DOI: http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.4(44).149616

УДК 616.53-002.25-07:616.153.94-07

Г. С. Лаврик, О. П. Корнійчук, З. Я. Федорович, З. Д. Воробець

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького,
вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна,
e-mail: lavrykgal@gmail.com

NO-СИНТАЗНА АКТИВНІСТЬ ЛЕЙКОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ НА *ACNE VULGARIS*

Мета. *Вивчити зміни активності окремих ізоформ NO-синтази лейкоцитів крові осіб з acne vulgaris за участі біоплівкових і планктонних форм стафілококів. Активність ензиму визначали до та після лікування.* ***Методи.*** *Обстежено 44 хворих на acne vulgaris, з гнійних пустул яких ізольовано культури плівкоутворювальних і планктонних форм Staphylococcus aureus та Staphylococcus epidermidis. Лейкоцити виділяли з свіжоотриманої периферичної гепаринізованої крові пацієнтів (до і після лікування) та осіб групи контролю у градієнті густини фікол-тріумбрасту (ρ=1,08 г/см³). NO-синтазну активність виражали в пмоль цитруліну за 1 хв на 1 мг протеїну.* ***Результати.*** *Виявлено дещо вищі показники iNOS лейкоцитів за участі біоплівкових стафілококів для видів S. aureus та S. epidermidis у порівнянні з показниками планктонних форм вказаних видів. Встановлено, що при формах акне, спричиненого як S. aureus, так і S. epidermidis (планктонна та плівкоутворювальна), достовірне збільшення активності в 3,8–5,2 рази ендотеліальної ізоформи NO-синтази та в 52,5–55,1 разів індуцибельної NO-синтази лейкоцитів периферичної крові щодо контрольних значень. Після проведеного курсу лікування акне, ускладненого проліферацією S. aureus (планктонна та плівкоутворювальна форма), достовірно знижується активність індуцибельної ізоформи NO-синтази відносно контрольного рівня.* ***Висновки.*** *За виявлення біоплівкових стафілококів видів S. aureus та S. epidermidis зафіксовано збільшення рівня активності iNOS. При обох формах акне, спричиненого як S. aureus, так і S. epidermidis (планктонна та плівкоутворювальна), збільшується активність ізоформ NO-синтази. Активність індуцибельної ізоформи NO-синтази може слугувати біомаркером для моніторингу ефективності лікування.*

Ключові слова: *хворі на acne vulgaris, ендотеліальна NOS, індуцибельна NOS, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis.*

Серед захворювань шкіри вугрова хвороба *(acne vulgaris)* є одним з найпоширеніших запальних, хронічних, захворювань пілосебоцейного комплексу, які викликають рецидив з локалізацією на обличчі і верхній частині тулуба. [11].

Відомо, що у таких хворих спостерігаються глибокі зміни кількісного

© Г. С. Лаврик, О. П. Корнійчук, З. Я. Федорович, З. Д. Воробець, 2018

та якісного складів мікробіоти шкіри, тому варіації бактеріальної колонізації є одним з основних елементів у його розвитку. Приєднання мікроорганізмів втягує у патологічний процес лейкоцити периферичної крові [2]. При запаленні, викликаному пошкодженням тканин шкіри або інфекцією, макрофаги первинної імунної відповіді визначаються як запальний М1-фенотип. Активний кисень і проміжні продукти метаболізму азоту, включаючи оксид азоту (NO) і супероксид, які утворюються М1-макрофагами, мають високу токсичність для мікроорганізмів та можуть призводити до аномального запалення сусідніх тканин [17]. Проте прозапальні і антимікробні М1-відповіді макрофагів контролюються М2-відповідями протизапальних макрофагів. У ході подальшого розвитку імунної відповіді в результаті кооперативних запальних механізмів, фактор запалення або патоген елімінуються, М1-активація макрофагів зменшується, відбувається накопичення протизапальних М2-макрофагів в заключній, відновлювальній стадії запалення. Набуваючи регуляторно-супресивного фенотипу макрофаги контролюють відновлення базового тканинного гомеостазу [1].

Макрофаги обох фенотипів часто присутні в тканинах одночасно і відрізняються спектром медіаторів і маркерів, які ними секретуються. Інтегративний ефект М1- і М2-макрофагів залежить від балансу їхніх функцій – активувальних і пригнічувальних, а також від тканинного мікрооточення [16].

Встановлено, що при різних захворюваннях переважання певних фенотипів макрофагів може сприяти небажаним ефектам у перебігу захворювань хронізації чи розвитку фатальної для організму надмірної запальної відповіді [9].

