

# Влияние иммуотропной терапии на уровень $\alpha$ -дефензинов у больных пиодермией

Е.А. Цывкина, Е.С. Феденко, А.С. Будихина, Б.В. Пинегин  
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, г. Москва

**Ключевые слова:** иммуномодуляторы, пептидогликаны, глюкозаминмурамилдипептид, антимикробные пептиды,  $\alpha$ -дефензины,  $\beta$ -дефензины, пиодермия

**Цель работы.** Изучить уровень  $\alpha$ -дефензинов в нейтрофилах периферической крови больных пиодермией в сравнении со здоровыми донорами и оценить клиническую эффективность ликопида и его влияние на уровень  $\alpha$ -дефензинов.

**Материалы и методы.** Методом проточной лазерной цитометрии с использованием мышиных моноклональных анти-ННР антител (Hu cult biotechnology) исследовали уровень внутриклеточных  $\alpha$ -дефензинов в нейтрофилах периферической крови 31 пациента с пиодермией и у 17 здоровых доноров. Всем пациентам с пиодермией проведена иммуотропная терапия с использованием ликопида в дозе 10 мг в сут в течение 10 дней. Клинические и лабораторные результаты оценивали через 7–10 дней и через месяц после лечения.

**Результаты.** Выявлено снижение уровня внутриклеточных  $\alpha$ -дефензинов в нейтрофилах периферической крови у пациентов с пиодермией по сравнению со здоровыми донорами. Иммуотропная терапия ликопидом в дозе 10 мг в сут в составе комплексного лечения у больных с пиодермией приводит к повышению уровня  $\alpha$ -дефензинов в лейкоцитах периферической крови.

**Заключение.** Снижение уровня  $\alpha$ -дефензинов у больных пиодермией по сравнению со здоровыми донорами можно рассматривать как маркер хронического бактериального воспаления, обусловленного *St. aureus*, являющимся причиной пиодермий. Включение в схему лечения ликопида 10 мг в сут приводит к удлинению сроков ремиссии пиодермии и повышению уровня внутриклеточных дефензинов. Определение дефензинов может быть полезным в вопросе целесообразности проведения и подбора иммуотропной терапии у пациентов с пиодермией.

## Введение

Актуальность проблемы восстановления иммунологических нарушений с помощью иммуотропных лекарственных препаратов в настоящее время не вызывает сомнения, поскольку почти любое хроническое заболевание сопровождается развитием вторичной иммунной недостаточности. Проблема иммуотерапии представляет интерес для врачей практически всех специальностей в связи с неуклонным ростом инфекционно-воспалительных заболеваний, склонных к хроническому и рецидивирующему течению. Иммуотропные лекарственные препараты – это препараты, у которых лечебный эффект связан с их преимущественным действием на иммунную систему. Различают три основные группы иммуотропных лекарственных препаратов, которые можно использовать при заболеваниях, связанных с

нарушениями в системе иммунитета: иммуномодуляторы, иммуностимуляторы и иммунодепрессанты.

Бактериальные иммуномодуляторы остаются одной из наиболее перспективных групп иммуотропных препаратов [1].

В комплексной терапии больных пиодермией используют препараты, оказывающие корректирующее действие на иммунную систему. Одним из препаратов, рекомендованных для лечения гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей, является ликопид. Ликопид – лекарственная форма глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП), представляет собой минимальную повторяющуюся структурную единицу пептидогликана клеточных стенок практически всех известных бактерий.

