

ПОКАЗНИКИ ФАГОЦИТАРНОЇ АКТИВНОСТІ НЕЙТРОФІЛІВ ТА МОНОЦИТІВ КРОВІ У ХВОРИХ НА БУЛЬОЗНИЙ ЕПІДЕРМОЛІЗ ПРИ ХРОНІЧНІЙ КОНТАМІНАЦІЇ РАН *S. AUREUS*

Ольга А. Голубовська¹, Євгенія А. Федорець¹, Соумаво Мукхерджи², Леонід Л. Пінський¹

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна

²Біофармацевтична компанія Alnylam Pharmaceuticals, м. Кембридж, США

Резюме

Мета. Оцінити фагоцитарну активність нейтрофілів та моноцитів крові у хворих на рецесивний дистрофічний бульозний епідермоліз (РДБЕ) при хронічній контамінації ран *S. aureus*.

Матеріали та методи. Проведено одномоментне поперечне дослідження. У 1 групу (без контамінації) включено 31 пацієнта; у 2 групу (хронічна контамінація *S. aureus*) – 44 пацієнти. Критерії включення: вік 18-60 років, клінічно підтверджений РДБЕ, хронічні рани > 3 міс., отримання інформованої згоди. Виключали пацієнтів із декомпенсованим цукровим діабетом, гострими системними інфекціями та ранами тривалістю менше 3 місяців.

Результати. У пацієнтів із хронічною контамінацією встановлено достовірне зниження рівня CD14⁺ моноцитів – $6,5 \pm 0,2$ % (Q_{25} – Q_{75} : 4,65–9,35 %) порівняно з 1 групою ($p < 0,001$, Манн–Уїтні) та донорами ($p < 0,002$, Манн–Уїтні). Спонтанна активність нейтрофілів знижувалася до $87 \pm 1,2$ Од (Q_{25} – Q_{75} : 63–99 Од; $p < 0,002$). Індукована активність у НСТ-тесті становила $208 \pm 2,6$ Од (Q_{25} – Q_{75} : 158–265,5 Од) та була достовірно нижчою за показники 1 групи ($p < 0,001$) і донорів ($p < 0,003$). Фагоцитарний індекс (ФІ) при хронічній контамінації знижувався до $1,5 \pm 0,1$ (Q_{25} – Q_{75} : 0,7–2,15), що достовірно менше як донорських значень ($2,6 \pm 0,1$; Q_{25} – Q_{75} : 2,25–2,9; $p < 0,001$), так і показників 1 групи ($2,7 \pm 0,1$; Q_{25} – Q_{75} : 2,4–3,4; $p < 0,001$). Дискримінантний аналіз продемонстрував, що найбільшу міжгрупову роздільну здатність має ФІ ($F = 35,5$; $p < 0,001$), далі – індукована активність нейтрофілів ($F = 32,3$; $p < 0,001$); менший, але значущий внесок мають спонтанна активність ($p < 0,01$) та рівень CD14⁺ ($F = 22,8$; $p < 0,01$).

Висновки. 1. У хворих на РДБЕ без контамінації виявлено підвищення CD14⁺ моноцитів ($10,8 \pm 0,2$ % проти $9,1 \pm 0,1$ %; $p < 0,003$), спонтанної ($107 \pm 1,2$ Од; $p < 0,045$) та індукованої активності нейтрофілів ($280 \pm 1,9$ Од; $p < 0,001$), що відображає реактивну активацію фагоцитарної ланки. При хронічній контамінації *S. aureus* встановлено зниження CD14⁺ ($6,5 \pm 0,2$ %; $p < 0,002$), спонтанної ($87 \pm 1,2$ Од; $p < 0,033$) та індукованої активності ($208 \pm 2,6$ Од; $p < 0,003$), що свідчить про функціональне виснаження нейтрофілів. Найвищу дискримінантну здатність мають ФІ ($F = 35,5$; $p < 0,001$) та індукована активність ($F = 32,3$; $p < 0,001$). Хронічна контамінація асоціюється зі зниженням резерву та ефективності фагоцитозу.

Ключові слова: рецесивний дистрофічний бульозний епідермоліз, фагоцитоз, *S. aureus*

ВСТУП

Рецесивний дистрофічний бульозний епідермоліз (РДБЕ) асоціюється з формуванням хронічних ран, що визначають основний тягар захворювання та створюють умови для тривалої мікробної персистенції. Доведена наявність системних компонентів імунної

дисфункції при РДБЕ, які можуть знижувати ефективність антибактеріального захисту та сприяти бактеріальній суперколонізації шкіри й ран [1]. Паралельно, локальне мікрооточення хронічної рани при РДБЕ характеризується стійкими запально-фібротичними змінами, що підтримують хронізацію та порушення загоєння [2, 3], а також специфічними

профілями розчинних медіаторів у рановому ексудаті на різних етапах прогресування рани [4].

Мікробіологічний профіль ран при РДБЕ відображає дисбіоз із редукцією бактеріальної різноманітності та зсувом у бік стафілококів, зокрема *Staphylococcus aureus* [5]. У дітей із РДБЕ домінування *S. aureus* корелює з рановим навантаженням і активністю хвороби та частково – з ознаками системного запалення [6]. Дані поздовжнього тривалого спостереження підтверджують зв'язок між динамікою загоєння та бактеріальною колонізацією, включно з *S. aureus*, а також вказують на клінічну значущість профілів резистентності ізолятів щодо персистенції хронічних ран [7]. Додатково показано, що застосування пов'язок і топічних втручань може модифікувати мікробні популяції при РДБЕ та асоціюватися зі змінами стафілококового носійства [8].

Інфекційні ускладнення при РДБЕ мають високий клінічний пріоритет з огляду на частоту колонізації *S. aureus* та наявність резистентних варіантів, включно з метицилін-резистентним золотистим стафілококом (MRSA). Поширеність *S. aureus* і профілі антимікробної резистентності у пацієнтів із РДБЕ продемонстровані в мультицентрових дослідженнях [9]. Оглядові узагальнення свідчать про значущість систематичного моніторингу резистентності, раціонального використання антибактеріальних засобів і обережності щодо топічних антибіотиків у пацієнтів з РДБЕ [10].

