

# ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИМОРФНО-ЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ II ТИПА

© Усанова Е.А.<sup>1</sup>, Чаусова С.В.<sup>1</sup>, Гуревич К.Г.<sup>2</sup>, Арутюнова Е.Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Кафедра общей патологии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, Москва;

<sup>2</sup> кафедра ЮНЕСКО «Здоровый образ жизни – залог успешного развития» Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова, Москва

E-mail: [usanova.alena@bk.ru](mailto:usanova.alena@bk.ru)

В статье оценивали фагоцитарную активность и эффект прайминга полиморфно-ядерных лейкоцитов крови (ПМЛ) при воздействии комплексного антигена *Streptococcus pyogenes* у пациентов с острыми гнойно-воспалительными заболеваниями кожных покровов и мягких тканей на фоне сахарного диабета II типа (с синдромом диабетической стопы) и без него. Исследование функциональной активности ПМЛ крови пациентов осуществлялось с помощью метода стимулированной сульфатом бария люминол-зависимой хемилюминесценции. Выявлено, что у пациентов с синдромом диабетической стопы наблюдается снижение фагоцитарной активности и ослабление эффекта прайминга ПМЛ крови по сравнению с пациентами, не имеющими нарушения углеводного обмена. Установлена отрицательная корреляция между фагоцитарной активностью, эффектом прайминга ПМЛ и уровнем гипергликемии в крови при синдроме диабетической стопы.

**Ключевые слова:** полиморфно-ядерные лейкоциты, фагоцитарная активность, прайминг, хемилюминесценция, синдром диабетической стопы, гипергликемия.

## STUDYING THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF POLYMORPHONUCLEAR BLOOD LEUKOCYTES IN PATIENTS WITH PURULENT IN FLAMMATORY COPLICATIONS IN TYPE II DIABETES MELLITUS

Usanova E.A.<sup>1</sup>, Chaushova S.V.<sup>1</sup>, Gurevich K.G.<sup>2</sup>, Arutyunova E.E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of General Pathology of Medical-Biological Faculty of N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow; <sup>2</sup> Department "Healthy lifestyle – the key to successful development" of A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow

In the article we present the results of estimating the phagocytic activity and priming effect in the polymorphonuclear leukocytes of blood under the effect of *Streptococcus pyogenes* complex antigen in patients having acute purulent inflammatory diseases of skin and soft tissues against the background of type 2 diabetes (with diabetic foot syndrome) and without it. The examination of patient's blood was performed by the method of barium sulfate-stimulated luminol-amplified chemiluminescence. On the basis of the obtained results it has been found out that the patients with diabetic foot syndrome had the reduction in phagocytic activity and priming effect of polymorphonuclear leukocytes as compared to the patients with no carbohydrate metabolism disorders. The significant negative correlation between phagocytic activity, priming effect in the polymorphonuclear leukocytes and blood hyperglycemia in diabetic foot syndrome was detected.

**Keywords:** polymorphonuclear leukocytes, phagocytic activity, priming, chemiluminescence, diabetic foot syndrome, hyperglycemia.

Проблема сахарного диабета (СД) в настоящее время является весьма актуальной для здравоохранения РФ, поскольку во всем мире отмечается тенденция к увеличению частоты его возникновения, а также наблюдается частая инвалидизация пациентов трудоспособного возраста в связи с прогрессированием основных осложнений СД. Одним из наиболее тяжелых осложнений СД является поражение сосудов и нервов нижних конечностей с развитием синдрома диабетической стопы (СДС) с последующим присоединением гнойно-воспалительных осложнений. Общеизвестно, что на возникновение такого рода осложнений влияет много патогенетических факторов, в том числе и состояние фагоцитарного звена иммунитета. Показано, что при СД наблюдаются из-

менения функциональной активности полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПМЛ), проявляющиеся в снижении хемотаксической активности, изменении фагоцитарной активности, продукции лейкотриенов, секреции лизосомальных ферментов, а также изменении базального уровня внутриклеточного кальция [9; 10; 12; 14]. Вместе с тем в литературе обсуждается влияние сопутствующей СД гипергликемии и кетоацидоза на функциональную активность ПМЛ. Так, зарубежными авторами показано, что при СД на фоне высокой гипергликемии происходит угнетение фагоцитарной активности ПМЛ [8]. Однако другими исследователями установлено, что при СДС выявляется активация фагоцитарной функции ПМЛ, но при этом происходит угнетение реакции ПМЛ на

