

На правах рукописи

Васильева Екатерина Юрьевна

**КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
АЛЛЕРГИЧЕСКОГО КОНТАКТНОГО ДЕРМАТИТА И
ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ НАНОАЛМАЗОВ ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДЕРМАТИТЕ, ВЫЗЫВАЕМОМ ЦВЕТНЫМИ
МЕТАЛЛАМИ**

14.01.10 – кожные и венерические болезни

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2013

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Прохоренков Виктор Иванович**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Позднякова Ольга Николаевна**

(Новосибирский государственный медицинский университет, профессор кафедры дерматовенерологии и косметологии)

доктор медицинских наук, доцент **Дмитрук Вадим Степанович**

(Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, доцент кафедры дерматовенерологии и косметологии)

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « 20 » декабря 2013 года в « ____ » часов на заседании диссертационного совета Д 208.062.06, созданного на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, Новосибирск, Красный проспект, д. 52; тел (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского государственного медицинского университета (630091, Новосибирск, Красный проспект, д. 52)

Автореферат разослан « ____ » ноября 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Т.Б. Решетникова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Аллергический контактный дерматит – одно из распространенных заболеваний. По данным разных авторов, этот вид патологии встречается у 2,0 % – 2,5 % населения Земного шара (Иванов О. Л., Белоусова Т. А., 2000; Львов А. Н. и соавт., 2007; Schnuch A. et al., 2002).

В последние годы возросла заболеваемость аллергическим контактным дерматитом, что связано с ростом числа химических веществ, используемых в быту и на производстве (Веселова Л. В., 2008). Чаще всего факторами развития этого заболевания являются металлы-сенсibilизаторы, такие как никель, кобальт и хром (Степанова Е. В., 2009; Мокроносова М. А., 2010). Поскольку аллергический контактный дерматит развивается на участках кожи при воздействии химических аллергенов, важное значение имеет разработка лечебно-профилактических средств, защищающих кожу от контакта с такими соединениями. В качестве профилактических средств защиты в настоящее время используют защитные средства, содержащие комплексообразующие и хелатирующие соединения, связывающие и нейтрализующие действие химических агентов (Селицкий Г. Д. и соавт., 2008).

Новым адсорбентом для нейтрализации химических аллергенов могут являться модифицированные наноалмазы детонационного синтеза (Бондарь В. С., Пузырь А. П., 2004). Физико-химические свойства модифицированных наноалмазов (Puzug A. P. et al., 2005; Gibson N. et al., 2009) определяют их высокие адсорбционные свойства к различным соединениям (Бондарь В. С. и соавт., 2008; Барон А. В. и соавт., 2012; Puzug A. P. et al., 2007; Purtov K. V. et al., 2008). Модифицированные наноалмазы нашли применение для выделения и очистки белков (Бондарь В. С. и соавт., 2008) и связывания токсических соединений, например, микотоксинов (Пузырь А. П. и соавт., 2007; Пузырь А. П. и соавт., 2010); для создания новых систем индикации, диагностики и адресной доставки лекарственных веществ (Ронжин Н. О. и соавт., 2010; Мамаева Е. С. и соавт., 2011; Purtov K. V. et al., 2010). Таким образом, изучение заболеваемости и клинических особенностей аллергического

контактного дерматита, выявление сенсibilизации к низкомолекулярным аллергенам и изучение защитных свойств наноалмазов при экспериментальном дерматите, вызываемом цветными металлами, явились основой данного исследования.

Цель исследования. Изучить динамику заболеваемости, клинические особенности, этиологические факторы аллергического контактного дерматита и исследовать влияние наноалмазов на структуру кожи при экспериментальном дерматите, вызываемом цветными металлами.

Задачи исследования

1. Провести статистический анализ заболеваемости аллергическим контактным дерматитом на территории Красноярского края за период 2007–2011 гг.

2. Изучить клинические особенности аллергического контактного дерматита и контактной экземы.

3. Выявить наиболее часто встречающиеся этиологические факторы аллергического контактного дерматита и контактной экземы.

4. Исследовать адсорбционные свойства наноалмазов к ионам двухвалентных металлов (кобальт, никель, хром) в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

5. Изучить влияние наноалмазов на структуру кожи экспериментальных животных в условиях физиологической нормы и при экспериментальном дерматите, вызываемом цветными металлами.

Научная новизна. Установлено, что в последние (с 2007 по 2011) годы в Красноярском крае наблюдается увеличение заболеваемости аллергическим контактным дерматитом среди взрослого и подросткового населения.

Выявлено, что наиболее часто встречающимися этиологическими факторами аллергического контактного дерматита и контактной экземы являются: никеля сульфат (41,4 %), кобальта хлорид (20,3 %), калия дихромат (10,0 %), смесь ароматизирующих веществ и тиомерсал (6,8 %).

Впервые выявлены особенности адсорбционных свойств модифицированных наноалмазов к ионам цветных металлов (кобальт, никель, хром) в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Впервые изучено влияние модифицированных наноалмазов на структуру кожи в условиях физиологической нормы, показано, что наноалмазы при концентрации частиц 0,5, 1,0 и 3,0 масс.% не оказывают раздражающего и сенсибилизирующего действия на кожу экспериментальных животных.

