

Сыманович О. Ю., Петракова О. В., Хватова Л. А., Гурманчук И. Е.

**ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ ВЛИЯНИЯ
ГИПЕРГЛИКЕМИИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ
НЕЙТРОФИЛОВ БОЛЬНЫХ С ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ ПРОЦЕССОМ ПРИ ТЕРМИЧЕСКОЙ
ТРАВМЕ**

*Белорусский государственный медицинский университет
Научно-исследовательская часть*

При термической травме и ряде других патологий (травмы, операции и т. д.) часто наблюдается значительная гипергликемия, выраженность и длительность которой зависит от тяжести повреждений [1–3]. При этом уровень глюкозы в крови коррелирует с выживаемостью больных, а также влияет на течение заболевания в т. ч. на наличие осложнений [4]. Так как большинство осложнений носит инфекционный характер, то большой интерес представляет изучение взаимосвязей уровня гипергликемии и функциональных параметров иммунокомпетентных клеток [5, 6].

В настоящем исследовании была проведена оценка действия высоких концентраций глюкозы *in vivo* на адгезивную и функциональную активность нейтрофилов периферической крови *in vitro*.

Материалы и методы

Исследования проводили на базе научной группы «Иммунология» Научно-исследовательской части Белорусского государственного универ-

ситета (НИЧ БГМУ). Материалом для исследования послужили нейтрофилы периферической крови пациентов с термическими травмами разной степени тяжести (клетки выделяли из цельной крови путем центрифугирования на двойном градиенте плотности Ficoll Paque — 1,080 и 1,120 г/см³).

Всего было обследовано 26 больных с термическими травмами, находящихся на лечении в связи с ожогами II–IV степени (средний возраст пациентов: $44 \pm 2,9$ года, площадь полученных ожогов — $34,5 \pm 2,6$ %, из них глубоких — $15,3 \pm 1,9$ %). Забор материала для исследования (периферическая кровь) производили в период со 2-х по 10-е сутки после получения травмы.

В зависимости от дозы инсулина, необходимой для поддержания нормогликемии, все пациенты с термическими травмами были разделены на 3 группы:

Группа 1 — пациенты с термическими травмами, для поддержания уровня глюкозы в крови был необходим инсулин в количестве не более 100 ЕД (13 человек, средний возраст составил $42,8 \pm 5,5$ года (от 20 до 80 лет), площадь полученных ожогов — $30,8 \pm 3,8$ % (от 11 до 50 %), площадь глубоких ожогов — $11,0 \pm 3,2$ % (от 0 до 35 %)).

Группа 2 — пациенты с термическими травмами, для поддержания уровня глюкозы в крови был необходим инсулин в количестве от 101 до 200 ЕД (11 человек, средний возраст составил $47,5 \pm 4,3$ года (от 28 до 67 лет), площадь полученных ожогов — $42,9 \pm 4,9$ % (от 18 до 70 %), площадь глубоких ожогов — $14,5 \pm 3,3$ % (от 0 до 40 %)).

Группа 3 — пациенты с термическими травмами, для поддержания уровня глюкозы в крови был необходим инсулин в количестве от 200 до 400 ЕД (2 человека).

Также была и контрольная группа, условно здоровые лица, не имеющие противопоказаний для донорства (28 человек, средний возраст составил $40 \pm 1,8$ лет (от 26 до 65 лет)).

В работе проводили оценку спонтанной и модифицированной активности клеток. Оценка модифицированной активности проводили в присутствии инсулина, глюкозы или РМА (для нейтрофилов). Конечная концентрация инсулина составила 10 и 100 нг/мл, глюкозы — 11 мМ и 100 мМ. С целью оценки влияния метаболических регуляторов на функциональные параметры клеток также проводили коинкубацию глюкозы и инсулина с активатором протеинкиназы С, РМА. Конечная концентрация РМА (Sigma) составила 100 нг/мл (оптимальная для стимуляции клеток концентрация, выявленная в предыдущих исследованиях).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA 6.0. После формирования групп пациентов проводили вычисление следующих характеристик выборки: средней, медианы, эксцесса, стандартного отклонения, ошибки средней, а

также проводили анализ соответствия вида распределения признака в выборке закону нормального распределения. Так как выборка не подчинялась закону нормального распределения, то в дальнейшем были использованы непараметрические методы, достоверными считались отличия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ данных, полученных при исследовании влияния инсулина и глюкозы на адгезивную активность (АА) клеток в группе доноров показал, что инсулин во всех использованных концентрациях достоверно увеличивал АА нейтрофилов крови (уровни значимости составили 0,03 и 0,006 для доз инсулина 10 и 100 нг/мл соответственно). Аналогичным эффектом обладала глюкоза в концентрации 11мМ ($p = 0,006$) (рис. 1).