дополнительную стимуляцию латексом (по результатам НСТ-теста), снижение экспрессии молекул адгезии на их поверхности и способности формировать внеклеточные ловушки [3; 5]. Очевидно, что ПМЛ, являясь основными клетками врожденного иммунитета и имея какой-либо структурно-метаболический дефект, при СД способны участвовать в патогенезе его осложнений. Установлено, что ПМЛ играют важную роль в развитии диабетических ангиопатий, ретинопатий, а также диабетической нефропатии [1, 11, 13, 14]. Между тем данные об участии ПМЛ в развитии СДС и их роли в присоединении гнойно-воспалительных осложнений неоднозначны. Важно заметить, что при возникновении гнойно-воспалительного процесса в макроорганизме ПМЛ подвергаются предстимуляции (праймингу) еще в общем кровотоке под действием находящихся там различных факторов. Далее, мигрируя в очаг воспаления, они выполняют все свои эффекторные функции. От того как реализуются данные функции ПМЛ зависит течение и исход гнойно-воспалительного процесса. Следовательно, изучение праймирующей способности ПМЛ *in vitro* может уточнить роль ПМЛ в развитии гнойно-воспалительных осложнений при СДС.

Цель исследования: оценить фагоцитарную активность ПМЛ периферической крови и их праймирующую способность при воздействии *Streptococcus pyogenes* у пациентов с гнойно-воспалительными осложнениями при СДС.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании принимали участие 54 человека (таблица 1). Все участники были разделены на три группы. 1-я группа являлась контрольной и состояла из 11 практически здоровых лиц в возрасте от 19 до 23 лет.

2-я группа включала 27 пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями кожных покровов и мягких тканей и состояла из пациентов с ограниченным гнойно-воспалительным процессом в виде абсцессов, карбункулов и фурункулов, а также пациентов с разлитым гнойно-воспалительным процессом в виде флегмон, инфицированных ран кожи и мягких тканей. В 3-ю группу вошли пациенты с СДС. Критерии включения в данную группу – сахарный диабет II типа в анамнезе, наличие СДС, высеивание *Streptococcus pyogenes* в гнойном отделяемом при микробиологическом исследовании. Критерий исключения – наличие других эндокринных, хронических воспалительных (ЛОР-органов, дыхательных путей, мочеполовых путей, ЖКТ) и онкологических заболеваний. Клинические формы СДС представлены в таблице 2.

Отмечалось преобладание нейроишемических (смешенных) форм СДС. Практически все пациенты имели тяжелую форму течения сахарного диабета (81,25%). Распределение пациентов по характеру гнойно-воспалительных осложнений представлено на рисунке 1.

Таблица 1

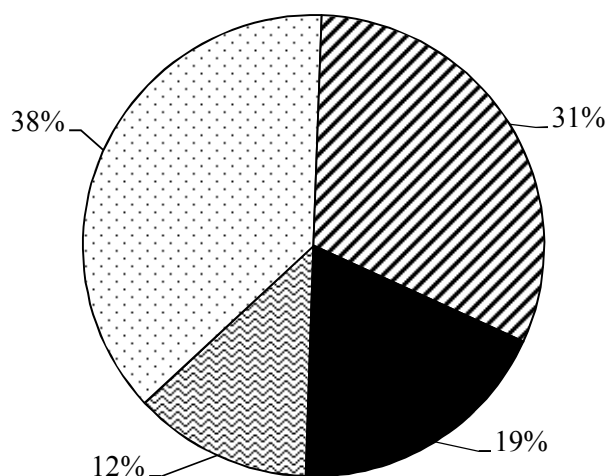
Общая характеристика лиц, включенных в исследование

Параметр характеристики \ Группа	Здоровые доноры (группа 1)	Гнойно-воспалительные заболевания мягких тканей (группа 2)		Синдром диабетической стопы (группа 3)
		абсцессы	флегмоны	
Количество человек (n)	11	27		16
Средний возраст, годы	19,90±0,56	10	17	57,75±2,68
		35,50±5,4	43,80±4,6	
Пол, м/ж	7/4	21/6		7/9
		5/5	16/1	
Длительность СД, годы	-	-		12,90±1,52
Концентрация глюкозы в крови, ммоль/л	4,60-5,41	4,50-5,60		7,00-15,00

Таблица 2

Распределение пациентов 3 группы по формам синдрома диабетической стопы

Форма синдрома диабетической стопы	n	%
Нейроишемическая (смешенная)	13	81,25%
Нейропатическая	3	18,75%
Ишемическая	0	0%



■ Абсцесс бедра, голени    ▨ Флегмона стопы    ▤ Влажная гангрена стопы    ■ Смешанные формы

Рис. 1. Распределение пациентов 3-й группы по характеру гнойно-воспалительных осложнений при синдроме диабетической стопы.