Впервые исследовано влияние модифицированных наноалмазов в условиях экспериментального дерматита, показано, что наноалмазы препятствуют развитию реакции гиперчувствительности замедленного типа при локальном воздействии ионов кобальта и никеля на кожу экспериментальных животных. При этом наноалмазы не оказывают протекторного эффекта при действии на кожу животных ионов хрома.

Научно-практическая значимость работы. Выявлены клинико-эпидемиологические особенности течения аллергического контактного дерматита и аллергической контактной экземы в г. Красноярске за период с 2007 по 2009 гг.

Получены данные об уровне и временной динамике заболеваемости аллергическим контактным дерматитом на территории Красноярского края, позволившие определить востребованность в разработке новых средств профилактики этого заболевания.

Показана высокая диагностическая ценность аппликационного аллергологического теста с низкомолекулярными аллергенами, позволяющего установить этиологический фактор, вызывающий развитие аллергического контактного дерматита.

Установлено, что модифицированные наноалмазы при концентрации частиц 0,5, 1,0 и 3,0 масс.% не оказывают раздражающего и сенсибилизирующего действия на кожу, что служит экспериментальным обоснованием высокой биосовместимости наноалмазов по отношению к кожным покровам.

Получены экспериментальные данные, свидетельствующие о защитном эффекте модифицированных наноалмазов при действии на кожу ионов кобальта и никеля. Это открывает перспективы дальнейших исследований,

направленных на изучение возможности применения модифицированных наноалмазов в практической дерматологии, как нового средства профилактики аллергических контактных дерматитов, вызываемых данными ионами.

Положения, выносимые на защиту

1. В Красноярском крае за период 2007 – 2011 годы выявлен рост первичной заболеваемости аллергическим контактным дерматитом на 12,3 %, общей заболеваемости – на 20,2 %.

2. Наиболее часто встречающимися аллергенами, вызывающими аллергический контактный дерматит и контактную экзему, являются никеля сульфат, кобальта хлорид, калия дихромат, смесь ароматизирующих веществ и тиомерсал.

3. У 18 % больных аллергическим контактным дерматитом клинические проявления трансформируются в контактную экзему.

4. Модифицированные наноалмазы детонационного синтеза не оказывают раздражающего и сенсибилизирующего действия на кожу экспериментальных животных.

5. Модифицированные наноалмазы при концентрации частиц 0,5 и 1,0 масс.% препятствуют развитию реакции гиперчувствительности замедленного типа и способствуют связыванию и нейтрализации ионов кобальта и никеля в коже экспериментальных животных.

Апробация материалов работы. Основные положения диссертации были представлены на 20-м и 22-м Международных конгрессах Европейской Академии Дерматологии и Венерологии (Лиссабон, 2011; Стамбул, 2013), на 9-м и 10-м Международных симпозиумах Европейской Академии Дерматологии и Венерологии (Верона, 2012; Краков, 2013), на 50-й и 51-й Международных научных конференциях «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2012, 2013).

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационной работы внедрены в лечебно-диагностический процесс Красноярского краевого кожно-венерологического диспансера № 1, в учебный процесс кафедры

дерматовенерологии с курсом косметологии и ПО Красноярского государственного медицинского университета имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

Публикации. Основные положения диссертационной работы изложены в 10 публикациях, из них 2 статьи в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов для публикаций материалов диссертации.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 158 страницах машинописного текста, содержит 20 таблиц и 55 рисунков; работа включает введение, обзор литературы, пять глав полученных результатов исследования, заключение и выводы. Список цитируемой литературы включает 239 источников, в том числе 142 зарубежных.

Личный вклад автора. Весь материал, представленный в диссертации, собран, обработан и проанализирован лично автором.

Исследование одобрено комитетом по этике Красноярского государственного медицинского университета имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 28 от 10.12. 2010).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования эпидемиологических особенностей заболеваемости аллергическим контактным дерматитом (АКД) среди населения Красноярского края использовали официальные данные отдела статистики (учетная форма № 12, приказ №154 ФС Госстатистики от 28.01.2009) Красноярского краевого кожно-венерологического диспансера № 1 за 2007 – 2011 годы. Оценивали показатели первичной и общей заболеваемости АКД у взрослого (от 18 лет и старше), подросткового (15 – 17 лет) и детского (до 14 лет) населения.

С целью изучения клинических особенностей АКД и контактной экземы был проведен ретроспективный анализ амбулаторных карт больных, находившихся на амбулаторном лечении в аллергологическом центре «Клиника Тисленко» (г. Красноярск) в период 2007 – 2009 годы. Для статистической обработки использовались данные 206 (82,1 %) больных АКД и 45 (17,9 %) больных контактной экземой. Основными анализируемыми параметрами были

пол, возраст, данные анамнеза, клинические особенности течения заболевания, этиологические факторы, провоцирующие обострение, локальный статус.

Распределение больных АКД и контактной экземой было по полу: женщин – 212 (84,5 %), мужчин – 39 (15,5 %). Среди больных преобладала возрастная категория: от 38 до 42 лет – 52 (20,7 %), от 23 до 27 лет – 50 (19,9 %), от 28 до 32 лет – 41 (16,3 %).