Імунопатологічні механізми хронізації ран при РДБЕ включають порушення рекрутингу лейкоцитів та дисрегуляцію клітинної відповіді у рані, що асоціюється з поганим загоєнням [11]. Аналіз клітин із використаних пов'язок дозволив показати відмінності між гострими й хронічними ранами при РДБЕ, зокрема відносно збагачення гранулоцитарних популяцій при хронічних ураженнях [12]. Огляд механізмів прогресування хронічних ран при РДБЕ підкреслює роль колонізації патогенною мікробіотою, неефективного запалення та системних імунних дефектів у формуванні персистуючих ранових фенотипів [13]. У цьому контексті показано взаємозв'язок бактеріальної інфекції ран РДБЕ із параметрами клітинної активації, включно з клітинними факторами імунної відповіді [14].

Окремий напрям сучасних досліджень стосується особливостей хронічної колонізації, де клінічна тяжкість і параметри імунної відповіді можуть визначатися адаптованими до шкіри варіантами *S. aureus* [15]. Таким чином, актуальним є вивчення функціонального стану клітин вродженого імунітету (нейтрофілів і моноцитів), зокрема показників фагоцитарної активності та бактерицидних механізмів, у хворих на РДБЕ за умов хронічної контамінації ран *S. aureus*.

МЕТА

Провести оцінку фагоцитарної активності нейтрофілів та моноцитів крові у хворих на РДБЕ при хронічній контамінації ран *S. aureus*.

Завдання дослідження

1. Проаналізувати фагоцитарну активність моноцитів крові CD14⁺ у хворих на РДБЕ із наявністю та відсутністю хронічної контамінації ран *S. aureus*.

2. Визначити спонтанну та індуковану фагоцитарну активність нейтрофілів в НСТ-тесті в групах РДБЕ без виявленої контамінації ран та із хронічною контамінацією *S. aureus*.

3. Оцінити фагоцитарний індекс нейтрофілів в групах хворих на РДБЕ при хронічній контамінації ран *S. aureus*.

4. Провести дискримінантний аналіз показників фагоцитарної активності нейтрофілів та моноцитів між групами із наявністю та відсутністю хронічної контамінації ран *S. aureus*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Було проведено одномоментне поперечне дослідження (англ. cross-sectional study), в яке були включені пацієнти із РДБЕ із різним мікробіологічним статусом ранових поверхонь. До групи хворих із РДБЕ без бактеріальної контамінації (1 група) віднесли 31 пацієнта (віком від 18 до 45 років; чоловіків – 14 (45,2 %), жінок – 17 (54,8 %), у яких при бактеріологічному дослідженні мазків із ран *S. aureus* не виділяли (рис. 1). До групи пацієнтів із РДБЕ із хронічною бактеріальною контамінацією *S. aureus* (2 група) віднесли 44 пацієнтів (віком від 18 до 46 років; чоловіків – 10 (40,0 %), жінок – 15 (60,0 %) із персистуючим виділенням *S. aureus* із ран, що відповідало критеріям хронічної контамінації (рис. 2). Критеріями хронічної персистенції при РДБЕ були: позитивні посіви на *S. aureus* щонайменше протягом понад 4 тижні, позитивні посіви більш ніж у 2 послідовних пробах з інтервалом понад 2 тижні та персистенція *S. aureus* без системних ознак гострої інфекції, що була розцінена, як хронічна колонізація.

Критеріями включення у дослідження були: вік пацієнтів від 18 до 60 років, клінічно підтверджений діагноз РДБЕ, наявність хронічних ран тривалістю понад три місяці, підписана інформована згода на участь у дослідженні.

До критеріїв виключення належала наявність у пацієнтів супутньої патології, яка могла б вплинути на результати дослідження, зокрема декомпенсованого цукрового діабету, гострих системних інфекційних захворювань, що потребували антибактеріальної терапії, а також ран тривалістю менше трьох місяців.



Рисунок 1. Шкірні рани хворого В. із РДБЕ без ознак контамінації *S. aureus*.



Рисунок 2. Шкірні рани, контаміновані *S. aureus*, у хворого К. із РДБЕ.

При мікробіологічній верифікації *S. aureus* матеріал для дослідження отримували з поверхні хронічних ран шляхом стерильного мазка-тампона, після очищення ранової поверхні від надлишкового ексудату. Зразки надсилали до мікробіологічної лабораторії в транспортному середовищі та висівали на стандартні поживні середовища для виділення стафілококів (кров'яний агар та селективні середовища). Ідентифікацію *S. aureus* проводили за культурально-морфологічними ознаками з подальшим підтвердженням стандартними фенотиповими тестами. Антимікробну чутливість визначали диско-дифузійним методом; метицилінорезистентність (MRSA) оцінювали за чутливістю до цефокситину як сурогатного маркера [16, 17, 18].

Функціональну активність нейтрофілів оцінювали за НСТ-тестом (спонтанним та індукованим)

з фотометричною реєстрацією в оптичних одиницях [19] та за розрахунком фагоцитарного індексу [20].

В кожній з обстежених груп нами визначалася нормальність розподілення варіант за критеріями Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors test та Shapiro-Wilk's W test. У разі невідповідності критеріям нормальності в кожній групі обчислювалися значення медіани (Me), її похибки (m_{Me}), мінімальне (Min), максимальне значення (Max), 25-й і 75-й перцентилі показників (Q_{25} - Q_{75}). Для оцінки вірогідності міжгрупових відмінностей нами був використаний тест Mann-Whitney у незв'язаних груп.

Для оцінки мінімальної кількості пацієнтів (розміру вибірки) при визначенні лабораторних даних у хворих на РДБЕ нами був використаний розрахунок потужності вибірки (power analysis), заснований на статистичному методі вибору розміру вибірки (sample

size calculation) за допомогою програми G*Power (Statistical Power Analyses for Windows; Ver 3.1.9.7).

Для розрахунку розміру вибірки при порівнянні середніх (t-тест) в програмі G*Power були розраховані такі дані: середнє значення індукованої активності в НСТ-тесті нейтрофілів (Од): лабораторного показника пацієнтів групи з контамінацією ран (201 Од), середнє

значення цього ж показника у контрольній групі (279 Од), стандартне відхилення (SD) показника (55 Од та 62 Од, відповідно), мінімальна значуща різниця (Δ) (1,55), бажаний рівень статистичної значущості ($\alpha = 0.05$), що відповідає 95% довірчого інтервалу, статистична потужність ($1-\beta = 80\%$; $p > 0,80$), був обраний двосторонній тест.

