, в котором наследственность играет важную роль и в последнее время случаи выявления наследственного АД становятся все чаще. Наследуется основной ген, который определяет клинические изменения кожи и дополнительные гены, которые отвечают за частоту ремиссий и обострений, отвечают за триггерные механизмы, за наличие сопутствующих заболеваний. Таким образом, АД полигеннонаследуемое заболевание.

Если смотреть в процентном соотношении, то при наличии АД у обоих родителей 80% вероятность, что и ребенок будет болеть; если болен, только один из родителей, особенно если больна мать, то вероятность наследственного АД -56%. Сопутствующие заболевания часто встречаются у ближайших родственников (например, бронхиальная астма 28%). Прослеживая наследование АД у близнецов, выявили частоту встречаемости АД у гомозиготных близнецов 80%, у гетерозиготных – 20%.

Таким образом, основной ген приводит к началу заболевания, под воздействием окружающей среды ребенка (питание, домашняя пыль, и т.д.) и реализует наследственную предрасположенность. Недавние исследования показали, что экологические и климатические факторы, а также стресс играют важную роль в повышении риска развития АД у детей. Некоторые факторы оказывают защитное действие против развития АД, включая пробиотические добавки и увлажняющие средства, даже при наличии генетической предрасположенности [179].

Окружающая среда ребенка, влияет и на наличие обострений, их частоту и хронический характер течения. Способность факторов окружающей среды влиять на тот или иной организм зависит от возраста больного и его индивидуальных особенностей (состояние нервной, иммунной, пищеварительной и эндокринной системы).

Хронический воспалительный процесс при АД поддерживается

наличием на коже грибковой флоры (грибов рода *Rhodotorula*, *Candida*, мицелиальных дерматофитов, *Malassezia furfur*). Грибы действуют при патогенезе АД как индукторы аллергических специфических IgE, дополнительно стимулируют дермальные лимфоциты и способствуют развитию сенсибилизации.

В конечном итоге, начало заболевания АД складывается из наследственной предрасположенности, состоянием иммунной, пищеварительной и других систем больного и влиянием экзогенных средовых факторов.

Во время лечения больных АД перед дерматологами встает задача диагностической и прогностической оценки клинической картины заболевания, лабораторных показателей и выбора рациональной патогенетической терапии.

В нашей работе мы исследовали состояние системы цитокинов, выявили объективные критерии интенсивности деструктивных процессов при АД, изучили состояние антидеструктивной системы (антипротеолитического потенциала), а также определили степень воспаления в тканях больных АД путем определения функциональной активности нейтрофилов и зависимость активности нейтрофилов от наличия или отсутствия сопутствующей грибковой или бактериальной контаминации кожи АД.

Нами проведено комплексное клинико-иммунологическое обследование 144 больных АД: из них 30,6% женщин и 69,4% мужчин в возрасте от 18 до 56 лет. У преобладающего большинства пациентов дебют заболевания приходился на возраст до 2-х лет.

Изучение наследственности позволило выявить у 20,8% больных АД у близких родственников, а у 4,2% – отягощенный семейный анамнез по atopическим заболеваниям.

Изучение аллергологического анамнеза показало, что 52% пациентов связывали обострение процесса с нарушением питания, 26% - с приемом

лекарственных средств, 15% – с контактом с ингаляционными аллергенами.

Это подтверждает тот факт, что наибольший процент среди экзогенных средовых факторов, которые влияют на развитие генетически предрасположенного АД и его хронизацию, принадлежит пищевым продуктам.

Такой пусковой механизм, как пищевые продукты начинает оказывать свое влияние в раннем детстве. Это может приводить как к однократной манифестации заболевания, что у многих проходит и без обращения к врачу, так и у части больных переходит в хронический АД с периодическими обострениями.

У большинства пациентов жалобы сводились к мучительному зуду, раздражительности, нарушению сна, высыпаниям на коже. Хронический зуд являлся одним из основных симптомов и существенно снижал качество жизни пациентов, что согласуется с данными литературы [170].

Распределение больных по формам клинического течения показало, что преобладали больные с эритематозно-сквамозной формой АД с лихенизацией (у 55,5%) и эритематозно-сквамозной (у 30,6%). Клинические проявления различных вариантов течения АД были типичными. Зуд является постоянным симптомом.

Следует отметить, что выражен первичный и вторичный полиморфизм заболевания. Особенности течения АД в современном мире становятся: очень ранняя манифестация – проявление клинических признаков с одомесячного возраста; с каждым годом все более тяжелое течение с частыми обострениями и редкими светлыми промежутками; площадь поражения увеличивается даже при первых эпизодах болезни у детей; стали не редки эритродермии; очень часто острое начало заболевания переходит в хроническое течение, сочетание АД с хронической патологией внутренних органов и заболеваниями нервной системы, изменения в иммунной системе; рост количества больных с резистентностью к терапии; ранняя инвалидизация. Количество больных с сочетанием АД и

бронхолегочной атопии значительно увеличилось в последние годы (аллергический ринит, атопическая бронхиальная астма). Это сочетание дермато-респираторных клинических признаков аллергии (дермореспираторный синдром), отмечаются «атопические качели» (переход от прогрессирования респираторных аллергических патологий к кожным симптомам и наоборот).

Возрастание количества тяжелых форм течения АД зависит от воздействия ряда факторов окружающей среды. Тяжелое течение АД значительно влияет на психоэмоциональное, физическое развитие детей; снижает их способность к обучению и работоспособность. Тяжелые формы АД приводят к расстройствам системы желудочно-кишечного тракта (до 100%); росту числа детей с вертеброневрологической патологией, астеноневротическим синдромом; им все чаще ставят такой диагноз как синдром гиперреактивности. Дети с тяжелым течением АД очень часто имеют различные психоэмоциональные нарушения, они очень плохо адаптируются социально. Кроме основных факторов окружающей среды, которые приводят к развитию тяжелых форм течения АД можно выделить еще и дополнительные, такие как, нарушения кормления грудных детей; не соблюдение режима питания в дальнейшем; частые инфекционные заболевания: паразитарные, бактериальные и вирусные заболевания и их сочетанное действие на растущий организм; самостоятельное, без назначения врача, применение антибиотиков и большого количества других медикаментов; психоэмоциональные травмы полученные в семье, дошкольных учреждениях, школе; неправильная оценка родителями состояния ребенка.

При распределении больных по распространенности патологического кожного процесса было выявлено, что локализованный характер поражения отмечен у 48,7%, распространенный – у 44,4%, диффузный – у 10%. Легкая степень тяжести диагностирована (с учетом iSc) у 50% больных, среднетяжелая – у 40,3%, тяжелая – у 9,7%.

Иммунологическое исследование было проведено 44,4% пациентам. Оказалось, что в группе больных с легким течением АД отмечалась тенденция к снижению Т-хелперов (CD4+) – до $35,19 \pm 5,96$, соответственно изменялся индекс CD4+/CD8+ – до $1,03 \pm 0,23$. В группе со средней степенью тяжести общее количество Т-лимфоцитов (CD3+) было статистически значимо снижено – до $45,62 \pm 17,56$, при этом отмечались тенденция к снижению Т-хелперов (CD4+) – до $33,5 \pm 8,06$ и повышение количества Т-супрессоров (CD8+) и В-лимфоцитов – до $21,17 \pm 4,83$ и до $15,32 \pm 5,57$ (соответственно). В группе с тяжелым течением статистически значимо были снижены показатели Т-хелперов (CD4+) и всех Т-лимфоцитов (CD3+) – до $29 \pm 7,05$ и $40,42 \pm 16,23$ (соответственно), отмечалась тенденция к снижению В-лимфоцитов – до $10,86 \pm 5,17$. Индекс CD4+/CD8+ был выше нормы – $1,68 \pm 0,1$.

Полученные нами данные не отличаются от принятой теории четырех видов иммунных разновидностей АД: так у одних АД протекает при увеличении первый количества CD8+-лимфоцитов с нормальным уровнем IgE; у других сочетается высокое и среднее содержание IgE с нормальным числом CD4+ и CD8+-лимфоцитов; у третьих различные значения IgE и всегда высокое содержание CD4+-лимфоцитов; у четвертых также различные значения IgE при снижении CD4+ и CD8+-лимфоцитов [3; 14]. Иммунологически разные виды коррелируют с различным клиническим течением АД.

Таким образом, иммунные изменения при АД различны, степень их выраженности также различна, это свидетельствует, что возможности организма у всех больных АД по-разному мобилизуют свои защитные силы.

Все таки мы должны отметить тот факт, что активность иммунной системы и ее отдельных звеньев, конечно, чаще всего, положительно влияет на течение АД, но возможна и гипериммунная реакция, которая может наоборот ухудшать процесс и приводить к увеличению имеющиеся нарушений. Так, увеличение Т-лимфоцитов приводит к развитию

аутоиммунных процессов.

Медиаторы иммунной системы – цитокины влияют на патогенез АД – патологические иммунные реакции приводят к развитию АД и поддерживают его клинические проявления [3; 14; 37]. Учитывая это, было проведено комплексное исследование содержания в крови ряда различных цитокинов у пациентов с АД различной степени тяжести во время обострения и ремиссии.

В зависимости от величины iSc обследованных распределили по 3 группам: менее 40 баллов – легкая степень тяжести (1 группа); от 40 до 60 баллов – средняя (2 группа); более 60 баллов – тяжелая форма (3 группа). В сыворотке крови исследовали уровни провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, а именно ИНФ γ , ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-4, 6, 10, 12, 8, 13.

Основной провоспалительный цитокин ИНФ γ , он продуцируется активными Т-хелперами 1 типа - Th $_1$; макрофагами; натуральными киллерами. Нами установлено, что во время обострения его уровень достоверно снижался, но во время ремиссии его контрольные значения были превышены, причем больше всего его значения были при средней тяжести течения АД.

Такие же изменения происходили и с содержанием ИЛ-12. ИЛ-12 приводит к развитию Th $_1$ фенотипа при экспрессии его макрофагами, дендроцитами и эозинофилами. Клетки Th $_1$ имеют рецепторы к ИЛ-12, у Th $_2$ они отсутствуют.

У всех больных, которые принимали участие в нашем исследовании, содержание ИЛ-12 достоверно возрастало только во время ремиссии, при обострении количество ИЛ-12 достоверно не превышало контрольные значения [5]. Отмечались такие же изменения, как и у ИНФ γ , самые высокие значения ИЛ-12 были во время ремиссии у больных АД со среднетяжелой формой [5].

