

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ РАНЕВОМ ПРОЦЕССЕ

Ярец Ю.И.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Республика Беларусь

Реферат. Была проведена оценка параметров функциональной активности нейтрофилов: фагоцитоз (фагоцитарный индекс — ФИ, фагоцитарное число — ФЧ), образование внеклеточных ловушек (NET-тест базальный и стимулированный), кислород-продуцирующая активность (НСТ-тест базальный и стимулированный) у пациентов с хроническими ранами (n = 90). Выявлены разнонаправленные изменения функциональной активности нейтрофилов пациентов по сравнению со здоровыми лицами. Индивидуальное сравнение показателей пациентов с широким интервалом нормальных значений (5–95 перцентилей) выявило в 25, 80 и 40% случаев повышение ФИ, НСТб, NETст и в 20 и 10% случаев снижение НСТст и NETб соответственно.

Ключевые слова: хроническая рана, функциональная активность нейтрофилов, фагоцитоз, нейтрофильные экстрацеллюлярные сети (NET), НСТ-тест.

Summary. The level of blood neutrophils phagocytosis, respiratory burst reaction (NBT-test), extracellular traps formation (NET-test) at the patients with chronic wounds (n = 90) was evaluated. It was revealed the multidirectional changes of the parameters of functional activity of patients' neutrophils in comparison with the healthy individuals' values. Individual analysis of the parameters showed the increased level of phagocytosis, NBT spontaneous and NET stimulated at 25, 80, 40% of the patients and decreased level of NBT stimulated and NET spontaneous at 20 and 10% of cases respectively.

Keywords: chronic wound, neutrophils function activity, neutrophils phagocytosis, NBT-test, NET-test.

Введение. Нейтрофилы (НФ) играют важную роль в раневом процессе. Они первыми мигрируют в очаг повреждения, где за счет фагоцитоза и действия различных факторов бактерицидности, таких как активные формы кислорода (АФК), формирование сетевидных образований (Neutrophil Extracellular Traps, NET), обеспечивают разрушение поглощенных микробов. При этом дефект на любом из этапов «адгезия – поглощение – киллинг» может приводить к нарушению заживления и хронизации раневого процесса [4]. В свою очередь изменения показателей активности НФ в динамике процесса позволит рассматривать эти лабораторные тесты для оценки эффективности лечения.

Цель исследования — оценка показателей функциональной активности нейтрофилов у пациентов с хроническими ранами (ХР).

Материалы и методы. Объектом исследования были пациенты ($n = 90$, 55 мужчин, 35 женщин в возрасте от 25 до 70 лет) с ХР различной этиологии (срок существования более 4 недель), находившиеся на стационарном лечении в ожоговом отделении ГУЗ «Гомельская городская клиническая больница № 1» в 2012–2014 гг. Группу сравнения составили 45 сопоставимых по возрасту и полу практически здоровых лиц.

Оценивали поглотительную, NET-образующую и кислород-продуцирующую активность функции НФ. В качестве стимулятора иммунологических реакций использовали суточную культуру *S. aureus* (штамм ATCC 25923). Из культуры готовили бактериальную суспензию с плотностью 0,5 по McFarland ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл), а также получали растворимые продукты *S. aureus*. Иммунологические исследования проводили на момент поступления пациентов в стационар. Материалом для исследования служили лейкоциты периферической венозной крови. Поглотительную активность НФ определяли в реакции фагоцитоза убитых нагреванием *S. aureus*. Подсчитывали фагоцитарный индекс (ФИ) как процентное содержание НФ, поглотивших 2 и более бактерий, а также фагоцитарное число (ФЧ) как среднее число поглощенных бактерий. Продукцию НФ АФК оценивали в реакции базального и стимулированного восстановления нитросинотетразолия (НСТб и НСТс соответственно). При микроскопии учитывали процентное содержание формазанположительных НФ. Формирование NET (базальный и стимулированный тесты — NETб, NETст) оценивали по методике И.И. Долгушина [1]. Для постановки NETст использовали растворимые продукты *S. aureus*. Учет проводили с помощью люминесцентного микроскопа ZEISS Axio Star plus HBO 50/AC.

Результаты исследований обработаны в программе Statistica 6.0. Результаты оценки функций НФ представляли в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25%; 75%) с указанием 5%–95% интервала (размах от 5 до 95 процентиля). Различия между группами вычислены с помощью непараметрического U-критерия Манн–Уитни.

Результаты и обсуждение. У пациентов с ХР по отношению к группе сравнения отмечались значимые различия показателей функциональной активности НФ ($p < 0,01$). Исключение составило только значение ФЧ, которое у пациентов с ХР не отличалось от нормы. Необходимо отметить, что изменения соответствующих показателей базальной и стимулированной продукции АФК и NET-образующей функции НФ имели различную направленность. Так, НСТб был повышен ($p < 0,01$), в то время как NETб была снижена ($p < 0,01$). В свою очередь при сниженной продукции АФК, измеренной после применения стимулятора (НСТст), НФ формировали больше экстрацеллюлярных сетей (NETст) ($p < 0,01$) (таблица).