Обследование пациентов проводили по заданному алгоритму:

1. При поступлении пациента в стационар проводили сбор и анализ общего и диабетического анамнеза. Выбирали пациентов по критериям включения и исключения из исследования.

2. На основании информированного согласия пациента на 1-3-е сутки после поступления в стационар осуществляли забор крови и проводили определение фагоцитарной активности и праймирующей способности ПМЛ крови с помощью хемилюминесцентного анализа.

3. По материалам медицинских карт пациентов собирались данные микробиологического исследования биоматериала ран при проведении оперативного лечения на предмет наличия *Streptococcus pyogenes* в гнойном отделяемом.

Для определения фагоцитарной активности ПМЛ крови проводили измерение интенсивности стимулированной сульфатом бария люминол-зависимой хемилюминесценции (Л-ХЛ) образцов гепаринизированной венозной крови на биохемилюминесцентном анализаторе БЛМ 3606 – 01 (СКТБ «Наука» КНЦ СО РАН, Россия). С помощью прилагаемого пакета компьютерных программ BLM - Obrab определяли основные параметры хемилюминесценции: интенсивность максимальной хемилюминесценции (I<sub>хл</sub> max); время достижения максимальной вспышки хемилюминесценции (T<sub>max</sub>).

Для определения праймирующей способности ПМЛ при воздействии *Streptococcus pyogenes* образцы гепаринизированной венозной крови ( $1 \times 10^6$  ПМЛ в пробе) предварительно инкубировали в термостате с различными концентрациями комплексного антигена в течение 60 минут при 37°C ( $5 \times 10^4$ - $1000 \times 10^4$  микробных клеток/мл в пробе). Далее регистрировали

Л-ХЛ и определяли ее основные параметры. Препарат комплексного антигена *Streptococcus pyogenes* для хемилюминесцентного анализа получали методом, описанным нами в ранее проведенных работах [6; 7]. Для выявления праймирующей способности ПМЛ при воздействии комплексного антигена *Streptococcus pyogenes* определяли дополнительные параметры ХЛ: интенсивность спонтанной хемилюминесценции (I<sub>хл</sub> спонт); интенсивность стимулированной хемилюминесценции (I<sub>хл</sub> стим = I<sub>хл</sub> max – I<sub>хл</sub> спонт). Вычисляли индекс прайминга (ИП), равный отношению интенсивности стимулированной Л-ХЛ опытной пробы (с комплексным антигеном *Streptococcus pyogenes*) к интенсивности стимулированной Л-ХЛ контрольной пробы (с физиологическим раствором). О наличии праймирующей способности у ПМЛ крови свидетельствовали значения ИП, превышающие 1,0. Полученные данные обрабатывались с использованием общепринятых статистических методов при помощи пакета статистических компьютерных программ «Statistica 7.0» (StatSoft, USA) и приложения Microsoft Word Exel 2016. При обработке результатов использовались параметрические методы статистики. Для проверки полученных данных на соответствие нормальному закону распределения использовался критерий Колмогорова-Смирнова. Достоверность результатов определяли с помощью критерия Стьюдента. Все результаты выражались в виде среднего арифметического и ошибки среднего ( $M \pm m$ ) и считались достоверно значимыми при  $p < 0,05$ . Для оценки связи между интересующими параметрами определяли коэффициент корреляции Пирсона ( $r$ ) и оценивали его достоверность.