Изучение роли антимикробных пептидов (АМП) и влияние иммуотропной терапии на них при пиодермии представляет большой научный и практический интерес, поскольку такие исследования могут пролить свет на механизмы противомикробной защиты, а также позволят установить новые диагностические маркеры воспаления и

*Адрес для корреспонденции*

Цывкина Е.А.  
E-mail: katiia1982@inbox.ru

прогнозировать течение заболевания, усовершенствовать алгоритм обследования и индивидуального подбора препарата у больных пиодермией. Учитывая недостаточность экспериментальных данных по изучению АМП при гнойничковых заболеваниях кожи [2–4], а также отсутствие данных о влиянии иммуотропной терапии на уровень АМП, целью данного исследования явилось изучение уровня  $\alpha$ -дефензинов в периферической крови у больных пиодермией в сравнении со здоровыми донорами, а также изучение влияния иммуотропной терапии с использованием ликопида на клиническое течение пиодермии и на содержание АМП в периферической крови.

### Материалы и методы

Основную группу составил 31 пациент с пиодермией в возрасте от 18 до 45 лет. Группу контроля составили 17 здоровых доноров в возрасте от 23 до 50 лет. Пациенты с пиодермией были разделены на 2 подгруппы: 12 человек с хроническим фурункулезом (ХФ) и 19 – с остеофолликулитом, среди которых 7 человек с легкой степенью тяжести, 12 – со средней степенью тяжести пиодермии и 12 человек с тяжелой пиодермией. У 7 пациентов пиодермия была в стадии ремиссии, у 24 – в стадии обострения. У всех пациентов и здоровых доноров определяли уровень внутриклеточных  $\alpha$ -дефензинов в нейтрофилах периферической крови. Из общей группы пациентов 13 больным (8 пациентов с ХФ и 5 пациентов с остеофолликулитом) проводили курс лечения, включающий стандартную местную и системную антибактериальную терапию и иммуотропную терапию ликопидом. Ликопид назначали в дозе 10 мг в сут в течение 10 дней как в фазе ремиссии, так и в фазе обострения основного заболевания. У пациентов с пиодермиями определяли уровень  $\alpha$ -дефензинов до проведения иммуотропной терапии ликопидом, а также через 7–10 дней и через месяц после лечения.

### Выделение лейкоцитов на желатине

Лейкоцитарную суспензию получали после спонтанной седиментации в 3% растворе желатина на фосфатно-солевом буфере (ФСБ) pH=7,4 и доводили до концентрации 2 млн/мл.

### Оценка внутриклеточных дефензинов методом проточной цитометрии с помощью мышиных моноклональных анти-ННР антител «Hu Cult Biotechnology»

Лейкоцитарную суспензию (2 млн/мл) обрабатывали фиксирующим-пермеабилзирующим раствором (0,01% раствора сапонина на 2% растворе параформальдегида «Sigma») в течение 20 мин при +4 °С. После чего клетки дважды отмывали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА)

«Sigma» на ФСБ. Далее к клеткам добавляли 1% раствор БСА и инкубировали в течение 20 мин при +4 °С. Затем в опытные лунки вносили мышиные моноклональные анти-ННР антитела (10 мкг/мл) «Hu Cult Biotechnology», в контрольные лунки вносили 1% раствор БСА и инкубировали в течение 20 мин при +4 °С. Далее клетки дважды отмывали 1% раствором БСА и окрашивали козыми-антимышиными мечеными фикоэритрином антителами «Beckman Coulter» в течение 20 мин при +4 °С. Далее клетки дважды отмывали 1% раствором БСА и переносили в цитометрические пробирки для анализа на проточном лазерном цитометре FACSCalibur (Beckton Dickinson) в программе CellQuest. Уровень внутриклеточных  $\alpha$ -дефензинов оценивали по средней геометрической интенсивности свечения клеток (Geo Mean). В каждой постановке использовали изотипический контроль (мышинные IgG1 «Beckman Coulter») и определяли аутофлюоресценцию клеток [5].