Критерии включения: жалобы на высыпания, локализованные на ограниченных и распространенных участках кожи и сопровождающиеся субъективными ощущениями в виде зуда и жжения; четкая связь высыпаний с воздействием провоцирующего фактора; улучшение течения кожного процесса после отмены контакта с провоцирующим фактором. Критерии исключения: острые и хронические сопутствующие заболевания основных органов и систем (сердечно-сосудистые, желудочно-кишечные, эндокринные, иммунные, психические, нервные, заболевания крови), беременность, период лактации, прием стероидов.

Всем пациентам проводили аппликационное аллергологическое исследование с помощью тест-системы «Аллертест» (Mekos Laboratories AS, Дания). На верхнюю часть спины пациентов наносили тест-пластины, содержащие 24 химических вещества. Результаты оценивали через 48, 72 и 96 часов.

Влияние модифицированных наноалмазов (МНА) на структуру кожи изучали в условиях физиологической нормы и экспериментального дерматита, вызываемого цветными металлами. Исследования проведены на морских свинках, распределенных на 13 экспериментальных групп по 6 животных в каждой (табл. 1).

Животные I, V, VIII и XI групп являлись контрольными (I группа – интактный контроль). Для инициации АКД кожу этих животных в течение 10 дней обрабатывали 1 раз в сутки водными растворами 2 % CoCl_2 (группа V), 2,5 % $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (группа VIII) и 5 % NiCl_2 (группа XI) (Рабен А. С. и соавт., 1970; Колпаков Ф. И., 1970).

Таблица 1 – Распределение животных по экспериментальным группам

Группы животных	Нанесение препарата в течение 10 дней на верхний (опытный) участок кожи	Нанесение разрешающей дозы препарата на 12-й день на нижний (интактный) участок кожи
I	Контрольная группа	Контрольная группа
II	МНА 0,5 масс.% – 0,5 мл через каждые 24 часа	МНА 0,5 масс.% – 0,5 мл
III	МНА 1 масс.% – 0,5 мл через каждые 24 часа	МНА 1 масс.% – 0,5 мл
IV	МНА 3 масс.% – 0,5 мл через каждые 24 часа	МНА 3 масс.% – 0,5 мл
V	Раствора хлористого кобальта 2 % – 0,5 мл через каждые 24 часа	2 % – 0,5 мл раствора хлористого кобальта
VI	МНА 0,5 масс.% – 0,5 мл и, с интервалом в 2 часа, 2 % – 0,5 мл раствора хлористого кобальта	2 % – 0,5 мл раствора хлористого кобальта
VII	МНА 1,0 масс.% – 0,5 мл и, с интервалом в 2 часа, 2 % – 0,5 мл раствора хлористого кобальта	2 % – 0,5 мл раствора хлористого кобальта
VIII	Раствора двуххромовокислого калия 2,5 % – 3 капли через каждые 24 часа	2,5 % – 3 капли раствора двуххромовокислого калия
IX	МНА 0,5 масс.% – 0,5 мл и, с интервалом в 2 часа, 2,5 %-3 капли раствора двуххромовокислого калия	2,5%-3 капли раствора двуххромовокислого калия
X	МНА 1,0 масс.% – 0,5 мл и, с интервалом в 2 часа, 2,5 % – 3 капли раствора двуххромовокислого калия	2,5 % – 3 капли раствора двуххромовокислого калия
XI	Раствора хлористого никеля 5% – 0,5 мл через каждые 24 часа	5 % – 0,5 мл раствора хлористого никеля
XII	МНА 0,5 масс.% – 0,5 мл и, с интервалом в 2 часа, 5 % – 0,5 мл раствора хлористого никеля	5 % – 0,5 мл раствора хлористого никеля
XIII	МНА 1,0 масс.% – 0,5 мл и, с интервалом в 2 часа, 5 % – 0,5 мл раствора хлористого никеля	5 % – 0,5 мл раствора хлористого никеля

Влияние на здоровую кожу морских свинок концентраций МНА 0,5; 1,0 и 3,0 масс.% исследовали на животных II, III, IV групп, соответственно. Эффект действия МНА на развитие АКД, индуцируемого цветными металлами, изучали на животных VI, VII, IX, X, XII, XIII групп, используя концентрации МНА 0,5 и 1,0 масс.%. В области спины каждого животного II – XIII групп выстригали волосяной покров. Подготовленную поверхность кожи делили на две области – верхнюю и нижнюю (табл. 1). Животным II-IV групп верхнюю область 1 раз в сутки обрабатывали МНА 0,5, 1,0 и 3,0 масс.%. Животным V, VIII и XI групп

верхнюю область 1 раз в сутки обрабатывали растворами CoCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ и NiCl_2 . Для изучения влияния МНА при локальном действии ионов цветных металлов животным VI, VII, IX, X, XII и XIII групп верхнюю область сначала обрабатывали гидрозолем МНА, а через 2 часа – растворами металлов. Обработку проводили в течение 10 суток – на кожу наносили 0,5 мл препарата с последующим его легким втиранием в кожу.