Анализ параметров Л-ХЛ, характеризующих фагоцитарную активность ПМЛ крови и неспецифическую опсонизирующую активность плазмы крови в исследуемых группах лиц

Параметр Л-ХЛ, единицы измерения	Здоровые доноры (группа 1)	Гнойно-воспалительные заболевания мягких тканей (группа 2)	Синдром диабетической стопы (группа 3)
I хл max, имс/сек	282,3±43,8	893,5±20,6*	573,5±76,2*#
T max, сек	2499,0±12,7	2203,0±11,2*	2964,0±16,0*#

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой 1; # –  $p < 0,05$  по сравнению с группой 2.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что для завершенности процесса фагоцитоза ПМЛ крови необходимо выполнение определенных условий, в частности, чтобы бактериальные агенты, вызывающие гнойно-воспалительные процессы были опсонизированы плазменными факторами крови для возможности их поглощения, а также происходила полноценная генерация активных форм кислорода ПМЛ для осуществления бактерицидных функций. Хемилюминесцентный анализ может наиболее точно отражать данное функциональное состояние ПМЛ при гнойно-воспалительных процессах. Так показано, что такой параметр Л-ХЛ как I хл max прямо пропорционален количеству генерированных активных форм кислорода ПМЛ и отражает его фагоцитарную активность, а параметр Л-ХЛ T max характеризует опсонизирующую активность плазмы крови, что дает возможность оценивать гуморально-клеточные взаимодействия при фагоцитозе [2; 4].

При изучении параметров Л-ХЛ ПМЛ крови у лиц, включенных в исследование, нами было выявлено, что во всех группах пациентов (2-я и 3-я группа) наблюдается достоверное увеличение фагоцитарной активности ПМЛ крови по сравнению с контрольной группой (таблица 3).

Однако в группе с СДС данное увеличение было выражено в меньшей степени. При проведении корреляционного анализа между фагоцитарной активностью ПМЛ и концентрацией глюкозы в крови пациентов данной группы была выявлена тесная отрицательная взаимосвязь данных параметров ( $r = -0,7802$ ;  $p < 0,05$ ). Таким образом, можно отметить, что фагоцитарная активность при СДС достоверно снижена по сравнению с пациентами, имеющими нормальный углеводный обмен, и зависит от уровня гипергликемии у пациента. Данные факты свидетельствуют о том, что активация фагоцитарного звена иммунитета при гнойно-воспалительных осложнениях СДС происходит не в полной мере, имеется нарушение функциональной активности ПМЛ.

Также из таблицы 3 видно, что при СДС наблюдается увеличение параметра T max при воздействии неспецифическим стимулом, по сравнению с 1-й и 2-й группой, что свидетельствует о наличии дефектов в процессах опсонизации микроорганизма при фагоцитозе. Между тем при проведении корреляционного анализа между неспецифической опсонизирующей активностью плазмы крови при СДС и концентрацией глюкозы в крови пациентов данной группы тесной взаимосвязи между данными параметрами отмечено не было ( $r = -0,4706$ ;  $p < 0,05$ ).

При изучении праймирующей способности ПМЛ крови при воздействии комплексного антигена *Streptococcus pyogenes* было выявлено, что данный антигенный препарат дозозависимо влияет на ИП во всех исследуемых группах лиц (рисунок 2).

При воздействии высокими концентрациями комплексного антигена ( $1000 \times 10^4$  микробных клеток/мл) во всех группах наблюдается подавление эффекта прайминга у ПМЛ, на средних и низких концентрациях – ИП  $> 1,0$ ;  $p < 0,05$ , причем в разных исследуемых группах эффект прайминга фиксируется на разном диапазоне концентраций. В контрольной группе праймирующими концентрациями являлись: 5 и  $10 \times 10^4$  микробных клеток/мл. Во 2-й и 3-й группах эффект прайминга отмечался, начиная с концентрации  $500 \times 10^4$  микробных клеток/мл. Данный факт также подтверждает, что при остром гнойно-воспалительном процессе *in vivo* ПМЛ праймируются еще в общем кровотоке и находятся в состоянии повышенной функциональной готовности по отношению к бактериальному агенту, вызывающему данный процесс. Между тем у пациентов с СДС этот эффект выражен слабее, по сравнению с пациентами 2-й группы, имеющими аналогичные распространенные гнойно-воспалительные процессы на фоне нормального углеводного обмена. Для подтверждения был проведен корреляционный анализ между ИП и концентрацией глюкозы в крови у пациентов 3-й группы, выявлена значительная отрицательная взаимосвязь данных параметров ( $r = -0,7826$ ;  $p < 0,05$ ).