Провоспалительный цитокин ФНО α не имел зависимости от

обострения и ремиссии заболевания, его значения колебались в зависимости от тяжести течения, так, при тяжелой форме АД при обострении и ремиссии его значения достоверно увеличивались, при среднетяжелой форме только во время ремиссии. При легкой форме контрольные значения не превышались, как во время обострения, так и во время ремиссии [5].

Провоспалительный цитокин ИЛ-1 β он является одним из главных медиаторов, от которого зависит развитие местной воспалительной реакции и острофазный ответ при инфекционном поражении, и он один из главных индукторов синтеза ИЛ-2 и ИЛ-4. ИЛ-1 усиливает экспрессию рецепторов к ИЛ-2 и ИЛ-4, что создает условия для аутокринной регуляции пролиферации Т-хелперов, в основном те Т-хелперы, которые продуцируют ИЛ-4, т.е. происходит формирование Th₂. Это подтверждается нашим исследованием: при тяжелом течении АД и течении средней тяжести количество ИЛ-1 β было достоверно повышено. При ремиссии колебания его уровня не превышали контрольных значений [5].

При исследовании противовоспалительных цитокинов ИЛ-4, 6, 10, 13 мы выявили следующую закономерность: при тяжелом и среднетяжелом течении АД их уровень был повышен во время обострения при распространенном и диффузном течении процесса [5].

ИЛ-4 и ФНО γ - основные цитокины, которые влияют на дифференцировку наивных CD4 Т-клеток. При отсутствии ИНФ γ нарушается иммунный ответ по клеточному типу, поддерживаемый Th₁, а элиминация ИЛ-4 блокирует Th₂-зависимый ответ. Дифференцировка наивных CD4 Т-клеток в направлении Th₂ приводит к синтезу цитокинов ИЛ-4, 10, которые снижают активность ИЛ-12,1, которые могут индуцировать рецепторы и синтез Т-клетками ИЛ-2 и ИНФ γ . Таким образом, ИЛ-4 подавляет образование Th₁ и противовоспалительных цитокинов, переводя Th₁ и Th₂ в сторону Th₂ [54; 83; 87].

Th1 и Th2 находятся в реципрокных отношениях, они продуцируют про- и противовоспалительные цитокины; каждый из этих фенотипов

подавляет противоположную дифференцировку и снижает продукцию соответствующих цитокинов [5; 166].

Такие реципрокные отношения субпопуляций цитокинов наглядно прослеживаются при комплексном анализе полученных результатов у пациентов с АД. 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, что согласуется с литературными данными [54; 83; 87]. 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 [5].

Что касается содержания в сыворотке ИЛ-8, то его уровни были повышены по сравнению с контролем в разных группах в 64-79% образцов и мало зависели от клинической картины заболевания, несмотря на то, что основное его свойство – обеспечение хемотаксиса в зону воспаления различных типов клеток – нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов, Т-клеток.

Были определены коэффициенты корреляции между индексом SCORAD и уровнями определяемых цитокинов во время обострения АД.

Оказалось, что только уровни ФНОα и ИЛ-4 достоверно коррелировали с тяжестью заболевания. Несмотря на то, что повышение ФНОα было более выражено при разрешении клинической симптоматики, во время обострения его содержание также коррелировало со степенью тяжести АД. Однако наблюдаемые корреляции не были выраженными [5].

В итоге, прослеживается тенденция к повышенной продукции цитокинов: противовоспалительных (ИЛ-4, 6, 10, 13) – при обострении АД и провоспалительных (ИНФγ, ФНОα, ИЛ-12) – во время ремиссии [5].

Известно, что в ответ на инвазию патогенов или повреждение ткани

организм реагирует воспалительной реакцией. Важную роль при этом играют ПМЯЛ как клетки первичной защиты. Привлекают ПМЯЛ и стимулируют их фагоцитарную функцию различные циркулирующие медиаторы (цитокины, лейкотриены, факторы комплемента, бактериальные эндотоксины, факторы свертывания и фибринолиза). Для разрушения патогенов ПМЯЛ используют протеиназы. Одна из этих протеиназ – ЛЭ, которая локализуется в азурофильных гранулах. Концентрация ферментов в них очень высокая – около 1 пкг на 1 клетку [4].

Фермент ЛЭ относится к группе сериновых протеаз и обладает активностью к человеческому кератину, эластину, коллагену III и IV типов [4; 158]. ЛЭ фагоцитируя чужеродные вещества, в небольших количествах может экстрадироваться в окружающее пространство, так ее можно обнаружить на поверхности кожи при таких кожных заболеваниях, как псориаз и АД. Это происходит даже при наличии ее ингибиторов, как в плазме, так и в тканях [126]. Количество ЛЭ зависит от активности течения заболевания. Чем активнее процесс, тем больше ее количество. Если лечение заболевания успешно, соответственно и количество ЛЭ снижается [126].

Выделение ЛЭ из нейтрофилов происходит посредством ФНО- α , ИЛ-8, ЛПС, фрагментов бактериальной стенки. Инактивация ЛЭ осуществляется протеиназным лейкоцитарным ингибитором α_1 -ПИ, элафином и эглином C_{α_1} -антитрипсином α_2 -макроглобулином. Снижение содержания данных ингибиторов при псориазе доказано.

Высвобождение ЛЭ в больших количествах не дает проявить ингибирующие возможности α_1 -ПИ. Слишком много высвободившейся ЛЭ, ее активность одновременно с образующимися оксидантами: O_2 -радикалами, H_2O_2 , O -радикал является причиной местного ограниченного повреждения тканей. ЛЭ является регулятором воспаления и снижает миграцию Т-лимфоцитов и нейтрофилов в очаг воспаления, кроме того снижает их адгезивные свойства [4]. Известны работы, в которых у больных АД и бронхиальной астмой при использовании аллергенов клещей домашней пыли

даже при лечении скорость заживления повреждений кожи снижалась [70; 153]. Таким образом, воздействие аллергенов способствует активации протеазазависимого рецептора PAR-2, что, в свою очередь, вызывает значительное снижение скорости восстановления барьерной функции эпидермиса. Введение ингибиторов уменьшает воздействие протеаз на воспалительный процесс и в свою очередь, ускоряет выздоровление [4].

АД - заболевание, при котором роль ЛЭ несомненна и дальнейшее ее изучение актуально. ЛЭ, начиная свою разрушающую деструктивную работу в тканях, способствует замедлению восстановительных процессов, особенно если ее активация вызвана уменьшением количества ее ингибиторов.

В нашей работе мы нашли изменения у всех обследованных, по сравнению с контрольной группой. Различия были статистически значимые. ЛЭ повышалась во всех 3-х группах, и это повышение имело корреляцию с тяжестью клинического процесса. Повышение ЛЭ в 3-й группе было в 1,7 раза больше, чем в контрольной группе. Активность ЛЭ во 2-й и 1-й группе была выше в 1,4 и 1,3 раза соответственно, т.е. увеличение активности ЛЭ было сильнее всего при тяжелом течении заболевания. Во время ремиссии активность ЛЭ была в норме только в 1-й группе с легким течением АД. Во 2-й и 3-й группах активность ЛЭ все равно была повышена, по сравнению с контрольной группой в 1,2 и 1,5 раза соответственно. Однако показатели ее все-таки упали в 1,2 раза в обеих группах. Мы можем предположить, что под воздействием различных аллергенов происходит повышенная дегрануляция нейтрофилов, следствием которой является повышенная активность ЛЭ, которая в свою очередь приводит к клиническим проявлениям заболевания. Так, например, ранее описано, что при АД активность эластазы в 2,4 раза была выше, чем в норме у 114 взрослых пациентов (возраст больных 18-45 лет). При терапии 2-4 нед препаратом кромоглициевой кислоты (динатрия кромогликат подавляет выделение медиаторов аллергии) с фенотеролом (Cromoglicic acid + Fenoterol) клиническое состояние улучшалось, активность ЛЭ снизилась в 1,4 раза уже через 7 дней, но не активность $\alpha 1$ -ПИ или

трипсина [4].

Аналогичные результаты выявлены у 23 больных с аллергическим ринитом и бронхиальной астмой. У больных в отсутствие как минимум двух недель до начала эксперимента специфического лечения определяли активность эластазы *ex vivo* (ELISA). При исследовании активности сериновых протеаз у 63 пациентов с АД было обнаружено их повышение не только во время обострения, но и при ремиссии [134].

В нашей работе мы исследовали влияние антипротеолитического (компенсаторного) потенциала - активность α_1 -ПИ и активность ЛЭ и их корреляцию с клиническим течением заболевания. Нами получены следующие данные: во время обострения в 1-й, 2-й и 3-й группах было увеличение активности α_1 -ПИ по сравнению с контрольной группой. В контрольной группе показатели α_1 -ПИ были в норме. Уровень увеличения α_1 -ПИ в группах 1-й и 2-й коррелировал с увеличением активности ЛЭ, но у некоторых больных из 2-й группы и у больных 3-й группы уровень увеличения α_1 -ПИ был недостаточен, по сравнению с ростом ЛЭ.

Рост α_1 -ПИ мы можем рассматривать, как ответный результат – «компенсаторное повышение» на увеличение ЛЭ при дегрануляции нейтрофилов. У ряда больных активность α_1 -ПИ была недостаточной, что можно расценивать как «истощение компенсаторного антипротеолитического потенциала». Кроме того, у части больных с тяжелым течением заболевания наблюдалось снижение активности α_1 -ПИ.

Таким образом, при АД мы наблюдаем дисбаланс между протеолитическими ферментами и антипротеазами и этим можно объяснить снижение активности ингибиторов ЛЭ. Нейтрофилы, макрофаги и эпителиальные клетки выделяют протеолитические ферменты, а в результате воспаления посредством оксидативного стресса и инактивации белков окислительными радикалами уменьшается антипротеазная активность.

Таким образом, α_1 -ПИ играет важную роль в регуляции противовоспалительного ответа.

Нами установлен целый ряд интересных корреляций между активностью ЛЭ, $\alpha 1$ -ПИ и SCORAD при обострении АД разной степени тяжести. С повышением индекса SCORAD наблюдали повышение активности ЛЭ. Что касается $\alpha 1$ -ПИ, то его повышение активности наблюдалось у пациентов с легким течением АД. По мере возрастания степени тяжести заболевания наблюдалось постепенное нивелирование положительной корреляции между индексом SCORAD и $\alpha 1$ -ПИ. Более того, в группе пациентов с тяжелым течением АД наблюдалась достоверная отрицательная корреляционная связь между этими параметрами, хотя при этом средний показатель активности $\alpha 1$ -ПИ был выше, чем при легком течении и течении средней тяжести. Это говорит о том, что при определенной степени развития воспалительного процесса в дерме имеет место истощение компенсаторного антипротеазного потенциала, что, безусловно, является неблагоприятным признаком течения болезни.

