

УДК [616.379–008.64–06:617.58]–097

И.И.Долгушин, Ю.О.Тарабрина, О.Л.Колесников, А.А.Колесникова

*Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия
(E-mail: olekol08@rambler.ru)*

Функциональное состояние клеток врожденного иммунитета у пациентов с синдромом диабетической стопы

В статье приведены данные обследования 14 пациентов, страдающих сахарным диабетом 2 типа с синдромом диабетической стопы, и 22 человека из группы сравнения. Отмечено, что у больных с синдромом диабетической стопы в 9,1 раза снижено процентное содержание нейтрофилов, способных формировать внеклеточные ловушки в цельной крови, и на 9,6 % уменьшено количество моноцитов, формирующих внеклеточные ловушки. Показано также, что при наличии синдрома диабетической стопы у моноцитов снижена способность к выработке активных форм кислорода (по результатам НСТ-теста), при сохраненной функции поглощения чужеродных объектов. Определено, что нейтрофилы больных с синдромом диабетической стопы демонстрировали активацию фагоцитоза (фагоцитарное число увеличивалось на 40,8 %), но обладали уменьшенной выраженностью реакции на внешние стимулы. Таким образом, авторами установлено, что синдром диабетической стопы определяет развитие дисбаланса в системе врожденного иммунитета.

Ключевые слова: сахарный диабет, иммунная система, нейтрофилы, моноциты, гликемия, уровень глюкозы, активные формы кислорода, гемоглобин, диабетическая стопа, фагоцитоз, ДНК.

Сахарный диабет в настоящее время представляет собой одну из самых актуальных проблем медицины. Это связано, в первую очередь, с широким распространением этой патологии. В последние 30 лет заболеваемость сахарным диабетом неуклонно повышается. Количество больных сахарным диабетом удваивается каждые 10–15 лет. В 2000 г. во всем мире страдало сахарным диабетом около 171 млн человек, в 2006 г. — 246 млн. По прогнозу на 2030 г. число больных этим заболеванием составит примерно 366 млн. При этом более 80 % случаев составляет сахарный диабет типа 2. Обращает на себя внимание тот факт, что прирост наиболее выражен среди лиц старше 65 лет. Это, скорее всего, связано с широкой распространенностью и преобладанием сахарного диабета 2 типа [1]. По оценке ВОЗ число больных сахарным диабетом в 2011 г. составило в Российской Федерации 3,357 млн человек [2]. При сахарном диабете страдают все виды обмена веществ, нарушаются функции не только эндокринной, но и сердечно-сосудистой и нервной систем. При недостаточном контроле уровня сахара в крови формируются различные осложнения, что является причиной развития инвалидности и часто приводит к ранней смерти пациентов.

Сахарный диабет неблагоприятно воздействует и на иммунную систему. Отмечается нарушение функций нейтрофилов, связанное, по мнению авторов, с плохим контролем гликемии [3]. При инкубации нейтрофилов в среде с высоким уровнем глюкозы уменьшалась способность к формированию активных форм кислорода [4]. У больных сахарным диабетом с тяжелыми осложнениями возрастала способность моноцитов реагировать выработкой активных форм кислорода на действие чужеродных агентов, что отразилось в статистически значимом увеличении функционального резерва моноцитов. Нейтрофилы таких пациентов обладали повышенной способностью к фагоцитозу [5]. Интенсивность фагоцитоза у пациентов с сахарным диабетом 2 типа положительно коррелировала с уровнем глюкозы в крови и содержанием гликированного гемоглобина. Уровень триглицеридов отрицательно связан с интенсивностью индуцированного НСТ-теста моноцитов и процентным содержанием внеклеточных нейтрофильных ловушек [6].

Цель настоящей работы — оценка состояния функциональной активности нейтрофилов и моноцитов у больных сахарным диабетом 2 типа с синдромом диабетической стопы.