Впродовж останніх десятиріч значна увага приділяється вивченню метаболізму оксиду азоту в патогенезі різноманітних захворювань. Оскільки макрофаги М1 експресують NO-синтазу (NOS), яка метаболізує аргінін в NO і цитрулін, а макрофаги М2 характеризуються експресією ферменту аргінази, який гідролізує аргінін до орнітину і сечовини [18] використовують біохімічні методи для визначення поляризації макрофагів, що засновані на активності їх ферментів щодо розщеплення аргініну [6].

Окрім *Propionibacterium acnes* до запального процесу при вугровій хворобі приєднується інша бактеріальна мікрофлора *(Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Staphylococcus epidermidis, Haemophilus spp., Escherichia coli* та ін.) [3]. За умов утворення мікроорганізмами біоплівок більш вираженою стає обтурація потових залоз, що має значення в патогенезі атопічного дерматиту, а також *acne vulgaris* [13]. Виявлено, що найчастіше до розвитку акне задіюється *S. aureus,* який спричинює більш високу фагоцитарну активність та міграційну здатність М1-макрофагів. [9].

За даними наукової літератури доведено, що в мікробіоті кишечника у пацієнтів з акне різко зменшується кількість *Lactobacillus,* зростає популяційний рівень *S. aureus* та зростає роль *E. coli haemolytica* [13].

Попередніми нашими дослідженнями встановлено високий відсоток виділення із гнійних пустул пацієнтів з *acne vulgaris* стафілококів як біоплівкової, так і планктонної форми [5]. Оскільки вугрову хворобу розглядають як порушення функції всього організму із задіюванням імунної системи в цьому

процесі [4], актуальними є проведення біохімічних досліджень, а саме вивчення зміни активності окремих ізоформ NO-синтази на пермеалізованих сапоніном мононуклеарних лейкоцитів периферичної крові хворих на акне.

Ефективність лікування вугрової хвороби на сьогодні залишається недостатньою і потребує комплесних підходів.

Мета роботи: вивчити зміни активності окремих ізоформ NO-синтази лейкоцитів крові осіб з *acne vulgaris* за участі біоплівкових і планктонних форм стафілококів. Активність ензиму визначали до та після лікування.

Матеріали та методи

Досліджено 44 хворих на *acne vulgaris* віком від 18 до 30 років, з гнійних пустул яких ізольовано культури плівкоутворювальних і планктонних форм *S. aureus* та *S. epidermidis*. Виділення та ідентифікацію стафілококів проводили з використанням стандартних середовищ у лабораторії кафедри мікробіології ЛНМУ ім. Данила Галицького відповідно до наказу [12]. Референтний штам *S. aureus* ATCC 25923 (F-49) отримано з музейної колекції бактеріологічної лабораторії Львівського обласного лабораторного центру для контрольного показника біоплівки.

Здатність до плівкоутворення у відібраних штамів було визначено за культуральними властивостями (підвищена в'язкість біомаси колонії) та за допомогою диференціальної інтерференційно-контрастної мікроскопії (DIC) з використанням конденсора темного поля та флуоресцентної мікроскопії [15].

Мононуклеарні лейкоцити виділяли з свіжоотриманої периферичної гепаринізованої крові пацієнтів (до і після лікування) та осіб групи контролю (n=9) у градієнті густини фікол-тріумбрасту (ρ=1,08 г/см^3). Визначення сумарної NO-синтазної ензиматичної активності (eNOS + iNOS) сапонін-перфорованих лейкоцитів проводили у відповідності з методом, описаним Равaєвою М. Ю. і Чуян О.М. [8]. Інкубаційна суміш (1 мл) містила 50 мМ KH_2P0_4 (pH 7,0), 1 мМ $MgCl_2$, 2 мМ $CaCl_2$, 2 мМ L-аргінін, 1мМ NADPH(H+) (Sigma, USA). NO-синтазну реакцію ініціювали внесенням до інкубаційного середовища аліквоти лейкоцитарної суміші (60–80 мкг/мл). Інкубацію проводили протягом 60 хв за температури 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням до інкубаційного середовища 0,3 мл 2N $HClO_4$. Контрольні зразки, що містили всі компоненти інкубаційного середовища, попередньо денатурували 2N $HClO_4$. Суміш центрифугували 10 хв при 3500 g і супернатант використовували для визначення L-цитруліну високоспецифічним методом в кольоровій реакції з антипірином. Дослідні та контрольні проби спектрофотометрували при 456 нм. Активність Ca^{2+}-незалежної iNOS визначали подібним методом, однак замість 2мМ $CaCl_2$ в середовище інкубації додавали 2 мкМ EDTA. Активність Ca^{2+}-залежної ізоформи NOS, яка відповідає конститутивній ізоформі (cNOS), вираховували як різницю між загальною NO-синтазною активністю та активністю iNOS. NO-синтазну активність виражали в пмоль цитруліну зі 1 хв на 1 мг протеїну.