Т.о., активность ЛЭ и $\alpha 1$ -ПИ сыворотки крови отражает интенсивность деструктивных процессов и состояние антипротеолитического (компенсаторного) потенциала организма: однонаправленное с ЛЭ увеличение активности $\alpha 1$ -ПИ призвано ограничить деструкцию и характеризует сохранность антипротеолитического потенциала. Однако сниженная активность $\alpha 1$ -ПИ говорит о прогрессировании деструктивного воспаления и является неблагоприятным прогностическим признаком течения АД [4].

Поэтому определение активности ЛЭ и ее ингибитора в сыворотке крови нам представляется важным показателем оценки интенсивности воспалительных/деструктивных процессов при АД.

В литературе есть данные, что больные с тяжелым течением АД, у которых имеется бактериальная контаминация кожи, имеют сниженную функциональную активность нейтрофилов. Кроме того, у некоторых больных эта сниженная активность связана с нарушением рецепторного аппарата клеток [151]. Рецепторы TLR4 и TLR2 распознают бактериальные

липополисахариды грамотрицательных и грамположительных бактерий, а так же, бактериальные пептиды и дрожжи [10]. Недостаточность GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагального стимулирующего фактора) также может изменять антибактериальные функции нейтрофилов [10]. Из всех бактерий и грибов на коже больных АД чаще всего определяют: грибы рода *Candida* и *Malassezia*; бактерии *Staphylococcus aureus*[53]. *Staphylococcus aureus* гораздо чаще обнаруживается на коже больных АД, чем у здоровых людей [51; 130]. В литературе есть данные, что *Staphylococcus aureus* высевается у 80-95% больных с диагнозом АД [104]. Кроме того, существенно значимыми аллергенами для больных АД являются клещи домашней пыли - *Dermatophagoides pteronyssinus*. Дети с АД, проживающие в домах с повышенной концентрацией аллергенов *Dermatophagoides pteronyssinus*, имели более высокий балл SCORAD, чем дети из домов с их низкой концентрацией [67]. В нашем исследовании хемилюминесценция, ни спонтанная, ни индуцированная не подавлялась у больных АД с легкой степенью тяжести и с контаминацией кожи условно патогенными дрожжами *Candida tropicalis*. Кроме того, в начале обострения наблюдалась тенденция к увеличению хемилюминесценции по сравнению с донорами. У больных АД с тяжелым течением хемилюминесценция как спонтанная, так и индуцированная была достоверно снижена [10]. Повышение спонтанной и индуцированной хемилюминесценции при легкой степени АД по сравнению со здоровыми донорами статистически недостоверно. Понижение спонтанной и индуцированной хемилюминесценции у больных с тяжелой степенью АД имело достоверное различие ($P < 0,05$) [10].

В зависимости от степени распространенности процесса достоверное повышение индуцированной зимозаном хемилюминесценции наблюдалось у больных с ограниченно-локализованным и понижение у больных с диффузным процессом [10].

При контаминации кожи условно патогенными дрожжами рода *Candida tropicalis* (18 больных, в первую неделю обострения) наблюдали

достоверное снижение спонтанной хемилюминесценции клеток крови у больных с тяжелым течением заболевания и достоверное повышение индуцированной зимозаном хемилюминесценции при легкой степени АД [10].

При контаминации кожи золотистым стафилококком (n=20) имелась тенденция к снижению уровня хемилюминесценции клеток крови, как спонтанной, так и индуцированной зимозаном или дрожжами рода *Candida tropicalis* по мере усиления тяжести заболевания. Достоверно снижена хемилюминесценция была у больных тяжелой формой АД, индуцированная зимозаном и стимулированная дрожжами *Candida tropicalis*. По литературным данным, у больных АД с бактериальной контаминацией показано снижение функциональной активности нейтрофилов [10; 81; 130]. По нашим данным, такое снижение наблюдалось при контаминации кожи золотистым стафилококком, а при контаминации условно патогенными дрожжами *Candida tropicalis* только у больных с тяжелой формой АД. Тенденция к снижению функциональной активности нейтрофилов без бактериальной и микотической контаминации была только у больных с тяжелым течением АД, при легком течении функциональная активность нейтрофилов возрастала.

При стимуляции клеток крови больных АД с легкой степенью тяжести и ограниченно-локализованном типе процессе мы наблюдали повышение генерации супероксидного аниона с последующим повышением гидроксильного радикала, который является мощным окислителем. Значение полученных результатов определяется тем, что показана стимуляция генерации супероксидного аниона [10]. Кроме того, при взаимодействии супероксидного аниона с молекулой окиси азота образуются реактивные метаболиты азота, высокая концентрация которых способствует развитию патологических изменений в тканях. Контаминация кожи условно патогенными дрожжами *Candida tropicalis* повышает как спонтанную, так и индуцированную хемилюминесценцию клеток крови больных АД. Таким

образом, как нормальная, так и повышенная активность нейтрофилов в первые дни заболевания может приводить к порочному кругу, когда средства антибактериальной защиты являются причиной развития патологических изменений в коже [10].

При тяжелой форме АД функциональная активность нейтрофилов достоверно снижена, что согласуется с рядом публикаций зарубежных авторов [170]. Анализ генерации супероксидного аниона клетками крови больных АД показал зависимость от тяжести течения заболевания и степени распространённости процесса. У больных с легкой степенью течения АД и когда воспалительный процесс на коже характеризуется ограниченно-локализованным типом обнаружено небольшое повышение спонтанной и индуцированной хемилюминесценции. Контаминация кожи условно патогенными дрожжами *Candida tropicalis* сопряжена с повышением спонтанной и индуцированной хемилюминесценции клеток крови больных АД в первые дни обострения заболевания при легкой степени процесса [10].

Исследование выделенной популяции нейтрофилов (с чистотой более 92% клеток в суспензии), которые поддерживают в течение нескольких часов оптимальную функциональную активность, позволяет проводить сравнительные исследования влияния разных факторов для одного и того же больного [11]. В данной работе было установлено, что нейтрофилы больных существенно различаются по уровню генерации супероксидного аниона в ответ на fmlp и в ответ на прямой активатор кислородного взрыва РМА. Известно, что действие fmlp на нейтрофилы зависит от концентрации, при 1мкМ он индуцирует поляризацию клеток и дегрануляцию с выходом лактоферрина [11; 76]. В нашей работе fmlp оказывал достоверно менее выраженный эффект на генерацию супероксидного аниона нейтрофилами периферической крови. По данным литературы, одним из феноменов воспаления является фактическая десенсибилизация, обусловленная связыванием G-протеин сопряженных рецепторов хемотаксическими пептидами, привлекающими нейтрофилы в очаг воспаления, так как эти

рецепторы становятся недоступными для других лигандов, в частности, для fmlp. Это показано при стимуляции fmlp нейтрофилами с целью генерации супероксидного аниона [11].

Несмотря на различные сигнальные пути, сопряженные с fmlp и РМА в нейтрофилах человека, их эффекты в отношении нейтрофилов больных и здоровых доноров показывают сходную тенденцию. Так, у больных АД легкой степени тяжести в начале процесса обострения наблюдается повышение уровня генерации супероксидного аниона по сравнению со здоровыми донорами. У больных с более выраженными клиническими признаками заболевания и контаминированных бактериальной инфекцией, генерация супероксидного аниона нейтрофилами достоверно супрессирована и, кроме того, существенно изменена динамика активности клеток в ответ на физиологические воздействия [11].

В данной работе впервые изучена динамика активности нейтрофилов крови больных АД в физиологических условиях после приёма стандартного завтрака. Эти исследования интересны не только с точки зрения сравнения показателей больных и здоровых людей, но также и для понимания естественных процессов, происходящих в организме. Все люди регулярно принимают пищу, макронутриенты которой оказывают существенное влияние на активность клеток иммунной системы [11]. Проведенными нами исследованиями установлено, что приём пищи оказывает разное действие на активность нейтрофилов больных и здоровых лиц. Следует подчеркнуть, что для этого эксперимента группы больных подбирались не рандомизировано, а только по идентичности таких показателей, как пол, возраст и состояние здоровья пациентов, чтобы минимизировать естественные колебания активности нейтрофилов. Даже при такой выборке имелись различия в пике концентрации супероксидного аниона, который у ряда здоровых доноров приходился на первый час после приёма завтрака, а у других лиц – на второй час [11]. То есть у молодых здоровых людей активность нейтрофилов периферической крови достоверно различается.

Ещё в прошлом веке была установлена гетерогенность циркулирующих в кровяном русле нейтрофилов на основании электрического заряда на поверхности клеток и электрофоретической подвижности клеток. Наименее электроотрицательные клетки генерируют супероксид в два раза больше максимально электроотрицательных клеток [11]. С точки зрения современных представлений об активности клеток мы предполагаем, что уровень генерации супероксидного аниона определяется, в том числе, активацией сигнальных путей апоптоза. У доноров, не имеющих атопии в анамнезе, могла быть бактериальная инфекция, не выявленная при внешнем осмотре, а при этом нейтрофилы этих лиц отвечали активацией апоптоза, что могло изменить временной характер генерации супероксидного аниона.

Таким образом, показано изменение уровня генерации супероксидного аниона у больных АД под действием fmlp и РМА, а также установлена различная динамика выброса супероксида при активации нейтрофилов РМА. Эти показатели отражают окислительный статус больных.

Нейтрофилы больных АД различаются по уровню генерации супероксидного аниона в ответ на рецепторзависимые стимулы и в ответ фторболовый эфир; 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 с более тяжелым течением заболевания генерация супероксидного аниона нейтрофилами достоверно снижена ($P < 0,05$) [11]. У больных АД изменена кинетика активности нейтрофилов в ответ на физиологические стимулы (приём стандартного завтрака) при почасовом измерении генерации супероксидного аниона [11].

Метод определения процента клеток, фагоцитировавших дрожжи, оказался наиболее оптимальным для анализа на проточном цитометре, так как крупные клетки дрожжей дают четкое облако поглощения, которое можно первоначально оценить без применения красителей. Использование окраски пропидиумом иодидом позволяет количественно измерить процент фагоцитирующих нейтрофилов, что важно для проведения сравнительных исследований.

Значение условно патогенных дрожжей *Rhodotorula spp.* в клинической практике определяется повышением их контагиозности на фоне изменения иммунного статуса организма [174]. Оппортунистический патоген *Rhodotorula spp.* начинает быстро колонизировать пациентов при наличии онкологических заболеваний, при рассеянном склерозе, при многих кожных заболеваниях. При этом штаммы дрожжей, выделенных из кожи, достаточно устойчивы к антимикотическим средствам [150; 176].