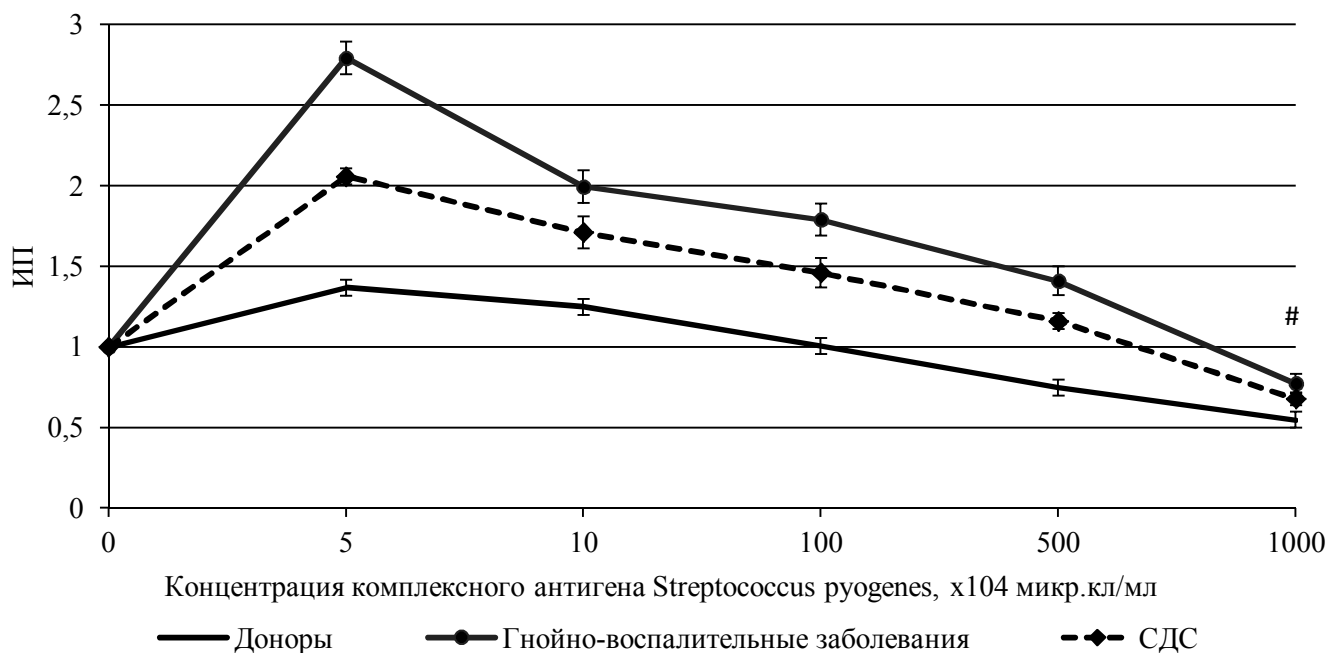


Рис. 2. Влияние комплексного антигена *Streptococcus pyogenes* на индекс прайминга у полиморфно-ядерных лейкоцитов крови в исследуемых группах лиц.

Примечание: # –  $p > 0,05$  при сравнении данной точки кривой в 3-й группе больных с аналогичной точкой во 2-й группе больных.

При исследовании параметра Тмах при воздействии праймирующей у доноров концентрации комплексного антигена  $10 \times 10^4$  микробных клеток/мл отмечалось достоверное увеличение данного параметра по сравнению с 1-й и 2-й группами, что говорило об изменении опсонизирующей активности плазмы крови в ответ на специфический стимул (*Streptococcus pyogenes*), а при определении корреляции отмечалась положительная взаимосвязь Тмах с уровнем гипергликемии у 3-й группы ( $r=0,5949$ ;  $p < 0,05$ ). Таким образом, можно заключить, что при СДС происходит нарушение опсонизации *Streptococcus pyogenes*, которое напрямую зависит от уровня гипергликемии. Выявленное нарушение может способствовать неполноценному фагоцитозу микроорганизма и более тяжелому и затяжному течению гнойно-воспалительного процесса при СДС.

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. При гнойно-воспалительных осложнениях СДС наблюдается снижение фагоцитарной активности ПМЛ крови, причем выявленному функциональному нарушению способствует гипергликемия.

2. Функциональная готовность ПМЛ крови по отношению к бактериальному агенту, вызывающему гнойно-воспалительные осложнения у пациентов с СДС, снижена по сравнению с пациентами, имеющими нормальный углеводный обмен.