На 12 сутки оценивали степень сенсибилизации животных к испытуемым веществам путем однократного нанесения разрешающих доз препаратов (табл. 1) на нижнюю область кожи морских свинок: II-IV группы – МНА с соответствующей концентрацией; V-VII группы – раствор CoCl_2 ; VIII – X группы – раствор $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; XI – XIII группы – раствор NiCl_2 .

По окончании эксперимента у животных брали биопсию кожного материала из опытных и интактных участков кожи для гистологического и спектрального исследования. Образцы кожи фиксировали в 10 % нейтральном формалине и затем готовили гистологические срезы. Препараты исследовали на световом микроскопе Olympus BX 45 (объективы 10 и 40) с телевизионной установкой Olympus DP 25.

Морфологические исследования проводили на гистологических препаратах, оцифрованных в редакторе Adobe Photoshop CS3. Изменения оценивали двумя способами: методом планиметрии определяли толщину эпидермиса, методом точечного счета определяли объемную долю гистологических структур, используя морфометрическую сетку Салтыкова с 60 равноудаленными тестовыми точками. За 100 % принимали общую площадь сканированных участков образца.

Адсорбцию ионов кобальта, никеля и хрома на МНА *in vitro* оценивали следующим образом. Растворы ионов смешивали с гидрозолем МНА при весовых соотношениях ион : МНА – 1 : 5 (объем проб составлял 1 мл). Суспензии интенсивно перемешивали (3-5 секунд) на Vortex-Genie 2 g-560E (Scientific Industries, Inc., USA) и инкубировали при комнатной температуре 2 минуты. МНА с адсорбированными ионами собирали центрифугированием

(16000g, 10 мин, 10°C) на Centrifuge 5415R (Eppendorf, Germany). Надосадочные жидкости отбирали для спектрального анализа количества не связавшихся с МНА ионов с помощью UV/VIS спектрофотометра UVIKON 943 (Kontron Instruments, Italy). Спектральный анализ контрольных (без обработки МНА) растворов ионов проводили аналогичным образом. Из величин оптической плотности в максимумах поглощения контрольных и опытных образцов рассчитывали сорбционную емкость МНА к ионам.

Содержание тяжелых металлов в образцах кожи определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре SOLAAR серии S (Thermo Electron, USA). Минерализацию проб проводили сухим способом.

Концентрацию определяемого элемента в каждой из двух проб рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{\alpha * v * m}{M} \text{ мкг/г}$$

где α – концентрация элемента в растворе, мкг/см³;

v – объем раствора пробы, см³;

M – навеска (объем) биоматериала, г(см³);

m – кратность разведения или концентрирования по отношению к первоначальному объему.

Изучение проницаемости МНА в кожу проводили на белых беспородных крысах Вистар, которые случайным образом были распределены на две группы по 6 в каждой: контрольные (интактные) крысы и опытные животные, в межлопаточной области которых апплицировали водные суспензии МНА 1,0 масс.% в течение 10 дней. На 12-е сутки у всех животных брали биопсию кожи для электронной микроскопии. Образцы погружали в охлажденный до 4 °С 1,5 % раствор глутаральдегида, приготовленный на фосфатном буфере, и фиксировали в 1 % осмиевой кислоте. После обезвоживания в этаноле образцы заливали в аралдит в смеси с эпоном. Срезы толщиной до 50 нм делали на

ультрамикротоме Reichert - UM O3 (Reichert, Austria), контрастировали уранилацетатом и докрашивали углекислым свинцом. Препараты просматривали на микроскопе LIBRA 120 (Zeiss, Germany).

Статистическую обработку материала проводили с использованием программы Statistica версия 6,0 (StatSoft, 2003). Определяли среднюю арифметическую и ее ошибку. Для оценки достоверности различий данных использовали критерий Манна-Уитни (Manna-Whitney). Для оценки достоверности результатов эпидемиологического исследования использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследований было выявлено, что на территории Красноярского края в период с 2007 по 2011 годы в структуре дерматологической заболеваемости АКД составил 14,7 % от всей кожной патологии. Показатели первичной и общей заболеваемости АКД увеличились на 12,3 % и 20,2 % (табл. 2).

Таблица 2 – Заболеваемость АКД у населения Красноярского края за 2007 – 2011 гг.

Год	Первичная заболеваемость	Общая заболеваемость
2007	$8,1 \pm 0,05$	$9,4 \pm 0,06$
2008	$8,0 \pm 0,05$	$9,3 \pm 0,06$
2009	$7,7 \pm 0,05$	$8,9 \pm 0,06$
2010	$8,4 \pm 0,05$	$10,3 \pm 0,06$
2011	$9,1 \pm 0,06^*$	$11,3 \pm 0,06^{***}$
Темп прироста, %	12,3	20,2
Среднегодовой темп прироста, %	1,2	2,1

* достоверность различий по отношению к показателю 2007 г., $p < 0,05$;

*** достоверность различий по отношению к показателю 2007 г., $p < 0,001$.

У взрослого населения значительно возросли показатели первичной и общей заболеваемости АКД (на 25,9 % и 39,7 %, соответственно) (табл. 3).

Таблица 3 – Заболеваемость АКД у взрослого населения Красноярского края за период 2007 – 2011 гг.