В настоящее время контаминация кожи человека условно патогенными дрожжами изучается недостаточно широко. Эта проблема в связи с АД начинала разрабатываться в конце прошлого века, когда было проведено сравнение контаминации кожи больных АД со здоровыми людьми. Было показано, что микологические проблемы кожи встречаются в 2–5 раз чаще у лиц с тяжелым течением АД. У 39% больных АД (vs 3% здоровых доноров) обнаружена контаминация кожи дрожжами [42]. В этой работе *Rhodotorula spp.* высевалась в 21% случаев, хотя позднее было показано, что *Rhodotorula spp.* составляет ~29% от всех азурофильных дрожжей, выделенных из кожи больных АД [44].

В сыворотке больных АД часто выявляют IgE специфические антитела к *Rhodotorula rubra* [183]. Изучался ответ IgA, IgG и IgE на *Candida albicans*, *Candida Utilis*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, а также перекрестная реактивность для этих дрожжей. У больных АД при пробах с введением аллергена (prick test) в 60% случаев выявлена перекрестная реактивность на, как минимум, два из пяти

протестированных аллергенов. Больные АД, сенсibilизированные к *Candida albicans*, могут давать аллергические реакции на другие дрожжи, в том числе *Rhodotorula spp.*[149].

Компонентами природного иммунитета к грибковой инфекции являются макрофаги и нейтрофилы, распознающие так называемые PAMPs, присутствующие на стенках клетки грибов, через рецепторы PRR, которые экспрессируются на плазматической мембране, эндосомах и в цитоплазме фагоцитов. К PRRs относятся рецепторы TLR (Toll-подобные рецепторы), CLR (рецепторы лектина С-типа) и NLR (Nod-подобные рецепторы). Именно благодаря этим рецепторам фагоциты могут поглощать грибы и разрушать их в фагосомах, используя окислительные механизмы и антимикробные пептиды [144].

В процессе взаимодействия клеток патогенов с фагоцитами есть несколько стадий – это миграция, распознавание, поглощение, созревание фагосом и обязательный киллинг патогенна (или фагоцита). Миграция в сторону дрожжей определяется только уровнем гликозилирования стенки дрожжей. Поглощение уже прикрепившихся клеток дрожжей определяется их морфологией – гифы поглощаются медленнее дрожжевых клеток. Макрофаги преимущественно фагоцитируют *Candida albicans* в виде клеток дрожжей, а не в форме гифов [96]. Подобные взаимодействия между макрофагами и патогенами показаны не только для *C.albicans* , но для других плесневых грибов. Если макрофаг поглотил 4 и более патогенов, он погибает, если менее 4 – то выживает в 50%. Гифы чаще вызывают гибель макрофагов, однако и клетки дрожжей также токсичны для макрофагов, в которых они ингибируют митоз. Для патогенных дрожжей описан феномен нелимитического выхода из фагоцитов. При этом происходит латеральный перенос патогена между клетками организма хозяина.

Нейтрофилы играют более значимую роль в клиренсе патогенных дрожжей, чем макрофаги. Если в фагосомах макрофагов у дрожжей есть шанс экзоцитоза, то в нейтрофилах его нет за счёт активности

миелопероксидазы и α -дефенсинов. Кроме того, за счёт формирования NETs патогенные дрожжи могут быть уничтожены экстраклеточно при незавершенном фагоцитозе. Основным противогрибковым компонентом NETs является кальпротектин, его отсутствие приводит к потере фунгицидной активности. Нейтрофилы быстрее макрофагов мигрируют в очаг поражения грибковой инфекцией и быстрее поглощают патогены. В пораженном грибами организме человека антифунгальная активность нейтрофилов определяется многими факторами, в том числе, уровнем хемокинов, концентрацией цитокинов, расположением инфильтрата грибов, числом фагоцитов, доступностью пораженного очага [47]. Используя прижизненную конфокальную микроскопию, показано, что нейтрофилы эффективно защищают организм только тогда, когда они накапливаются в очаге поражения в первые двое суток после инфицирования, дополнительное привлечение нейтрофилов после этого срока не оказывает положительного эффекта. Для нейтрофилов имеется органная специфичность в накоплении в очаге поражения, так как органы имеют разный уровень секреции хемокинов [117]. У тех больных, у которых имеется нейтропения или снижение активности нейтрофилов, может развиваться генерализованная грибковая инфекция.

В ответ на поглощение фагоцитами у патогенных дрожжей происходит синтез каталазы и нескольких супероксиддисмутаз, которые детоксицируют ROS, продуцируемые макрофагами [82]. Благодаря этому патогенные дрожжи оказываются резистентными к фагоцитарной активности макрофагов и персистируют 2–3 дня до тех пор, пока окончательно не лизируются новыми макрофагами. Таким образом, для больных АД выявлены разные уровни активности нейтрофилов (то есть активность кислородного взрыва и фагоцитоза) в зависимости от наличия или отсутствия сопутствующей грибковой или бактериальной контаминации. 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 или нет снижения фагоцитарной активности, или она снижена незначительно, в группе больных с контаминацией *Rhodotorula spp.* можно говорить просто о подавлении этой функции нейтрофилов. Поскольку фагоцитоз дрожжей определяется, в том числе, уровнем экспрессии рецепторов, можно говорить, что у данной группы больных АД имеются нарушения рецепторного аппарата фагоцитов и их функциональной активности. Следует отметить, что имеется некий порочный круг, когда ослабление рецепторного аппарата фагоцитов приводит к первичному накоплению грибов в очаге поражения, а затем активность этих патогенов, уничтожающих макрофаги, обуславливает их генерализованное распространение.

Таким образом, можно сделать вывод об изменении показателей фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови больных АД, которые усугубляются при наличии контаминации кожи микроскопическими плесневыми грибами.

РЕЗЮМЕ:

Проведенное исследование позволило изучить особенности системы цитокинов у больных АД; выявить объективные критерии интенсивности деструктивных процессов и активности антидеструктивной системы при АД; исследовать функциональную активность нейтрофилов.

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 дизрегуляции 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 (РМА)) 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.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У больных АД целесообразно измерять функциональную активность нейтрофилов в крови для мониторинга патологического процесса и определения дальнейшей тактики лечения.

2. При АД предлагаем определять наличие сопутствующей грибковой контаминации дрожжами *Rhodotorula spp.*, которая снижает фагоцитарную активность нейтрофилов.

3. У пациентов с АД рекомендуем определять сывороточное содержание комплекса противовоспалительных и провоспалительных цитокинов для выявления степени активности аллергического воспаления.

4. Учитывая то, что активность ЛЭ сыворотки крови коррелирует с тяжестью АД, определяя содержание ЛЭ сыворотки крови больных АД, можно оценить выраженность деструктивных процессов у больных АД и качество лечения.

5. Целесообразно определять состояние антипротеолитического потенциала, ограничивающего деструктивные процессы в коже, снижающие качество жизни больных АД, определяя активность α_1 -ПИ.

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 колонии стимулирующий фактор
	– молекула межклеточной адгезии 1
Ig	– иммуноглобулин
ИНФ α	– интерферон– α
ИНФ γ	– интерферон– γ
iSc	– индекс Scrad
LEKTI	– лимфо-эпителиальный ингибитор
PMA	– форболовый эфир - форболмиристатацетат
SKALP	– антилейкопротеаза
SLPI /MPI	– ингибитор секреторных лейкоцитарных эластаз
α 1-ПИ	– α 1 протеиназный ингибитор
TREM	- рецептор (triggeringreceptorexpressedonmonocytes), который экспрессируется на нейтрофилах и моноцитах периферической крови

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Балаболкин И.И. Атопия и аллергические заболевания у детей // Педиатрия. — 2003. — № 6. — Р. 99-102.
2. Бурместер Г.Р., Пецутто А. Наглядная иммунология / пер. с англ. М.: БИНОМ: Лаборатория знаний, 2007. — 320р.
3. Волкова Е.Н. Атопический дерматит // Лечащий врач. — 2006. — №9. — Р. 22-31.
4. Волкова Е.Н., Короткая Е.А., Морозов С.Г., Елистратова И.В. Объективные критерии оценки интенсивности деструктивных процессов при хронически протекающих дерматозах (сообщение 2) // Российский журнал кожных и венерических болезней. — 2012. — №2. — Р. 40-44.
5. Волкова Е.Н., Морозов С.Г., Тарасова М.В., Елистратова И.В., Григорьева А.А. Исследование уровня циркулирующих цитокинов у больных атопическим дерматитом // Журнал Вестник дерматологии и венерологии. — 2014. — №2. — Р. 26-30.
6. Вулф К., Джонсон Р., Сюрмонд Д. Дерматология по Томасу Фицпатрику/ пер. с англ. М: Практика, 2007. 74-84 р.
7. Доценко В.Л., Нешкова Е.А., Яровая Г.А. Выявление лейкоцитарной эластазы из комплекса с плазменным ингибитором по ее энзиматической активности с синтетическим субстратом // Вопросы медицинской химии. — 1994. — V. 40. — №3. — Р. 20-25.
8. Елистратова Е.В., Иванченко О.Б., Гречко А.В., Морозов С.Г. Анализ экспрессии шаперонов DNAJB6/MRJ семейства HSP40 в клетках крови больных атопическим дерматитом при разных стадиях заболевания // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2016. — № 60(3). — Р. 23-30.
9. Елистратова И.В., Морозов С.Г., Захарова И.А., Экспрессия рецепторов PAR-2 на нейтрофилах периферической крови больных атопическим дерматитом и их связь с белками теплового шока HSP90 // Российский

- журнал кожных и венерических болезней. — 2016. — №1. — Р. 53-57.
10. Елистратова И.В., Морозов С.Г., Захарова И.А., Тарасова М.В. Люминол-зависимая хемилюминесценция лейкоцитов периферической крови больных атопическим дерматитом при различной тяжести течения заболевания // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2015.— V. 49.— №4.— Р. 35-40.
 11. Елистратова И.В., Тарасова М.В., Морозов С.Г., Динамика генерации супероксидного аниона нейтрофилами крови больных атопическим дерматитом в молодом возрасте // Патогенез. — 2015.— V. 13.— №4. — Р. 41-46.
 12. Кандалова О.В., Елистратова И.В., Иванченко О.Б., Гречко А.В., Морозов С.Г. Микробиом кожи при атопическом дерматите у взрослых // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2018. — №62(4). — Р. 209-214.
 13. Кетлинский С.А. Роль Т-хелперов типов 1 и 2 в регуляции клеточного и гуморального иммунитета // Иммунология. — 2002. — №2. — Р.77-79.
 14. Козлова В.А., Сенников С.В. Система цитокинов: теоретические и клинические аспекты / Козлова В.А., Сенников С.В. - Новосибирск: Наука, 2004. - 324 р.
 15. Короткая Е.А., Морозов С.Г., Волкова Е.Н. и др. Объективные критерии оценки интенсивности деструктивных процессов при хронически протекающих дерматозах // Российский журнал кожных и венерических болезней. — 2011. — №3. — Р. 32-36.
 16. Кубанов А.А., Катунина О.Р., Чикин В.В. Экспрессия нейропептидов, нейротрофинов и нейромедиаторов в коже больных атопическим дерматитом и псориазом // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2015. — № 3. — Р. 295-299.
 17. Кунгуров Н.В., Кохан М.М., Кениксфест Ю.В., Засадкевич Ю.М. «Проактивная» наружная терапия больных атопическим дерматитом детей и взрослых — новый, эффективный тактический подход // Вестник