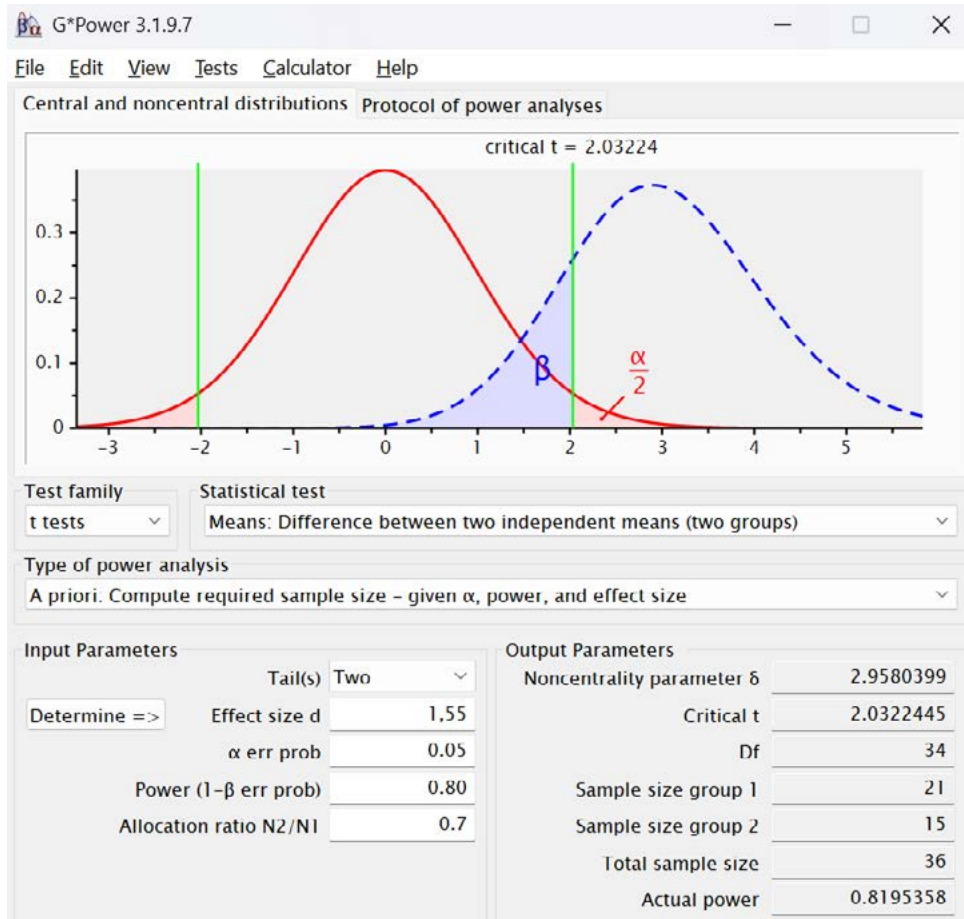


Рисунок 3. Розрахунок статистичної потужності та розміру вибірки.

Для непараметричних досліджень нами було додано до необхідної кількості хворих ще 20 %. Таким чином, необхідною вибіркою для 1 групи є 25 пацієнтів, для 2 групи – 18 пацієнтів.

РЕЗУЛЬТАТИ

При аналізі фагоцитарної активності моноцитів крові хворих на РДБЕ без контамінації (1 група) було встановлено підвищення відсотку моноцитів (CD14⁺) в крові до $10,8 \pm 0,2\%$ (Q_{25} - $Q_{75} = 9$ - $13,1\%$), що вірогідно перевищує показники групи донорів в 1, 2 рази ($9,1 \pm 0,1\%$; Q_{25} - $Q_{75} = 8,3$ - $10,1\%$; $p < 0,003$ за Манн-Уїтні). При аналізі рівня моноцитів (CD14⁺) у пацієнтів із РДБЕ із хронічною бактеріальною контамінацією *S. aureus* (2 група) нами було встановлено, що в цій групі пацієнтів має місце

вірогідне зниження цього показника ($6,5 \pm 0,2\%$; Q_{25} - $Q_{75} = 4,65$ - $9,35\%$), як по відношенню до показників 1 групи ($p < 0,001$ за Манн-Уїтні), так і рівня CD14⁺ донорів ($p < 0,002$ за Манн-Уїтні) (табл. 1).

Аналізуючи фагоцитарну активність нейтрофілів нами встановлено, що в 1 групі відбувається зростання спонтанної активності цих клітин в НСТ тесті до $107 \pm 1,2$ Од (Q_{25} - $Q_{75} = 87$ - 134 Од), що вірогідно перевищує цей показник групи донорів $98 \pm 1,1$ Од (Q_{25} - $Q_{75} = 84,5$ - $109,5$ Од) ($p < 0,045$ за Манн-Уїтні). При аналізі показників 2-ї групи із наявністю хронічної контамінації ран *S. aureus* було визначено вірогідне зниження рівня спонтанної активності нейтрофілів до $87 \pm 1,2$ Од (Q_{25} - $Q_{75} = 63$ - 99 Од) по відношенню до показників 1 групи ($p < 0,033$ за Манн-Уїтні) та донорів ($p < 0,001$ за Манн-Уїтні) (рис. 3).

Таблиця 1

Показники фагоцитарної активності нейтрофілів та моноцитів крові у хворих на РДБЕ при наявності та відсутності хронічної контамінації ран *S. aureus*

Показники	Донори (n=32)	РДБЕ без бактеріальної контамінації (n=31) (1 група)	РДБЕ з хронічною бактеріальною контамінацією <i>S. aureus</i> (n=44) (2 група)
Моноцити/макрофаги (CD14 ⁺), %	9,1 ± 0,1 8,3-10,1	10,8 ± 0,2 [^] 9-13,1	6,5 ± 0,2 [#] 4,65-9,35
НСТ-тест нейтрофілів) Спонтанна активність, оптич. од.	98 ± 1,1 84,5-109,5	107 ± 1,2* 87-134	87 ± 1,2* [#] 63-99
НСТ-тест нейтрофілів): Індукована активність, оптич. од.	256,5 ± 0,8 243,0-267,5	280 ± 1,9 [^] 257-325	208 ± 2,6 [#] 158-265,5
Фагоцитарний індекс	2,6 ± 0,1 2,25-2,9	2,7 ± 0,1 2,4-3,4	1,5 ± 0,1 [#] 0,7-2,15

Примітка: В чисельнику вказана медіана значень та стандартна похибка медіани (Me±m_{Me}), в знаменнику – 25-й і 75-й перцентилі показників (Q₂₅-Q₇₅).