Усім хворим проводився курс вакцинотерапії автостафілококовою вакциною та пробіотичним препаратом «Лацидофіл» (Institut Rosell Inc., Канада)

для посилення імуномоделювального ефекту.

Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel.* Визначали такі основні статистичні показники, як середнє арифметичне значення *(M),* стандартну похибку *(m).* Достовірність змін встановлювали за t-критерієм Стьюдента.

Результати та обговорення

З гнійних пустул хворих (n=44) виділено 28 штамів (63,6%) стафілококів, що утворювали плівки, з них 15 штамів (53,6%) віднесено до *S. aureus* і 13 штамів (46,4%) – до *S. epidermidis.*

Хоча всі ізоформи NOS каталізують утворення NO, кожна з них має свої особливості як у механізмах дії та локалізації, так і у біологічному значенні для організму і визначаються як конститутивна (cNOS) та індуцибельна (iNOS) синтази оксиду азоту. Підвищений рівень NO та його дефіцит є шкідливим для організму. За даними науковців високий рівень NO – це основний фактор у розвитку патологічних станів організму та посилення їх запального процесу [7].

Встановлено, що в лейкоцитах крові практично здорових осіб активність ендотеліальної ізоформи NO-синтази (eNOS) складає 12,5±0,1 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну, а активність індуцибельної ізоформи (iNOS) ледве визначається і становить 1,0±0,1 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну (рис. 1).

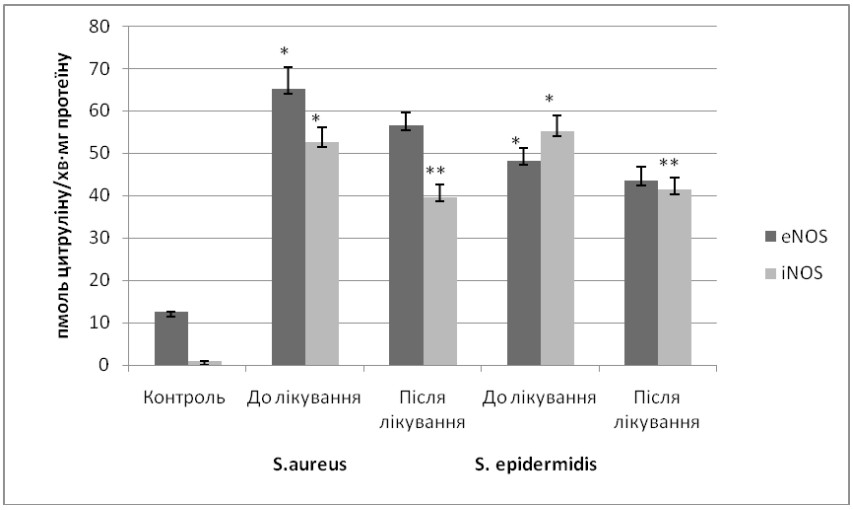

Рис. 1. Активність окремих ізоформ NO-синтази лейкоцитів крові хворих на *acne vulgaris* (плівкоутворювальна форма стафілококів)

* p<0,001 – зміни достовірні щодо величин в осіб групи контролю (практично здорові донори); ** p<0,05 – зміни достовірні щодо показників iNOS у пацієнтів до лікування

Fig. 1 The activity of distinct isoforms of NO-synthase of blood leukocytes in patients with *acne vulgaris* (film-forming type of staphylococci)

* p <0,001 – statistically significant relative to the values in the control group (practically healthy donors); ** p<0,05 – statistically significant relative to iNOS indices the untreated patients

За результатами наших досліджень виявлено значне зростання рівнів iNOS (у кілька десятків разів) у хворих на вугрову хворобу на тлі стафілококового ураження шкіри у порівнянні із практично здоровими особами. Показники iNOS у хворих акне становили в межах 55,1±3,7….41,4±3,9 1,0±0,1 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну проти контрольних даних1,0±0,1 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну.