- дерматологии и венерологии. — 2012. — №3. — Р.115-120.
18. Лукушкина Е.Ф., Абелевич М.М., Баскакова Е.Ю. Современные подходы к профилактике и лечению болезней кожи у детей // Русский медицинский журнал. — 2014. — V. 22. — № 21. — С. 1502-1506
 19. Львов А.Н., Катунина О.Р., Знаменская Л.Ф., Миченко А.В., Егорова Ю.Ю., Иноятова Л.А., Хайрулин Р.Ф., Волков И.А. Перспективы изучения патогенеза воспаления и зуда при atopическом дерматите и псориазе // Вестник дерматологии и венерологии. — 2012. — №3. — Р. 22-25.
 20. Мартынов А.А. Современные подходы к управлению качеством дерматовенерологической помощи (на примере atopического дерматита): дис. ...д-ра мед. наук: 14.00.11 / Мартынов Андрей Александрович. — М., 2009. — 472р.
 21. Мельников В.Л., Рыбалкин С.Б., Митрофанова Н.Н., Агейкин А.В. Современные проявления эпидемического процесса и особенности течения atopического дерматита // Фундаментальные исследования. — 2014. — №10-8. — Р. 1528-1531.
 22. Осипова Н.К. Комплексный подход к терапии и реабилитации кожи у больных с различными формами акне и постакне: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.10, 14.03.03 / Осипова Наталья Константиновна — М., — 2011. — 167 р.
 23. Ревякина В.Л. Atopические заболевания у детей на современном этапе // Лечащий врач. — 2002. — №44. — Р. 49-52.
 24. Ревякина В.Л., Коростовцев Д.С. Atopический дерматит: роль цитокинов в механизмах развития // Аллергология. — 2000. — №1. — Р. 40-47.
 25. Сергеев А. Ю. Atopический дерматит: гетерогенность клинических форм и разнообразие механизмов патогенеза // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2001. — №3. Р. 61-73.
 26. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции //

- Цитокины и воспаление. — 2004. — V.3. — №2. — P.16-22.
27. Скрипкина П.А. Роль герпесвирусной инфекции в патогенезе atopического дерматита: дис. ...канд. мед. наук: 14.00.11 / Скрипкина Полина Александровна — М., — 2008.— 107р.
 28. Смолкин Ю.С., Чебуркин А.А., Ревякина В.А. Механизмы развития atopического дерматита у детей (обзор литературы) // Российский вестник перинатологии и педиатрии. — 2000. — №3. — P. 25-29.
 29. Тарасова М.В., Елистратова И.В., Морозов С.Г. Экспрессия рецепторов нейтрофилов периферической крови при обострении atopического дерматита у взрослых мужчин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2019. — №3. — P. 29-34.
 30. Тарасова М.В., Морозов С.Г. Экспрессия рецепторов нейтрофилов TREM-1 при atopическом дерматите // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. — V.1. — 2019. — P. 177-181.
 31. Тарасова М.В., Овсянников М.В., Волкова Е.Н. Активность лейкоцитарной эластазы и альфа-1 протеиназного ингибитора у больных с atopическим дерматитом // Патогенез. — 2018. — №16(4). — P. 153-156.
 32. Феденко Е.С. Факторы риска развития atopического дерматита // Лечащий врач. — 2002. — №4. — P. 20.
 33. Цебоева М.Б. Клинико-иммунологические критерии atopического дерматита у детей, осложненного бактериальной инфекцией: дис. ... канд. мед. наук :14.01.10 / Цебоева Мирослава Борисовна —М., — 2012.
 34. Шарова Н.И. и др. Выработка интерферона-γ и интерлейкина-4 тимоцитами человека *in vitro* // Цитокины и воспаление. — 2002. —V.1. №4. — P. 12-16.
 35. Эртнеева И.Я. Наружная терапия больных atopическим дерматитом на основании изучения цитокинового профиля и показателей гуморального иммунитета: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.11 / Эртнеева Инга Яковлевна —М., — 2006 — 136 p.

36. Ajmani S., Singh H., Chaturvedi S., Mishra R., Rai M., Jain A. Utility of neutrophil CD64 and serum TREM-1 in distinguishing bacterial infection from disease flare in SLE and ANCA-associated vasculitis // Clin. Rheumatol. — 2019. — №38(4). — P. 997-1005.
37. Akdis M., Blaser K., Akdis C.A. T regulatory cells in allergy // Chem Immunol Allergy.— 2006.— V. 91. — P. 159-173.
38. Akdis M., Blaser K., Akdis C.A. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases // Allergy Clin Immunol. — 2005. — V. 116. — № 5. — P. 961-968.
39. Aldonyte R., Hutchinson E., Jin B. Endothelial alpha- 1-antitrypsin attenuates cigarette smoke induced apoptosis in vitro // COPD. — 2008. — V. 5. — № 3. — P. 153-162.
40. Alflen A., Stadler N., Aranda Lopez P., Teschner D., Theobald M., Heß G. Idelalisib impairs TREM-1 mediated neutrophil inflammatory responses // Scientific Reports. — 2018. — №8(1). — P. 5558.
41. Amirbeagi F., Thulin P., Pullerits R., Pedersen B., Andersson B.A., Dahlgren C., Welin A., Bylund J. Olfactomedin-4 autoantibodies give unusual c-ANCA staining patterns with reactivity to a subpopulation of neutrophils // Leukoc Biol. — 2015.—№1. — P. 181-189.
42. Arron S.T., Dimon M.T., Li Z., Johnson M.E., A Wood T., Feeney L., G Angeles J., Lafyatis R., Whitfield M.L. High Rhodotorula sequences in skin transcriptome of patients with diffuse systemic sclerosis // Invest Dermatol. — 2014. — V.134(8). — P. 2138-2145.
43. Arts R., Joosten L., van der Meer J., Netea M., TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors // Leukocyte Biology. — 2013. — № 93(2). — P. 209-215.
44. Arzumanyan V.G., Magarshak O.O., Semenov B.F. Yeast fungi in patients with allergic diseases: species variety and sensitivity to antifungal drugs // Bulletin of experimental Biology and Medicine. — 2000. — № 129(6). — P.

601-604.

45. Bacchetta R., Gregori S., Roncarolo M.G. CD4⁺ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function // *Autoimmun Rev.* — 2005. V. 4. — №8. — P. 491- 496.
46. Bakele M., Lotz-Havla A.S., Jakowetz A., Carevic M., Marcos V., Muntau A.C., Gersting S.W., Hartl D. An interactive network of elastase, secretases, and PAR-2 protein regulates CXCR1 receptor surface expression on neutrophils // *Biological Chemistry.* — 2014. — №289(30). — P. 20516-20525.
47. Bain J., Gow N., Erwig L. Novel insights into host-fungal pathogen interactions derived from live-cell imaging // *Semin Immunopathol.* — 2015. — №37. — P.131–139.
48. Baruah S., Keck K., Vrenios M., Pope M., Pearl M., Doerschug K. et al., Identification of a novel splice variant isoform of TREM-1 in human neutrophil granules // *Immunology.* — 2015. — №195(12). — P. 5725-5731.
49. Baruah S., Murthy S., Keck K., Galvan I., Prichard A., Allen L. TREM-1 regulates neutrophil chemotaxis by promoting NOX-dependent superoxide production // *Leukocyte Biology.* — 2019. — №1. — P. 124-131.
50. Bieber T. The pro- and anti-inflammatory properties of human antigen-presenting cells expressing the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon RI) // *Immunobiology.* — 2007. — V. 212. — №6. — P. 499-503.
51. Bitschar K., Staudenmaier L., Klink L., Focken J., Sauer B., Fehrenbacher B., Herster F., Bittner Z., Bleul L., Schaller M., Wolz C., Weber A.N.R., Peschel A., Schitteck B. Staphylococcus aureus skin colonization is enhanced by the interaction of neutrophil extracellular traps with keratinocytes // *Invest Dermatol.* — 2019. — №12. — P. 33474-33478.
52. Böhm I., Bauer R. Th1 cells, Th2 cells and atopic dermatitis // *Hautarzt.* — 1997. — V.48. — №4. — P. 223-227.
53. Braun C., Nosbaum A. Histoire naturelle de la dermatite atopique: Natural History of Atopic Dermatitis / *Ann Dermatol Venereol.* — 2019. — №

146(12S3. — P. 58-66.

54. Brøgger P., Blom L.H., Simonsen S., Thyssen J.P., Skov L. Antagonism of the interleukin 4 receptor α promotes T_H 1-signalling among T cells from patients with atopic dermatitis after stimulation // *Immunology*. — 2020. — № 91(1). — P. 12835.
55. Brown A., Farmer K., MacDonald L. House dust mite Der p 1 downregulates defenses of the lung by inactivating elastase inhibitors // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. — 2003. — №29. — P. 381–389.
56. Campione E., Lanna C., Diluvio L., Cannizzaro M.V., Grelli S., Galluzzo M., Talamonti M., Annicchiarico-Petruzzelli M., Mancini M., Melino G., Candi E., Schiavone G., Wang Y., Shi Y., Bianchi L. Skin immunity and its dysregulation in atopic dermatitis, hidradenitis suppurativa and vitiligo // *Cell Cycle*. — 2020. — № 5. — P.1-11.
57. Cao C., Gu J., Zhang J. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cell-1 (sTREM-1): a potential biomarker for the diagnosis of infectious diseases // *Frontiers of Medicine*. — 2017. — №11(2). — P. 169-177.
58. Carrasco K., Boufenzer A., Jolly L., Le Cordier H., Wang G., Heck A. TREM-1 multimerization is essential for its activation on monocytes and neutrophils // *Cell. Mol. Immunol.* — 2019. — №16(5). — P. 460-472.
59. Carvalho C.A., Moreira S., Ventura G., Sunkel C.E., Morais-de-Sá E. Aurora a triggers Lgl cortical release during symmetric division to control planar spindle orientation // *Current Biology*. — 2015. — №25(1). — P. 53-60.
60. Chamlin S.L., Cella D., Frieden I.J. Development of the Childhood Atopic Dermatitis Impact Scale: initial validation of a quality-of-life measure for young children with atopic dermatitis and their families // *Invest Dermatol.* — 2005. — V. 125. — № 6. — P. 1106-1111.
61. Chen C.X., Soto I., Guo Y.L., Liu Y. Control of secondary granule release in neutrophils by Ral GTPase // *Biological Chemistry*. — 2011. — №13. — P.