Год	Первичная заболеваемость	Общая заболеваемость
2007	5,8 ± 0,05	6,8 ± 0,05
2008	5,9 ± 0,05	6,9 ± 0,05
2009	5,7 ± 0,05	6,7 ± 0,05
2010	6,7 ± 0,05*	8,5 ± 0,06***
2011	7,3 ± 0,06**	9,5 ± 0,07***
Темп прироста, %	25,9	39,7
Среднегодовой темп прироста, %	2,6	3,7

* достоверность различий по отношению к показателю 2007 г., $p < 0,05$;

** достоверность различий по отношению к показателю 2007 г., $p < 0,01$;

*** достоверность различий по отношению к показателю 2007 г., $p < 0,001$.

В изучаемый период первичная заболеваемость АКД у подросткового населения увеличилась на 12,6 %, общая заболеваемость – на 6,9 % (табл. 4).

Таблица 4 – Заболеваемость АКД у подросткового населения Красноярского края за период 2007 - 2011 гг.

Год	Первичная заболеваемость	Общая заболеваемость
2007	9,5 ± 0,26	11,6 ± 0,29
2008	8,7 ± 0,26	10,8 ± 0,29
2009	10,0 ± 0,29	12,2 ± 0,33
2010	9,6 ± 0,31	11,3 ± 0,33
2011	10,7 ± 0,34	12,4 ± 0,36
Темп прироста, %	12,6	6,9
Среднегодовой темп прироста, %	1,4	0,8

Таким образом, за исследуемый период времени первичная и общая заболеваемость АКД у взрослого населения была выше, чем у подросткового населения. Эти показатели у взрослого населения увеличились в 1,3 и 1,4 раза, соответственно, у подросткового населения – в 1,1 раза

За исследуемый период показатели первичной и общей заболеваемости АКД у детского населения, напротив, снизились на 7,3 % и 8,9 % (табл. 5).

Таблица 5 – Заболеваемость АКД у детского населения Красноярского края за период 2007 – 2011 гг.

Год	Первичная заболеваемость	Общая заболеваемость
2007	19,2 ± 0,20	21,9 ± 0,21
2008	18,6 ± 0,19	21,2 ± 0,22
2009	17,4 ± 0,19*	19,3 ± 0,21**
2010	16,4 ± 0,18**	19,2 ± 0,20**
2011	17,8 ± 0,20	19,9 ± 0,21*
Темп прироста, %	-7,3	-8,9
Среднегодовой темп прироста, %	-0,6	-0,9

* достоверность различий по отношению к показателю 2007 г., $p < 0,05$;

** достоверность различий по отношению к показателю 2007 г., $p < 0,01$

Анализ амбулаторных карт 206 (82,1 %) больных АКД и 45 (17,9 %) больных контактной экземой, находившихся в 2007 – 2009 годах на амбулаторном лечении в аллергологическом центре «Клиника Тисленко» показал, что среди них преобладали женщины – 212 (84,5 %), мужчин было 39 (15,5 %). При среднем возрасте пациентов $35,3 \pm 4,5$ года наибольшее количество больных было выявлено в возрасте от 23 до 27 лет – 50 (19,9 %) и от 38 до 42 лет – 52 (20,7 %). Кожный процесс у 179 (86,9 %) больных АКД носил локализованный характер и соответствовал месту контакта с аллергеном, у 27 (13,1 %) очаги поражения выходили за пределы зоны контакта. Кожные высыпания у 85 (41,3 %) больных АКД были представлены очагами эритемы без четких границ, папулезными элементами и мелкопластинчатым шелушением. У 121 (58,7 %) пациента высыпания были представлены очагами эритемы разной выраженности, без четких границ, папулезными и единичными везикулезными элементами, а также микроэрозиями, серозно-геморрагическими корочками, мелкопластинчатым шелушением и эксфолиациями. Высыпания сопровождалась зудом слабой, умеренной и выраженной интенсивности, чувством жжения. При анализе субъективной оценки симптомов 45 (21,8 %) больных оценивали их как незначительные,

92 (44,7 %) – как умеренные, 69 (33,5 %) – как выраженные. Наиболее часто у больных АКД процесс локализовался на коже туловища – у 74 (36,0 %) человек, предплечий – у 57 (27,7 %), кистей – у 47 (22,8 %), реже на коже лица – у 33 (16,0 %), голеней – у 12 (5,8 %), шеи – у 9 (4,4 %).

У 30 (66,7 %) больных аллергической контактной экземой кожный процесс имел тенденцию к диссеминации. Кожные проявления у данной группы больных, как правило, распространялись за пределы контакта с аллергеном, появлялись очаги высыпаний на участках, удаленных от первичного очага поражения. Процесс, преимущественно, был представлен выраженной эритемой без четких границ, папулами, везикулярными элементами с серозным содержимым, микроэрозиями, мокнутием и серозно-геморрагическими корочками. Наблюдался более выраженный полиморфизм высыпаний, по сравнению с больными АКД. У таких больных высыпания сопровождались зудом умеренной и выраженной интенсивности, чувством жжения, 32 (71,1 %) пациента субъективно оценивали жалобы как выраженные, 13 (28,9 %) – как умеренные. Процесс у больных контактной экземой чаще локализовался на коже кистей – у 30 (66,7 %), предплечий – у 23 (51,1 %), туловища – у 19 (42,2 %), реже на коже лица – у 2 (4,4 %) и голеней – у 1 (2,2 %).

