

Елистратова И.В.¹, Морозов С.Г.², Захарова И.А.², Тарасова М.В.²

Люминол-зависимая хемилюминесценция лейкоцитов периферической крови больных атопическим дерматитом при различной тяжести течения заболевания

¹ — ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь внутренних войск МВД России», 143930, Балашиха, мкр. Никольско-Архангельский, ш. Вишняковское, д. 101

² — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Целью работы было изучение спонтанной и индуцированной люминол — зависимой хемилюминесценции лейкоцитарных клеток крови больных атопическим дерматитом.

Методы. Кровь получали из локтевой вены, эритроциты удаляли, лейкоцитарную взвесь анализировали на люминографе. Опсонизированный зимозан и дрожжи *Candida tropicalis* были использованы для индукции хемилюминесценции лейкоцитов.

Результаты. При легкой степени тяжести атопического дерматита спонтанная и индуцированная хемилюминесценция лейкоцитов периферической крови больных была повышена, статистически достоверная разница показана между группами больных легкой и тяжелой степенью атопического дерматита, при которой изучаемые показатели достоверно были снижены. Контаминация кожи *Candida tropicalis* способствовала повышению уровня хемилюминесценции лейкоцитов крови при легкой степени тяжести атопического дерматита в первую неделю обострения. Тяжелая степень атопического дерматита сопряжена с подавлением как спонтанной, так и индуцированной хемилюминесценции.

Выводы. Люминол-зависимая хемилюминесценция лейкоцитов крови взрослых больных атопическим дерматитом может быть повышена на ранних стадиях обострения при легкой степени заболевания, но достоверно подавлена при тяжелом течении атопического дерматита.

Ключевые слова: атопический дерматит, хемилюминесценция, зимозан, *Candida tropicalis*.

Для цитирования: Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015; 59(4): 35-40.

Elistratova I.V.¹, Morozov S.G.², Zakharova I.A.², Tarasova M.V.²

Peripheral blood cells luminol-dependent chemiluminescence at the different stages of atopic dermatitis

¹ — The main military clinical hospital of internal troops of the MIA of Russia, 143930, Balashikha, Nikolo-Archangel, St. Vishnyakovskaya, 101

² — Research Institute General pathology and pathophysiology», 125315, Moscow, Russia, Baltiyskaya st., 8

Aim of this work was to record the luminol-dependent spontaneous and induced chemiluminescence at the different stages of atopic dermatitis.

Methods. Peripheral blood cells were obtained from adult patient with atopic dermatitis followed by the registration of luminol-dependent chemiluminescence on luminograph. Opsonized zymosan as well as yeasts *Candida tropicalis* have been used to induce the chemiluminescence.

Results. Spontaneous and induced chemiluminescence were slightly elevated at the mild atopic dermatitis but were decreased at the severe stage of disease. Statistically significant difference has been found between group with mild and severe atopic dermatitis, Skin contamination by yeasts *Candida tropicalis* causes the increased level of blood cells chemiluminescence at the first week of atopic relapse when the disease was mild. Severe stage of atopic dermatitis was coupled with statistically significant inhibition of both, spontaneous and induced chemiluminescence.

Conclusions. Luminol-dependent chemiluminescence of peripheral blood cells from adult atopic dermatitis patients may be stimulated at the mild stage and suppressed at severe stage of atopic dermatitis.

Key words: atopic dermatitis, chemiluminescence, zymosan, *Candida tropicalis*.

For citation: *Patologicheskaya Fiziologiya I eksperimentalnaya terapiya.* 2015; 59(4): 35-40.

For correspondence: Morozov S.G., e-mail: biopharm@list.ru

Полиморфноядерные гранулоциты (нейтрофилы) — это первые клетки, которые мигрируют в очаг воспаления в ответ на бактериальные или иные инфекционные стимулы. Помимо фагоцитарной активности, синтеза антимикробных пептидов, нейтрофилы также высвобождают в ткани реактивные метаболиты кислорода (Reactive Oxygen Species — ROS) и протеолитические ферменты. При накоплении нейтрофилов в тканях и нарушении программы апоптоза, высвобождаемые ими цитокины и ROS могут вызвать повреждение клеток и поддерживать воспалительный процесс в экстраклеточном пространстве [1]. Число нейтрофилов в коже больных атопическим дерматитом не меньше, чем у больных псориазом [2]. По другим данным, при атопическом дерматите ослаблен приток нейтрофилов в ткани [3].

