

УДК 616-092.18

Кибалина И.В., Фефелова Е.В., Цыбиков Н.Н.

ДВОЙСТВЕННАЯ РОЛЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 672000, г. Чита, ул. Горького 39а

Цель исследования. Исследование роли нейтрофильных внеклеточных ловушек, α -дефензинов и ИЛ-8 в патогенезе atopического дерматита.

Материал и методы. В исследовании участвовали 40 пациентов, страдающих ограниченной и распространенной формами atopического дерматита, подписавшие добровольное информированное согласие. У всех пациентов до проведения стандартной базисной терапии брали мазок-отпечаток с эрозивной поверхности кожи, а также кровь в период обострения и ремиссии дерматоза. В мазке-отпечатке определяли нейтрофильные внеклеточные ловушки, в сыворотке крови – интерлейкин-8 и α -дефензины.

Результаты. В мазках-отпечатках выявлены внеклеточные нейтрофильные ловушки, являющиеся первой линией защиты от микробных триггерных факторов. В период обострения atopического дерматита уровень ИЛ-8 и α -дефензинов в сыворотке крови значительно превышает их содержание в ремиссию заболевания.

Заключение. Нейтрофильные гранулоциты играют двойственную роль в патогенезе atopического дерматита, с одной стороны, оказывают выраженный противомикробный эффект, с другой – усиливают вторичную альтерацию, влияя на хронизацию процесса.

Ключевые слова: atopический дерматит, нейтрофильные внеклеточные ловушки, интерлейкин-8, α -дефензины

Kibalina I.V., Fefelova E.V., Tsybikov N.N.

DUAL ROLE OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN THE PATHOGENESIS OF ATOPIC DERMATITIS

Chita state medical Academy, Chita, Russia, 39A Gorky str., 672000

The aim of the research. Investigation of the role of neutrophil extracellular traps, α -defensins, and IL-8 in the pathogenesis of atopic dermatitis.

Material and methods. The study included 40 patients suffering from limited and common forms of atopic dermatitis. Prior to standard basic therapy, all patients received a smear imprint from the erosive surface of the skin, as well as blood during the period of exacerbation and remission of dermatosis. In a smear from the surface of erosion, neutrophilic extracellular traps were determined, interleukin-8 and α -defensins were determined in blood serum.

Results. Extracellular neutrophilic traps, which are the first line of defense against microbial trigger factors, were detected in fingerprint smears. In the period of exacerbation of atopic dermatitis, the level of IL-8 and α -defensins in serum significantly exceeds their number in remission of the disease.

Conclusion. Neutrophilic granulocytes have a dual role in the pathogenesis of atopic dermatitis, on the one hand, have a pronounced antimicrobial effect, on the other hand, they enhance the processes of secondary alteration, affecting the chronization of the process.

Keywords: atopic dermatitis, neutrophilic extracellular traps, interleukin-8, α -defensins

В последнее десятилетие значительно изменились и расширились представления о значимости нейтрофильных гранулоцитов в механизмах реализации врожденного иммунного ответа [1, 2, 3]. Однако в современных литературных источниках недостаточно сведений для понимания их роли в патогенезе atopического дерматита.

Активное изучение нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), образуемых полиморфноядерными лейкоцитами, началось относительно недавно – с 2004 года. Выявлено, что после контакта с триггерными факторами нейтрофилы способны к синтезу и выбросу во внеклеточное пространство сетеподобных структур, состоящих из фрагментов

ДНК и включающих эластазу, миелопероксидазу, гистоны, лизоцим, лактоферрин, а также гидролитические ферменты [4, 5]. Триггерными факторами для образования НВЛ являются микробные агенты, грибы, простейшие, аутоантигены [6, 7, 8]. При atopическом дерматите наблюдается высокий уровень обсемененности кожи условно-патогенными микроорганизмами. Основными звеньями антимикробной защиты, направленными на данное звено патогенеза, являются не только НВЛ, но и а-дефензины. Это пептиды, синтезируемые при активации нейтрофильных гранулоцитов и выполняющие функции первой линии защиты от грибов, вирусов и бактерий [9, 10]. Одна из значимых ролей в механизме развития atopического дерматита отводится интерлейкину-8 (ИЛ-8). Данный цитокин, обладая хемоатрактантными свойствами, способен обеспечивать миграцию клеток, в том числе нейтрофилов, в зону воспаления. Обладая защитными свойствами, НВЛ, а-дефензины и ИЛ-8 играют важную роль в механизмах врожденного иммунного ответа при atopическом дерматите.

