

УДК 616-092.4

ИЗМЕНЕНИЕ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ И ЭФФЕКТ ПРАЙМИНГА ПОЛИМОРФНОЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПРИ СИНДРОМЕ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ

© Усанова Е.А.¹, Чаусова С.В.¹, Арутюнова Е.Э.¹, Балякин Ю.В.¹, Гуревич К.Г.²

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

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

E-mail: usanova.alena@bk.ru

В статье оценивали фагоцитарную активность и эффект прайминга полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЛ) крови при воздействии комплексного антигена *Staphylococcus aureus* у больных с острыми гнойно-воспалительными заболеваниями кожных покровов и мягких тканей на фоне сахарного диабета II типа (с синдромом диабетической стопы) и без него. Исследование ПМЛ крови больных осуществлялось с помощью метода стимулированной сульфатом бария люминолзависимой хемилюминесценции. Было выявлено, что при синдроме диабетической стопы наблюдается снижение фагоцитарной активности и ослабление эффекта прайминга ПМЛ крови по сравнению с больными, не имеющими нарушения углеводного обмена.

Ключевые слова: полиморфноядерные лейкоциты, фагоцитарная активность, прайминг, хемилюминесценция, синдром диабетической стопы.

CHANGE IN PHAGOCYTAL ACTIVITY AND PRIMING EFFECT OF POLYMORPHONUCLEAR BLOOD LEUKOCYTES IN PATIENTS WITH DIABETIC FOOT SYNDROME

Usanova E.A.¹, Chaushova S.V.¹, Arutyunova E.E.¹, Balyakin Yu.V.¹, Gurevich K.G.²

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

The article analyses the phagocytic activity and priming effect in polymorphonuclear leukocytes of blood influenced by the complex antigen *Staphylococcus aureus* in patients with acute pyoinflammatory skin and soft tissues disorders with or without type 2 diabetes (with diabetic foot syndrome). The examination of patients' blood was performed by the method of barium sulfate stimulated luminol-dependent chemiluminescence. On the basis of the obtained results it has been found out that in diabetic foot syndrome the lowering of phagocytic activity and priming effect of polymorphonuclear leukocytes are observed as compared to patients without carbohydrate metabolism disorder.

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

Актуальность исследования фагоцитарной активности полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЛ) крови больных с синдромом диабетической стопы обусловлена в первую очередь тем, что патогенез гнойно-воспалительных заболеваний может определяться нарушениями биохимических регуляций в организме, в частности состоянием углеводного обмена. В настоящее время известно, что наличие у больного сахарного диабета сильно осложняет течение гнойно-воспалительного процесса. По некоторым данным, гипергликемия, наблюдаемая при сахарном диабете, неблагоприятно влияет на функциональную активность ПМЛ крови, в том числе и на их фагоцитарную активность [1, 4, 5]. Вторым важным обстоятельством является то, что ПМЛ играют первостепенную роль в патогенезе гнойного воспаления в качестве клеток-эффекторов. Они осуществляют свою функцию за счет изменения окислительного метаболизма, которое проявляется в резком усилении потребле-

ния кислорода, активации окислительных процессов и секреции активных форм кислорода (АФК). Регистрация данной секреции АФК ПМЛ посредством хемилюминесцентного анализа может характеризовать фагоцитарную активность этих клеток при гнойно-воспалительных заболеваниях. Явление прайминга, или предстимуляции, является одним из возможных способов регуляции окислительного метаболизма ПМЛ. В настоящее время известно много праймирующих факторов, изменяющих фагоцитарную активность данных клеток крови как *in vivo*, так и *in vitro*. К ним относят различные химические, физические факторы, бактерии и их антигены, различные эндогенные биологически активные вещества, выделяемые клетками организма, а также различные биохимические сдвиги в системе гомеостаза [2, 3, 6, 9, 10]. Необходимо отметить, что при возникновении гнойно-воспалительного процесса в макроорганизме ПМЛ подвергаются праймингу еще в

системном кровотоке под действием находящихся там праймирующих факторов. Затем, мигрируя в очаг гнойного воспаления, там они реализуют все свои эффекторные функции, в том числе и секрецию АФК. От того, как будут реализованы эти функции ПМЛ, зависит исход гнойно-воспалительного процесса. Таким образом, изучение праймирующей способности ПМЛ, проявляющейся изменением секреции АФК *in vitro* имеет патофизиологическое значение *in vivo*. Вместе с тем известно, что *Staphylococcus aureus* – наиболее частый возбудитель гнойных инфекций кожи и мягких тканей; данный микроорганизм может осложнять течение многих воспалительных заболеваний, возбудителем которых не является, а также приводить к генерализации воспалительного процесса вплоть до развития сепсиса. По данным литературы, 30% больных сахарным диабетом II типа являются носителями золотистого стафилококка, а при исследовании микрофлоры ран у больных с синдромом диабетической стопы в основном преобладает *Staphylococcus aureus* и *E. coli* [1, 7].