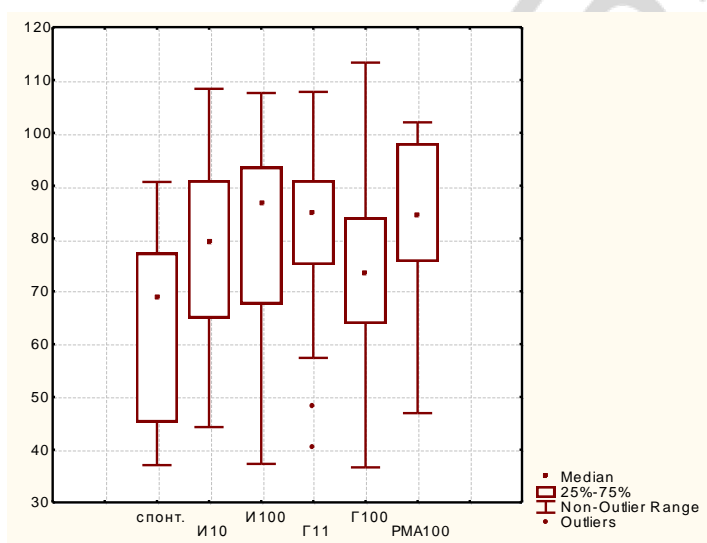


Рис. 1. Влияние инсулина и глюкозы на адгезивную активность нейтрофилов периферической крови доноров

Стимулирующий эффект инсулина сохранялся и при совместной инкубации с РМА ($p = 0,0009$), тогда как под действием глюкозы в таком же эксперименте было выявлено снижение РМА-индуцированной активации адгезивной активности клеток ($p = 0,03$).

При анализе данных полученных от пациентов с термическими травмами установлено, что в группе 1 (пациенты с наименьшей потребностью в инсулине) внесение глюкозы в культуральную среду в обеих концентрациях приводило к достоверному ($p < 0,05$) увеличению адгезивной активности нейтрофилов крови (рис. 2).

В результате исследования влияния модуляторов на показатели стимулированной РМА активности клеток было выявлено, что коинкубация использованных энергетических модуляторов с РМА частично отменяла его стимулирующий эффект при дозах инсулина в 10 нг/мл и глюкозы в 11 мМ ($p < 0,05$), тогда как при дозе инсулина в 100 нг/мл и глюкозы

100 мМ стимулирующий эффект РМА сохранялся в полной мере (достоверных отличий между активностью клеток в присутствии только РМА или при добавлении модуляторов выявлено не было). Что свидетельствует, о возросших энергетических потребностях клеток пациентов в ответ на термическую травму.

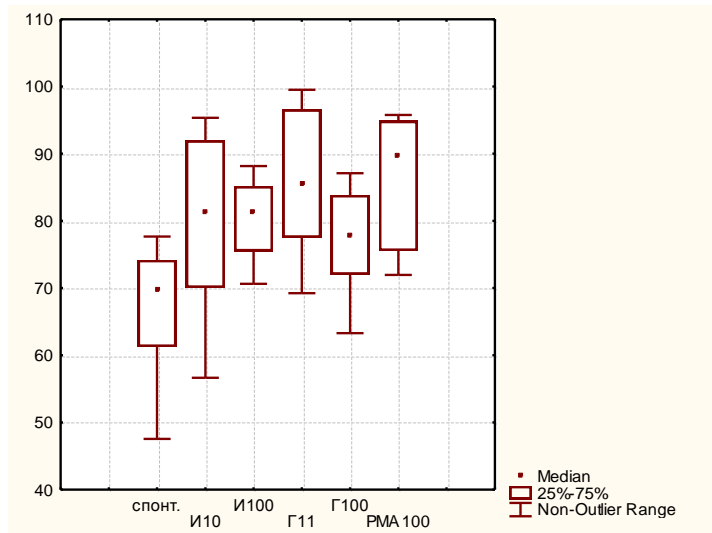


Рис. 2. Влияние инсулина и глюкозы на адгезивную активность нейтрофилов периферической крови пациентов с термическими травмами (группа 1)

Результаты исследования изменения адгезивной активности клеток при внесении изолированных модуляторов показали, что при инкубации с инсулином отсутствуют отличия между активностью клеток при добавлении гормона и стимулированной РМА активностью, что свидетельствует о способности этого гормона активировать клетки у некоторых пациентов этой группы.