В связи с вышеизложенным, является неоспоримо актуальным изучение роли данных звеньев врожденного иммунитета в процессах хронизации и формирования клинических симптомов atopического дерматита.

Цель. Исследование роли НВЛ, а-дефензинов и ИЛ-8 в патогенезе atopического дерматита.

Материалы и методы. В исследовании участвовали 40 пациентов в возрасте от 15 до 37 лет с ограниченной (52,3%) и распространенной формами (47,7%) atopического дерматита. Локальный этический комитет одобрил протокол исследования, все пациенты подписали добровольное информированное согласие на исследование. Ограниченная форма atopического дерматита преимущественно локализовалась на коже локтевых и подколенных сгибов, запястий, лица. Клиническая картина была представлена очагами инфильтрации, лихенификацией, единичными пузырьками, эрозивными элементами и геморрагическими корочками. При распространенной форме заболевания в процесс были вовлечены кожа лица, туловища, верхних и нижних конечностей. Морфологическими элементами являлись разнообразные структуры: мелкие папулы, пузырьки, выраженная инфильтрация, шелушение, стойкая эритема, эрозии, эксфолиации, корки. При поступлении в стационар всем пациентам с поверхности эрозивных дефектов кожи были взяты мазки-отпечатки, которые окрашивались реакцией Фельгена с применением реактива Шиффа. С помощью данной реакции окрашивается дезоксирибоза, входящая в состав хроматина. Морфологическим критерием НВЛ являлась сетчатая структура, состоящая из нитей хроматина. Мазки-отпечатки исследовали методом световой микроскопии с определением числа нейтрофилов и нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Исследование уровня ИЛ-8 и а-дефензинов в сыворотке крови проводили с помощью стандартных тест-систем методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием автоматического иммуноферментного анализатора с последующей стандартной статистической обработкой.

Описательная статистика представлена медианой и межквартильными интервалами, применялись методы непараметрической статистики с использованием U-критерия Манна-Уитни и Вилкоксона, критическое значение уровня значимости менее 0,05.

Результаты и их обсуждение. Ранее предполагалось, что нейтрофильные гранулоциты обладают лишь антимикробной защитой, однако в последние годы их функции были расширены. Данные клетки способны к синтезу белков, секреции ферментов, молекул, модифицирующих активность хемокинов, цитокинов и ростковых факторов.

В мазках-отпечатках с поверхности эрозий выявлен $81 \pm 7,4\%$ нейтрофилов с преобладанием несегментированных форм ($31,2 \pm 2,8\%$) и $19 \pm 9,2\%$ лимфоцитов. Количество НВЛ составило $27,1 \pm 4,7\%$. Были выявлены 8 проб, в которых уровень образованных НВЛ значительно превышал количество интактных нейтрофильных гранулоцитов. При распространенной форме и выраженном воспалительном процессе НВЛ образуют сплошные поля в мазке-отпечатке.

В процессе активации нейтрофилов происходит каскад окислительных реакций с последующим образованием свободных радикалов. Активация нейтрофильных гранулоцитов, с одной стороны, выполняет функцию элиминации триггерных факторов, однако, с другой стороны, запускает механизмы развития вторичной альтерации, вызывающей повреждение собственных тканей с образованием аутоантигенов. При нормальных процессах синтеза и элиминации НВЛ осуществляется антимикробная функция, однако рост числа НВЛ не всегда имеет положительное значение и, возможно, провоцирует развитие воспалительных процессов в коже, усугубляя течение атопического дерматита.

