



УДК 616.5-076:[616.15:577.17.049]

С. Г. Сапунцова¹, О. А. Лебедько^{1,2}, Ю. Г. Ковальский¹,
М. Ю. Флейшман¹, Г. Г. Обухова¹, Г. П. Березина¹, С. С. Тимошин¹

СОДЕРЖАНИЕ ГИСТАМИНА И АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС ПРИ ГИПЕРРЕГЕНЕРАТОРНЫХ ДЕРМАТОЗАХ

¹Дальневосточный государственный медицинский университет,
680000, ул. Муравьева-Амурского, 35, тел. 8-(4212)-32-63-93, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru;
²Хабаровский филиал ФГБУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»
СО РАМН – НИИ охраны материнства и детства,
680022, ул. Воронежская, 49, корп. 1, e-mail: iomid@yandex.ru, г. Хабаровск

Резюме

Изучали содержание гистамина, антиоксидантный статус и процессы пролиферации у больных atopическим дерматитом (АД) и красным плоским лишаем (КПЛ). Иммуногистохимический анализ продемонстрировал, что в сравнении с контролем, в биоптатах кожи индекс Ki-67 позитивных ядер был увеличен в 3,3 раза при АД, в 3,8 раза при КПЛ. Гиперрегенераторная реакция развивалась на фоне повышения содержания гистамина в плазме крови (ИФА-анализ) у пациентов с АД – в 6,2 раза, у пациентов с КПЛ – в 5,9 раза. Системный антиоксидантный статус характеризовался снижением содержания селена в сыворотке крови (флюориметрический анализ) при АД – в 1,7 раза, при КПЛ – в 1,8 раза. Хемилюминесцентное исследование локального уровня антиоксидантной защиты (в биоптатах кожи) зарегистрировало снижение перекисной резистентности и антиоксидантной активности при АД в 2,0–2,1 раза, при КПЛ в 2,2–2,5 раза. Обсуждается роль гистамина и антиоксидантного статуса в формировании гиперрегенераторных процессов при дерматозах.

Ключевые слова: гистамин, антиоксидантный статус, селен, свободные радикалы, пролиферация, atopический дерматит, красный плоский лишай.

S. G. Sapuntsova¹, O. A. Lebed'ko^{1,2}, Yu. G. Kowalskiy¹, M. Yu. Fleyshman¹,
G. G. Obuchova¹, G. P. Berezina¹, S. S. Timoshin¹

HISTAMINE LEVEL AND ANTIOXIDANT STATUS IN HYPERREGENERATIVE DERMATOSES

¹Far Eastern State Medical University;
²Khabarovsk Facility of FSBI FSC PPR SB RAMS – Scientific research institute of Mother and Child Care, Khabarovsk

Summary

We studied the histamine content, antioxidant status and proliferation processes in patients with lichen planus (LP) and atop dermatitis (AD). Immunohistochemical analysis showed that the Ki-67 positive nucleus index in skin biopsies was increased by 3, 3-fold in AD patients and by 3,8-fold in LP patients, compared to the control. Hyperregeneration was observed at the background of increasing the content of histamine in the blood plasma (ELISA test) in patients with AD – in 6,2 times, in patients with KPL – in 5,9 times. Systemic antioxidant status characterized by decreasing the selenium content in the serum (fluorometric analysis) in patients with AP – in 1,7 times and with LP – in 1,8 times. Chemiluminescent investigation of local antioxidant protection (in biopsies of the skin) registered decline peroxide resistance and antioxidant activity in AD patients (in 2,0–2,1 times) and LP patients (in 2,2–2,5 times). The role of histamine and antioxidant status in the development of hyperregenerative processes during dermatosis is discussed.

Key words: histamine, antioxidant status, selenium, free radical, proliferation, atop dermatitis, lichen planus.

Хронические дерматозы представляют серьезную медико-социальную проблему в связи с неуклонным ростом заболеваемости и увеличением количества больных тяжелыми, инвалидизирующими формами.