В результате исследования влияния глюкозы и инсулина на параметры адгезивной активности клеток пациентов группы 2 (пациенты, для поддержания концентрации глюкозы в крови которых потребовалась доза инсулина 200–300 ЕД) было выявлено, что активность клеток в присутствии глюкозы в обеих концентрациях была достоверно ниже ($p = 0,04$) таковой в присутствии РМА. Тогда как при внесении инсулина АА клеток не отличалась от той, которая была зарегистрирована со стимулятором, при этом следует отметить большой разброс данных, полученных в этой группе при тестировании активности клеток с модуляторами, что говорит о высокой разнородности этой группы пациентов в отношении направления реакции на этот гормон. Согласно полученным данным, адгезивная реакция клеток при их инкубации с инсулином некоторых пациентов этой группы советуется таковой, наблюдаемой в группе доноров.

Анализ данных, полученных при исследовании влияния инсулина и глюкозы на метаболическую активность клеток в группе доноров показал,

инсулин и глюкоза во всех дозах приводили к достоверному росту показателей активности клеток ($p < 0,05$ во всех случаях). Анализ действия инсулина и глюкозы на показатели стимулированной метаболической активности клеток в группе доноров показали, что эти регуляторы достоверно снижают ответ клеток на PMA ($p < 0,03$ во всех случаях) (рис. 3).

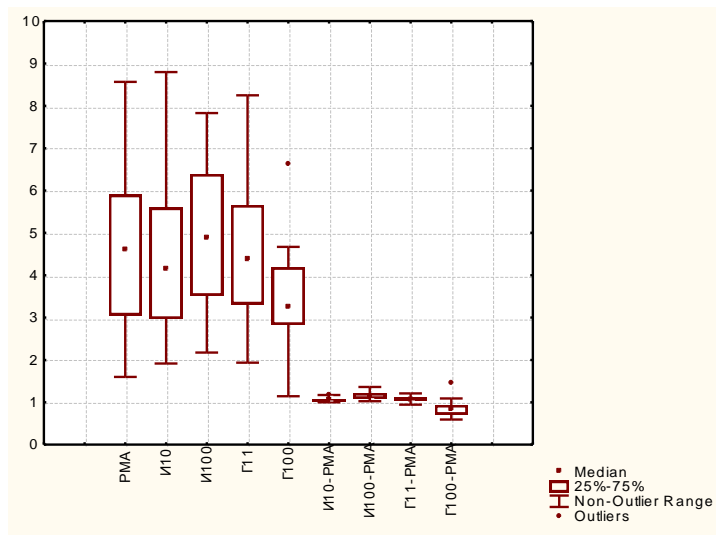


Рис. 3. Влияние инсулина и глюкозы на стимулированную PMA метаболическую активность нейтрофилов доноров

Результаты исследования изменений под влиянием энергетических модуляторов, глюкозы и инсулина, метаболической активности нейтрофилов и способности клеток к стимуляции у пациентов с термическими травмами в группе с наименьшим уровнем гликемии, показали, что глюкоза в концентрации 11 мМ у этих больных приводила к достоверному ($p = 0,05$) росту метаболической активности клеток (рис. 4).

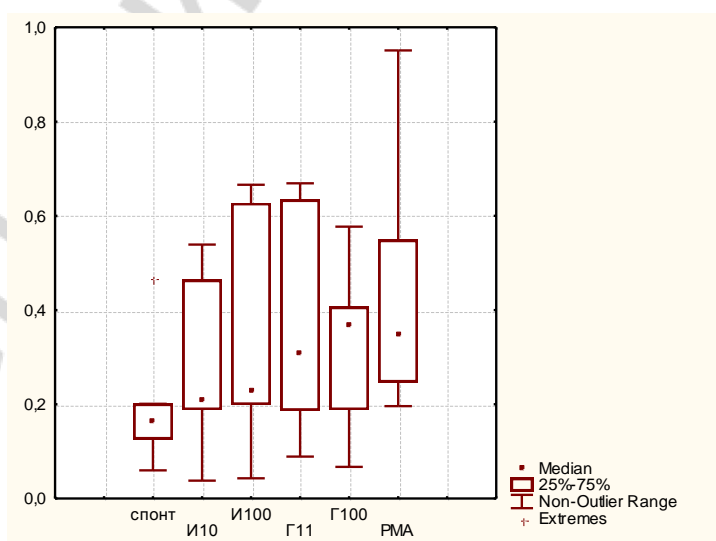


Рис. 4. Влияние инсулина и глюкозы на метаболическую активность нейтрофилов периферической крови пациентов с термическими травмами (группа 1)

При этом стимулирующий эффект РМА в коинкубационных тестах сохранялся только в пробах с инсулином и глюкозой в дозе 11 мМ ($p = 0,05$), тогда как отличий между активностью клеток при коинкубации с РМА и глюкозой в дозе 100 мМ выявлено не было ($p > 0,05$) (рис. 5).