При изучении анамнестических данных было установлено, что у 185 (89,8 %) больных АКД и 35 (77,8 %) больных контактной экземой провоцирующим фактором, приводящим к развитию заболевания, являлся контакт с аллергеном. Регресс кожного поражения при прекращении контакта с аллергеном отмечали 186 (90,3 %) больных АКД. У 30 (66,7 %) больных контактной экземой наблюдался замедленный регресс кожного поражения после прекращения контакта с аллергеном.

При аппликационном аллергологическом тестировании установлено, что у 13 (6,3 %) пациентов положительной реакции не наблюдалось, у 173 (84,0 %) больных АКД отмечалась моновалентная сенсibilизация, у 20 (9,7 %) – сенсibilизация к 2 аллергенам. У 40 (88,9 %) пациентов с контактной экземой отмечалась сенсibilизация к 1 аллергену, у 4 (8,9 %) – к 2-м, у 1 (2,2 %) – к 3-м.

Результаты тестирования показали, что у больных АКД и контактной экземой наиболее часто аллергические реакции регистрировались на следующие аллергены (рис. 1).



Рис.1. Спектр наиболее часто встречающихся аллергенов у больных АКД и контактной экземой

Спектральные исследования показали, что в условиях водной среды на 1 мг МНА адсорбируется более 30 мкг ионов кобальта и 20 мкг ионов никеля. В аналогичных экспериментальных условиях МНА не связывают ионы хрома.

При обработке опытного участка кожи морских свинок II, III и IV групп МНА видимых макроскопических изменений кожи не наблюдалось. После обработки интактного участка кожи II – IV групп разрешающей дозой МНА, через 24-48 часов ни у одного из животных не отмечалось видимых макроскопических изменений кожи. При гистологическом исследовании образцов кожи II – IV групп, выявлялись скудные лимфоциты и фибробласты. Полученные данные позволяют говорить о том, что МНА обладают биосовместимостью по отношению к кожным покровам животных, не оказывают раздражающего и сенсибилизирующего действия на кожу животных. Результаты электронной микроскопии свидетельствуют в пользу проникновения МНА в дерму, поскольку в ее структурах были выявлены агрегированные наночастицы. Эти данные позволили высказать предположение о трансглангулярном пути проникновения МНА в дерму.

При обработке опытных участков кожи морских свинок V, VIII и XI групп растворами металлов у всех животных регистрировались клинические признаки развития АКД. При гистологическом исследовании образцов кожи наблюдалось значительное утолщение эпидермиса, в сосочковом слое дермы диффузные и очаговые воспалительные инфильтраты, представленные лимфоцитами и полиморфноядерными лейкоцитами с примесью макрофагов и эозинофилов. Сосуды сосочкового слоя дермы расширены. После нанесения на интактный участок кожи V, VIII и XI групп разрешающих доз растворов металлов через 24-72 часа у всех животных регистрировалась ограниченная эритема. Гистологическое исследование образцов кожи из этих участков выявило выраженную лимфоцитарную инфильтрацию. Эти данные свидетельствуют о выраженном раздражающем и сенсибилизирующем действии растворов металлов на кожные покровы морских свинок.

Предварительная обработка кожных покровов морских свинок водной суспензией МНА 0,5 масс.% (VI группа) и 1,0 масс.% (XIII группа) нивелировала раздражающее и сенсибилизирующее действие хлорида кобальта и хлорида никеля при последующей их аппликации на кожу животных, поскольку клинических признаков АКД у данных групп животных не наблюдалось в течение всего эксперимента. В опытных и интактных образцах кожи VI и XIII групп выявлялись скудные инфильтраты, состоящие из лимфоцитов и полиморфноядерных лейкоцитов.

Морфометрическое исследование опытных образцов кожи VI, VII, XII и XIII групп показало достоверное снижение показателей «свободное интерстициальное пространство», «кровеносные сосуды», «лимфоциты», «нейтрофилы», по сравнению с аналогичными показателями кожи контрольных V и XI групп (табл. 6 и табл. 7).

По результатам атомно-адсорбционной спектроскопии содержание кобальта в образцах кожи животных VI и VII групп было достоверно ($p < 0,05$) снижено на 50 % и 64,5 % по сравнению с образцами кожи контрольной V группы. Содержание никеля в образцах кожи XII и XIII групп было ниже на

47,9 %, и 33,5 % по сравнению с его содержанием в образцах кожи контрольной XI группы.

Таблица 6 – Относительный объем гистологических фракций дермы морских свинок при комбинированном воздействии МНА и хлорида кобальта (%)

Оцениваемый параметр	Экспериментальные группы животных		
	V раствор CoCl ₂ (2%)	VI МНА (0,5 масс.%) + раствор CoCl ₂ (2 %)	VII МНА (1,0 масс.%) + раствор CoCl ₂ (2%)
Свободное интерстициальное пространство	21,1 ± 0,49	10,7 ± 0,19*	11,6 ± 0,27*
Коллагеновые волокна	60,0 ± 0,58	82,3 ± 0,23*	79,0 ± 0,35*
Фибробласты	1,7 ± 0,16	3,2 ± 0,11*	2,6 ± 0,14*
Кровеносные сосуды	10,0 ± 0,36	1,3 ± 0,07*	3,3 ± 0,15*
Лимфоциты	3,5 ± 0,22	1,1 ± 0,06*	2,1 ± 0,12*
Нейтрофилы	1,7 ± 0,15	0,6 ± 0,04*	0,9 ± 0,08*

Примечание: * отличия от показателей контрольной группы (применение только хлорида кобальта) по сравнению с показателями в опытных группах (комбинированное применение МНА и хлорида кобальта) ($p < 0,05$).