Порівнюючи показники iNOS лейкоцитів хворих на акне (біоплівкова та планктонна форма стафілококів), дещо вищі показники iNOS лейкоцитів зафіксовано за участі біоплівкових стафілококів для видів *S. aureus* та *S. epidermidis* відповідно 52,5±3,6 та 55,1±3,7 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну. При виділенні планктонних форм вказаних видів стафілококів показники iNOS лейкоцитів становили 49,3±4,5 та 41,4±3,9 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну. Оскільки eNOS, виконуючи фізіологічні функції, забезпечує підтримування гомеостазу в організмі, її рівень не є високим у контрольній групі – 12,5±0,1 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну, проте рівень в лейкоцитах пацієнтів з акне є вищим у 4–5 разів як за участі біоплівкової, так і планктонної форми стафілококів.

S. epidermidis є представником автохтонної мікробіоти, присутній в організмі у різних біотопах і виконує одну з важливих функцій – захист організму від мікробних патогенних чинників, у тому числі, через реалізацію «постійного тренінга» імунної системи. Одним із аспектів цього процесу є підтримка на відповідних рівнях eNOS. За умов розвитку *acne vulgaris* в організмі активуються механізми протиінфекційного імунітету, тому є дещо підвищена імунна відповідь на опортуністичні мікроорганізми.

У пацієнтів хворих на акне (плівкоутворювальна форма *S. aureus*) активність eNOS лейкоцитів до початку лікування становила 65,1 ±5,2 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну, тобто була в 5,2 рази більшою ($p<0,001$), а активність iNOS становила до 52,8±3,6 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну, тобто в 52,5 рази перевищувала ($p<0,001$) відповідні показники ензиму у контрольних осіб. Після проведеного лікування активність eNOS дещо знижувалася щодо показників до лікування – 56,5±3,1 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну, однак це зниження не було достовірним ($p>0,05$). Що стосується iNOS, то її активність знижувалася більш суттєво і становила 39,6±3,1 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну – зміна показника в 1,3 рази ($p<0,05$) відносно вихідного рівня ензиму.

У пацієнтів, хворих на акне, ускладнене проліферацією плівкоутворювальної форми *S. epidermidis,* активність eNOS лейкоцитів до початку лікування становила 48,2±3,0 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну, тобто була вищою у 3,8 рази щодо показників активності здорових осіб ($p<0,001$). Ще більш виражені зсуви показників у бік підвищення встановлено для iNOS 55,1±3,7 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну, тобто в 55,1 рази ($p<0,001$) у порівнянні з контролем. За результатами проведеного лікування активність eNOS незначно відрізнялася щодо показників до лікування. Зафіксовано дещо нижчі рівні – 43,5±3,4 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну ($p>0,05$). Після проведеного лікування активність iNOS знижувалася достовірно щодо такої до лікування і становила 41,3±2,9 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну, тобто в 1,3 рази ($p<0,05$).

Дослідження NO-синтазної активності лейкоцитів пацієнтів хворих на

акне, від яких виділяли планктонну форму *S. aureus,* засвідчує аналогічний тренд показників (48,2±3,4 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну, p<0,001). Активність iNOS, індукована в результаті запальних реакцій, спричинених вказаним видом, також сягала високих показників (49,3±4,5 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну), тобто була більшою в 49,3 рази (p<0,001), як і за умов виділення біоплівкової форми S. aureus (рис. 2). Під впливом лікування зафіксовано деяке зниження активності eNOS лейкоцитів (42,4±3,8 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну) (p>0,05). Зниження iNOS було достовірним і становило 35,4±3,8 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну, тобто в 1,4 рази (p<0,05) відносно показників ензиму до лікування.

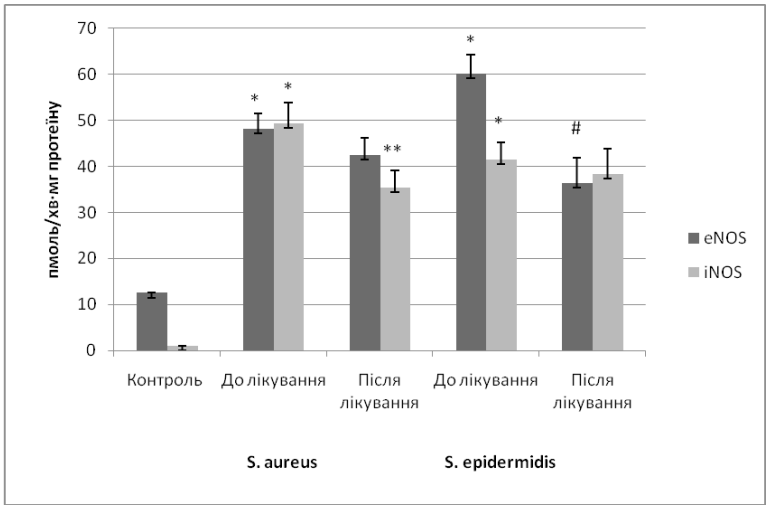

Рис. 2. Активність окремих ізоформ NO-синтази лейкоцитів крові пацієнтів хворих на *acne vulgaris* (планктонна форма стафілококів)