Материалы и методы

При проведении работы обследованы 14 больных сахарным диабетом 2 типа с синдромом диабетической стопы и 22 человека из группы сравнения. Критерии включения в основную группу: сахарный диабет 2 типа со стажем болезни не менее 1 года, согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: злокачественные новообразования любой локализации, цирроз печени, психические заболевания, острые инфекции, травмы или оперативные вмешательства в течение последних 6 месяцев, использование больными иммуномодуляторов и вакцин в течение последних 6 месяцев. Поскольку пациенты с сахарным диабетом также страдали артериальной гипертензией и/или ишемической болезнью сердца, в группу сравнения были включены пациенты с этими нозологиями, которые имели нормальный уровень глюкозы крови. Обследование проводилось на вторые сутки после поступления. Возраст больных составил $60,57 \pm 2,29$ года в основной группе и $61,68 \pm 2,83$ года — в группе сравнения. У обследуемых людей исследовали функциональную активность нейтрофилов и моноцитов: количество клеток, способность к фагоцитозу частиц латекса, уровень выработки активных форм кислорода по НСТ-тесту (спонтанному и стимулированному), лизосомальную активность. В выделенных чистых фракциях моноцитов и нейтрофилов определяли способность клеток к формированию внеклеточных ловушек. Этот показатель исследовали в спонтанном варианте и после стимуляции пирогеналом [7]. По методу, описанному в [8], оценивали способность эффекторов врожденного иммунитета к адгезии по относительной доле фиксированных клеток (активность адгезии) и размерам клеток, которые определяли с помощью окуляр-микрометра. Статистический анализ проводили с помощью пакета прикладных статистических программ SPSS. Данные представлены в виде средней величины и стандартной ошибки средней ($M \pm m$). Для оценки статистической значимости различий между группами использовали непараметрические критерии Манна-Уитни (U), Колмогорова-Смирнова (KS) и Вальда-Вольфовица (WW). При сравнении связанных переменных применяли парный критерий Вилкоксона (PKW). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$ [9].

Результаты и обсуждение

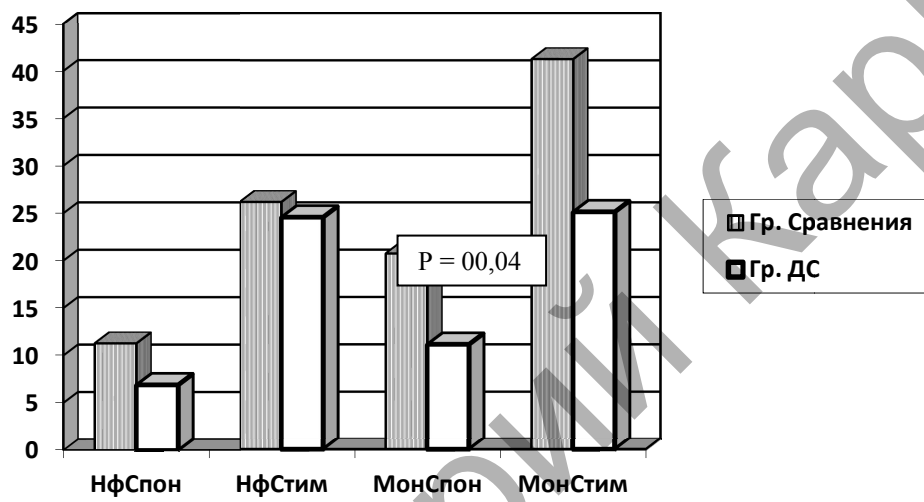
Содержание глюкозы в сыворотке крови составило $4,42 \pm 0,10$ ммМ/л в группе сравнения и $12,00 \pm 0,79$ ммМ/л — у пациентов с сахарным диабетом ($p = 0,001$, KS). Это указывает на нормальный углеводный обмен у лиц из группы сравнения и недостаточно эффективный контроль гликемии у людей, страдающих синдромом диабетической стопы. Индекс массы тела был равен $26,84 \pm 1,09$ кг/м² в группе сравнения и $28,79 \pm 2,39$ кг/м² у больных с синдромом диабетической стопы. Различия были статистически значимыми ($p = 0,001$ U). Данные указывают на наличие избыточной массы тела в стадии предожирения у лиц из обеих групп.

Количество нейтрофилов в крови демонстрировало тенденцию к увеличению и составило $7,11 \pm 0,54 \times 10^9$ /л в группе сравнения и $8,40 \pm 0,80$ в группе пациентов с диабетической стопой. Наличие синдрома диабетической стопы сопровождалось увеличением уровня палочкоядерных нейтрофилов до $5,25 \pm 1,37$ % (в группе сравнения $2,73 \pm 0,91$ %, $p = 0,04$, U). При этом содержание лимфоцитов статистически значимо снижалось с $16,91 \pm 1,10$ % в группе сравнения до $12,0 \pm 1,20$ % ($p = 0,016$, U). Наличие элементов сдвига лейкоцитарной формулы влево, при отсутствии статистически значимого лейкоцитоза, можно рассматривать как свидетельство наличия воспалительного очага при синдроме диабетической стопы.