Таблица 7 – Относительный объем гистологических фракций дермы морских свинок при комбинированном воздействии МНА и хлорида никеля (%)

Оцениваемый параметр	Экспериментальные группы животных		
	XI раствор NiCl ₂ (5 %)	XII МНА(0,5 масс. %)+ раствор NiCl ₂ (5 %)	XIII МНА(1,0 масс.%) + раствор NiCl ₂ (5 %)
Свободное интерстициальное пространство	13,9 ± 0,31	7,8 ± 0,24*	7,1 ± 0,23*
Коллагеновые волокна	77,1 ± 0,38	84,1 ± 0,32*	84,7 ± 0,32*
Фибробласты	1,2 ± 0,09	3,6 ± 0,16*	4,5 ± 0,19*
Кровеносные сосуды	3,0 ± 0,15	1,5 ± 0,09*	1,4 ± 0,11*
Лимфоциты	1,8 ± 0,12	0,7 ± 0,08*	0,3 ± 0,05*
Нейтрофилы	1,0 ± 0,09	0,4 ± 0,06*	0,3 ± 0,05*

Примечание: * отличия от показателей контрольной группы (применение только хлорида никеля) по сравнению с показателями в опытных группах (комбинированное применение МНА и хлорида никеля) ($p < 0,05$).

Предварительная обработка кожи морских свинок IX и X групп МНА 0,5 и 1,0 масс.%, соответственно, не оказывала протекторного эффекта при воздействии ионов хрома и не предотвращала развитию реакции гиперчувствительного замедленного типа. Данные морфометрического исследования не выявили тенденции к снижению параметров «свободное интерстициальное пространство», «кровеносные сосуды», «лимфоциты» и «нейтрофилы» в образцах кожи, которые предварительно обрабатывали МНА 0,5 % и 1,0 масс.%, а затем раствором хрома.

ВЫВОДЫ

1. По данным проведенного эпидемиологического анализа на территории Красноярского края за период 2007 – 2011 годы зарегистрировано повышение уровня первичной и общей заболеваемости АКД на 12,3 % и 20,2 %. Показано, что за этот период первичная и общая заболеваемость АКД у взрослого населения региона выросла в 1,3 и 1,4 раза, у населения подросткового возраста этот показатель увеличился в 1,1 раза. В указанный временной период выявлено снижение первичной и общей заболеваемости АКД у детского населения Красноярского края на 7,3 % и 8,9 %.

2. Клиническая картина АКД характеризовалась частым поражением кожи туловища у 36,0 %, реже кожи голеней у 5,8 % и шеи у 4,4 %. Процесс носил локализованный характер у 86,9 % больных. Клиническая картина контактной экземы характеризовалась частым поражением кожи кистей у 66,7 % и предплечий у 51,1 %, реже кожи лица у 4,4 % и голеней у 2,2 %. Кожный процесс у 66,7 % больных контактной экземой носил распространенный характер. По результатам анамнестических данных у 185 (89,8 %) больных АКД и 35 (77,8 %) больных контактной экземой провоцирующим фактором, приводящим к развитию заболевания, являлся контакт с аллергеном.

3. При аллергологическом тестировании исследуемых больных АКД и контактной экземой показано, что аллергенами, наиболее часто вызывающими сенсibilизацию, являются: никеля сульфат (41,4 %), кобальта хлорид (20,3 %),

калия дихромат (10,0 %), смесь ароматизирующих веществ и тиомерсал (6,8 %).

4. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* установлено, что в условиях водной среды МНА адсорбируют ионы кобальта и никеля и не связывают ионы хрома. Показано *in vitro*, что в водной среде на 1 мг частиц может быть адсорбировано более 30 мкг ионов кобальта и 20 мкг ионов никеля. В исследованиях *in vivo* показано, что предварительная обработка кожных покровов морских свинок водной суспензией МНА с концентрацией частиц 0,5 и 1,0 масс.% приводит к снижению содержания кобальта в образцах кожи на 50 % и 64,5 % и никеля на 47,9 % и 33,5 %, соответственно.

5. Установлено, что в условиях физиологической нормы частицы МНА при концентрациях 0,5, 1,0 и 3,0 масс.% не оказывают раздражающего и сенсибилизирующего действия на кожу экспериментальных животных. Показано, что при аппликации МНА на кожные покровы частицы проникают в кожу преимущественно трансгландулярным путем. Показано, что в условиях экспериментального АКД частицы МНА при концентрациях 0,5 и 1,0 масс.% оказывают протекторный эффект при воздействии ионов кобальта и никеля на кожу животных и предотвращают развитию реакции гиперчувствительности замедленного типа.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью диагностики наиболее часто встречающихся этиологических факторов АКД рекомендуется использовать аппликационный тест с химическими носителями («Аллертест»).