В отношении функциональной активности нейтрофилов периферической крови при атопическом дерматите данные разных авторов противоречивы. По некоторым данным, у больных атопическим дерматитом снижена фагоцитарная активность, при этом повышена экспрессия рецепторов CD11b, CD66b, TLR2, TLR4, TLR5 по сравнению со здоровыми лицами [4]. У больных атопическим дерматитом 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 [5]. По другим данным, у больных атопическим дерматитом функциональная активность нейтрофилов в ответ на рецептор-зависимые стимулы (fmlr, C5a, LTB4, опсонизированный зимозан) сопоставима с данными здоровых людей. Моноциты больных атопическим дерматитом отвечали повышенной продукцией супероксидного аниона после стимуляции зимозаном и небольшим повышением fmlr-индуцированного хемотаксиса. При высоком уровне контаминации бактериальной инфекцией хемотаксис нейтрофилов и моноцитов больных атопическим дерматитом был снижен в течение трех дней от начала заболевания. Генерация супероксидного аниона нейтрофилами при этом была снижена, а в моноцитах — повышена. Изменение функциональной активности нейтрофилов и моноцитов при атопическом дерматите связывают с наличием или отсутствием бактериальной инфекции. При нормальной фагоцитарной активности у больных они, как правило, не имели выраженной бактериальной контаминации. При дефиците хемотаксиса и фагоцитоза у больных были повторы выраженной бактериальной инфекции и поражения грибами или системная инфекция [6].

При атопическом дерматите клетки кожи в пораженных участках находятся в условиях высокой концентрации реактивных метаболитов кислорода.

Основной источник ROS внутри клеток — митохондриальное дыхание, нарушение которого при различных патологических состояниях приводит к изменению уровня супероксидного аниона. За «респираторный взрыв» ответственна NADPH оксидаза — мембранно-связанный ферментный комплекс, генерирующий супероксидный анион путем каталитического переноса электронов от NADPH на молекулярный кислород [7]. На нейтрофилах присутствует NADPH оксидаза-2. С-концевой домен NADPH оксидазы-1, -2, -3 и -5 связывает белок теплового шока HSP90, который необходим для стабилизации фермента и продукции супероксидного аниона. NADPH оксидаза-4 ответственна только за продукцию перекиси водорода, но не продуцирует супероксидный анион [8].

Для изучения функциональной активности нейтрофилов часто используют опсонизированный зимозан, который распознается экспрессированными вместе рецепторами FcγRIIa и FcγRIIb (CD32a и CD16b). CD32a — это трансмембранный белок, CD16b — GPI-заякоренный протеин, экспрессия которого на нейтрофилах в 10 раз превышает уровень экспрессии CD32a (135 000 vs 10 000 рецепторов на клетку). В состоянии покоя аффинность связывания этих рецепторов для Fc фрагмента мономерного IgG человека относительно низка, при активации их экспрессия повышается, а также возрастает аффинность связывания. Оба рецептора необходимы для адекватного ответа на IgG-зависимые стимулы и продукции супероксидного аниона нейтрофилами [9].

В связи с тем, что нет определенного понимания функции нейтрофилов при атопическом дерматите, мы поставили задачу изучить генерацию супероксидного аниона нейтрофильными клетками периферической крови больных атопическим дерматитом в зависимости от стадии заболевания и тяжести течения.

Методика

Пациенты и доноры

В работе представлены материалы обследования 146 пациентов с атопическим дерматитом (до лечения), в возрасте от 18 до 38 лет. Все пациенты и доноры подписывали форму информированного согласия. Критериями исключения пациентов из исследования служили:

- 1) наличие острых вирусных или бактериальных инфекций;
- 2) онкологические заболевания;
- 3) соматические заболевания, которые могли бы оказать дезинформирующее влияние на полученные результаты;

4) наличие системных аллергических или воспалительных заболеваний;

5) беременность;

5) невозможность постоянной работы с пациентом в связи с его психомоторным состоянием.

Тяжесть течения заболевания оценивали по индексу SCORAD. В настоящем исследовании представлены данные 32 здоровых доноров.