3. У пациентов с гнойно-воспалительными осложнениями СДС выявлены нарушения гуморально-клеточного взаимодействия при фагоцитозе, проявляющиеся в снижении неспецифической опсонизирующей активности плазмы крови и наличии опсонин-фагоцитарных дефектов в отношении бактерии *Streptococcus pyogenes*, которые также коррелируют с уровнем гипергликемии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М.И., Клебанова Е.А., Креминская В.М. Патогенез ангиопатий при сахарном диабете // Сахарный диабет. – 1999. – № 1. – С. 2-8.
2. Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П. Хемилюминесценция клеток // Итоги науки и техники. Серия Биофизика / под ред. М.Н. Мерзляка – М.: ВИНТИ, 1989. – Т. 24. – 176 с.
3. Долгушин И.И., Тарабрина Ю.О., Колесников О.Л., Колесникова А.А. Функциональное состояние клеток врожденного иммунитета у пациентов с синдромом диабетической стопы [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://articlekz.com/article/12027>, свободный (02.05.2017)
4. Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. Клеточные механизмы прайминга и активации фагоцитов // Успехи соврем. биологии. – 1999. – Т. 119, № 5. – С. 462-475.
5. Тарабрина Ю.О., Колесников О.Л., Колесникова А.А. О влиянии показателей обмена веществ на функциональную активность нейтрофилов у больных сахарным диабетом 2 типа // Вестник уральск. мед. акад. науки. – 2012. – № 4 (41). – С. 165.

6. Усанова Е.А., Чаусова С.В., Филатов О.Ю., Балякин Ю.В. Особенности кислородозависимого метаболизма и эффект прайминга полиморфно-ядерных лейкоцитов крови при воздействии комплексными препаратами антигенов *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* // Сист. анализ и управл. в биомед. системах. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 461-467.
7. Усанова Е.А., Чаусова С.В., Арутюнова Е.Э., Балякин Ю.В., Гуревич К.Г. Изменение фагоцитарной активности и эффект прайминга полиморфно-ядерных лейкоцитов крови при синдроме диабетической стопы // Курск. науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». – 2015. – № 2. – С. 49-52.
8. *Alba-Loureiro T.C., Munhoz C.D., Martins J.O., Cerchiaro G.A., Scavone C., Curi R., Sannomiya P.* Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus // *Braz J Med Biol Res.* – 2007. – Vol. 40, N 8. – P. 1037-1044 / – doi: 10.1590/S0100-879X2006005000143.
9. *Alexiewicz J.M., Kumar D., Smogorzewski M., Klin M., Massry S.G.* Polymorphonuclear leukocytes in non-insulin-dependent diabetes mellitus: abnormalities in metabolism and function // *Ann. Intern. Med.* – 1995. – Vol. 123, N 12. – P. 919-924.
10. *Delamaille M., Maugendre D., Moreno M., Le Goff M.C., Allannic H.* Impaired leukocyte functions in diabetic patients // *Diabet. Med.* – 1997. – Vol. 14, N 1. – P. 29-34.
11. *Hayasaka S., Zhang X., Cui H., Yanagisawa S., Chi Z., Hayasaka Y.* Chemokines and Sho (Zheng in Chinese) of Chinese-Korean-Japanese medicine in patients with diabetic vitreoretinopathy // *Am. J. Clin. Med.* – 2006. – Vol. 34, N 04. – P. 537-543.
12. *Kannan Y., Tokunaga M., Moriyama M., Kinoshita H., Nakamura Y.* Diabetic neutrophil dysfunction and troglitazone // *Clin. Exp. Immunol.* – 2004. – Vol. 137, N 2. – P. 263-271.
13. *Morii T., Fujita H., Narita T., Shimotomai T., Fujishima H., Yoshioka N., Imai H., Kakei M., Ito S.* Association of monocyte chemoattractant protein-1 with renal tubular damage in diabetic nephropathy // *J. Diabetes Complications.* – 2003. – Vol. 17, N 1. – P. 11-15.
14. *Tong P.C., Lee K.F., So W.Y., Ng M.H., Chan W.B., Lo M.K., Chan N.N., Chan J.C.* White blood cell count is associated with macro- and microvascular complications in Chinese patients with type 2 diabetes // *Diabetes Care.* – 2004. – Vol. 27, N 1. – P. 216-222.