В таблиці позначкою:

- * – визначена вірогідна відмінність від показників донорів за результатами непараметричного аналізу Манн-Уїтні (p < 0,05),
- [^] – визначена вірогідна відмінність від показників донорів за результатами непараметричного аналізу Манн-Уїтні (p < 0,005),
- [#] – вірогідна відмінність за Манн-Уїтні (p < 0,001) від показників групи хворих на РДБЕ без бактеріальної контамінації ран *S. aureus*.

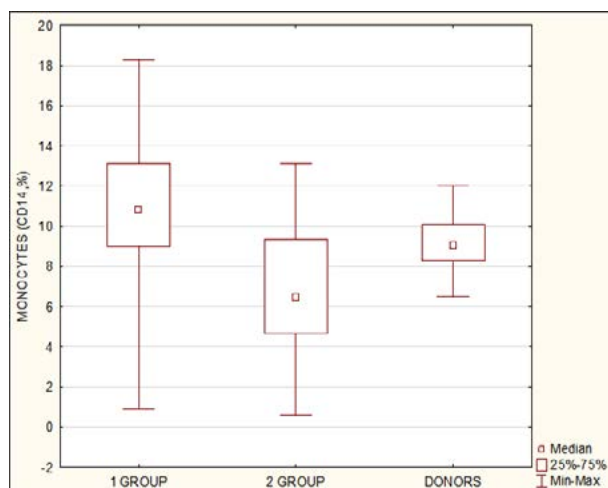


Рисунок 4. Рівень моноцитів (CD14⁺, %) в групах хворих на РДБЕ із наявністю та відсутністю хронічної контамінації ран *S. aureus*.

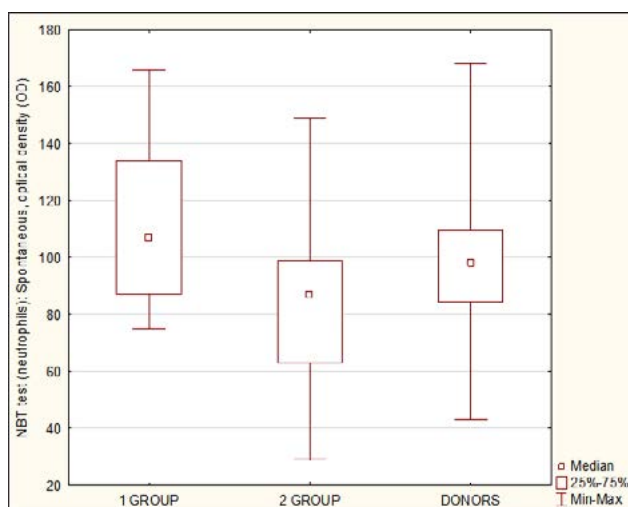


Рисунок 5. Спонтанна активність нейтрофілів в НСТ-тесті в групах хворих на РДБЕ із наявністю та відсутністю хронічної контамінації ран *S. aureus*.

При визначенні спроможності нейтрофілів щодо активації їх фагоцитарних властивостей в НСТ-тесті нами було встановлено, що індукована активність цих клітин в 1-й групі перевищує показники донорів ($280 \pm 1,9$ Од; Q_{25} - Q_{75} = 257-325 Од; $256,5 \pm 0,8$ Од; Q_{25} - Q_{75} = 243,0-267,5 Од, відповідно) ($p < 0,001$ за

Манн-Уїтні). При співставленні рівня індукованої активності нейтрофілів 2-ї групи із наявністю контамінації ($208 \pm 2,6$ Од, Q_{25} - Q_{75} = 158-265,5 Од) має місце вірогідне зменшення цього показника у співставленні із 1 групою ($p < 0,001$ за Манн-Уїтні) та групою донорів ($p < 0,003$ за Манн-Уїтні) (рис. 3).

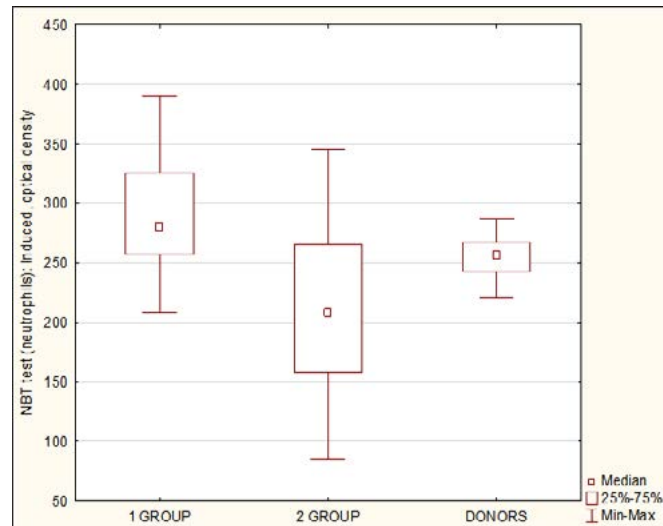


Рисунок 6. Індукована активність нейтрофілів в НСТ-тесті в групах хворих на РДБЕ із наявністю та відсутністю хронічної контамінації *S. aureus*.

Аналізуючи фагоцитарний індекс (ФІ) нейтрофілів у хворих на РДБЕ 1 групи без ознак бактеріальної контамінації було встановлено, що цей показник не має вірогідних відмінностей від значення групи донорів ($2,7 \pm 0,1$; Q_{25} - Q_{75} = 2,4-3,4; $2,6 \pm 0,1$; Q_{25} - Q_{75} = 2,25-2,9 відповідно; $p > 0,451$ за

Манн-Уїтні). При наявності хронічної контамінації ран *S. aureus* (2 група) має місце зниження ФІ ($1,5 \pm 0,1$; Q_{25} - Q_{75} = 0,7-2,15), яке вірогідно менше величин, і групи донорів ($2,6 \pm 0,1$; Q_{25} - Q_{75} = 2,25-2,9; $p < 0,001$ за Манн-Уїтні), і 1 групи хворих ($2,7 \pm 0,1$; Q_{25} - Q_{75} = 2,4-3,4; $p < 0,001$ за Манн-Уїтні) (рис. 4).