Усиление пролиферации кератиноцитов и нарушение их дифференцировки являются базовыми патоморфологическими признаками таких хронических дерматозов, как atopический дерматит (АД) и красный

плоский лишай (КПЛ) [9, 14]. Изучение локальных и системных механизмов патологического ремоделирования эпидермиса является актуальным для разработки основ селективного управления реакцией гипергенерации при этих дерматозах.

В настоящее время патогенез АД и КПЛ как хронических рецидивирующих воспалительных заболеваний кожи аллергической природы рассматривают с позиций мембранной патологии. В дестабилизации биологических мембран ключевую роль играют такие медиаторы воспаления и аллергии, как гистамин и активные формы кислорода (АФК). Имеются данные о тесной взаимосвязи процессов секреции гистамина и генерации АФК при ряде патологий и, соответственно, о важной роли систем антиоксидантной защиты в ограничении деструктивных эффектов не только АФК, но и гистамина [10, 11, 15].

Однако данных, сопоставляющих уровни гистамина периферической крови и показатели системной и локальной (в биоптатах кожи) антиоксидантной защиты при хронических дерматозах в доступной нам литературе не обнаружено. Оценивая АД и КПЛ как мембранную патологию, в рамках данного исследования считаем необходимым определить региональные особенности формирования и функционирования антиоксидантной защиты у наших пациентов, проживающих в условиях Приамурья, относящегося к селендефицитным территориям. Даже у здоровых жителей г. Хабаровска выявлен «субоптимальный статус» селена, характеризующийся уровнем микроэлемента в сыворотке крови в пределах 70-90 мкг/л, что составляет 60-80% от величины физиологической нормы [2]. Поэтому не только теоретический, но и практический интерес представляет анализ антиоксидантного статуса больных КПЛ и АД с учетом уровня селена.

Целью настоящего исследования было изучение содержания гистамина и селена в сыворотке крови, локального антиоксидантного статуса и процессов пролиферации в биоптатах кожи пациентов с атопическим дерматитом и красным плоским лишаем в стадии обострения.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 18 больных АД и 16 больных КПЛ. Перед началом лечения проводили забор крови и биоптатов кожи из пораженных участков. Контролем служили кровь и биоптаты нормальной кожи 24 пациентов, подвергнутых плановой хирургической операции по поводу грыж белой линии живота, левой и правой подвздошных областей. На проведение исследования было получено согласие этического комитета ЛПУ, всеми пациентами были подписаны добровольные информированные согласия об участии в исследовании.

Уровень гистамина в плазме крови анализировали иммуноферментным методом с помощью тест-систем Histamine ELISA («IBL Hamburg»).

Уровень селена в сыворотке крови определяли флуориметрическим методом [1] с применением в каждой серии определений реферанс-стандартов сыворотки крови N23-КТ (Nippan Co, Oslo) с регламентированным содержанием Se 88 мкг/л. Исследования проводи-

ли совместно с токсикологической лабораторией НИИ питания РАМН (д-р мед. наук Н. А. Голубкина).

Оценку биогенеза АФК в гомогенизированных биоптатах кожи осуществляли методом хемилюминесценции (ХМЛ). Алгоритм ХМЛ-исследования включал определение следующих параметров [3]: активность генерации свободных радикалов (S-sp), в т. ч. супероксид-анион-радикалов (S-luc); гидроксил-радикалов (S-lum), перекисных радикалов (Sind-1), концентрацию гидроперекисей липидов (h), перекисную резистентность субстрата (H), активность антиоксидантной антирадикальной защиты-АОРЗ (Sind-2). Интенсивность ХМЛ, измеренную в милливольтгах, рассчитывали на 1 мг влажной ткани и выражали в относительных единицах.