Результаты исследования обработаны и сравнены статистически с использованием методов непараметрической статистики. Вычисляли медиану и интерквартильный размах (Me [Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>]). Достоверность различий полученных данных для качественных признаков устанавливали при помощи критерия  $\chi^2$  (метод Пирсона). Группы сравнивали с использованием непараметрического критерия Вилкоксона (для парных сравнений показателей внутри групп), U-критерия Манна-Уитни (для сравнения показателей между двумя независимыми группами) с использованием электронных таблиц «Microsoft Excel» и пакета прикладных программ «Statistica for Windows» v. 6.0, StatSoft Inc. (США). Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Обследован 31 пациент с пиодермией в возрасте от 18 до 45 лет. Всем пациентам проведено клиническое обследование с учетом жалоб, анамнеза заболевания, данных осмотра пациентов, а также лабораторное и инструментальное исследование на базе ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. Учитывая наличие аллергического компонента при фурункулезе, отмеченного рядом авторов [6, 7], нами проведено аллергологическое обследование пациентов, включающее кожные скарификационные тесты с небактериальными аллергенами и определение общего IgE.

В ходе обследования установлено, что у 7 пациентов пиодермия была в стадии ремиссии, у 24 – в стадии обострения. Давность заболевания больных хронической рецидивирующей пиодермией составила от 0,5 года до 18 лет (в среднем  $5,67 \pm 0,72$  года). У 5 больных с обострением ХФ отмечались симптомы общей интоксикации: повышение температуры тела, слабость, головная боль, потливость, лейкоцитоз до  $17 \times 10^9$ /л, ускорение СОЭ до 40 мм/ч.

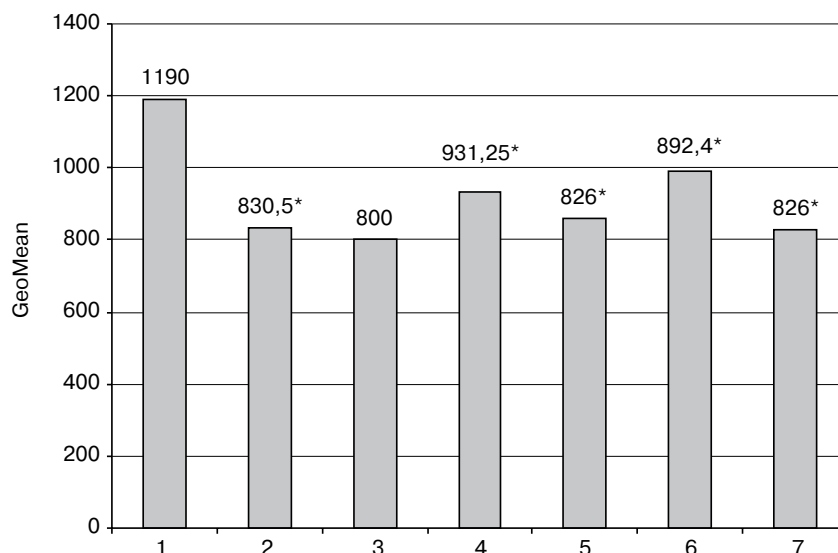
Средние значения остальных показателей в клиническом анализе крови не превышали нормальных значений. При аллергологическом обследовании у 33,3% пациентов выявлена сенсibilизация к ингаляционным аллергенам, из них в 14,8% случаев установлена сенсibilизация к домашней пыли, в 15% – к пылевым аллергенам с клиническими проявлениями в виде круглогодичного аллергического риноконъюнктивита (11,1%), сезонного аллергического риноконъюнктивита (11,1%) и бронхиальной астмы (3,7%), у 11% больных сенсibilизация носила латентный характер. В большинстве случаев у обследованных пациентов с пиодермией уровень общего IgE в сыворотке крови не превышал нормальных значений (130 МЕ/мл) и составил  $81,7 \pm 69,6$  МЕ/мл; у 3 пациентов отмечалось повышение данного показателя от 138 МЕ/мл до 156 МЕ/мл.