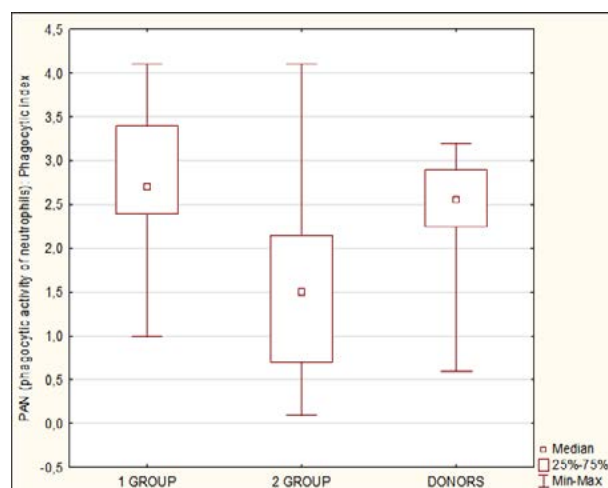


Рисунок 7. Фагоцитарний індекс в групах хворих на РДБЕ із наявністю та відсутністю хронічної контамінації *S. aureus*.

Далі нами був проведений дискримінантний аналіз лабораторних показників 1-ї та 2-ї групи хворих на РДБЕ. Було встановлено, що найбільший міжгруповий дискримінантний коефіцієнт F має показник ФІ ($F = 35,5$; $p < 0,001$), далі – індукована активність нейтрофілів в НСТ-тесті ($F = 32,3$;

$p < 0,001$). Меншою мірою дискримінують групи із наявністю та відсутністю контамінації ран *S. aureus* у хворих на РДБЕ такі показники, як спонтанна активність нейтрофілів в НСТ-тесті ($F = 32,3$; $p < 0,01$) та рівень моноцитів крові ($F = 22,8$; $p < 0,01$) (рис. 3).

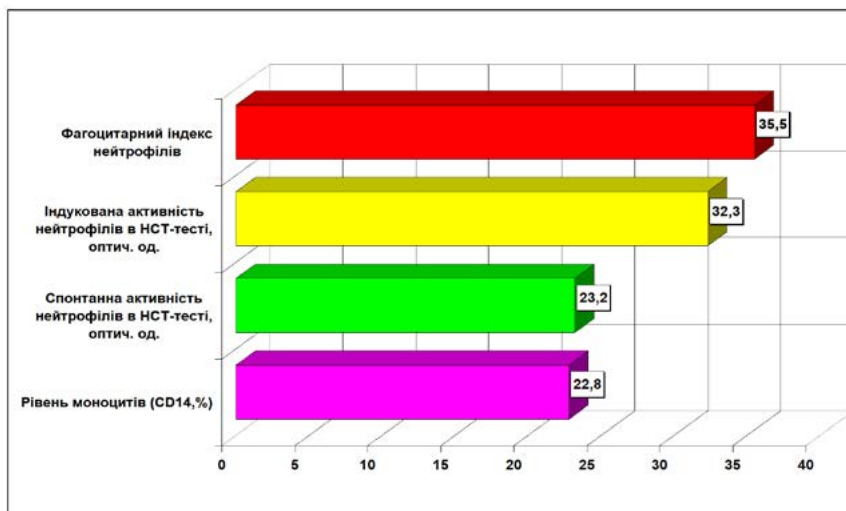


Рисунок 8. Рівень дискримінантного коефіцієнта F для груп з наявністю та відсутністю хронічної контамінації *S. aureus*.

ДИСКУСІЯ

Отримані результати підтверджують, що у хворих на РДБЕ функціональний стан клітин вродженого імунітету суттєво залежить від мікробіологічного статусу хронічних ран. Виявлене підвищення частки CD14⁺ моноцитів та зростання спонтанної й індукованої активності нейтрофілів у пацієнтів без бактеріальної контамінації узгоджується з концепцією компенсаторної активації фагоцитарної ланки на тлі хронічного ушкодження шкіри та персистоючого асептичного запалення. Такі зміни можуть відображати мобілізацію резервів вродженого імунітету у відповідь на постійну тканинну деструкцію та мікробну експозицію, що описано при РДБЕ як складову системної імунної дисрегуляції.

Натомість при хронічній контамінації *S. aureus* встановлено зниження як кількісного показника CD14⁺ моноцитів, так і функціональних параметрів нейтрофілів, включно зі спонтанною та індукованою активністю в НСТ-тесті і фагоцитарним індексом. Зменшення індукованої активності є особливо показовим, оскільки відображає зниження здатності до адекватної метаболічної відповіді на стимул. Це дозволяє припустити формування феномену функціонального виснаження фагоцитів за умов тривалої антигенної стимуляції та персистенції патогену.

Сучасні дані свідчать, що мікробіота хронічних ран при РДБЕ характеризується редукцією різноманітності та домінуванням стафілококів, зокрема *S. aureus*, причому клінічна тяжкість корелює з бактеріальним навантаженням і профілями імунологічної резистентності. Персистоючі варіанти *S. aureus*, адаптовані до шкірного мікрооточення, здатні модулювати місцеву та системну імунну

відповідь, підтримуючи неефективне запалення. У цьому контексті зниження фагоцитарного індексу до $1,5 \pm 0,1$ у пацієнтів із хронічною контамінацією може відображати порушення завершальних етапів фагоцитозу та бактерицидних механізмів, що сприяє персистенції збудника.

Отримані дані також узгоджуються з концепцією аберантного рекрутингу та дисрегуляції лейкоцитарної відповіді при хронічних ранах РДБЕ. Тривала стимуляція нейтрофілів у зоні ушкодження може призводити до їх функціонального виснаження, метаболічної дисфункції та зниження здатності до оксидативного вибуху. Зменшення CD14⁺ клітин у периферичній крові при хронічній контамінації може бути пов'язане як із перерозподілом моноцитарного пулу в осередок запалення, так і з пригніченням їх проліферативного потенціалу під впливом хронічного інфекційного процесу.