В свете всего вышесказанного, целью настоящего исследования стало выявление праймирующего эффекта комплексного антигена *Staphylococcus aureus* у ПМЛ крови больных с острыми гнойно-воспалительными заболеваниями на фоне сахарного диабета II типа (с синдромом диабетической стопы) и без него.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовались 3 группы больных и группа здоровых доноров. 1-я группа больных – 15 пациентов с острыми гнойно-воспалительными заболеваниями в виде абсцессов кожных покровов и мягких тканей; 2-я группа – 10 пациентов с флегмонами кожных покровов и мягких тканей; 3-я группа – 12 пациентов с синдромом диабетической стопы (гипергликемия 8-11,2 ммоль/л; нейроишемическая форма; среднее и тяжелое течение, степень поражения стопы от II до V степени; длительность заболевания от 5 до 22 лет). Для всех трех групп больных было выявлено наличие *Staphylococcus aureus* в гнойном отделяемом при

микробиологическом исследовании. Группа сравнения состояла из 10 практически здоровых доноров (таблица 1).

Взятие крови осуществлялось на основании информированного согласия после поступления больных в стационар и до проведения им назначенного лечения. Препарат комплексного антигена *Staphylococcus aureus* получали путем приготовления бактериальных комплексов на целлофановом диске по методу В.Н. Федосеевой, В.А. Камышевой [8]. Полученная маточная суспензия представляла собой комплексный антигенный препарат, содержащий 10^9 микробных клеток на 1 мл суспензии, фрагменты бактериальных стенок, продукты жизнедеятельности бактерий, антигены, ферменты и токсины данного вида микроорганизма. Образцы разведенной крови (1×10^6 ПМЛ в пробе) предварительно инкубировали в термостате с различными концентрациями комплексного антигена в течение 60 минут при 37°C (5×10^4 - 1000×10^4 микробных клеток/мл в пробе). После чего производили измерение интенсивности стимулированной сульфатом бария люминол-зависимой хемилюминесценции (Л-ХЛ) на биохемилюминесцентном анализаторе БЛМ 3606 - 01 (СКТБ «Наука» КНЦ СО РАН, Россия). С помощью компьютерной программы BLM-Obgrab определяли следующие параметры хемилюминесценции: интенсивность спонтанной хемилюминесценции (*I хл спонт*); интенсивность максимальной хемилюминесценции (*I хл макс*); время достижения максимальной вспышки хемилюминесценции (*T макс*); интенсивность стимулированной хемилюминесценции (*I хл стим* = *I хл макс* – *I хл спонт*). Уровень секреции АФК ПМЛ крови, отражающий их фагоцитарную активность оценивали по *I хл макс*, которая прямо пропорциональной светосумме Л-ХЛ. Для выявления эффекта прайминга вычисляли другой показатель – индекс прайминга (*ИП*), равный отношению интенсивности стимулированной Л-ХЛ опытной пробы (праймированной комплексным антигеном *Staphylococcus aureus*) к интенсивности стимулированной Л-ХЛ контрольной пробы. О наличии эффекта прайминга у ПМЛ крови свидетельствовали значения показателя, превышающие 1,0.

Таблица 1

Общая характеристика людей, включенных в исследование

Количество человек, (n)			
Здоровые доноры	1-я группа (Абсцессы)	2-я группа (Флегмоны)	3-я группа (Синдром диабетической стопы)
10	15	10	12
Пол, М/Ж			
6/4	9/6	9/1	6/6
Возраст, года, (М±m)			
19,9 ± 0,6	37,9 ± 3,9	43,6 ± 4,6	60,4 ± 1,9

Таблица 2

Влияние комплексного антигена *Staphylococcus aureus* на уровень секреции активных форм кислорода полиморфноядерными лейкоцитами крови, оцениваемый по интенсивности максимальной люминолзависимой хемилюминесценции в исследуемых группах людей, ($M \pm m$)