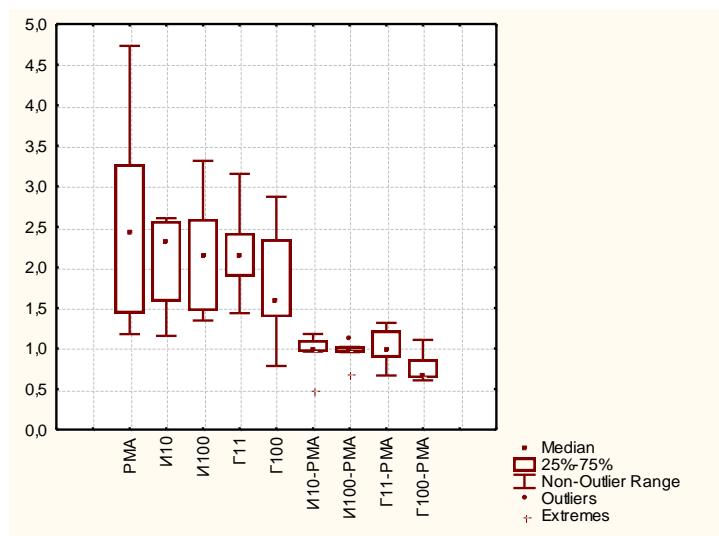


Рис. 5. Влияние инсулина и глюкозы на стимулированную РМА метаболическую активность нейтрофилов периферической крови пациентов с термическими травмами (группа 1)

Исследование аналогичных параметров клеток в группе 2 показало, что инсулин в дозе 100 нг/мл и глюкоза в дозе 11 мМ приводили к росту метаболической активности клеток по сравнению с пробами в которые вносился только РМА ($p = 0,02$), т. е. в этих дозах препараты позволяли восстановить сниженный ранее ответ клеток на стимулятор РМА.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о наличии значительных отличий в направлении и степени реакции иммунокомпетентных клеток на метаболические модуляторы (инсулин и глюкозу) у пациентов с различным уровнем гликемии и, следовательно, различной тяжестью воспалительного процесса при термической травме. Эти данные могут стать основанием для модификации и уточнения применяемых в настоящее время методик коррекции гипергликемии с целью учета индивидуальной реакции иммунокомпетентных клеток пациентов на глюкозу и инсулин *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Acute hyperglycaemia following thermal injury : friend or foe?* / С. Holm [et al.] // *Resuscitation*. 2004. Vol. 60. P. 71–77.
2. *Glycemic control in the burn intensive care unit: focus on the role of anemia in glucose measurement* / E. A. Mann [et al.] // *J. Diabetes Sci. Technol*. Vol. 3. P. 1319–1329.
3. *Alterations in blood glucose homeostasis during septic or injury stress-hyperglycemia* / E. Otto-Buczowska [et al.] // *Family Medicine & Primary Care Review*. 2008. Vol. 10, № 2. P. 197–205.

4. *Jeschke, M. G.* Insulin treatment improves the systemic inflammatory reaction to severe trauma / M. G. Jeschke, D. Klein, D. N. Herndon // *Ann Surg.* 2004. Vol. 239. P. 553–560.
5. *In vivo* evidences that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions / S. Walrand [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* 2004. Vol. 76, № 6. P. 1104–1110.
6. *Reduced* hydrogen peroxide production in neutrophils from patients with diabetes / S. Inoue [et al.] // *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1996. Vol. 33, № 2. P. 199–127.

Symanovich V. U. and others

**Analysis of immunologic aspects of influence of hyperglycemia
on functional activity of neutrophils of burned patients
with systemic inflammatory process**

The aim of this study was to identify the influence of hyperglycemia *in vivo* on the adhesive and the metabolic activity of neutrophils of peripheral blood of severely burned patients *in vitro*.

The statistically important differences were founded for the cells of donors and group of patients (with low dose of insulin for maintaining of glucose blood level), but there are many different results for other patients.