Выделение клеток крови

Работа с кровью людей проводилась по международным правилам работы с биологическим материалом. Кровь брали натошак из локтевой вены в вакутейнер с ЭДТА. Для получения лейкоцитарной взвеси кровь переносили в центрифужные пробирки, добавляли 15 мл лизирующей жидкости (коммерческий препарат фирмы Vecton Dickinson для удаления эритроцитов), затем центрифугировали 10 мин при 200g при комнатной температуре. Супернатант удаляли, осадок встряхивали, добавляли 199 среду и отмывали суспензию клеток центрифугированием.

Люминол-зависимая хемилюминесценция

Суспензию клеток доводили до концентрации 1×10^6 клеток в 100 мкл фосфатного буфера с люминолом. По 100 мкл суспензии переносили в пробирки люминографа и термостатировали при 37°C . Для каждого больного ставили по три параллельные пробирки. Динамику хемилюминесценции измеряли на автоматизированном 36-канальном хемилюминографе «Люцифер-Б» (Диалог, Москва). Спонтанную хемилюминесценцию определяли до выхода кривой числа импульсов на плато (10 ± 2 мин). Затем добавляли 5 мкл 1% раствора опсонизированного зимозана (или другого активатора) и в течение 40 мин измеряли индуцированную хемилюминесценцию. В качестве индуктора хемилюминесценции также использовали дрожжи *Candida tropicalis* (20 мкл раствора дрожжей по 50×10^3 клеток на пробу). Схема проведения измерений представлена на рисунке. Результаты определяли по максимальным значениям кинетической кривой и выражали в виде среднего числа импульсов в минуту на 100 мкл клеток, а также в пересчете на 1×10^6 клеток по сумме трех измерений на каждую пробу.

Статистический анализ

Все эксперименты проводились в повторах, полученные данные представлены как $M \pm m$. Данные анализировались по программе ANOVA. Сравнение между двумя группами проводили по критерию Стьюдента, статистический анализ нескольких групп проводился с помощью непараметрического анализа

методом множественного сравнения по критерию Ньюмена—Кейлса, $P \leq 0,05$ дается как статистически значимое различие между группами.

Результаты и обсуждение

Полученные данные по спонтанной и индуцированной хемилюминесценции лейкоцитарной взвеси периферической крови проанализированы в зависимости от тяжести течения атопического дерматита (по индексу SCORAD) (табл. 1) и распространенности процесса (табл. 2).

Полученное повышение спонтанной и индуцированной хемилюминесценции при легкой степени тяжести атопического дерматита и ограниченной локализации процесса по сравнению со здоровыми донорами не является статистически достоверной. При сравнении результатов больных с тяжелым течением и легкой степенью имеется достоверное различие ($P < 0,05$). Показано достоверное различие ($P < 0,05$) между уровнем индуцированной зимозаном хемилюминесценции у больных ограниченно-локализованным и диффузным процессом.

Далее был проведен анализ полученных результатов в зависимости от длительности течения настоящего обострения. Среди тех больных, которые обратились в поликлинику в течение первой недели текущего обострения (с 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 раздельно. Для этих выделенных групп больных были подобраны доноры соответствующего возраста. При контаминации кожи условно-патогенными дрожжами рода *Candida tropicalis* ($n = 18$) показана более высокая спонтанная хемилюминесценция по сравнению со

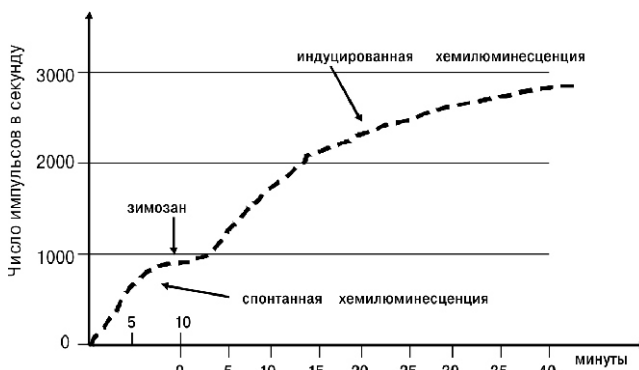


Схема проведения измерений люминол-зависимой хемилюминесценции.