Важливим є те, що за результатами дискримінантного аналізу саме фагоцитарний індекс та індукована активність нейтрофілів продемонстрували найвищу міжгрупову роздільну здатність. Це підкреслює їх потенціал як функціональних маркерів хронічної контамінації *S. aureus* при РДБЕ. На відміну від базальної активації, що може відображати неспецифічну запальну реакцію, показники резерву та ефективності фагоцитозу більш чутливо реагують на стан персистенції патогену.

Таким чином, результати дослідження дозволяють розглядати хронічну контамінацію *S. aureus* не лише як локальний мікробіологічний феномен, а як чинник системних змін вродженого імунітету при РДБЕ. Виявлене зниження фагоцитарного резерву може бути одним із механізмів підтримання хронічного ранового процесу та перешкоджання його ефективному загоєнню. Подальші дослідження доцільно спрямувати на аналіз

метаболічних та цитокінових чинників, що можуть модулювати активність фагоцитів у хворих на РДБЕ.

ВИСНОВКИ

1. У хворих на РДБЕ без бактеріальної контамінації встановлено вірогідне підвищення частки CD14⁺ моноцитів у периферичній крові до $10,8 \pm 0,2\%$ ($Q_{25}-Q_{75}$: 9,0-13,1 %) порівняно з донорами – $9,1 \pm 0,1\%$ ($Q_{25}-Q_{75}$: 8,3-10,1 %; $p < 0,003$), що може відображати компенсаторну активацію моноцитарної ланки імунітету. Водночас у пацієнтів із хронічною контамінацією *S. aureus* відзначено достовірне зниження цього показника до $6,5 \pm 0,2\%$ ($Q_{25}-Q_{75}$: 4,65-9,35 %) як відносно групи без контамінації, так і донорів ($p < 0,002$), що може свідчити про функціональне виснаження або перерозподіл моноцитарного пулу.

2. У хворих на РДБЕ без бактеріальної контамінації спонтанна активність нейтрофілів у НСТ-тесті становила $107 \pm 1,2$ Од ($Q_{25}-Q_{75}$: 87-134 Од), що вірогідно перевищувало показник донорів – $98 \pm 1,1$ Од ($Q_{25}-Q_{75}$: 84,5-109,5 Од; $p < 0,05$), що може свідчити про реактивну активацію нейтрофілів. Натомість при хронічній контамінації *S. aureus* цей рівень знижувався до $87 \pm 1,2$ Од ($Q_{25}-Q_{75}$: 63-99 Од), що було достовірно нижчим порівняно з 1 групою та донорами ($p < 0,05$). Це може бути ознакою функціонального виснаження нейтрофілів або свідченням порушень оксидативного метаболізму цих клітин.

3. У хворих на РДБЕ без бактеріальної контамінації індукована активність нейтрофілів у НСТ-тесті становила $280 \pm 1,9$ Од ($Q_{25}-Q_{75}$: 257-325 Од) і вірогідно перевищувала показник донорів – $256,5 \pm 0,8$ Од ($Q_{25}-Q_{75}$: 243,0-267,5 Од; $p < 0,001$), що свідчить про підвищений резерв оксидативної відповіді. Водночас при хронічній контамінації *S. aureus* цей показник знижувався до $208 \pm 2,6$ Од ($Q_{25}-Q_{75}$: 158-265,5 Од; $p < 0,003$ щодо обох груп), що відображає виснаження функціонального потенціалу нейтрофілів та зменшення їх здатності до адекватної метаболічної активації.

4. За результатами дискримінантного аналізу встановлено, що найбільшу міжгрупову роздільну здатність має фагоцитарний індекс ($F = 35,5$; $p < 0,001$), далі – індукована активність нейтрофілів у НСТ-тесті ($F = 32,3$; $p < 0,001$). Менший, проте статистично значущий внесок у диференціацію груп вносять спонтанна активність нейтрофілів ($F = 32,3$; $p < 0,01$) та рівень моноцитів крові ($F = 22,8$; $p < 0,01$). Таким чином, найбільш чутливими маркерами наявності хронічної контамінації *S. aureus* при РДБЕ є параметри, що відображають резерв та ефективність фагоцитозу, тоді як показники базальної активації

та моноцитарної ланки мають додаткове, але менш виражене дискримінантне значення.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження мають бути спрямовані на проспективні спостереження із чіткою стратифікацією хворих на РДБЕ за тяжкістю перебігу та характером мікробної контамінації ран. Доцільно оцінити причинно-наслідкові зв'язки між рівнем 25(OH)D, феритину, прозапальних інтерлейкінів (IL-6, IL-1 β , TNF- α) та функціональними показниками фагоцитарної активності нейтрофілів і моноцитів із урахуванням маркерів системного запалення й нутритивного статусу. Перспективним є формування інтегрованих імунометаболічних алгоритмів із використанням даних клінічних реєстрів і методів машинного навчання для побудови моделей прогнозування інфекційних ускладнень. Доцільно впроваджувати цифровий моніторинг стану ран і клінічної динаміки з метою раннього виявлення загострень та оцінки ефективності корекції дефіциту вітаміну D і порушень обміну заліза. Важливо забезпечити включення пацієнтів різного віку та соціального статусу з дотриманням етичних принципів доступності діагностики й лікування. Очікуваним результатом має стати розробка клінічно придатних алгоритмів персоналізованого ведення хворих на РДБЕ з урахуванням метаболічних та запальних біомаркерів сироватки крові.

ДОТРИМАННЯ ЕТИЧНИХ НОРМ

Дослідження було схвалено Комісією з біомедичної етики Національного медичного університету імені О. О. Богомольця та проводилося відповідно до принципів біоетики, викладених у Гельсінській декларації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людей» (1975), яка була переглянута у 2000 році; «Загальній декларації про біоетику та права людини» (ЮНЕСКО); та Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (2007); а також Рекомендаціях Комітету з біоетики Президії Національної академії медичних наук України (2002). Усі учасники були повністю проінформовані про дослідження, та їхня письмова інформована згода була отримана до початку дослідження.