При изучении состояния нейтрофилов в цельной крови было установлено, что $2,65 \pm 1,36$ % нейтрофилов лиц из группы сравнения формировали внеклеточные ловушки. Наличие синдрома диабетической стопы вызывает статистически значимое снижение этого показателя до $0,29 \pm 0,13$ % ($p = 0,037$, U). Стимуляция клеток пирогеналом вызывала разнонаправленную реакцию: в группе сравнения показатель демонстрировал только тенденцию к уменьшению и составил $2,10 \pm 0,91$ %. Под действием пирогенала возросла функциональная активность и $0,57 \pm 0,20$ % нейтрофилов больных сахарным диабетом образовывали внеклеточные ловушки, различия со спонтанным уровнем оказались статистически значимыми ($p = 0,046$, PKW). При этом, несмотря на выраженную разницу уровня клеток, формирующих внеклеточные ловушки после стимуляции, статистической значимости они не достигли. Внеклеточные ловушки формируются эффекторными клетками врожденного иммунитета за счет выброса за пределы цитоплазматической мембраны петель из собственной ДНК. Ло-

вушки обеспечивают фиксацию микроорганизмов, высокоэффективный киллинг и разрушение чужеродных агентов за счет высокой концентрации бактерицидных субстанций. Наши данные свидетельствуют, что нейтрофилы больных с синдромом диабетической стопы сохраняют способность положительно реагировать на дополнительную стимуляцию, но при этом относительное количество образованных внеклеточных ловушек меньше, чем в группе сравнения.

Как видно на рисунке, нейтрофилы больных сахарным диабетом с синдромом диабетической стопы в чистой фракции формировали меньше внеклеточных ловушек, чем клетки лиц из группы сравнения. Однако эти различия не достигли статистической значимости. Относительная доля моноцитов, продуцировавших внеклеточные ловушки, при синдроме диабетической стопы была значимо меньше — в 1,86 раза ($p = 0,040$, U). После стимуляции пирогеналом сохранилась только тенденция к уменьшению способности формировать внеклеточные ловушки.



НфСпон — нейтрофилы без дополнительной стимуляции;
 НфСтим — нейтрофилы после инкубации с пирогеналом;
 МонСпон — моноциты без дополнительной стимуляции;
 МонСтим — моноциты после стимуляции пирогеналом;
 Гр. ДС — пациенты с синдромом диабетической стопы

Рисунок. Количество клеток (%), формирующих внеклеточные ловушки в чистой фракции

Обращает на себя внимание тот факт, что в обеих группах отмечалась позитивная реакция на стимуляцию пирогеналом, и доля клеток, формировавших внеклеточные ловушки, повышалась статистически значимо как для нейтрофилов, так и для моноцитов. Однако степень прироста в группе сравнения составила 2,32 для нейтрофилов и 1,99 для моноцитов. Аналогичный показатель для больных с синдромом диабетической стопы составил 3,57 и 2,56 соответственно. Таким образом, синдром диабетической стопы обуславливает тенденцию к увеличению реактивности клеток на дополнительную стимуляцию.

Как видно из таблицы, способность моноцитов к поглощению чужеродных частиц в обеих изучаемых группах практически не различалась. Способность моноцитов к выработке активных форм кислорода статистически значимо возрастала у пациентов с синдромом диабетической стопы. Активность спонтанного НСТ-теста была выше при наличии диабетической стопы в 1,48 раза, а интенсивность спонтанного НСТ-теста была выше, чем в группе сравнения в 1,65 раза. После инкубации клеток с частицами латекса в качестве дополнительной стимуляции наблюдаемая картина не изменилась: активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста также статистически значимо выше в группе пациентов с синдромом диабетической стопы в 1,89 и 1,81 раза соответственно.

Дополнительно был рассчитан функциональный резерв как соотношение активности или интенсивности индуцированного и спонтанного вариантов НСТ-теста. Функциональный резерв моноцитов был статистически значимо выше в группе пациентов с синдромом диабетической стопы, что указывает на повышенную способность моноцитов активироваться под действием дополнительного стимула.