средними показателями для общей группы больных. У двух больных с тяжелым течением 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 ($P < 0,05$). Индуцированная зимозаном хемилюминесценция была повышена (недостоверно) при легкой степени тяжести заболевания по сравнению с донорами, но достоверно повышена по сравнению с тяжелой формой заболевания ($P < 0,05$) (табл. 3). Неожиданным оказался 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 первую неделю обострения, у которых подтверждена контаминация кожи бактериями ($n = 42$), выделена группа лиц, контаминированных золотистым стафилококком ($n = 20$). У трех больных с тяжелой формой атопиче-

Таблица 1

Хемилюминесценция (импульсы в секунду) на 1×10^6 клеток крови доноров и больных атопическим дерматитом в зависимости от тяжести течения*

	Доноры (n = 32)	Больные атопическим дерматитом. Классификация по индексу SCORAD		
		Легкое течение <20 (n = 48)	Средней тяжести 20 — 40 (n = 76)	Тяжелое течение 40 — 60 (n = 22)
Спонтанная хемилюминесценция	963 ± 71	1210 ± 141	982 ± 113	729 ± 122
Индуцированная хемилюминесценция				
Зимозан	3136 ± 244	3482 ± 201	3017 ± 324	2921 ± 306
<i>Candida tropicalis</i>	2905 ± 298	2988 ± 265	2794 ± 302	2521 ± 287

Примечание. * Фон составил 300 импульсов в секунду

Таблица 2

Хемилюминесценция (импульсы в секунду) на 1×10^6 клеток крови доноров и больных атопическим дерматитом в зависимости от площади поражения кожи*

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

Примечание. * Фон составил 300 импульсов в секунду

Таблица 3

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*

	Доноры (n = 12)	Больные атопическим дерматитом. Классификация по индексу SCORAD		
		Легкое течение <20 (n = 7)	Средней тяжести 20 — 40 (n = 9)	Тяжелое течение 40 — 60 (n = 2)
Спонтанная хемилюминесценция	1202 ± 95	1351 ± 124	1196 ± 133	801 ± 57
Индуцированная хемилюминесценция				
Зимозан	3341 ± 195	3556 ± 201	3198 ± 227	2980 ± 166
<i>Candida tropicalis</i>	3220 ± 169	3301 ± 244	3012 ± 295	2891 ± 306

Примечание. * Фон составил 300 импульсов в секунду

ского дерматита была микст-инфекция, у двух — сочетанное поражения грибами и бактериями. В этой группе больных имеется тенденция к снижению уровня хемилюминесценции по мере усиления тяжести заболевания. Индуцированная зимозаном хемилюминесценция клеток крови больных тяжелой формой атопического дерматита достоверно снижена ($P < 0,05$) по сравнению с донорами и больными с легкой формой заболевания. Уровень хемилюминесценции, стимулированной дрожжами *Candida tropicalis*, ниже показателей для общего числа больных атопическим дерматитом, и достоверно ниже у больных с тяжелой формой атопического дерматита ($P < 0,05$) по сравнению с донорами и с больными легкой формой заболевания (табл. 4). Таким образом, контаминация кожи бактериальной инфекцией при атопическом дерматите обуславливает снижение хемилюминесценции лейкоцитов, как спонтанной, так и индуцированной зимозаном или дрожжами рода *Candida tropicalis*.

По имеющимся данным литературы, у больных с тяжелой формой заболевания и бактериальной контаминацией показано снижение функциональной активности нейтрофилов, которое связано в некоторых случаях с нарушением рецепторного аппарата клеток. Рецепторы TLR4 распознают бактериальный липополисахарид Грам-отрицательных бактерий, а рецепторы TLR2 распознают Грам-положительные бактерии, бактериальные пептиды и дрожжи. Кроме того, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий 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 атопическом дерматите являются: *Malassezia spp.*, *Candida spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Dematiophagoides pteronyssinus* [10]. Однако, по нашим данным, контаминация кожи условно патогенными дрожжами *Candida tropicalis* у больных атопическим дерматитом 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 атопического дерматита все определяемые показатели были достоверно снижены, что соответствует данным литературы.