Таблица — Результаты комплексной оценки функциональной активности нейтрофилов

Параметр	Здоровые лица, $n = 45$		Пациенты с ХР, $n = 90$		Интерпретация результата
	Me (25%;75%)	5%–95%	Me (25%;75%)	5%–95%	
ФИ	70 (64; 75)	60–80	76 (67; 80)*	56–90	↑
ФЧ	7 (6; 8)	5–9	7 (5; 8)	3–10	Не изменен
НСТб	7 (5; 10)	2–12	19 (15; 23)*	9–39	↑
НСТст	52 (47; 57)	40–60	47 (40; 52)*	31–59	↓
NETб	5 (4; 7)	2–9	3 (2; 6)*	0–9	↓
NETст	10 (9; 12)	7–14	12 (10;18)*	5–28	↑
Примечания: 1. — Me — медиана. 2. — 25%–75% — интерквартильный размах. 3. — 5%–95% — интервал, включающий размах от 5 до 95 процентиля.					

Также у пациентов с ХР регистрировалась повышенная фагоцитарная активность НФ ($p = 0,005$) (таблица). Выявленная разнонаправленность изменений кислород- и NET-образующей

способности лейкоцитов, с одной стороны, может быть связана с функциональной неоднородностью НФ, обуславливающей особенности их активации [2]. По-видимому, одна субпопуляция НФ интенсивно генерирует АФК, тогда как другая реализует свой потенциал преимущественно путем формирования NET. С другой стороны, оба процесса — генерация АФК и образование NET — являются НАДФ-зависимыми [5], поэтому между данными проявлениями функций НФ возможна конкуренция за ферментные системы.

На следующем этапе мы провели индивидуальный анализ полученных значений лабораторных показателей пациентов с ХР относительно параметров здоровых лиц, приняв за норму широкий интервал нормальных значений (5–95 перцентили). Несмотря на выявленные различия между выборками пациентов и здоровых лиц в целом, детальный анализ показал, что не во всех случаях показатели активности НФ изменялись (рисунок). Выявлено, что ФИ, НСТб, NETст были повышены у 25, 80 и 40% пациентов с ХР. Обращает на себя внимание, что у максимального количества пациентов (80%, n = 72) была повышена генерация АФК, что следует из повышенных значений НСТб. Это может быть следствием постоянной стимуляции НФ бактериями, колонизирующими ХР. В предварительных исследованиях нами показано, что при микробиологическом исследовании мазков из ран у всех пациентов с ХР высевается разнообразная микрофлора [3]. Снижены были показатели НСТст и NETб у 20 и 10% пациентов соответственно. Как известно, нарушение функций НФ может усугубляться с увеличением давности патологического процесса [4]. Учитывая, что давность существования ХР варьировала в широких пределах (от 4 недель до нескольких лет), можно предположить, что неоднородность изменений функций НФ пациентов относительно широкого диапазона нормы связана длительностью процесса и нуждается в дальнейшем изучении.

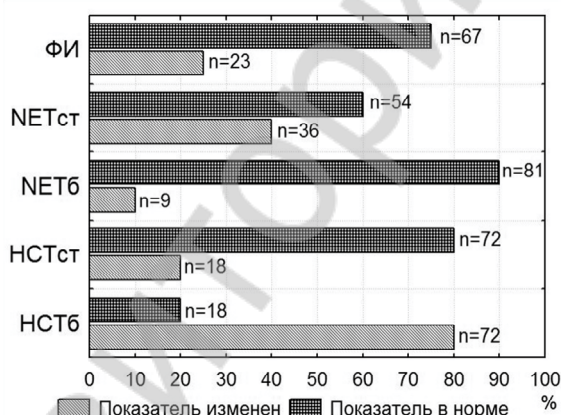


Рисунок — Частота встречаемости изменений в показателях функциональной активности НФ у пациентов с ХР

Заключение. На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. У пациентов с ХР в сравнении со здоровыми лицами выявлены разнонаправленные изменения параметров функций НФ: повышение ФИ, НСТб, NETст и снижение НСТст, NETб.
2. Индивидуальное сравнение показателей пациентов с широким интервалом нормальных значений (5–95 перцентили) выявило в 25, 80 и 40% случаев повышение ФИ, НСТб, NETст и в 20 и 10% случаев снижение НСТст и NETб соответственно.

Литература

1. Долгушин, И.И. Технологии определения и роль нейтрофильных внеклеточных ловушек в антимикробной защите / И.И. Долгушин, Ю.С. Шишкова, А.Ю. Савочкина // Вестн. РАМН. — 2010. — № 4. — С. 26–30.
2. Герасимов, И.Г. Функциональная неоднородность нейтрофилов / И.Г. Герасимов // Клинич. лабораторная диагностика. — 2006. — № 2. — С. 34–36.

3. Ярец, Ю.И. Мониторинг штаммов и лекарственной чувствительности микроорганизмов Гомельского областного центра термической травмы, ран, раневой инфекции и реконструктивной хирургии / Ю.И. Ярец, Н.И. Шевченко, Л.Н. Рубанов // Инфекции в хирургии. — 2011. — Т. 9, № 3. — С. 8–11.

4. Martin, P. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly / P. Martin, S.J. Leibovich // Trends Cell Biol. — 2005. — Vol. 15, № 11. — P. 599–607.

5. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps / V. Papayannopoulos [et al.] // J. Cell Biol. — 2010. — Vol. 191, № 3. — P. 677–691.

РЕПОЗИТОРИЙ БГМУ