2. Учитывая полученные экспериментальные результаты, рекомендуется продолжить дальнейшие исследования (включая клинические испытания) по разработке лечебно-профилактических средств, содержащих МНА детонационного синтеза.

3. В клинических испытаниях, направленных на профилактику АКД, вызываемых ионами кобальта, можно рекомендовать применение гидрозоля МНА с концентрацией частиц 0,5 масс.%; для профилактики АКД, вызываемых ионами никеля, рекомендуется использовать гидрозоль МНА с концентрацией частиц 1,0 масс.%.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Влияние наноалмазов на структуру кожи морских свинок в условиях физиологической нормы и при локальном действии хлорида кобальта / В.И. Прохоренков, В.В. Гребенникова, А.А. Гайдаш, **Е.Ю. Васильева**, Ю.В. Карачева, А.П. Пузырь, В.С. Бондарь / **Сибирское медицинское обозрение**. – 2011. – № 3. – С.34-38.

2. Иммунологические механизмы развития аллергических дерматозов / Р.Т. Казанбаев, В.И. Прохоренков, Т.А. Яковлева, **Е.Ю. Васильева** // **Сибирское медицинское обозрение**. – 2013. – №4. – С.9-13.

3. Study of the effect of nanodiamonds on animal skin structure / **E. Yu. Vasilyeva**, V.I. Prokhorenkov, A.P. Puzyr, V.S. Bondar // Abstracts of 20-th Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology. – Lisbon, 2011. – P. 0180.

Изучение воздействия наноалмазов на структуру кожи / **Е.Ю. Васильева**, В.И. Прохоренков, А.П. Пузырь, В.С. Бондарь // Тезисы 20-го Конгресса Европейской Академии Дерматологии и Венерологии. – Лиссабон, 2011. – С.180.

4. **Васильева Е.Ю.** О возможных перспективах применения наноалмазов в дерматологии / **Е.Ю. Васильева** // Студент и научно-технический прогресс : Материалы 50-й юбилейной международной научной студенческой конференции. – Новосибирск, 2012. – С.12-13.

5. The effects of nanodiamonds on Guinea pigs skin with cobalt chloride local treatment / **E.Yu. Vasilyeva**, V.I. Prokhorenkov, A.P. Puzyr, V.S. Bondar // Abstracts of 9-th Spring Symposium of the European Academy of Dermatology and Venereology. – Verona, 2012. – P. 609.

Влияние наноалмазов на структуру кожи морских свинок при локальном действии хлорида кобальта / **Е.Ю. Васильева**, В.И. Прохоренков, А.П. Пузырь, В.С. Бондарь // Тезисы 9-го Весеннего Симпозиума Европейской Академии Дерматологии и Венерологии. – Верона, 2012. – С. 609.

6. **Васильева Е.Ю.** Адсорбция ионов кобальта модифицированными наноалмазами в эксперименте in vivo / **Е.Ю. Васильева** // Студент и научно-

технический прогресс : Материалы 51-й международной научной студенческой конференции. – Новосибирск, 2013. – С.9-10.

7. **Васильева Е.Ю.** Эпидемиологический анализ заболеваемости аллергическим контактным дерматитом на территории Красноярского края / **Е.Ю. Васильева** // Студент и научно-технический прогресс : Материалы 51-й международной научной студенческой конференции. – Новосибирск, 2013. – С.59-60

8. Protective effect of nanodiamonds at the local action of nickel ions on the skin of Guinea pigs / **E.Yu. Vasilyeva**, V.I. Prokhorenkov, A.P. Puzyr, V.S. Bondar // Abstracts of 10-th Spring Symposium of the European Academy of Dermatology and Venereology. – Cracow, 2013. – P.502.

Протекторный эффект наноалмазов при локальном действии хлорида никеля на кожу морских свинок / **Е.Ю. Васильева**, В.И. Прохоренков, А.П. Пузырь, В.С. Бондарь // Тезисы 10-го Весеннего Симпозиума Европейской Академии Дерматологии и Венерологии. – Краков, 2013. – С.502.

9. Тисленко Л.Н. Современная диагностика аллергического контактного дерматита / Л.Н. Тисленко, **Е.Ю. Васильева**, В.И. Прохоренков // День специалиста : Актуальные вопросы дерматовенерологии: материалы трудов. – Красноярск, 2013. – С. 102-104.

10. Modified nanodiamonds as a new adsorbent for binding and neutralization of nickel ions to protect against of allergic contact dermatitis / **E.Yu. Vasilyeva**, V.I. Prokhorenkov, A.P. Puzyr, V.S. Bondar // Abstracts of 22-th Congress of the European Academy of Dermatology and Venereology. – Istanbul, 2013. – P. 1649.

Модифицированные наноалмазы как новый адсорбент для связывания и нейтрализации ионов никеля для защиты от аллергического контактного дерматита / **Е.Ю. Васильева**, В.И. Прохоренков, А.П. Пузырь, В.С. Бондарь // Тезисы 22-го Конгресса Европейской Академии Дерматологии и Венерологии. – Стамбул, 2013. – С.1649.