Концентрация комплексного антигена, микробных клеток/мл, $\times 10^4$	Интенсивность максимальной Л-ХЛ, отн. ед.			
	Здоровые доноры	1 группа (Абсцессы)	2 группа (Флегмоны)	3 группа (Синдром диабетической стопы)
5	$1,75 \pm 0,05$	$1,85 \pm 0,05$	$2,31 \pm 0,06$	$2,09 \pm 0,04$
10	$0,98 \pm 0,07^*$	$1,53 \pm 0,07$	$1,84 \pm 0,05$	$1,81 \pm 0,05$
100	$0,97 \pm 0,08^*$	$1,31 \pm 0,06$	$1,99 \pm 0,07$	$1,78 \pm 0,07$
500	$0,70 \pm 0,07$	$1,42 \pm 0,04$	$1,95 \pm 0,04$	$1,70 \pm 0,04$
1000	$0,68 \pm 0,05$	$1,30 \pm 0,05$	$1,98 \pm 0,02$	$1,42 \pm 0,05$

Примечание: * – $p > 0,05$ относительно контроля.

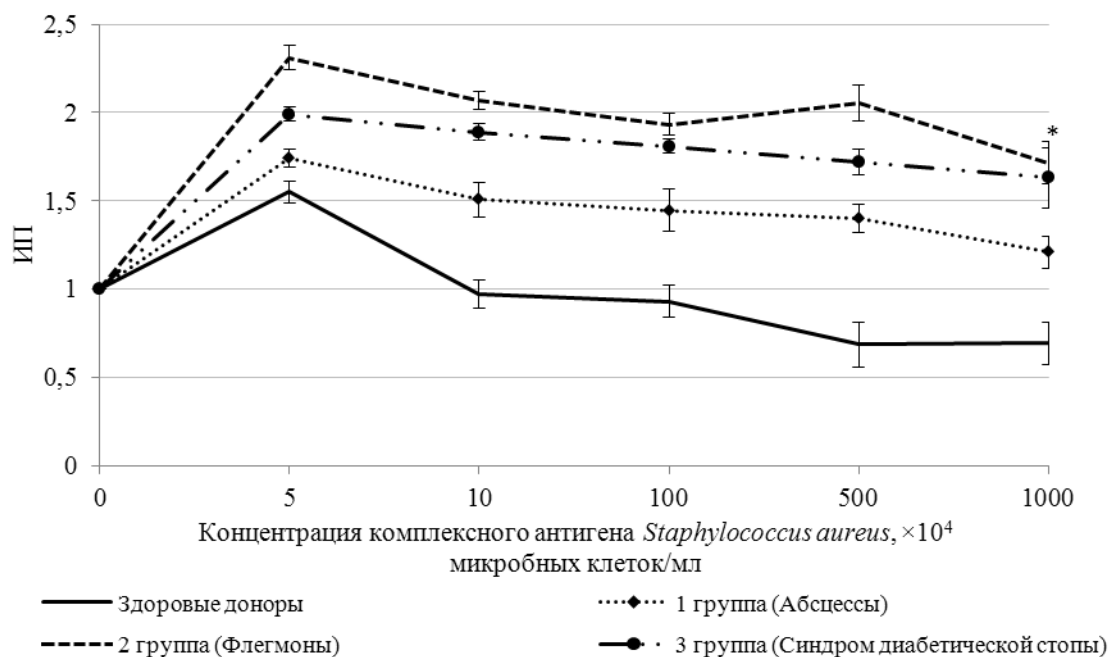


Рис. 1. Влияние комплексного антигена *Staphylococcus aureus* на индекс прайминга у ПМЛ крови в исследуемых группах людей (примечание: * – $p > 0,05$ при сравнении данной точки кривой в 3-й группе больных с аналогичной точкой во 2-й группе больных).

Полученные данные обрабатывались с использованием общепринятых статистических методов при помощи статистических компьютерных программ «Statistica» (версия 7.0.) и приложения Microsoft Word Exel 2010. 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 и ошибки среднего ($M \pm m$) и считались достоверно значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате полученных нами данных было выявлено, что во всех группах обследованных нами людей комплексный антиген *Staphylococcus aureus* дозозависимо изменяет способность ПМЛ крови секретировать АФК, ответственные за хемилюминесцентный ответ клеток (таблица 2).