* p<0,001 – зміни достовірні щодо величин в осіб групи контролю (практично здорові донори); ** p<0,05 – зміни достовірні щодо показників iNOS у пацієнтів до лікування; # p<0,01 – зміни достовірні щодо показників eNOS у пацієнтів до лікування

Fig. 2. The activity of distinct isoforms of NO-synthase of blood leukocytes in patients with *acne vulgaris* (planktonic type of staphylococci)

* p <0,001 – statistically significant relative to the values in the control group (practically healthy donors); ** p<0,05 – statistically significant relative to iNOS indices the untreated patients; # p <0,01 – statistically significant relative to eNOS indices the untreated patients

У пацієнтів хворих на акне, від яких ізольовано планктонну форму *S. epidermidis,* активність eNOS лейкоцитів до початку лікування становила 60,1±4,1 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну, тобто перевищувала контрольні значення в 4,8 рази (p<0,001), а активність iNOS – 41,4±3,9 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну, тобто в 41,4 рази більша (p<0,001) за відповідні показники контрольних значень. Після проведеного лікування активність eNOS суттєво знижувалася щодо показників до лікування – до 36,3±5,5 пмоль цитруліну/хв×мг протеїну, тобто в 1,7 рази (p<0,01). Що стосується iNOS, то її активність практично не знижувалась щодо такої до лікування і становила 38,3±5,6пмоль цитруліну/хв×мг протеїну (p>0,05).

Такі високі значення активності у декілька десятків разів індуцибельної NO-синтази лейкоцитів периферичної крові хворих на акне до розвитку якого задіюються плівкоутворювальної і планктонної форми стафілокока, вказують на їхню важливу роль у розвитку запального процесу на шкірі.

Нещодавні результати показують, що кількісні показники стафілококів зростають у процесі наростання клінічних проявів акне [14]. Отже, вугрова хвороба може спричинятися стафілококами з високим потенціалом до плівкоутворення, що сприяє рецидивуванню хвороби і є однією з причин низької ефективності протимікробної терапії. При цьому біоплівки високої щільності утворює як культура вірулентна *(S. aureus),* так і умовно-патогенна бактерія *(S. epidermidis)*. Здатність до плівкоутворення є важливою властивістю як для потенційних патогенів (зокрема, золотистого й епідермального стафілококів), так і для нормальних симбіонтів людського організму, що сприяє виживанню їхньої популяції з різними наслідками для організму людини [5]. Відтак, плівкоутворення розглядають як додатковий фактор патогенності мікроорганізмів [10], і важливість якого зростає у разі зниження реактивності імунної системи.

Наші дані також погоджуються з такими, що свідчать про наявність оксидативного та нітрозативного стресу при акне. Так, показано, що при акне зростає концентрація малонового діальдегіду та нітроген оксиду і одночасно знижується активність антиоксидантних ензимів – супероксиддисмутази та каталази [12].

Під впливом комплексної терапії (введення аутовакцини та застосування пробіотиків), на тлі незначної зміни активностей eNOS, встановлено значний вплив на кількісний показник iNOS. Причому більш виражений ефект зафіксовано у пацієнтів зі шкіри яких була виділена біоплівкова форма *S. aureus,* і меншою мірою від хворих з планктонною формою *S. aureus*.

Оскільки отримані нами дані свідчать про те, що активність індуцибельної ізоформи NO-синтази в лейкоцитах при акне, як при планктонній, так і при плівкоутворювальній формі, зростає більш як у 50 разів, що визначається як нітрозативний стрес, можна припустити, що активність цього ензиму може слугувати маркерним показником для характеристики активності патологічного процесу та ефективності терапії акне.

Результати проведених досліджень підтвердили тісний зв'язок між активністю стафілококів шкіри при акне, як бактеріального фактора, що індукує розвиток запальних реакцій в організмі із залученням механізмів NO синтазної системи мононуклеарних лейкоцитів. Хоча основним джерелом оксиду нітрогену є індуцибельна NO-синтаза, при *acne vulgaris,* спричиненому як *S. aureus,* так і *S. epidermidis* незалежно від того, яку форму було виявлено (плівкоутворювальну чи планктонну), макрофагами активно експресується ендотеліальна ізоформа NO-синтази.