Пролиферативную активность в биоптатах кожи оценивали по уровню экспрессии Ki-67. Биоптаты фиксировали в течение суток в 10% нейтральном формалине на фосфатном буфере. После заливки в гистовакс срезы (7 мкм) наклеивали на обработанные полилизинном («Sigma») стекла. Определение экспрессии Ki-67 антигена проводили с помощью иммуногистохимической технологии Novolink (Polymer Detection System) Novocastro. Срезы докрашивали гематоксилином Лили-Майера. Индекс экспрессии Ki-67 выражали в процентах к общему числу ядер регенераторной зоны эпидермиса после просмотра не менее 1 000 ядер.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью t критерия Стьюдента в программе «Statistica 6.0». Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты иммуноферментного анализа свидетельствуют (табл. 1) о достоверном увеличении содержания гистамина в плазме крови пациентов с дерматозами в стадии обострения. При АД показатель превышал аналогичный в контроле – в 6,2 раза, при КПЛ – в 5,9 раза. Эти результаты соответствуют представлениям о доминирующей роли иммунологической концепции в патогенезе гиперрегенераторных дерматозов [7].

Ранее нами было показано наличие выраженного системного оксидативного стресса у пациентов с АД и КПЛ в стадии обострения [4, 5]. Таким образом, в данной клинической ситуации можно констатировать включение иммунных механизмов аллергического воспаления с декомпенсированной активацией процессинга АФК на фоне угнетения АОРЗ. Следствием этого явилась дестабилизация клеточных мембран иммунокомпетентных клеток с высвобождением повышенных количеств гистамина. Интересно, что еще в 1995 году на основании собственных исследований, проведенных *in vitro* (в модельных системах, генерирующих гидроксил радикал), T.L. Ching, et al. предложили использовать гистамин в качестве эндогенного маркера этого высокотоксичного метаболита кислорода [6].

Ионы селена – свободные и в составе селен-зависимых белков (глутатион-пероксидаз, тиоредоксин-редуктаз, тиреоиддейодиназ, селенопротеинов Р, Н, К) – играют особую роль в функционировании мно-

гокомпонентных систем антиоксидантной антирадикальной защиты [13]. Как показало настоящее исследование, существенным механизмом угнетения АОРЗ у обследованных пациентов – жителей г. Хабаровска – является резкий дефицит селена. О чем свидетельствуют достоверно сниженные уровни этого эссенциального микроэлемента в сыворотке крови (в сравнении с аналогичными показателями в контроле): у больных с АД – в 1,7 раз, у больных с КПЛ – в 1,8 раза (табл. 1). Многочисленными клинико-экспериментальными исследованиями доказано, что подобные нарушения селенового статуса людей и животных, обусловленные биогеохимическими особенностями территории их проживания, крайне негативно сказываются на всех уровнях детоксикации АФК и продуктов свободнорадикального окисления.

Таблица 1

Содержание гистамина и селена в крови больных атопическим дерматитом и красным плоским лишаем (M±m)

	Контроль	Атопический дерматит	Красный плоский лишай
Гистамин, нг/мл	0,313±0,066	1,940±0,192*	1,839±0,394*
Селен, мкг/л	95,20±1,12	56,87±1,46*	53,37±1,78*

Примечание. * – p<0,05 в сравнении с контролем.

Выявленный нами общий дефицит селена у пациентов с дерматозами безусловно отражается на уровне локальной антиоксидантной защиты. Результаты ХМЛ-анализа свидетельствуют (табл. 2), что в биоптатах кожи также имело место угнетением защитных систем – показатель Sind-2, значение которого обратно активности АОРЗ, увеличен в 2,0 раза при АД и в 2,2 раза при КПЛ. Устойчивость к перекисному окислению снижена, о чем свидетельствует повышение показателя Н в 2,1 раза при АД и в 2,5 раза при КПЛ. При этом усилена активность генерации АФК: при АД показатель Ssp превышал аналогичный в контроле – в 1,6 раза, при КПЛ – в 1,8 раза; продукция супероксиданион-радикалов (Sluc) возросла, соответственно, в 1,3 и 1,8 раза, гидроксил-радикалов (Slum) – в 1,7 и 1,8 раза. Зарегистрирована интенсификация процессов перекисного окисления липидов: при АД концентрация гидроперекисей липидов (h) превышала контрольные значения в 2,1 раза, при КПЛ – в 2,3 раза, скорость накопления перекисных радикалов липидной природы (Sind-1) возросла при АД в 1,6 раза, при КПЛ – в 1,9 раза. Эти изменения указывают на формировании локального оксидативного стресса у пациентов с данными видами дерматозов в стадии обострения.