11724-11733.

62. Chen F., Pandey D., Chadli A., Catravas J., Chen T., Fulton D. Hsp90 regulates NADPH oxidase activity and is necessary for superoxide but not hydrogen peroxide production // *Antioxid. Redox. Signal.* — 2011. — №14(11). — P. 2107-2119.
63. Chen F., Yu Y., Qian J., Wang Y., Cheng B., Dimitropoulou C., Patel V., Chadli A., Rudic R.D., Stepp D.W., Catravas J.D., Fulton D.J. Opposing actions of heat shock protein 90 and 70 regulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase stability and reactive oxygen species production // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* — 2012. — №12. — P. 2989-2999.
64. Chen X., Eksioglu E., Carter J., Fortenbery N., Donatelli S., Zhou J. Inactivation of DAP12 in PMN inhibits TREM1-mediated activation in rheumatoid arthritis // *PLoS One.* — 2015. — № 10(2). — P. e0115116.
65. Choi E.H., Brown B.E., Crumrine D., Chang S., Man M.Q., Elias P.M., Feingold K.R. Mechanisms by which psychologic stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity // *Invest Dermatol.* — 2005. — №3. — P. 587-595.
66. Choy D.F., Hsu D.K., Seshasayee D., Fung M.A., Modrusan Z., Martin F., Liu F.T., Arron J.R., Comparative transcriptomic analyses of atopic dermatitis and psoriasis reveal shared neutrophilic inflammation // *Allergy Clin Immunol.* — 2012. — № 6. — P. 1335-1343.
67. Cid B. J., Perez-Mateluna G., Iturriaga C., Zambrano M.J., Vives M.I., Valenzuela P.M., Borzutzky A. Is there an association between indoor allergens and the severity of atopic dermatitis? // *Dermatoljgy.* — 2019. — №58(4). — P. 433-439.
68. Clemmensen S.N., Bohr C.T., Rorvig S., Glenthoj A., Mora-Jensen H., Cramer E.P., Jacobsen L.C., Larsen M.T., Cowland J.B., Tanassi J.T., Heegaard N.H., Wren J.D., Silahtaroglu A.N., Borregaard N. Olfactomedin 4 defines a subset of

- human neutrophils // *Leukocyte Biology*. — 2012. — №3. — P. 495-500.
69. Cork M.J., Robinson D.A., Vasilopoulos Y. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: Gene-environment interactions // *Allergy Clin Immunol*. — 2006. — V.118. — P. 3-21.
 70. Custovic A., Taggart S., Francis H. Exposure to house dust mite allergens and clinical activity of asthma // *Allergy Clin. Immunol*. — 1996. — №98. — P. 64-72.
 71. Czarnowicki T., Gonzalez J., Shemer A., Malajian D., Xu H., Zheng X., Khattri S., Gilleaudeau P., Sullivan-Whalen M., Suárez-Fariñas M., Krueger J.G., Guttman-Yassky E. Severe atopic dermatitis is characterized by selective expansion of circulating TH2/TC2 and TH22/TC22, but not TH17/TC17, cells within the skin-homing T-cell population // *Allergy Clin Immunol*. — 2015. — №1. — P. 104-115.
 72. Dalboni T.M., Abe A.E., de Oliveira C.E., Lara V.S., Campanelli A.P., Gasparoto C.T., Gasparoto T.H. Activation profile of CXCL8-stimulated neutrophils and aging // *Cytokine*. — 2013. — №3. — P. 716-719.
 73. Dallerigi F., Ottonello L. Tissue injury in neutrophil inflammation // *Inflammation Research*. — 1997. — V. 46. — P. 382-391.
 74. de A Paes A.M., Veríssimo-Filho S., Guimarães L.L., Silva A.C., Takiuti J.T., Santos C.X., Janiszewski M., Laurindo F.R., Lopes L.R. Protein disulfide isomerase redox-dependent association with p47(phox): evidence for an organizer role in leukocyte NADPH oxidase activation // *Leukocyte Biology*. — 2011. — №4. — P. 799-810.
 75. Dhingra N., Suárez-Fariñas M., Fuentes-Duculan J. Attenuated neutrophil axis in atopic dermatitis compared to psoriasis reflects TH17 pathway differences between these diseases // *Allergy Clin. Immunol*. — 2013. — №2. — P. 498-501.
 76. Dib K., Perecko T., Jenei V., McFarlane C., Comer D., Brown V., Katebe M., Scheithauer T., Thurmond R.L., Chazot P.L., Ennis M. The histamine H4 receptor is a potent inhibitor of adhesion-dependent degranulation in human

- neutrophils // *Leukocyte Biology*. — 2014. — №3. — P. 411-418.
77. Eggleton P., Fisher D., Crawford N. Heterogeneity in the circulating neutrophil pool: studies on subpopulations separated by continuous flow electrophoresis // *Leukocyte Biology*. — 1992. — №1(6). — P. 617-625.
78. Eichenfield L.F., Ellis C.N., Mancini A.J., Paller A.S., Simpson E.L. Atopic dermatitis: epidemiology and pathogenesis update // *Seminars in cutaneous medicine and Surgery*. — 2012. — V. 31. — №3. — P. 3-5.
79. Elias P.M., Sugarman J. Moisturizers vs. Barrier Repair in the Management of Atopic Dermatitis // *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. — 2018. — №12. — P. 1081-1206.
80. Favier B. Regulation of neutrophil functions through inhibitory receptors: an emerging paradigm in health and disease // *Immunological Reviews*. — 2016. — V. 273(1). — P. 140-155.
81. Forte W.C., Guardian V.C., Mantovani P.A., Dionigi P.C., Menezes M.C. Evaluation of phagocytes in atopic dermatitis // *Allergol Immunopathol*. — 2009. — №37(6). — P. 302-308.
82. Frohner I.E. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance // *Molecular Microbiology*. — 2009. — №71. — P. 240–252.
83. Fujii M. Current Understanding of Pathophysiological Mechanisms of Atopic Dermatitis: Interactions among. Skin Barrier Dysfunction, Immune Abnormalities and Pruritu // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. — 2020. — № 43(1). — P. 12-19.
84. Futosi K., Fodor S., Mócsai A., Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways // *International Immunopharmacology*. — 2013. — V. 17(3). — P. 638-650.
85. Gould H.J., Takhar P., Harries H.E., Chevretton E., Sutton B.J. The allergic march from *Staphylococcus aureus* superantigens to immunoglobulin E

- // Chemical Immunology and Allergy. — 2007. — V.93. — P. 106-136.
86. Grewe M., Bruijnzeel-Koomen C.A., Schopf E. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis // Immunology Today. — 1998. — V. 19. — P. 359-361.
 87. Hachem El.M., Di. Mauro G., Rotunno R., Giancristoforo S., De Ranieri C., Carlevaris C.M., Verga M.C., Dello Iacono I. Pruritus in pediatric patients with atopic dermatitis: a multidisciplinary approach - summary document from an Italian expert group // Pediatr.. — 2020. — № 30. — P. 46.
 88. Hall Jessica M. F. , Cruser des A., PodawiltzA., Mummert Diana I. , H. Jones, M. E. Mummert Psychological Stress and the Cutaneous Immune Response: Roles of the HPA Axis and the Sympathetic Nervous System in Atopic Dermatitis and Psoriasis // Dermatology Research and Practice. — 2012. — P. 403-908.
 89. Hanifin J., Chan S., Cheng J. Type 4 phosphodiesterase inhibitors have clinical and in vitro antiinflammatory effects in atopic dermatitis // Investigative Dermatology. — 1996. — V. 107. — P. 51-56.
 90. Herz U., Bunikowski R., Renz H. Role of T cells in atopic dermatitis \ International Archives of Allergy and Immunology. — 1998. — V. 115. — P. 179-190.
 91. Hinkofer L.C., Seidel S.A., Korkmaz B., Silva F., Hummel A.M., Braun D., Jenne D.E., Specks U. A monoclonal antibody (MCPR3-7) interfering with the activity of proteinase 3 by an allosteric mechanism // Biological Chemistry. — 2013. — V. 288(37). — P. 26635-26648.
 92. Hon K.L., Wang S.S., Pong N.H., Leung T.F. Circulating immunoglobulins, leucocytes and complements in childhood-onset atopic eczema. Indian // Pediatr. — 2013. — V. 80(2). — P. 128-131.
 93. Ide H., Itoh H., Yoshida E. Immunohistochemical demonstration of inter- α -trypsin inhibitor light chain (bikunin) in human mast cells // Cell and Tissue Research. — 1999. — V.297. — P. 149-154.