Активність вказаної конститутивної ізоформа NO-синтази знаходиться у позитивній кореляції з ідуцибельною NO-синтазою, що виявлено при акне спричиненого *S. aureus* (планктонна та плівкоутворювальна форма), активність якої багаторазово зростає щодо контрольних значень і достовірно знижується після проведеного курсу лікування. Оскільки на індукцію запальної

реакції більшою мірою впливає біоплівкова форма золотистого стафілокока, вірогідно у її структурах присутні компоненти, які впливають на рівень запальної реакції

Лікувальний ефект імунотерапії із застосуванням автовакцини, ґрунтується, як відомо, на імунофізіологічному впливові та мобілізації імунної відповіді за умов активної бактеріальної інфекції, а застосування пробіотичних бактерій сприяє реалізації протибактеріального захисту, що засвідчило альтерацію показників NO-синтазної системи мононуклеарних лейкоцитів.

Таким чином, активність індуцибельної ізоформи NO-синтази може слугувати біомаркером і використовуватися для оцінки ефективності лікування при станах, що супроводжуються активацією патогенних чи опортуністичних мікроорганізмів, зокрема і при *acne vulgaris*.

Г. С. Лаврик, О. П. Корнейчук, З. Я. Федорович, З. Д. Воробец
Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого,
ул. Пекарская, 69, Львов, 79010, Украина,
e-mail: lavrykgal@gmail.com

NO-СИНТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ *ACNE VULGARIS*

Реферат

Цель. *Изучить изменения активности эндотелиальной и индуцибельной NO-синтаз лейкоцитов крови лиц с acne vulgaris с участием биоплёночных и планктонных форм стафилококков. Активность фермента определяли до и после лечения.* ***Методы.*** *Обследовано 44 больных с acne vulgaris, из гнойных пустул которых изолированы культуры биоплёночных и планктонных форм Staphylococcus aureus и Staphylococcus epidermidis. Лейкоциты выделяли из периферической гепаринизированной крови пациентов (до и после лечения) и лиц группы контроля в градиенте плотности фикол-триумбрасту (ρ = 1,08 г / см³). NO-синтазную активность выражали в пмоль цитруллина за 1 мин на 1 мг протеина.* ***Результаты.*** *Выявлено, что показатели индуцибельной NOS лейкоцитов с участием биоплёночных стафилококков для видов S. aureus и S. epidermidis несколько выше по сравнению с показателями планктонных форм указанных видов стафилококков. Установлено, что при формах акне, вызванного как S. aureus, так и S. epidermidis (планктонная и пленкообразующая), достоверное увеличение активности в 3,8–5,2 раза эндотелиальной изоформы NO-синтазы и в 52,5–55,1 раза индуцибельной NO-синтазы лейкоцитов периферической крови относительно контрольных значений. После проведённого курса лечения акне, осложненного пролиферацией S. aureus (планктонная и пленкообразующая форма), достоверно снижается активность индуцибельной изоформы NO-синтазы относительно контрольного уровня.* ***Вывод.*** *При выявлении биоплёночных стафилококков видов S. aureus и S. epidermidis зафиксировано увеличение уровня активности индуцибельной NOS. При обеих формах акне, вызванного как S. aureus, так и S. epidermidis (планктонная и пленкообразующая), увеличивается*

активность изоформ NO-синтаз. Активность индуцибельной изоформы NO-синтазы может служить биомаркером для мониторинга эффективности лечения.

Ключевые слова: *больные acne vulgaris, эндотелиальная NOS, индуцибельная NOS, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis.*

G. Lavryk, O. Korniychuk, Z. Fedorovych, Z. Vorobets
Danylo Halytsky Lviv National Medical University,
69, Pekarska St., Lviv, 79010, Ukraine,
e-mail: lavrykgal@gmail.com