Таблица 2

Состояние процессов пролиферации в эпидермисе больных атопическим дерматитом и красным плоским лишаем (M±m)

	Контроль	Атопический дерматит	Красный плоский лишай
ИМЯ,%	8,65±1,31	28,40±2,00*	32,60±1,90*

Примечание. * – p<0,05 в сравнении с контролем.

Как известно, одним из ключевых факторов запуска гиперрегенераторной реакции является изменение

редокс-гомеостаза именно по типу формирования оксидативного стресса: АФК взаимодействуют с редокс-зависимыми молекулами сигнальной трансдукции, регулирующими пролиферацию (MAP kinases, PI3 kinase, protein tyrosine phosphatases) [12]. Полученные нами результаты наглядно иллюстрируют этот процесс (табл. 3). В сравнении с контролем индекс Ki67-позитивных ядер увеличился при АД в 3,3 раза, при КПЛ в 3,8 раза. В условиях оксидативного стресса повышение пролиферативной активности направлено на сохранение и поддержание целостности эпителиального пласта, но на фоне избытка АФК ускорение клеточного цикла приводит к нарушению процессов дифференцировки. В наших исследованиях подтверждением этому служит расширение зоны регенерации при АД и КПЛ. Так, в неизменной коже доноров меченые Ki67 ядра идентифицировались в базальном и нижнем отделах шиповатого слоя. При АД и КПЛ Ki67-позитивные ядра локализовались в базальном, более высоких отделах шиповатого слоя, единичные меченые ядра обнаружены в зернистом слое и нижнем отделе шиповатого слоя.

Таблица 3

Показатели хемилюминесценции (в отн. ед.) биоптатов кожи больных атопическим дерматитом и красным плоским лишаем (M±m)

	Контроль	Атопический дерматит	Красный плоский лишай
Ssp	0,083±0,005	0,136±0,009*	0,148±0,009*
Sind-1	0,195±0,007	0,309±0,010*	0,371±0,010*
H	0,071±0,003	0,150±0,008*	0,165±0,009*
Sluc	0,067±0,003	0,090±0,006*	0,119±0,008*
Slum	0,096±0,005	0,164±0,011*	0,177±0,010*
Sind-2	0,135±0,011	0,286±0,017*	0,303±0,015*
H	0,104±0,005	0,217±0,011*	0,258±0,010*

Примечание. * – p<0,05 в сравнении с контролем.

В рамках полученных нами данных о повышении уровня секреции гистамина в условиях угнетения антиоксидантной защиты необходимо отметить возможность участия гистамин-опосредованных механизмов в нарушении дифференцировки кератиноцитов при АД и КПЛ. В пользу этого предположения свидетельствуют данные Gschwandtner M., et al. (2013) о способности гистамина in vitro снижать экспрессию протеинов (кератинов 1 и 10, филагтрина, лорикрина), отвечающих за дифференцировку кератиноцитов, на 80-95% [8].

Декодирование универсальных молекулярных механизмов развития гиперрегенераторной реакции эпидермиса при АД и КПЛ необходимо для разработки эффективных стратегий терапии данной патологии. Результаты нашего исследования указывают на целесообразность использования в лечении больных КПЛ и АД в комплексе со стандартной терапией антиоксидантных препаратов, содержащих селен. При этом, наряду с ликвидацией дефицита селена и восстановлением антиоксидантного статуса, будет получен дополнительный антигистаминный эффект – стабилизация мембран базофилов и тучных клеток позволит добиться уменьшения выброса из них гистамина.