Известно, что дефензины обеспечивают антибактериальную защиту против широкого спектра бактерий. Уменьшение содержания дефензинов в фагоцитарных клетках может привести к недостаточности бактерицидности нейтрофилов и, как следствие – к возникновению инфекции, в том числе, бактериальной [8]. На примере пациентов с различными проявлениями пиодермии (фурункулез, остиофолликулит) нами показано, что уровень внутриклеточных дефензинов в нейтрофилах снижен на 30,2% ( $p=0,0001$ ) по сравнению с показателями здоровых доноров (1190 (1096; 1857) GeoMean).

Уровень дефензинов у данной группы больных составил 830,5 (682,75; 1130,3) GeoMean. Обращает внимание достоверное различие уровня дефензинов в зависимости от формы и степени тяжести пиодермии (рис. 1). Во всех группах пациентов с пиодермией выявлено снижение уровня  $\alpha$ -дефензинов, причем наибольшее снижение данного показателя отмечено в группе с тяжелым течением заболевания, а также у больных с проявлениями в виде остиофолликулита.

Таким образом, достоверное снижение уровня  $\alpha$ -дефензинов в нейтрофилах у больных с тяжелым течением пиодермии может служить объективным лабораторным признаком хронического бактериального воспаления, обусловленного колонизацией кожи *St. aureus*.

Учитывая преимущественные изменения фагоцитарного звена в патогенезе хронической рецидивирующей пиодермии, в качестве иммуномодулирующей терапии использовали ликопад. Ранее показано, что иммуностропные препараты бактериального происхождения могут вызывать обострения заболевания, поэтому и должны назначаться с одновременным приемом антибактериальных средств [9]. У 3 пациентов применение ликопада вызывало обострение пиодермии, однако на фоне антибактериальной терапии обострение носило умеренный характер и не требовало отмены иммуностропного лечения. При этом наступала быстрая регрессия фурункулов. Стойкая ремиссия более 1 года наблюдалась в 75% случаев у пациентов с фурункулезом



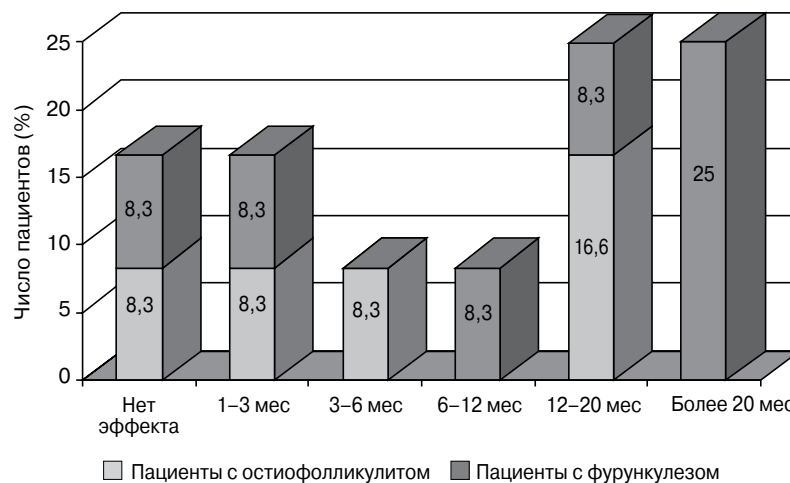
**Рис. 1. Определение уровня внутриклеточных дефензинов у пациентов с разной степенью тяжести и различными формами пиодермии по сравнению со здоровыми донорами.**

Уровень дефензинов: 1 – у здоровых доноров; 2 – у пациентов с пиодермией ( $p=0,0001$ ); 3 – у пациентов с легкой степенью пиодермии ( $p=0,69$ ); 4 – у пациентов с пиодермией средней степени тяжести ( $p=0,014$ ); 5 – у пациентов с тяжелой пиодермией ( $p=0,001$ ); 6 – у пациентов с фурункулезом ( $p=0,015$ ); 7 – у пациентов с остиофолликулитом ( $p=0,003$ ).