В диапазоне используемых концентраций в контрольной группе здоровых доноров увеличение секреции АФК происходит при использовании малых концентраций комплексного антигена, а эффект прайминга у ПМЛ крови наблюдается только на концентрации 5×10^4 микробных клеток/мл, поскольку значение ИП достоверно превышает значение 1,0 (рис. 1).

Между тем во всех 3 группах больных наблюдается увеличение секреции АФК, а также наличие эффекта прайминга на всем диапазоне концентраций комплексного антигена *Staphylococcus aureus* по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$). В то же время у больных с синдромом диабетической стопы уровень секреции АФК ниже, чем у больных 2-й группы с флегмонами, что говорит о снижении фагоцитарной активности ПМЛ у больных с сахарным диабетом II типа.

Таким образом, при воздействии комплексного антигена *Staphylococcus aureus* на ПМЛ крови у всех больных выявляется эффект прайминга по сравнению со здоровыми донорами, что свидетельствует об активации фагоцитарного иммунитета при остром гнойно-воспалительном процессе. Однако у больных с синдромом диабетической стопы этот эффект выражен слабее по сравнению с больными, имеющими аналогичные распространенные гнойно-воспалительные процессы на фоне нормального углеводного обмена. Данный факт свидетельствует о том, что нарушения углеводного обмена, характерные для сахарного диабета II типа, могут оказывать подавляющее влияние на фагоцитарную активность ПМЛ крови и влиять на механизмы прайминга лейкоцитарных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бирюкова Е.В., Гуров А.В., Юшкина М.А. Сахарный диабет и гнойно-воспалительные заболевания ЛОР-органов // Сахарный диабет. – 2012. – № 2. – С. 54-59.
2. Горудко И.В., Вахрушева Т.В., Мухортова А.В., Черенкевич С.Н., Тимошенко А.В., Сергеев В.И., Панасенко О.М. Праймирующее влияние галогенированных фосфолипидов на функциональные ответы нейтрофилов человека // Биол. мембраны: журнал мембранной и клеточной биологии. – 2010. – Т. 27, № 4. – С. 314-324.
3. Долгина Е.Н., Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Клебанов О.Г., Никанкина Л.В. Модуляция кислородного метаболизма фагоцитов рекомбинантными цитокинами и комплексом природных цитокинов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1999. – № 5. – С. 106-108.
4. Долгушин И.И., Тарабрина Ю.О., Колесникова О.Л., Колесникова А.А. Анализ экспрессии молекул адгезии на нейтрофилах больных сахарным диабетом 2 типа // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5. – С. 534-541.
5. Зеньков А.А. Особенности клеточного иммунитета у больных с синдромом диабетической стопы // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2004. – № 2. – С. 59-62.
6. Нестерова И.В., Швыдченко И.Н. Влияние миелопептидов на функционирование нейтрофильных гранулоцитов // Аллергол. и иммунол. – 2005. – Т. 6, № 1. – С. 70-80.
7. Николаева К.В., Хитрихеев В.Е., Сиденов О.И., Семенов А.С., Дорджиев Ю.Д. Опыт лечения гнойно-некротизированных заболеваний стоп у больных сахарным диабетом в условиях гнойно-хирургического отделения. // Бюлл. Восточно-Сибирского НЦ СО РАМН. – 2008. – № 3. – С. 121-122.
8. Способ получения бактериальных аллергенов: пат. 2183970 Рос. Федерация: МПК 7 А61К39/35, А61К39/02 / Федосеева В.Н., Камышева В.А.; заявитель и патентообладатель ООО «Медалл» – № 2001102725; заявл. 31.01.2001; опубл. 27.06.2002, [Электронный ресурс] // Поиск патентов и изобретений, зарегистрированных в РФ и СССР. [Офиц.сайт]. URL: <http://www.findpatent.ru/patent/218/2183970.html> (дата обращения 14.02.2015).
9. Усанова Е.А., Чаусова С.В., Филатов О.Ю., Крассук О.В., Ефимов Б.А., Балякин Ю.В. Влияние комплексных бактериальных препаратов на оксидантные функции полиморфноядерных лейкоцитов крови доноров // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2012. – № 5. – С. 71-75.
10. Усанова Е.А., Чаусова С.В., Филатов О.Ю., Балякин Ю.В. Особенности кислородозависимого метаболизма и эффект прайминга полиморфноядерных лейкоцитов крови при воздействии комплексными препаратами антигенов *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 461-467.