Литература

1. Голубкина Н.А. Флуориметрический метод определения селена // Журнал аналитической химии. – 1995. – Т. 50, № 5. – С. 492-497.
2. Ковальский Ю.Г., Сенькевич О.А., Сиротина З.В. и др. Оценка обеспеченности селеном взрослого и детского населения г. Хабаровска // Дальневосточный медицинский журнал. – 2006. – № 3. – С. 29-30.
3. Лебедько О.А., Рыжавский Б.Я., Задворная О.В. Свободнорадикальный статус неокортекса белых крыс и его модификация экзогенными производными тестостерона // Дальневосточный медицинский журнал. – 2011. – № 4. – С. 95-99.
4. Сапунцова С.Г. Морфологическое, иммунологическое и клинико-лабораторное обоснование применения тимодепрессина в комплексной терапии atopического дерматита: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Новосибирск, 2004. – 18 с.
5. Щеткина М.В. Применение тимодепрессина в комплексной терапии красного плоского лишая с морфологическим и клинико-лабораторным обоснованием: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Москва, 2010. – 22 с.
6. Ching T.-L., van der Hee R. M., Bhoelan N. M., et al. Histamine as a marker for hydroxyl Radicals // Mediators of Inflammation. – 1995. – Vol. 4. – P. 339-343.
7. Ermertcan A.T., Öztürk F., Gündüz K. Toll-like receptors and skin // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. – 2011. – Vol. 25, № 9. – P. 997-1006.
8. Gschwandtner M., Mildner M., Mlitz V., et al. Histamine suppresses epidermal keratinocyte differentiation and impairs skin barrier function in a human skin model // Allergy. – 2013. – Vol. 68, № 1. – P. 37-47.
9. Peternel S., Manestar-Blažič T., Brajac I., et al. Expression of TWEAK in normal human skin, dermatitis and epidermal neoplasms: association with proliferation and differentiation of keratinocytes // J. Cutan. Pathol. – 2011. – Vol. 38, № 10. – P. 780-789.
10. Pini A., Somma T., Formicola G., et al. Effects of a selective histamine H4R antagonist on inflammation in a model of carrageenan-induced pleurisy in the rat // Curr. Pharm. Des. – 2014. – Vol. 20, № 9. – P. 1338-1344.
11. Rada B., Boudreau H.E., Park J.J., et al. Histamine stimulates hydrogen peroxide production by bronchial epithelial cells via histamine H1 receptor and dual oxidase // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 2014. – Vol. 50, № 1. – P. 125-134.
12. Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling // Cell Signal. – 2012. – Vol. 24, № 5. – P. 981-990.
13. Roman M., Jitaru P., Barbante C. Selenium biochemistry and its role for human health // Metallomics. – 2014. – Vol. 6, № 1. – P. 25-54.
14. Sapuntsova S.G., Lebed'ko O.A., Shchetkina M.V., Fleyshman M.Yu., Kozulin E.A., Timoshin S.S. Status of free-radical oxidation and proliferation processes in patients with atopical dermatitis and lichen planus // Bull. Exp. Biol. Med. – 2011. – Vol. 150, Issue 6. – P. 690-692.
15. Vasicek O., Lojek A., Jancinova V., et al. Role of histamine receptors in the effects of histamine on the production of reactive oxygen species by whole blood phagocytes // Life Sci. – 2014. – Vol. 100, № 1. – P. 67-72.