При атопическом дерматите уровень α -дефензинов в сыворотке крови значительно увеличен, особенно при распространенной форме заболевания. Этот факт свидетельствует о высокой персистенции микроорганизмов в период обострения дерматоза. При разрешении клинических проявлений заболевания уровень α -дефензинов значительно снижается (табл. 1). Антимикробные пептиды вызывают нарушения целостности мембраны микроорганизмов, вызывая их лизис. Подавляя синтез белков микроорганизмов, α -дефензины способствуют развитию не только дисфункции митохондрий бактерий, но и вызывают «электропробой» при взаимодействии с отрицательно заряженной мембраной кератиноцита, способствуя развитию цитолиза клеток кожи и появлению аутоантигенов.

Таблица 1

Содержание α -дефензинов в сыворотке крови при атопическом дерматите (M \pm SD)

Форма АтД/Стадия	Ограниченная форма (n=21)	Распространенная форма (n=19)	Контрольная группа (n=10)
Обострение (мкг/мл)	0,93 \pm 0,31 P1	1,98 \pm 0,94 P1, P2, P3	0,74 \pm 0,18
Ремиссия (мкг/мл)	0,62 \pm 0,24 P3	0,54 \pm 0,18 P2	

Примечание: P1 – $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни в сравнении с контрольным значением, P2 – $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни в сравнении между группами, P3 – $p < 0,05$ по критерию Вилкоксона сравнение показателей в период ремиссии и обострения.

Обладая выраженными противовоспалительными свойствами, ИЛ-8 способен привлекать в зону повреждения кожи лимфоциты, нейтрофилы, эозинофилы, моноциты. Клетками продуцентами ИЛ-8 в коже являются кератиноциты, макрофаги, лимфоциты и фибробласты. Данный хемокин, являясь маркером острой фазы воспаления, способен не только усиливать адгезию нейтрофилов в коже при атопическом дерматите, стимулировать синтез и увеличение концентрации биологически активных веществ, но и осуществлять провоспалительную функцию. В период обострения дерматоза уровень ИЛ-8 значительно возрастает, особенно при распространенном кожном процессе (табл. 2). Снижение концентрации данного показателя зафиксировано в период стойкой ремиссии.

Таблица 2

Содержание ИЛ-8 в сыворотке крови при атопическом дерматите (M \pm SD)

Форма АтД/Стадия	Ограниченная форма (n=21)	Распространенная форма (n=19)	Контрольная группа (n=10)
Обострение(пг/мл)	199,86 \pm 24,87 P1	518,51 \pm 94,86	13,64 \pm 4,18
Ремиссия(пг/мл)	7,03 \pm 3,01 P1, P3	38,24 \pm 7,32 P1, P2, P3	

Примечание: P1 – Манна-Уитни в сравнении с контрольным значением, P2 - Манна-Уитни в сравнении между группами, P3 - Вилкоксона сравнение показателей в период ремиссии и обострения

Выводы. При атопическом дерматите нейтрофилы реализуют антимикробную защиту за счет внеклеточных ловушек, усиливающих локальный протеазный потенциал в коже, что вызывает вторичную альтерацию и хронизацию воспаления. Усиливают эту реакцию ИЛ-8 и α -дефензины.

Список литературы:

1. Brinkmann V. Neutrophil extracellular traps in the second decade. *J. Innate Immun.* 2018. 3. 1-8.
2. Русинова Т.В., Чудилова Г.А., Колесникова Н.В. Сравнительная оценка иммуотропных эффектов *in vitro* дерината и синтетического агониста TLR9 на рецепторную функцию нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов в норме и при инфекционном процессе. *Кубанский научный медицинский вестник.* 2016. 5. 94-97.
3. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В. [и др.]. Дифференцированность вариантов субпопуляций трансформированного фенотипа CD16+CD11b+ нейтрофильных гранулоцитов при острой вирусной и острой бактериальной инфекциях. *Иммунология.* 2016. 4. 199-204.
4. Паршина А.А., Цыбиков Н.Н. Нейтрофильные внеклеточные ловушки. *Успехи современной биологии.* 2018. 5. 488-502.
5. Evglevsky A.A., Nesterova I.V., Chudilova G.A. [et al.] Ezaugarri espontaneo eta eragindako berregituraketa erabiliz-neutrophil granulocyte nukleo batean pertsona osasuntsu. *Allergy, asthma, immunology: International Proceedings.* 2016. 1. 327-332.
6. Евглевский А.А., Нестерова И.В., Чудилова Г.А. Хроматин ядер нейтрофильных гранулоцитов здоровых людей: фракции, спонтанная и индуцированная реструктуризация, ассоциированность с экспрессией генов цитокинов. *Аллергология и иммунология.* 2016. 2. 100-103.
7. Евглевский А.А., Нестерова И.В., Ковалева С.В. Особенности реструктуризации хроматина нейтрофильных гранулоцитов при различных видах патологии и их диагностическое значение. *Российский иммунологический журнал.* 2016. 2. 84-86.
8. Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В. [и др.]. Новые иммунологические биомаркеры острых вирусных и бактериальных инфекций: детекция дифференцированной трансформации фенотипа нейтрофильных гранулоцитов. *Аллергология и иммунология.* 2015. 4. 383.
9. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А. [и др.]. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле. *Иммунология.* 2015. 4. 257-265.
10. Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A. [et al.]. The positive transformation of the phenotype, the functional activity of neutrophilic granulocytes in children with recurrent respiratory infections as treatment' results of interferon and immunomodulation therapy. *Allergy, asthma, immunology: International Proceedings.* 2015. 4. 69-72.

References

1. Brinkmann V. Neutrophil extracellular traps in the second decade. *J. Innate Immun.* 2018. 3. 1-8.
2. Rusinova T.V., Chudilova G.A., Kolesnikova N.V. Comparative evaluation of immunotropic effects of *in vitro* derinate and synthetic agonist TLR9 on the receptor function of neutrophil granulocytes and monocytes in normal and infectious processes. *Kuban scientific medical Bulletin.* 2016. 5. 94-97. in Russian.
3. Nesterova I.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V. [et al.]. Differentiation of variants of subpopulations of the transformed CD16+CD11b+ neutrophil granulocyte phenotype in acute viral and acute bacterial infections. *Immunology.* 2016. 4. 199-204. in Russian.
4. Parshina A.A., Tsybikov N.N. Neutrophil extracellular traps. *Advances in modern biology.* 2018. 5. 488-502. in Russian.
5. Evglevsky A.A., Nesterova I.V., Chudilova G.A. [et al.]. Features of spontaneous and induced restructurization of the nucleus chromatin of neutrophilic granulocytes of healthy people. *Allergy, asthma, immunology: International Proceedings.* 2016. 1. 327-332.
6. Evglevsky A.A., Nesterova I.V., Chudilova G.A. Chromatin of neutrophil granulocyte nuclei in healthy people: fractions, spontaneous and induced restructuring, Association with cytokine gene expression. *Allergology and immunology.* 2016. 2. 100-103. in Russian.

7. Yevglevsky A.A., Nesterova I.V., Kovaleva S.V. Features of chromatin restructuring of neutrophil granulocytes in various types of pathology and their diagnostic significance. Russian journal of immunology. 2016. 2. 84-86. in Russian.
8. Chudilova G.A., Lomtadze L.V., Kovaleva S.V. [et al.]. New immunological biomarkers of acute viral and bacterial infections: detection of differentiated transformation of the neutrophil granulocyte phenotype. Allergology and immunology. 2015. 4. 383. in Russian.
9. Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A. [et al.]. Neutrophilic granulocytes: a new look at the "old players" in the immunological field. Immunology. 2015. 4. 257-265. in Russian.
10. Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A. [et al.]. The positive transformation of the phenotype, the functional activity of neutrophilic granulocytes in children with recurrent respiratory infections as treatment' results of interferon and immunomodulation therapy. Allergy, asthma, immunology: International Proceedings. 2015. 4. 69-72.