Функциональная активность нейтрофилов и моноцитов у пациентов с синдромом диабетической стопы

Показатель	Группа сравнения	Группа пациентов с синдромом диабетической стопы	<i>P</i>
Моноциты			
Активность фагоцитоза (%)	51,09 ± 2,99	50,00 ± 3,12	> 0,05
Интенсивность фагоцитоза (у.е.)	1,37 ± 0,13	1,42 ± 0,18	> 0,05
Фагоцитарное число (у.е.)	2,55 ± 0,13	2,80 ± 0,26	> 0,05
Активность спонтанного НСТ-теста (%)	16,05 ± 1,88	23,75 ± 5,34	0,024 WW
Интенсивность спонтанного НСТ-теста (у.е.)	0,191 ± 0,023	0,315 ± 0,081	0,024 WW
Активность индуцированного НСТ-теста (%)	12,32 ± 1,86	23,25 ± 3,90	0,019 U
Интенсивность индуцированного НСТ-теста (у.е.)	0,156 ± 0,024	0,283 ± 0,055	0,035 U
Функциональный резерв (по активности)	0,780 ± 0,092	1,067 ± 0,103	0,008 WW
Функциональный резерв (по интенсивности)	0,838 ± 0,118	0,996 ± 0,109	0,000 WW
Нейтрофилы			
Активность фагоцитоза (%)	45,27 ± 3,39	42,50 ± 1,95	> 0,05
Интенсивность фагоцитоза (у.е.)	1,07 ± 0,13	1,48 ± 0,23	> 0,05
Фагоцитарное число (у.е.)	2,35 ± 0,14	3,45 ± 0,48	0,007 U
Активность спонтанного НСТ-теста (%)	27,55 ± 2,88	19,50 ± 3,27	> 0,05
Интенсивность спонтанного НСТ-теста (у.е.)	0,485 ± 0,057	0,345 ± 0,040	> 0,05
Активность индуцированного НСТ-теста (%)	25,82 ± 2,32	20,00 ± 2,45	> 0,05
Интенсивность индуцированного НСТ-теста (у.е.)	0,432 ± 0,052	0,285 ± 0,031	> 0,05
Функциональный резерв (по активности)	1,06 ± 0,10	1,14 ± 0,13	> 0,05
Функциональный резерв (по интенсивности)	1,02 ± 0,15	0,832 ± 0,039	0,008 WW

При оценке состояния нейтрофилов было обнаружено, что фагоцитарное число статистически значимо выше у лиц с синдромом диабетической стопы относительно группы сравнения в 1,47 раза (табл.). Показатели спонтанного и индуцированного НСТ-теста демонстрировали тенденцию к снижению в группе пациентов с сахарным диабетом. При этом функциональный резерв нейтрофилов, рассчитанный по интенсивности, статистически значимо снизился и составил 81,6 % относительно группы сравнения. Результаты указывают на снижение способности нейтрофилов увеличивать выработку активных форм кислорода при дополнительной стимуляции.

Выводы

1. Синдром диабетической стопы сопровождается ингибированием способности нейтрофилов и моноцитов формировать внеклеточные ловушки в цельной крови и чистой фракции клеток.
2. Моноциты больных с синдромом диабетической стопы характеризуются сохраненной способностью к фагоцитозу и увеличенной выработкой активных форм кислорода как в спонтанном варианте НСТ-теста, так и при дополнительной стимуляции частицами латекса.
3. У нейтрофилов пациентов с синдромом диабетической стопы увеличена способность к фагоцитозу и снижена выработка активных форм кислорода при стимуляции частицами латекса.
4. Синдром диабетической стопы у больных сахарным диабетом определяет формирование дисбаланса в состоянии эффекторных клеток системы врожденного иммунитета.

Список литературы

- 1 Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030 // *Diabetes Care*. — 2004. — Vol. 27. — P. 1047–1053.
- 2 Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. — М., 2011. — 115 с.
- 3 Gallacher S.J., Thomson G., Fraser W.D. et al. Neutrophil bactericidal function in diabetes-mellitus — evidence for association with blood-glucose control // *Diabetic Medicine*. — 1995. — Vol. 12, Iss. 10. — P. 916–920.
- 4 Nielson C.P., Hindson D.A. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst by elevated glucose concentrations in vitro // *Diabetes*. — 1989. — Vol. 38, No. 8. — P. 1031–1035.