Literature

1. Golubkina N.A. Fluorometric method for determination of selenium // Journal of Analytical Chemistry. – 1995. – Т. 50, № 5. – P. 492-497.
2. Kowalski Yu.G., Senkevich O.A., Sirotina Z.V., et al. Estimation of the provision by selenium of the adult and baby population in Khabarovsk // Far Eastern Medical Journal. – 2006. – № 3. – P. 29-30.
3. Lebedko O.A., Ryzhavskii B.Ya., Zadvornaya O.V. Free radical status of neocortex of albino rats and its modification by exogenous testosterone's derivatives // Far Eastern Medical Journal. – 2011. – № 4. – P. 95-99.
4. Sapuncova S.G. Morphological, immunological, clinical and laboratory motivation of the using thymodepressin in complex treatment of atopical dermatitis: Abstract of PhD thesis. – Novosibirsk, 2004. – 18 p.
5. Shchetkina M.V. Application thymodepressin in the treatment of lichen ruber planus with morphological, clinical and laboratory rationale: Abstract of PhD thesis. – Moscow, 2010. – 22 p.
6. Ching T.-L., Van der Hee R. M., Bhoelan N.M., et al. Histamine as a marker for hydroxyl Radicals // Mediators of Inflammation. – 1995. – Vol. 4. – P. 339-343.
7. Ermertcan A.T., Öztürk F., Gündüz K. Toll-like receptors and skin // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. – 2011. – Vol. 25, № 9. – P. 997-1006.
8. Gschwandtner M., Mildner M., Mlitz V., et al. Histamine suppresses epidermal keratinocyte differentiation and impairs skin barrier function in a human skin model // Allergy. – 2013. – Vol. 68, № 1. – P. 37-47.
9. Peternel S., Manestar-Blažič T., Brajac I., et al. Expression of TWEAK in normal human skin, dermatitis and epidermal neoplasms: association with proliferation and differentiation of keratinocytes // J. Cutan. Pathol. – 2011. – Vol. 38, № 10. – P. 780-789.
10. Pini A., Somma T., Formicola G., et al. Effects of a selective histamine H4R antagonist on inflammation in a model of carrageenan-induced pleurisy in the rat // Curr. Pharm. Des. – 2014. – Vol. 20, № 9. – P. 1338-1344.
11. Rada B., Boudreau H.E., Park J.J., et al. Histamine stimulates hydrogen peroxide production by bronchial epithelial cells via histamine H1 receptor and dual oxidase // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 2014. – Vol. 50, № 1. – P. 125-134.
12. Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling // Cell Signal. – 2012. – Vol. 24, № 5. – P. 981-990.
13. Roman M., Jitaru P., Barbante C. Selenium biochemistry and its role for human health // Metallomics. – 2014. – Vol. 6, № 1. – P. 25-54.

14. Sapuntsova S.G., Lebed'ko O.A., Shchetkina M.V., et al. Status of free-radical oxidation and proliferation processes in patients with atopic dermatitis and lichen planus // Bull. Exp. Biol. Med. – 2011. – Vol. 150, Issue 6. – P. 690-692.

15. Vasicek O., Lojek A., Jancinova V., et al. Role of histamine receptors in the effects of histamine on the production of reactive oxygen species by whole blood phagocytes // Life Sci. – 2014. – Vol. 100, № 1. – P. 67-72.

Координаты для связи с авторами: *Сапунцова Наталья Геннадьевна* – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник ЦНИЛ, доцент кафедры дерматовенерологии ДВГМУ; *Лебедько Ольга Антоновна* – д-р мед. наук, заведующая лабораторией комплексных методов обследования НИИ ОМид СО РАМН, ведущий научный сотрудник ЦНИЛ ДВГМУ, e-mail: leoaf@mail.ru; *Ковальский Юрий Григорьевич* – д-р мед. наук, заведующий кафедрой биохимии ДВГМУ; *Флейшман Марина Юрьевна* – д-р мед. наук, главный научный сотрудник ЦНИЛ ДВГМУ; *Обухова Галина Григорьевна* – канд. мед. наук, старший научный сотрудник ЦНИЛ ДВГМУ; *Березина Галина Петровна* – научный сотрудник ЦНИЛ ДВГМУ; *Тимошин Сергей Серафимович* – д-р мед. наук, профессор, заведующий ЦНИЛ ДВГМУ.