Усі методи дослідження застосовувалися відповідно до встановлених рекомендацій та правил. Відповідно до норм конфіденційності, усі дані були зібрані анонімно та оброблені з дотриманням чинного законодавства щодо захисту персональних даних, включаючи Загальний регламент захисту даних (GDPR), для забезпечення захисту особистої інформації. Уся інформація використовувалася виключно в рамках цього дослідження та була узагальнена для подальшого аналізу результатів.

Декларація використання генеративного ШІ у підготовці рукопису

У цій роботі штучний інтелект не використовувався для генерації тексту, аналізу даних або створення зображень. Увесь контент підготовлено авторами, які несуть відповідальність за точність, оригінальність та дотримання етичних стандартів.

Обмеження дослідження

Дане дослідження має певні методологічні обмеження, які слід враховувати при інтерпретації результатів. Поперечний одноцентровий дизайн обмежує можливість оцінки причинно-наслідкових зв'язків і може певною мірою впливати на узагальнюваність отриманих даних. Обсяг вибірки, який був розрахований із використанням аналізу потужності, може бути недостатнім для виявлення менш виражених патогенетичних факторів. Включення пацієнтів із спеціалізованого центру створює потенційний ризик selection bias. Використані лабораторні методи

(НСТ-тест, визначення CD14⁺) відображають окремі функціональні характеристики фагоцитів. Подальші багатоцентрові проспективні дослідження з розширеним імунологічним профілюванням сприятимуть уточненню та підтвердженню отриманих результатів.

ФІНАНСУВАННЯ ТА КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Дослідження не отримувало зовнішнього фінансування. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів чи фінансових інтересів. Всі автори дали згоду на публікацію цього рукопису.

ВНЕСОК АВТОРІВ

Голубовська О. А.^{A, F}

Федорець Є. А.^{B, D}

Соумаво Мукхерджи^E

Пінський Л. Л.^{C, D}

REFERENCES

- Nyström, A., Bornert, O., Köhl, T., Gretzmeier, C., Thriene, K., Dengjel, J., Pfister-Wartha, A., Kiritsi, D., & Bruckner-Tuderman, L. (2018). Impaired lymphoid extracellular matrix impedes antibacterial immunity in epidermolysis bullosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(4), E705–E714. <https://doi.org/10.1073/pnas.1709111115>
- Anderson-Crannage, M., Ascensión, A. M., Ibáñez-Solé, O., Zhu, H., Schaefer, E., Ottomanelli, D., Hochberg, B., Pan, J., Luo, W., Tian, M., Chu, Y., Cairo, M. S., Izeta, A., & Liao, Y. (2023). Inflammation-mediated fibroblast activation and immune dysregulation in collagen VII-deficient skin. *Front Immunol*, 14, 1211505. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1211505>
- De Gregorio, C., Catalán, E., Garrido, G., Riquelme, I., Pavez, L., Moreno, R., & Palisson, F. (2023). Maintenance of chronicity signatures in fibroblasts isolated from recessive dystrophic epidermolysis bullosa chronic wound dressings under culture conditions. *Biol Res*, 56(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s40659-023-00437-2>
- Alexeev, V., Huitema, L., Phillips, T., Patel, P., Salas Garza, M. S., Ringpfeil, F., Salas-Alanis, J. C., & Igoucheva, O. (2025). Cross-sectional analysis of wound-associated soluble factors in early established and chronic wounds of recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients. *Arch Dermatol Res*, 317, 796. <https://doi.org/10.1007/s00403-025-04293-w>
- Bar, J., Levy, R., Ollech, A., Yosipovitch, G., & Zlotogorski, A. (2021). Evidence for cutaneous dysbiosis in dystrophic epidermolysis bullosa. *Clin Exp Dermatol*, 46(7), 1223-1229. <https://doi.org/10.1111/ced.14592>
- Reimer-Taschenbrecker, A., Künstner, A., Hirose, M., Hübner, S., Gewert, S., Ibrahim, S., Busch, H., & Has, C. (2022). Predominance of Staphylococcus correlates with wound burden and disease activity in dystrophic epidermolysis bullosa: a prospective case-control study. *J Invest Dermatol*, 142(8), 2117-2127. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2022.01.020>
- Fuentes, I., Yubero, M. J., Morandé, P., Varela, C., Oróstica, K., Acevedo, F., Rebolledo-Jaramillo, B., Arancibia, E., Porte, L., & Palisson, F. (2023). Longitudinal study of wound healing status and bacterial colonisation of Staphylococcus aureus and Corynebacterium diphtheriae in epidermolysis bullosa patients. *Int Wound J*, 20(3), 774-783. <https://doi.org/10.1111/iwj.13922>
- Horev, A., Brandwein, M., Vaknin, A., Motro, Y., & Moran-Gilad, J. (2023). Temporal changes in the skin microbiome of epidermolysis bullosa patients following the application of wound dressings. *J Clin Med*, 12(20), 6435. <https://doi.org/10.3390/jcm12206435>
- Santin, J. T., Mariath, L. M., Rossato, A. M., Schuler-Faccini, L., & Kiszewski, A. E. (2021). Prevalence and antimicrobial resistance profile of Staphylococcus aureus in inherited epidermolysis bullosa: a cross-sectional multicenter study in Brazil. *Int J Dermatol*, 60(9), 1126-1130. <https://doi.org/10.1111/ijd.15634>
- Jayawardena, N. S., El Hachem, M., Diociaiuti, A., Ruggiero, A., Castiglia, D., & Zambruno, G. (2024).