\* – достоверное отличие уровня дефензинов у больных по сравнению со здоровыми донорами

и в 20 % случаев у пациентов с остеофолликулитом (рис. 2). В среднем длительность ремиссии составила  $12,73 \pm 8,4$  мес, при этом сроки ремиссии у пациентов с ХФ были более длительными и составили  $15,6 \pm 7,9$  мес, а у пациентов с остеофолликулитом

дефензинов у 9 пациентов (69,2%) до 1374 (992; 1859) GeoMean ( $p=0,009$ ). Через 5–10 дней после окончания проведения иммуностропной терапии не было статистически достоверного повышения данных показателей (по сравнению с исходными



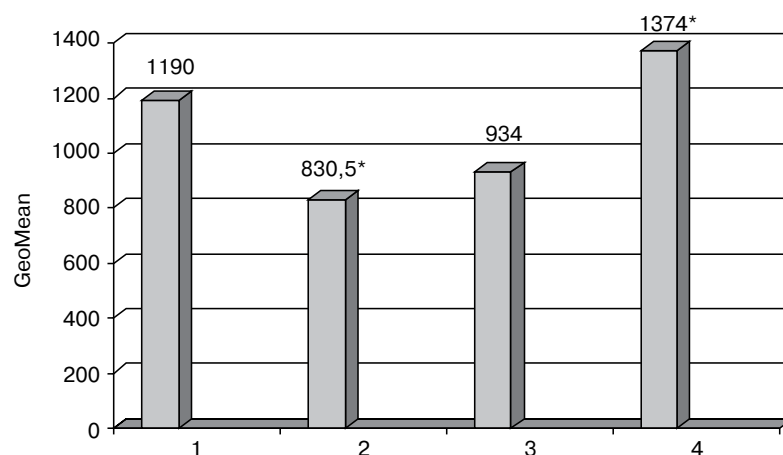
**Рис. 2.** Длительность ремиссии у пациентов с пиодермией ( $n=12$ ) после проведенной иммуноотерапии

$5,83 \pm 5,34$  мес. У 2 пациентов эффекта от проведенного лечения не было, что потребовало повторных курсов иммуностропной, антибактериальной терапии и проведения хирургического лечения. У одной пациентки с остеофолликулитом удалось добиться относительной ремиссии с уменьшением интенсивности и количества элементов пиодермии.

Через 1 мес после проведения иммуностропного лечения ликолипидом в составе комплексной терапии было отмечено значимое повышение уровня

данными 830,5 GeoMean), однако отмечалась умеренная тенденция к повышению уровня дефензинов на данной стадии исследования – 934 (815; 1222) GeoMean (рис. 3).

Таким образом, иммуностропная терапия больных пиодермией ликолипидом в дозе 10 мг в сут приводит к повышению уровня  $\alpha$ -дефензинов в лейкоцитах периферической крови, что может рассматриваться как критерий эффективности лечения в совокупности с выраженным клиническим эффек-



**Рис. 3.** Определение уровня внутриклеточных дефензинов у пациентов с пиодермией до и после лечения.

1. Уровень дефензинов: 1 – у здоровых доноров; 2 – у пациентов с пиодермией до лечения ( $p=0,0001$ ); 3 – 7–10 дней после лечения ликолипидом ( $p=0,87$ ); 4 – через 1 мес после лечения ликолипидом ( $p=0,009$ ).

\* – достоверное отличие уровня дефензинов у больных по сравнению со здоровыми донорами

том, проявляющимся в удлинении сроков ремиссии, уменьшении потребности в антибактериальной терапии и отсутствии необходимости проведения хирургического лечения.

### Заключение

Приведенные данные позволяют считать, что снижение уровня дефензинов у больных пиодермией может служить прогностическим критерием частых рецидивов заболевания, высокой вероятности хронизации гнойного процесса и развития толерантности к терапии, а определение данного показателя, в свою очередь, может быть полезным для решения вопроса о целесообразности назначения иммуотропной терапии и оценки ее эффективности у данных пациентов.