NO-SYNTHASE ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES IN PATIENTS WITH *ACNE VULGARIS*

Summary

*The **aim** is to study changes in the activity of distinct NO-synthase isoforms of blood lymphocytes in persons with acne vulgaris, for those individuals with disease accompanied by seeding of film-forming and planktonic staphylococcus forms. Enzyme activity was determined both before and after treatment. **Methods.** 44 patients with acne vulgaris were studied, for that persons the cultures of film-forming and planktonic forms of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis were isolated from purulent pustules. Separation of lymphocytes from fresh peripheral heparinized blood of patients (before and after treatment) and individuals in the control group was done in the ficol triumbras (ρ=1.08 g/cm^3). NO-synthase activity was expressed as citrulline production in picomoles per 1 milligram of protein per 1 minute. **Results.** Slightly higher rates of leukocyte iNOS were detected with the participation of biofilm staphylococci for S. aureus and S. epidermidis species compared to the planktonic forms of these staphylococcal species. For the acne caused both by S. aureus and S. epidermidis (planktonic and film-forming form) it was shown the significant increase ofendothelial NO-synthase activity (3.8–5.2 times) and inducible NO-synthas activity (52.5–55.1 times) ofperiferial blood leukocytes compared to control. The activity of the inducible isoform NO synthase significantly decreases relative to the control level after the course of acne treatment complicated by the proliferation of S. aureus (planktonic and film-forming form). **Conclusions.** The increase in the activity level of iNOS was observed with the participation of biofilm staphylococci of S. aureus and S. epidermidis species. In both forms of acne caused by S. aureus and S. epidermidis (planktonic and film-forming), the activity of NO-synthase isoforms increases with respect to control values. The activity of the inducible isoform NO-synthase can serve as a biomarker for monitoring treatment efficacy.*

Key words: *patients with acne vulgaris, endothelial NOS, inducible NOS, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis.*

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Белова О. В., Зимина И. В., Торховская Т. И., Никитина Н. А., Сергиенко В. И.* Иммунологическая функция кожи в свете новых даннях // Российский иммунологический журнал. – 2015. – 9, № 2. – С. 155–163.

2. *Горячкина М. В., Белоусова Т. А.* Комбинированная терапия акне у женщин: поиск оптимальных решений // Вестник дерматологии и венерологии. – 2014. – № 2. – С. 90–95.

3. *Калюжна Л. Д., Гречанська Л. В., Петренко А. В.* Роль розсмоктувальної терапії в лікуванні хворих на акне // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2014. – 77, № 8. – С. 41–44.

4. Кутасевич Я. Ф., Маштакова И. А. Опыт лечения тяжелых форм угревой болезни // Український журнал, дерматології, венерології, косметології. – 2011. – № 3. – С. 66–72.

5. *Лаврик Г. С., Корнійчук Г. С.* Біоплівкова форма стафілококів у моно- та бівидовій культурі в поєднанні з лактобацилами // Біологічні студії/Studia Biologica. – 2015. – 9, № 3–4. – С. 89–98.

6. *Монастырская Е. А, Лямина С. В, Малышев И. Ю.* М1 и М2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии // Патогенез. – 2008. – 6, № 4. – С. 31–39.

7. *Пікас О. Б.* Особливості дії оксиду азоту та його метаболітів в організмі людини, їх значення у виникненні патологічних процесів // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – 3, № 1. – С. 28–33.

8. *Раваева М. Ю., Чуян Е. Н.* Изменение активности системы синтеза оксида азота под действием низкоинтенсивного миллиметрового излучения // Ученые записки Таврического национального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2011. – 24, №. 4. – С. 201–210.

9. *Сахаров В. Н.* Роль различных фенотипов макрофагов в развитии заболеваний человека / В. Н. Сахаров, П. Ф. Литвицкий // Актуальные вопросы патофизиологии. – 2015. – № 1. – С. 26–31.

10. *Сідашенко О. І., Воронкова О. С., Сірокваша О. А., Вінніков А. І.* Біоплівка як особлива форма організації бактерій та її роль в інфекційних процесах // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – 2, №. 3– С. 36–41.

11. *Barratt H., Hamilton F., Car J., Lyons C., Layton A., Majeed A.* Outcome measures in acne vulgaris: systematic review // British Journal of Dermatology. –2009. – 160, № 1. – P. 132–136.

12. *Bonne D. R., Garrity G. M., Castenholz R. W., Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T.* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes. – Springer-Verlag New York, 2009. – Vol. 3. – 1450 p.

13. *Clark A. K.* Edible Plants and Their Influence on the Gut Microbiome and Acne. Sivamani International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – 18, № 5. – P. 1070.

14. *Dreno B., Martin R., Moyal D., Henley J.B., Khammari A., Seité S.* Skin microbiome and acne vulgaris: Staphylococcus, a new actor in acne. Experimental dermatology. – 2017. – 26, № 9. – P. 798–803.

15. *Krysko D. V., Berghe T. V., Parthoens E., D'Herde K., Vandenabeele P.* Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their

clearance // Methods in enzymology. – 2008. – 442. – P. 307–341.