- The spectrum of antimicrobial resistance in bacteria isolated from wounds of patients with epidermolysis bullosa. *J Dermatolog Treat*, 35(1), 2370424. <https://doi.org/10.1080/09546634.2024.2370424>
11. Phillips, T., Alexeev, V., Huitema, L., Campanelli, C., & Igoucheva, O. (2020). Aberrant recruitment of leukocytes defines poor wound healing in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Dermatol Sci*, 100(3), 209-216. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2020.10.009>
 12. Fuentes, I., Guttman-Gruber, C., Tockner, B., Laimer, M., Hintner, H., & Bauer, J. W. (2020). Cells from discarded dressings differentiate chronic from acute wounds in patients with epidermolysis bullosa. *Sci Rep*, 10(1), 15064. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71794-1>
 13. Huitema, L., Phillips, T., Alexeev, V., & Igoucheva, O. (2021). Immunological mechanisms underlying progression of chronic wounds in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol*, 30(12), 1724-1733. <https://doi.org/10.1111/exd.14411>
 14. Alexeev, V., Huitema, L., Phillips, T., Chen, Y., Campanelli, C., & Igoucheva, O. (2022). T-cell activation and bacterial infection in skin wounds of recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients. *Exp Dermatol*, 31(9), 1431-1442. <https://doi.org/10.1111/exd.14615>
 15. Jamet, A., Fu, X., Dietrich, C., Sutter, D. E., Tawk, C., Wilson, G., Mathey, F., Riffaud, C., Veluti, S., Bessou, P., Jourdain, C., Pirnay, J. P., Coste, A., Ponthus, N., Olexa, C., Barlegue, D., Badiou, C., Chafey, P., Simon, M., Collette, K., Perrodeau, E., Dupont, S., Recker, T., Richer, Q., Qiuc, Namasivayam, P., Prévost, G., Vandenesch, F., & Rasigade, J. P. (2025). Immune response and clinical severity are shaped by skin-adapted *Staphylococcus aureus* in chronically infected patients. *Sci Transl Med*, 17(813), eadq7985. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adq7985>
 16. Levin, L. E., Shayegan, L. H., Lucky, A. W., Hook, K. P., Bruckner, A. L., Feinstein, J. A., Whittier, S., Lauren, C. T., Pope, E., Lara-Corrales, I., Wiss, K., McCuaig, C. C., Powell, J., Eichenfield, L. F., Levy, M. L., Diaz, L., Glick, S. A., Paller, A. S., Price, H. N., Browning, J. C., & Morel, K. D. (2021). Characterization of wound microbes in epidermolysis bullosa: results from the epidermolysis bullosa clinical characterization and outcomes database. *Pediatr Dermatol*, 38(1), 119-124. <https://doi.org/10.1111/pde.14444>
 17. Yan, A., Kus, J. V., & Sant, N. (2025). The *Staphylococcus aureus* complex: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*, 63(7), e01276-24. <https://doi.org/10.1128/jcm.01276-24>
 18. McClure, J. A., Conly, J. M., Obasuyi, O., Ward, L., Ugarte-Torres, A., Louie, T., & Zhang, K. (2020). A novel assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples. *Front Microbiol*, 11, 1295. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01295>
 19. Blasi-Brugué, C., López-Serrano, S., Rodríguez-Franco, F., Pérez-Sancho, M., Domínguez, L., & Álvarez, J. (2023). Nitroblue Tetrazolium test and IFN- γ . *Vet Sci*, 10(9), 572. <https://doi.org/10.3390/vetsci10090572>
 20. Lee, J. K., Guevara, V., Akanbi, O. D., Hoff, J. D., Kupor, D., Brannon, E. R., & Eniola-Adefeso, O. (2025). Deciphering neutrophil dynamics: enhanced phagocytosis of elastic particles and impact on vascular-targeted carrier performance. *Sci Adv*, 11(1), eadp1461. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adp1461>

Abstract**PHAGOCYtic ACTIVITY PARAMETERS OF NEUTROPHILS AND MONOCYTES IN PATIENTS WITH EPIDERMOLYSIS BULLOSA WITH CHRONIC *S. AUREUS* WOUND CONTAMINATION**Olha A. Holubovska¹, Yevheniia A. Fedorets¹, Soumavo Mukherjee², Leonid L. Pinsky¹¹Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine²Alnylam Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA

Aim. To evaluate the phagocytic activity of peripheral blood neutrophils and monocytes in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) with chronic *Staphylococcus aureus* wound contamination.

Materials and methods. A cross-sectional study was conducted. Group 1 (without contamination) included 31 patients; Group 2 (chronic *S. aureus* contamination) comprised 44 patients. Inclusion criteria were age 18-60 years, clinically confirmed RDEB, chronic wounds lasting > 3 months, and written informed consent. Patients with decompensated diabetes mellitus, acute systemic infections, or wounds of < 3 months' duration were excluded.

Results. Patients with chronic contamination demonstrated a significant decrease in CD14⁺ monocytes – 6.5±0.2% (Q25–Q75: 4.65-9.35%) compared with Group 1 (p < 0.001, Mann–Whitney test) and healthy donors (p < 0.002, Mann–Whitney test). Spontaneous neutrophil activity decreased to 87 ± 1.2 AU (Q25–Q75: 63-99 AU; p<0.002). Induced activity in the NBT test was 208 ± 2.6 AU (Q25–Q75: 158-265.5 AU) and was significantly lower than in Group 1 (p < 0.001) and donors p < 0.003). The phagocytic index (PI) declined to 1.5 ± 0.1 (Q25–Q75: 0.7-2.15), which was significantly lower than in donors (2.6 ± 0.1; Q25–Q75: 2.25-2.9; p < 0.001) and Group 1 (2.7 ± 0.1; Q25–Q75: 2.4-3.4; p < 0.001). Discriminant analysis revealed the highest intergroup discriminative capacity for PI (F = 35.5; p < 0.001), followed by induced neutrophil activity (F = 32.3; p < 0.001); spontaneous activity (p < 0.01) and CD14⁺ level (F = 22.8; p < 0.01) showed a smaller but significant contribution.

Conclusions. In patients with RDBE without contamination, an increase in CD14⁺ monocytes (10.8 ± 0.2% vs. 9.1 ± 0.1%; p < 0.003), spontaneous (107 ± 1.2 U; p < 0.045) and induced neutrophil activity (280 ± 1.9 U; p < 0.001) was detected, which reflects reactive activation of the phagocytic link. In chronic *S. aureus* contamination, a decrease in CD14⁺ (6.5 ± 0.2%; p < 0.002), spontaneous (87 ± 1.2 U; p < 0.033) and induced activity (208 ± 2.6 U; p < 0.003) was detected, which indicates functional depletion of neutrophils. The highest discriminant ability is possessed by FI (F = 35.5; p < 0.001) and induced activity (F = 32.3; p < 0.001). Chronic contamination is associated with a decrease in the reserve and efficiency of phagocytosis.

Keywords: recessive dystrophic epidermolysis bullosa, phagocytosis, *Staphylococcus aureus*

Received: 28.11.2025

Accepted: 6.02.2026