Иммуотропная терапия ликолидом 10 мг в сут в составе комплексного лечения больных различными видами пиодермий приводит к повышению уровня внутриклеточных  $\alpha$ -дефензинов в лейкоцитах периферической крови, оказывает положительный клинический эффект и способствует удлинению сроков ремиссии.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Караулов А.В., Калужин О.В. Медикаментозная иммунотерапия. VII Рос. нац. конгр. «Человек и лекарство». Тез. докл. М., 2000, с. 407.

2. Catherine M.T. Chronnell, Lucy R. Ghali, Rozina S. Ali et al. Human  $\beta$ -Defensin-1 and -2 Expression in Human Pilosebaceous Units: Upregulation in Acne Vulgaris Lesions. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001, v. 117, p. 1120-1125.
3. Yamasaki K., Gallo R.L. Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur. J. Dermatol.* 2008, v. 18 (1), p. 11-21.
4. Philpott M. Defensins and acne. *Mol. Immunol.* 2003, v. 40 (7), p. 457-462.
5. Дьяконова В.А., Пак В.Г., Будихина А.С. и соавт. Оценка функциональной активности фагоцитарной системы человека в норме и при патологии. Пособие для врачей по клинической лабораторной диагностике. М., 2008, с. 29.
6. Laube S. Skin infections and ageing. *Ageing. Res. Rev.* 2004, v. 3, p. 69-89.
7. Вашенко Е.В. Клиническая значимость оценки функциональной активности лейкоцитов у больных с хронической рецидивирующей пиодермией. Диссертация канд. мед. наук. М., 2008.
8. Cole A.M. Antimicrobial peptide microbicides targeting HIV. *Protein and Peptide Letters*. 2005, v. 12, p. 41-47.
9. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные иммуномодуляторы, классификация, механизм действия. *Рос. Аллергол. Журн.* 2005, № 4, с. 30-43.

Статья поступила 17.05.2010 г., принята к печати 01.06.2010 г.  
Рекомендована к публикации Пинегиным Б.В.

## INFLUENCE OF AN IMMUNE THERAPY ON ALPHA-DEFENSIN LEVEL IN PERIPHERAL BLOOD IN PYODERMIA PATIENTS

Tsyvkina E.A, Fedenko E.S., Pinegin B.V.

Institute of Immunology, Moscow, Russia

**Key words:** immunomodulators, peptidoglycan, glucosaminyl muramyl dipeptide, antimicrobial peptides,  $\alpha$ -defensins,  $\alpha$ -defensins, pyoderma

**Background.** The purpose was to investigate alpha-defensin levels in the circulatory neutrophils of pyoderma patients in comparison with healthy donors, estimate clinical efficiency of Licopid, and its influence on alpha-defensin levels.

**Materials and method.** 31 patients with pyoderma in comparison with 17 healthy donors were investigated. Intracellular alpha-defensin levels in neutrophils in the peripheral blood were estimated by flow cytometry with mouse anti-HNP-antibodies (Hy cult biotechnology). All patients with pyoderma were treated by Licopid in a dose of 10 mg a day within 10 days. Clinical and laboratory results were estimated in 7–10 days after the course of treatment and in a month after treatment.

**Results.** The alpha-defensin level in patients with pyoderma was reduced in comparison with healthy donors. Immune therapy by licopid as a part of complex treatment in a dose of 10 mg a day leads to alpha-defensin level increase in leukocytes of peripheral blood.

**Conclusion.** Thus, a decrease of alpha-defensin levels in pyoderma patients, possibly, is a marker of the chronic bacterial inflammation and may cause chronic bacterial skin disease, *St. aureus* colonizations. The treatment by licopid 10 mg a day leads to prolonged remission and to increase of endocellular alpha-defensin levels. Definition of alpha-defensin levels can be useful for advisability and for selection of immune therapy in pyoderma patients.