94. Karlsson J., Bylund J., Movitz C., Björkman L., Forsman H., Dahlgren C. A methodological approach to studies of desensitization of the formyl peptide receptor: Role of the read out system, reactive oxygen species and the specific agonist used to trigger neutrophils // *Immunol Methods*. — 2010. — V. 352(1-2). — P. 45-53.
95. Katsunuma T., Kawahara H., Yuki K. Impaired interferon-gamma production in a subset population of severe atopic dermatitis // *International Archives of Allergy and Immunology*. — 2004. — V. 134. — №3. — P. 240-247.
96. Keppler-Ross S. Recognition of yeast by murine macrophages requires mannan but not glucan // *Eukaryot Cell*. — 2010. — №9. — P.1776–1787.
97. Keshari R.S., Verma A., Barthwal M.K., Dikshit M. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils // *Cellular Biochemistry*. — 2013. — V. 114(3). — P.532-540.
98. Khanfer R., Phillips A.C., Carroll D, Lord J.M. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20562369> // *Psychosomatic Medicine*. — 2010. — V. 72(7). — P. 636-640.
99. Kiehl P., Falkenberg K., Vogelbruch M. Tissue eosinophilia in acute and chronic atopic dermatitis: a morphometric approach using quantitative image analysis of immunostaining // *British Journal of Dermatology*. — 2001. — № 145. — P. 720-729.
100. Kim C., Dinauer M. Rac 2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways // *Immunol*. — 2001. — V. 166. — № (2). — P. 1223-1232.
101. Klesney-Tait J., Keck K., Li X., Gilfillan S., Otero K., Baruah S. Transepithelial migration of neutrophils into the lung requires TREM-1 //

- Clinical Investigation. — 2013. V. 123. — № 1. — P. 138-149.
102. Kolasinski S.L., Haines K.A., Siegel E.L., Cronstein B.N., Abramson S.B. Neuropeptides and inflammation. A somatostatin analog as a selective antagonist of neutrophil activation by substance P. // *Arthritis Rheum.* — 1992. — V. 35(4). — P. 369-375.
 103. Korkmaz B., Lesner A., Letast S., Mahdi Y.K., Jourdan M.L., Dallet-Choisy S., Marchand-Adam S., Kellenberger C., Viaud-Massuard M.C., Jenne D.E., Gauthier F. Neutrophil proteinase 3 and dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) as pharmacological targets in granulomatosis with polyangiitis (Wegener granulomatosis) // *Semin Immunopathol.* — 2013. — V. 35. — № 4. — P. 411-421.
 104. Kutasevych Y., Dzhoraeva S., Shcherbakova Y., Bondarenko G., Sobol N. The study of skin autoflora's pathogenic properties in patients diagnosed with atopic dermatitis // *Georgian medical news.* — 2019. — № 292-293. — P. 113-117.
 105. Kuwabara W.M., Zhang L., Schuiki I., Curi R., Volchuk A., Alba-Loureiro T.C. NADPH oxidase-dependent production of reactive oxygen species induces endoplasmic reticulum stress in neutrophil-like HL60 cells // *PLoS One.* — 2015. — V.10. — № 2. — P. 0116410.
 106. Lazarević-Pasti T., Leskovac A., Vasić V. Myeloperoxidase Inhibitors as Potential Drugs // *Current Drug Metabolism.* — 2015. — V.16. — №3. — P. 168-190.
 107. Lechtenberg B.C., Kasperkiewicz P., Robinson H., Drag M., Riedl S.J. The elastase-PK101 structure: mechanism of an ultrasensitive activity-based probe revealed // *ACS Chemical Biology.* — 2015. — V.10 — №4. — P. 945-951.
 108. Lee H.H., Sung M.H. The neutrophil elastase mutant affects viability and differentiation of the human monocytic THP-1 cell // *Cell Biochem Funct.* —

2013. — V. 31. — №4. — P. 305-311.
109. Lee J.H., Ki H.H., Kim D.K., Lee Y.M. Triticum aestivum sprout extract attenuates 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in mice and the expression of chemokines in human keratinocytes // *Molecular Medicine Reports*. — 2018. — V.18. — № 3. — P. 3461-3468.
 110. Lee S.H., Jeong S.K., Ahn S. K., An update of the defensive barrier function of skin // *Yonsei Medical Journal* . — 2006. — №47. — P. 293–306.
 111. Leung D.Y., Gao P.S., Grigoryev D.N. Human atopic dermatitis complicated by eczema herpeticum is associated with abnormalities in IFN- γ response // *Allergy Clin. Immunol.* — 2011. — V. 127. — № 4. — P. 965-973.
 112. Levine A.P., Duchon M.R., de Villiers S., Rich P.R., Segal A.W.. Alkalinity of neutrophil phagocytic vacuoles is modulated by HVCN1 and has consequences for myeloperoxidase activity // *PLoS One*. — 2015. — V. 10. — № 4. — P. 0125906.
 113. Liao H.R., Chien C.R., Chen J.J., Lee T.Y., Lin S.Z., Tseng C.P.. The anti-inflammatory effect of 2-(4-hydroxy-3-prop-2-enyl-phenyl)-4-prop-2-enyl-phenol by targeting Lyn kinase in human neutrophils // *Chemico-Biological Interactions*. — 2015. — V. 5. — № 236. — P. 90-101.
 114. Lindberg S., Jensen J.S., Mogelvang R., Pedersen S.H., Galatius S., Flyvbjerg A., Magnusson N.E.. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the general population: association with inflammation and prognosis // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. — 2014. — V. 34.— №9. — P. 2135-2142.
 115. Lin S.J, Dong K.C., Eigenbrot C., van Lookeren Campagne M., Kirchhofer D.. Structures of neutrophil serine protease 4 reveal an unusual mechanism of substrate recognition by a trypsin-fold protease // *Structure*. — 2014. — V. 22 — №9. — P. 1333-1340.
 116. Lin Y.T., Wang C.T., Chiang B.L. Role of bacterial pathogens in atopic

- dermatitis // *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. — 2007. — V. 33. №3. — P. 167-77.
117. Lionakis M.S. Organ-specific innate immune responses in a mouse model of invasive candidiasis // *Innate Immunol.* — 2011. — №3. — P. 180–199.
 118. Liu T., Zhou Y., Li P., Duan J., Liu Y., Sun G. Blocking triggering receptor expressed on myeloid cells-1 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibiting NLRP3 inflammasome activation // *Scientific Reports*. — 2016. — №6. — P. 39473.
 119. Machura E., Mazur B., Kwiecien J., Karczewska K. Intracellular production of IL-2, IL-4, IFN-gamma, and TNF-alpha by peripheral blood CD3(+) and CD4 (+) T cells in children with atopic dermatitis // *European Journal of Pediatrics*. — 2006.— №11. — P. 21.
 120. Mamessier E., Botturi K., Vervloet D. T regulatory lymphocytes, atopy and asthma: a new concept in three dimensions // *La Revue des Maladies Respiratoires*. — 2005. — V. 22. — № 2. — P. 305-311.
 121. Marois L., Pare' G., Vaillancourt M., Rollet-Labelle E., Naccache P. FcγRIIIb triggers raft-dependent calcium influx in IgG-mediated responses in human neutrophils // *Journal of Biological Chemistry*. — 2011. — V. 286. — №5. — P. 3509-3519.
 122. Marsh D., Neely J., Breazeale D. Linkage analysis of IL 4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum IgE concentrations // *Science*. — 1994. — V. 264. — P. 1152-1156.
 123. Matsumoto K. Non-IgE-related diagnostic methods (LST, patch test) // *Chemical Immunology and Allergy*. — 2015. — V.101. — P. 79-86.
 124. McCormick S., Nelson A., Nauseef WM. Proconvertase proteolytic processing of an enzymatically active myeloperoxidase precursor // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. — 2012. — V 527. — №11(1). — P. 31-36.
 125. Méni C., Bodemer C., Toulon A, Merhand S., Perez-Cullell N, Branchoux S., Taieb C. Atopic dermatitis burden scale: creation of a specific burden

- questionnaire for families // European Academy of Dermatology. — 2013. — №16. — P. 12180.
126. Meyer–Hoffert U. Reddish, scaly, and itchy: how proteases and their inhibitors contribute to inflammatory skin diseases // *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. — 2009. — № 57. — P. 345–354.
 127. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond // *Experimental Medicine*. — 2013. — V. 210. — №7. — P. 1283-1299.
 128. Morren MA, Bruwiere I, Lemmens M, Goossens A, Garmyn M. Lack of compliance to topical corticosteroid therapy: possible cause and solutions // *Journal de pharmacie de Belgique*. — 2013. — №1. — P. 20-27.
 129. Mrowietz U., Konter U., Traut R., Schröder J.M., Christophers E. Atopic dermatitis: influence of bacterial infections on human monocyte and neutrophil granulocyte functional activities // *Allergy Clin Immunol*. — 1988. — V. 82. — №6. — P. 1027-1036.
 130. Murzina E., Kaliuzhna L. Bardova K. Yurchyk Y., Barynova M. Human Skin Microbiota in Various Phases of Atopic Dermatitis // *Acta Dermatovenerologica Croatica*. — 2019. — V.27. — №4. — P. 245-249.
 131. Nakatani K., Takeshita S., Tsujimoto H. et al. Inhibitory effect of serine protease inhibitors on neutrophil-mediated endothelial cell injury.// *J. Leukoc. Biol.* – 2001. -Vol. 69. – №2. – P. 241-247.
 132. Neuber K., Hilger R.A., König W. Interleukin-3, interleukin-8, FMLP and C5a enhance the release of leukotrienes from neutrophils of patients with atopic dermatitis // *Immunology*. — 1991. — V.73. — №1. — P. 83-87.
 133. Noh G., Lee J. Atopic dermatitis and cytokines: the immunoregulatory and therapeutic implications of cytokines in atopic dermatitis--part II: negative regulation and cytokine therapy in atopic dermatitis // *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*. — 2012. — V.6. — №3. — P. 248-261.

134. Nomura H., Suganuma M., Takeichi T., Kono M., Isokane Y., Sunagawa K., Kobashi M., Sugihara S., Kajita A., Miyake T., Hirai Y., Yamasaki O., Akiyama M., Morizane S. Multifaceted Analyses of Epidermal Serine Protease Activity in Patients with Atopic Dermatitis // *Molecular Sciences* . — 2020. — V. 30. — № 21(3). — P. 913.
135. Novak N., Bieber T., Kraft S. Immunoglobulin E-bearing antigen-presenting cells in atopic dermatitis // *Current Allergy and Asthma Reports*. — 2004. — V.4. — №4. — P. 263-269.
136. Ohshima Y., Yasutomi M., Omata N. Dysregulation of IL-13 production by cord blood CD4⁺ T cells is associated with the subsequent development of atopic disease in infants // *Pediatric Research*. — 2002. — V. 51. — № 2. — P. 195-200.
137. Ong P.Y., Leung D.Y. Immune dysregulation in atopic dermatitis // *Current Allergy and Asthma Reports*. — 2006. — V.6. — №5. — P. 384-389.
138. Park Y.D., Park D., Bhak J., Yang J.M. Proteomic approaches to the analysis of atopic dermatitis and new insights from interactomics // *Proteomics Clinical Applications*. — 2008. — V.2. — №3. — P. 290-300.
139. Perera N.C., Schilling O., Kittel H., Back W., Kremmer E., Jenne D.E. NSP4, an elastase-related protease in human neutrophils with arginine specificity // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2012. — V. 109. — №16. — P. 6229-6234.
140. Perera N.C., Wiesmüller K.H., Larsen M.T., Schacher B., Eickholz P., Borregaard N., Jenne D.E. NSP4 is stored in azurophil granules and released by activated neutrophils as active endoprotease with restricted specificity // *Immunol.* — 2013. — V.1. — № 191(5). — P. 2700-2707.
141. Phipps S., Ying S., Wangoo A., Ong Y.E. The relationship between allergen-induced tissue eosinophilia and markers of repair and remodeling in human atopic skin // *Immunol.* — 2002.— V. 169. — № 8. — P. 604-12.
142. Pratt C.W., Pizzo S.V. Mechanism of action of inter-alpha-trypsin inhibitor