Заключение

Значение полученных результатов определяется тем, что показана стимуляция генерации супероксидного аниона лейкоцитарными клетками крови больных атопическим дерматитом в первые дни обострения заболевания при легкой степени тяжести (< 20 по индексу SCORAD) 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 лейкоцитов крови больных атопическим дерматитом. 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 атопического дерматита функциональная активность нейтрофилов достоверно снижена, что согласуется с рядом публикаций зарубежных авторов.

Таблица 4

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

	Доноры (n = 14)	Больные атопическим дерматитом. Классификация по индексу SCORAD		
		Легкое течение <20 (n = 4)	Средней тяжести 20 — 40 (n = 11)	Тяжелое течение 40 — 60 (n = 5)
Спонтанная хемилюминесценция	1083 ± 124	921 ± 109	887 ± 126	862 ± 148
Индуцированная хемилюминесценция				
Зимозан	3012 ± 222	2986 ± 213	2598 ± 283	2401 ± 254
<i>Candida tropicalis</i>	2998 ± 182	2750 ± 205	2434 ± 237	2216 ± 321

Примечание. * Фон составил 300 импульсов в секунду

Выводы

1. Генерация супероксидного аниона лейкоцитарными клетками крови больных атопическим дерматитом зависит от тяжести течения заболевания и степени распространённости процесса.

2. У больных с легкой степенью тяжести атопического дерматита или при ограниченно-локализованном типе процесса показано небольшое повышение спонтанной и индуцированной хемилюминесценции лейкоцитов.

3. Контаминация кожи условно патогенными дрожжами *Candida tropicalis* сопряжена с повышением спонтанной и индуцированной хемилюминесценции лейкоцитов крови больных атопическим дерматитом в первые дни обострения заболевания при легкой степени процесса.

References

1. Kandalova O.V., Taratutina N.V., Martinova E.A. Spontaneous and ceramide-induced apoptosis in the skin cells obtained from patients with atopic dermatitis, eczema, and psoriasis, compared with donors. *Patogenez*. 2014; 10 (4): 60-5. (in Russian)

2. Choy D., Hsu D., Seshasayee D., Fung M., Modrusan Z., Martin F. et al. Comparative transcriptomic analyses of atopic dermatitis and psoriasis reveal shared neutrophilic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 130 (6): 1335-143.

3. Dhingra N., Suarez-Farinas M., Fuentes-Duculan J., Gittler J., Shemer A., Raz A. et al. Attenuated neutrophil axis in atopic dermatitis compared to psoriasis reflects TH17 pat-

hway differences between these diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 132 (2): 498-501.

4. Fierro M., Banche G., Marengo F., Novelli M., Allizond V., Mandras N. et al. Functional and phenotypical impairment of polymorphonuclear cells in atopic dermatitis: an additional cause for the known susceptibility to infections? *Dermatology*. 2012; 224 (4): 323-30.

5. Forte W., Guardian V., Mantovani P., Dionigi P., Meneses M. Evaluation of phagocytes in atopic dermatitis. *Allergol. Immunopathol. (Madr)*. 2009; 37(6): 302-8.

6. Mrowietz U., Konter U., Traut R., Schroder J., Christophers E. Atopic dermatitis: influence of bacterial infections on human monocyte and neutrophil granulocyte functional activities. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1988; 82 (6): 1027-1036.

7. Kim C., Dinauer M. Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways. *J. Immunol.* 2001; 166 (2): 1223-32.

8. 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): 2107-19.

9. Marois L., Pare G., Vaillancourt M., Rollet-Labelle E., Naccache P. FcγRIIIb triggers raft-dependent calcium influx in IgG-mediated responses in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 2011; 286 (5): 3509-19.

10. Sonesson A., Bartosik J., Christiansen J., Roscher I., Nilsson F., Schmidtchen A., Back O. Sensitization to skin-associated microorganisms in adult patients with atopic dermatitis is of importance for disease severity. *Acta Derm. Venereol.* 2013; 93: 340-5.

Поступила 02.11.15

Сведения об авторах:

Елистратова Ирина Владимировна (Elistratova I.V.), канд. мед. наук, врач дерматовенеролог; ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь внутренних войск МВД

Захарова Ирина Александровна (Zakharova I.A.), канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ФГБНУ «НИИОПП»

Тарасова Маргарита Валерьевна (Tarasova M.V.), науч. сотр. ФГБНУ «НИИОПП»