5 Тарабрина Ю.О., Колесников О.Л., Колесникова А.А., Абрамовских О.С. Оценка показателей липидного обмена и функционального состояния иммунной системы у больных сахарным диабетом 2 типа в зависимости от выраженности поздних осложнений // Вестн. Челябинского гос. ун-та. — 2013. — № 7 (298). Биология. — Вып. 2. — С. 204–205.

6 Долгушин И.И., Тарабрина Ю.О., Колесников О.Л. и др. Оценка взаимосвязей между показателями углеводного и липидного обмена и активностью иммунной системы у больных сахарным диабетом 2 типа // Вестн. Уральской мед. академ. науки. — 2012. — № 2 (39). — С. 31–32.

7 Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. — М.: РАМН, 2009. — 208 с.

8 Зурочка А.В. Иммунобиологические свойства секреторных продуктов нейтрофилов (нейтрофилокинов): Дис. ... д-ра мед. наук. — Челябинск, 1991. — 231 с.

9 Наследов А.Д. SPSS 15: профессиональный статистический анализ данных. — СПб.: Питер, 2008. — 416 с.

И.И.Долгушин, Ю.О.Тарабрина, О.Л.Колесников, А.А.Колесникова

Диабеттік өкше синдромымен аура тындардың туа бітк е иммунитет торының функциялық күйі

Макалада 2 үлгідегі диабеттік өкше синдромына шалдыққан 14 емделуші және салыстырмалы тобынан 22 адам зерттеуінің нәтижелері келтірілген. Диабеттік өкше синдромымен аурулардың нейтрофилдерінің пайыздық саны 9,1 төмендеген және моноциттарының саны 9,6 % азайтылған. Диабеттік өкше синдромының кездестіргенде, моноциттардың оттектің белсенді пішінінің өндіруі төмендейді (НСТ-тест нәтижесі бойынша). Аурудың осындай түріне шалдыққан нейтрофилдердің фагоцитозын белсендіруі көрсетілген (фагоцитарлық саны 40,8 % өсті), бірақ олар сыртқы ынталарға реакцияны азайтуын көрсетті. Сонымен, диабеттік өкше синдромы тумыстан иммунитеттің жүйесінде тепе-теңсіздіктің дамуын анықтады.

I.I.Dolgushin, Yu.O.Tarabrina, O.L.Kolesnikov, A.A.Kolesnikova

Functional state of cells in innate immunity in treatment-off with diabetic foot syndrome

14 patients with type 2 diabetes with diabetic foot syndrome and 22 patients from the comparison group are examined. In patients with diabetic foot syndrome the percentage of neutrophils able to form extracellular traps in whole blood is reduced in 9.1 times and the number of monocytes that form the extracellular traps is decreased by 9.6 %. In the presence of diabetic foot syndrome it was found that ability of monocytes to produce active oxygen forms (according to the NBT-test results) with preserved function of the absorption of alien objects is reduced. Neutrophils of patients with diabetic foot syndrome demonstrated the activation of phagocytosis (phagocytic number increased by 40.8 %), but it had reduced severity of response to external stimuli. Thus, diabetic foot syndrome determines the development of the imbalance in the innate immune system.

References

- 1 Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. *Diabetes Care*, 2004, 27, p. 1047–1053.
- 2 *Algorithms of specialized medical care to patients with diabetes mellitus*, Moscow, 2011, p. 115.
- 3 Gallacher S.J., Thomson G., Fraser W.D. et al. *Diabetic Medicine*, 1995, 12(10), p. 916–920.
- 4 Nielson C.P., Hindson D.A. *Diabetes*, 1989, 38(8), p. 1031–1035.
- 5 Tarabrina Yu.O., Kolesnikov O.L., Kolesnikova A.A., Abramovskih O.S. *Bulletin of the Chelyabinsk State University*, 2013, 7(298), Biology, 2, p. 204–205.
- 6 Dolgushin I.I., Tarabrina Yu.O., Kolesnikov O.L. et al. *Journal of Ural medical academic science*, 2012, 2(39), p. 31–32.
- 7 Dolgushin I.I., Andreyeva Yu.S., Savochkina A.Yu. *Neutrophil traps and methods for evaluating the functional status of neutrophils*, Moscow: Russian Academy of medical sciences, 2009, p. 208.
- 8 Zurochka A.V. *Immunobiological properties of secretory products of neutrophils (nejtrofilokinov)*: Dissertation, Chelyabinsk, 1991, p. 231.
- 9 Nasledov A.D. *SPSS 15: professional statistical analysis of data*, St. Petersburg: Piter, 2008, 416 p.