- // Biochemistry. — 1987. — № 26. — P. 2855-2863.
143. Prokopowicz Z., Marcinkiewicz J., Katz D.R., Chain B.M. Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman // Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. — 2012. — V. 60.— №1. — P. 43-54.
 144. Romani L. Immunity to fungal infections // Nature Reviews Immunology. — 2011. — № 11.— P. 275–288.
 145. Rosenwasser L., Klemm D., Dresback J. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy // Clinical & Experimental Allergy. — 1995. — V. 25. — № 2. — P. 74-78.
 146. Roychaudhuri R., Hergrueter A.H., Polverino F., Laucho-Contreras M.E., Gupta K., Borregaard N., Owen C.A. ADAM 9 is a novel product of polymorphonuclear neutrophils: regulation of expression and contributions to extracellular matrix protein degradation during acute lung injury // Immunol. — 2014. — V.193.— №5. — P. 2469-2482.
 147. Sadik C., Sezin T., Kim N. Leukotrienes orchestrating allergic skin inflammation // Experimental Dermatology. 2013. — V.22. — №11. — P.705-709.
 148. Sales K.U., Friis S., Konkel J.E. Non-hematopoietic PAR-2 is essential for matriptase-driven pre-malignant progression and potentiation of ras-mediated squamous cell carcinogenesis // Oncogenes. — 2015. — V. 15.— № 34(3).— P. 346-536.
 149. Savolainen J., Kortekangas-Savolainen O., Nermes M., Viander M., Koivikko A., Kalimo K., Terho E.O. Ig E, Ig A, and Ig G responses to common yeasts in atopic patients // Allergy. — 1998.— V. 53. — №5. — P. 506-512.
 150. Seyfarth F., Wiegand C., Erhard M., Gräser Y., Elsner P., Hipler U.C. Identification of yeast isolated from dermatological patients by MALDI-TOF mass spectrometry // Mycoses.— 2012.— №55(3). — P. 276-280.

151. Sonesson A., Bartosik J., Christiansen J., Roscher I., Nilsson F., Schmidtchen A., Bäck O. Sensitization to skin-associated microorganisms in adult patients with atopic dermatitis is of importance for disease severity // *Acta Dermato-Venereologica*. — 2013. — № 93(3). — P. 340-345.
152. Song Z., Deng X., Chen W., Xu J., Chen S., Zhong H., Hao F. Toll-like receptor 2 agonist Pam3CSK4 up-regulates FcεRI receptor expression on monocytes from patients with severe extrinsic atopic dermatitis // *European Academy of Dermatology and Venereology*. — 2015. — № 24. — P. 234-237.
153. Sporik R., Holgate S. T., Platts-Mills T. A. E. Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study // *New England Journal of Medicine*. — 1990. — № 323. P. 502–507.
154. Sugai M., Gonda H., Kusunoki T. Essential role of Id 2 in negative regulation of IgE class switching // *Nature Immunology*. — 2003. — V. 4. — № 1. — P. 25-30.
155. Sugaya M. Chemokines and skin diseases // *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. — 2015. — №63(2). — P. 109-115.
156. Sugihara S., Sugimoto S., Tachibana K., Kobashi M., Nomura H., Miyake T., Hirai Y., Yamasaki O., Morizane S. TNF-α and IL-17A induce the expression of lympho-epithelial Kazal-type inhibitor in epidermal keratinocytes // *Dermatological Science*. — 2019. — №96(1). — P. 26-32.
157. Suzuki Y., Lehrer R.I. NAD(P)H oxidase activity in human neutrophils stimulated by phorbol myristate acetate // *Clinical Investigation*. — 1980. — V. 66 — № 6. — P. 1409-1418.
158. Takahashi H., Nukiwa T., Yoshimura K. Myelomonocytic cell lineage expression of the neutrophil elastase gene // *Biological Chemistry*. — 1988. — V. 263. — № 29. — P. 14739–14747.
159. Takatsu K. IL-5 and allergig inflammation // *Arerugi*. — 2018. — № 67(2). — P. 108-113.

160. Taniguchi K., Masuda Y., Takanaka K. Effects of beta-adrenergic agonists on metabolic activations of human neutrophils // *Pharmacobiodyn.* — 1991.— № 14(8).— P. 435-442.
161. Thompson M.M., Hanifin J.M. Effective therapy of childhood atopic dermatitis allays food allergy concerns // *American Academy of Dermatology.* — 2005. — V. 53. — № 2. — P. 214-249.
162. Thomas K., King R., Sestero C., Justement L. TREM-like transcript 2 is stored in human neutrophil primary granules and is up-regulated in response to inflammatory mediators // *Leukocyte Biology.* — 2016. — № 100(1). — P. 177-184.
163. Tongaonkar P., Golji A.E., Tran P., Ouellette A.J., Selsted M.E. High fidelity processing and activation of the human α -defensin HNP1 precursor by neutrophil elastase and proteinase // *PLoS One.* — 2012. — №7(3). — P. 32469.
164. Tsujii T., Katajama K., Naito I., Seno S., The circulating alpha 1-antitrypsin-elastase complex attacks the elastic lamina of blood vessels. An immunohistochemical study // *Histochemistry.* — 1988. — № 88. — P. 443-451.
165. Veldman C., Nagel A., Hertl M. Type. I Regulatory T Cells in Autoimmunity and Inflammatory Diseases // *International Archives of Allergy and Immunology.* —2006. — V.140. — №2. — P. 174-183.
166. Verhagen J., Akdis M., Traidl-Hoffmann C. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin // *Allergy and Clinical Immunology.* — 2006. — V. 117. — №1. — P. 176-183.
167. Vest B.E., Krauland K. *Malassezia Furfur* // *StatPearls Publishing.* — 2020. — Jan. — 18.
168. Vogelmeier C., Biedermann T., Maier K., Mazur G., Behr J., Krombach F., Buhl R., Comparative loss of activity of recombinant secretory leukoprotease

- inhibitor and α 1-protease inhibitor caused by different forms of oxidative stress // *European Respiratory*. — 1997. — V.10. — P. 2114-2119.
169. Wada T., Akagi T., Muraoka M., Toma T., Kaji K., Agematsu K., Koeffler H.P., Yokota T., Yachie A. A novel in-frame deletion in the leucine zipper domain of C/EBP ϵ leads to neutrophil-specific granule deficiency // *Immunol.* — 2015. — V.1.— № 195(1).— P. 80-86.
170. Waizman D.A., Ghosh S., Rothlin C.V. Bringing on the itch // *Elife*. — 2019. — V. 29. — №8. — P.52931.
171. Walsh C.M., Hill R.Z, Schwendinger-Schreck J., Deguine J., Brock E.C., Kucirek N., Rifi ., Wei ., Gronert K., Brem R.B., Barton G.M., Bautista D.M. Neutrophils promote CXCR3-dependent itch in the development of atopic dermatitis // *Elife*. — 2019. — № 8. — P. 48448.
172. Werfel T., Novel systemic drugs in treatment of atopic dermatitis: results from phase II and phase III studies published in 2017/2018 // *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. — 2018. — № 18(5). — P. 432 - 437.
173. Wiedow O., Muhle K., Streit V. Human eosinophils lack human leukocyte elastase // *Biochimica et Biophysica Acta*. — 1996. — V. 1315. — P. 185–187.
174. Wirth F., Goldani L.Z. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen // *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. — 2012. — P. 465717.
175. Wolach B., Gavrieli R., Roos D., Berger-Achituv S. Lessons learned from phagocytic function studies in a large cohort of patients with recurrent infections // *Clinical Immunology*. — 2012. — № 32(3). — P. 454-466.
176. Woodman R.C., Newburger P.E., Anklesaria P. A new X-linked variant of chronic granulomatous disease characterized by the existence of a normal clone of respiratory burst-competent phagocytic cells // *Blood*. — 1995. — V. 85. —

P. 231–241.

177. Yang C., Chen B., Zhao J., Lin L., Han L., Pan S. TREM-1 signaling promotes host defense during the early stage of infection with highly pathogenic *Streptococcus suis* // *Infection and Immunity*. — 2015. — № 83(8). — P. 3293-3301.
178. Yang J.H., Lee E., Lee B., Cho W.K., Ma J.Y., Park K.I. Ethanolic Extracts of *Artemisia apiacea* Hance Improved Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions In Vivo and Suppressed TNF-Alpha/IFN-GammaInduced Proinflammatory Chemokine Production In Vitro // *Nutrients*. — 2018. — V. 10 — № 7. — P. 806.
179. Ye S., Mo X., Liu J., Yan F., Chen D. Factors Influencing Atopic Dermatitis Incidence in Offspring // *Allergy Asthma Immunol.* — 2019. — V. 17. — № 18(4). — P. 347-357.
180. Yoshino T., Asada H., Sano S. Impaired responses of peripheral blood mononuclear cells to staphylococcus superantigen in patients with severe atopic dermatitis: a role of T cell apoptosis // *Investigative Dermatology*. — 2000. — V. 114. — №2. — P. 281-284.
181. Zhao X.W., Gazendam R.P., Drewniak A., van Houdt M., Tool AT., van Hamme J.L., Kustiawan I., Meijer A.B., Janssen H., Russell D.G., van de Corput L., Tesselaar K., Boelens J.J., Kuhnle I., Van Der Werff Ten Bosch J, Kuijpers T.W., van den Berg T.K. Defects in neutrophil granule mobilization and bactericidal activity in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL-5) syndrome caused by STXBP2/Munc18-2 mutations // *Blood*. — 2013. — V. 4. — № 122(1). — P. 109-111.
182. Zhou Y., Song K., Painter R.G., Aiken M., Reiser J., Stanton B.A., Nauseef W.M., Wang G. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator recruitment to phagosomes in neutrophils // *Innate Immunity*. — 2013. — № 5(3). — P. 219-230.

183. Zinkeviciene A., Girkontaite I., Citavicius D. Specific immunoglobulin E antibodies to saprophytic yeasts in sera of atopic patients allergic to house dust mites // *Investigational Allergology and Clinical Immunology*. — 2012. — № 22(6). — P. 412-418.
184. Zoega M., Ravnsborg T., Højrup P., Houen G, Schou C. Proteinase 3 carries small unusual carbohydrates and associates with α -defensins // *Proteomics*. — 2012. — V.16. — № 75(5). — P 1472-1485.