16. *Martinez F. O., Gordon S.* The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment // F1000prime reports. – 2014. – 6.

17. *Nathan C., Ding A.* Nonresolving inflammation // Cell. – 2010. – 140, № 6. – P. 871–882.

18. *Rath M., Müller I., Kropf P., Closs E.I., Munder M.* Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages // Frontiers in immunology. – 2014. –5. – C. 532.

References

1. *Belova OV, Zimina IV, Torhovskaya TI, Nikitina NA, Sergienko VI.* Immunologicheskaya funkciya kozhi v svete novyh dannyh. Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal. 2015;9(2):155–163. (in Russian)

2. *Goryachkina MV, Belousova TA.* Kombinirovannaja terapija akne u zhenshhin: poisk optimal'nyh reshenij. Vestnik dermatologii i venerologii. 2014;(2):90–95 (in Russian)

3. *Kalyujna LD, Grechanska LV, Petrenko AV.* Rol rozsmoktuvalnoi terapii v likuvanni hvoryh na acne. Klinichna Imunologiya. Alergologiya. Infektologiya, 2014; 77(8):41–44. (in Ukrainian)

4. Kutasevich YaF, Mashtakova IA. Opyt lecheniya tyazhelyh form ugrevoy bolezni. Ukrainskyi zhurnal, dermatolohii, venerolohii, kosmetolohii. 2011;(3):66–72. (in Ukrainian)

5. Lavryk HS, Korniichuk HS. Bioplivkova forma stafilokokiv u mono-ta bivydovii kulturi v poiednanni z laktobatsylamy. Biolohichni studii/Studia Biologica. 2015;9(3–4):89–98. (in Ukrainian)

6. Monastyrskaya EA, Lyamina CV, Malyshev IYu. M1 i M2 fenotipy aktivirovannyh makrofagov i ih rol v immunnom otvete i patologii. Patogenez. 2008;6(4):31–39. (in Russian)

7. Pikas OB. Osoblyvosti dii oksydu azotu ta yoho metabolitiv v orhanizmi liudyny, yikh znachennia u vynyknenni patolohichnykh protsesiv. Visnyk problem biolohii i medytsyny. 2015;3(1):28–33. (in Ukrainian)

8. Ravaeva MYu, Chuyan EN. Izmenenie aktivnosti sistemy sinteza oksida azota pod deystviem nizkointensivnogo millimetrovogo izlucheniya. Uchenye zapiski Tavricheskogo nacionalnogo universiteta imeni V. I. Vernadskogo. Biologiya. Himiya. 2011;24(4):201–210. (in Ukrainian)

9. Saharov VN. Rol razlichnyh fenotipov makrofagov v razvitii zabolevaniy cheloveka. Aktualnye voprosy patofiziologii. – 2015;1:26–31. (in Russian)

10. Sidashenko OI, Voronkova OS, Sirokvasha OA, Vinnikov AI. Bioplivka yak osoblyva forma orhanizatsii bakterii ta yii rol v infektsiinykh protsesakh. Visnyk problem biolohii i medytsyny. 2013; 2(3):36–41. (in Ukrainian)

11. *Barratt H, Hamilton F, Car J, Lyons C, Layton A, Majeed A.* Outcome measures in acne vulgaris: systematic review. British Journal of Dermatology. 2009;160(1): 132–136. DOI:10.1111/j.1365-2133.2008.08819.x

12. *Bonne DR, Garrity GM, Castenholz RW, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT.* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes. Springer-Verlag New York, 2009;Vol. 3.1450 p.

13. *Clark AK.* Edible Plants and Their Influence on the Gut Microbiome and Acne. Sivamani International Journal of Molecular Sciences. 2017;18(5), 1070. doi:10.3390/ijms18051070

14. *Dreno B, Martin R, Moyal D, Henley JB, Khammari A, Seité S.* Skin microbiome and acne vulgaris: Staphylococcus, a new actor in acne. Experimental dermatology. 2017;26(9):798-803. doi: 10.1111/exd.13296.

15. *Krysko DV, Berghe TV, Parthoens E., D'Herde K., Vandenabeele P.* Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance. Methods in enzymology. 2008;442:307–341. doi: 10.1016/S0076-6879(08)01416-X.

16. *Martinez FO, Gordon S.* The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000prime reports. 2014;6.

17. *Nathan C, Ding A.* Nonresolving inflammation. Cell. 2010;140(6):871–882.

18. *Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M.* Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. Frontiers in immunology. 2014;5:532.

Стаття надійшла до редакції 04.11.2018 р.