

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ ФАГОЦИТАРНЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫХ ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНЫМ СИНУСИТОМ, СТРАДАЮЩИХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Попов Н.Н.¹, Огнивенко Е.В.¹, Романова Е.А.²

¹ Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, г. Харьков, Украина

² Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины, г. Харьков, Украина

Резюме. В работе изучена фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов у больных верхнечелюстным синуситом, страдающих сахарным диабетом. У больных хроническим верхнечелюстным синуситом, страдающих сахарным диабетом, наблюдается угнетение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов, нарушение процессов захвата и киллинга бактерий, депрессия оксидазной микробицидной системы и активности рецепторного аппарата.

Ключевые слова: фагоциты, хронический синусит, сахарный диабет.

Popov N.N., Ognivenko E.V., Romanova E.A.

SOME FEATURES OF PHAGOCYTIC CELL FUNCTIONS IN THE PATIENTS WITH MAXILLARY SINUSITIS SUFFERING FROM DIABETES MELLITUS

Abstract. The study concerns phagocytic activity of neutrophilic granulocytes investigated in diabetic patients with insular diabetes, accompanied by maxillary sinusitis. The patients exhibited suppressed phagocytic abilities of neutrophilic granulocytes and monocytes, disturbed killing of captured bacteria, suppression of oxidase microbicidal system, and disorders of receptor system. (*Med. Immunol.*, 2008, vol. 10, N 2-3, pp 145-150)

Клинические наблюдения свидетельствуют о том, что в последнее время наблюдается устойчивая тенденция роста числа хронических бактериальных и вирусных заболеваний ЛОР-органов, среди которых весьма значительной является доля синуситов [9]. Для лиц с сахарным диабетом характерным является непрерывное рецидивирующее течение заболевания и малая эффективность антимикробной и симптоматической терапии [2].

В возникновении и развитии хронических риносинуситов наряду с особенностями возбудителя, его патогенными, вирулентными и инвазивными

свойствами большую роль играют иммунные нарушения как системного, так и местного характера, расстройства во взаимодействии различных звеньев иммунной системы [1, 10].

Ведущая роль в элиминации инфекционных агентов из организма принадлежит клеткам с фагоцитарными свойствами, иммуноглобулинам и комплементу. Фагоциты обеспечивают поглощение и переваривание микробов, а комплемент и иммуноглобулины усиливают этот процесс [6].

Эффективная комплексная терапия хронических инфекционно-воспалительных заболеваний предусматривает применение иммунокоррирующих средств, а адресность их назначения предполагает выяснение характера расстройств в иммунной системе и степени нарушения в отдельных ее звеньях.

Учитывая вышеизложенное, целью настоящей работы явилось изучение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов

Адрес для переписки:

Огнивенко Елена Владимировна
62459, Украина, Харьковская область,
Харьковский район, пос. Высокий,
ул. Комсомольская, 7/1.
Тел.: (8057) 746-51-72 (дом.).
E-mail: lingyocenter@univer.kharkov.ua

у больных верхнечелюстным синуситом, страдающих сахарным диабетом.

Подобные данные в зарубежной и отечественной литературе отсутствуют.

Материалы и методы

Проведено иммунологическое обследование 30 больных хроническим гнойным верхнечелюстным синуситом (ХГВС) в фазе обострения, страдающих инсулинзависимым сахарным диабетом (ИЗСД), — 1 группа и 30 больных без ИЗСД — 2 группа. Степень тяжести СД определялась как среднетяжелая. Контрольную группу составили 30 здоровых лиц.

По данным микробиологического исследования этиологическими факторами заболевания выступали бактериальные ассоциации, представленные грамположительными бактериями *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*; грамотрицательными бактериями — *E. coli*, *P. aeruginosa*; анаэробами — *Peptostreptococcus*, *Bacteroides spp.*

Программа иммунологического исследования включала изучение фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов, эффективности внутриклеточного киллинга бактерий, состояния кислородзависимых микробицидных систем клеток, плотности экспрессии молекул CD11b, CD16, CD35, CD14.

Лейкоциты из периферической крови выделяли на 3% растворе желатина. Взвесь мононуклеарных лейкоцитов получали на градиенте плотности фиколла-верографина 1,077, нейтрофилы — на градиенте двойной плотности 1,093 : 1,077 [8]. Фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов оценивали по их способности поглощать бактерии *S. aureus* (штамм 209) [3]. Для этого смешивали 1 мл суспензии клеток (10^7) и 1 мл взвеси бактерий (10^9) в растворе Хенкса. Смесь инкубировали 30 мин при температуре 37°C при постоянном помешивании. По окончании процедуры на стеклах готовили мазки, которые окрашивали по Романовскому–Гимзе. В препаратах подсчитывали 200 клеток, из них число фагоцитировавших клеток (ФЧ) и число бактерий, поглощенных одной клеткой (ФИ). Эффективность фагоцитоза опсонизированных бактерий изучали таким же способом. Опсонизацию бактерий проводили в растворе Хенкса, содержащем 20% термоактивированной сыворотки больных (аутосыворотки) или сыворотки здоровых доноров (пул от 3–5 доноров) в течение 30 мин при 37°C. Бактерицидную способность (БС) фагоцитов оценивали по методу S. Nielsen [11]. После 30-минутной инкубации лейкоцитов со стафилококком непоглощенные бактерии отмывали центрифугированием при 1500 об/мин

в течение 10 минут. Число поглощенных, но живых стафилококков определяли после высева лизата клеток по методу Гольда на чашки Петри с мясопептонным агаром. Лизис лейкоцитов проводили путем добавления 3-кратного объема воды. Активность кислородзависимой микробицидной системы фагоцитов оценивали в спонтанном и стимулированном *S. aureus* НСТ-тесте [4]. Результаты учитывали морфологически, определяя относительное количество формазан-положительных клеток.

Количество CD11b⁺, CD16⁺, CD35⁺ клеток в суспензии нейтрофилов и CD14⁺ клеток в суспензии мононуклеаров определяли методом непрямой мембранной иммунофлюоресценции с использованием панели моноклональных антител («Сорбент», Москва) [7]. О плотности экспрессии на клетках молекул CD11b, CD16, CD35, CD14 судили по интенсивности флюоресценции клеток, обработанных моноклональными антителами, меченными ФИТЦ. Интенсивность свечения клеток выражали в относительных единицах. Весь диапазон флюоресценции клеток делили на 3 равные части: 0,05–0,20 отн.ед. — считали слабой, 0,21–0,40 отн.ед. — средней, 0,41–0,60 отн.ед. — сильной. В каждом образце изучали по 200 клеток. Полноценность реакции рецепторного аппарата клеток больных хроническим гнойным синуситом оценивали в сравнении с таковой клеток больных острым гнойным синуситом, протекающим без осложнений (32 человека).

Математическую обработку полученных данных проводили с использованием программы «Statistica 6.0». Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Данные в тексте приведены в виде среднего арифметического значения M и среднеквадратичного отклонения.

Результаты

Исследование крови больных 1 и 2 групп показало, что у лиц с ИЗСД и без ИЗСД обострение гнойного верхнечелюстного синусита сопровождается повышением общего количества лейкоцитов, увеличением относительного и абсолютного числа палочкоядерных и сегментоядерных форм нейтрофилов, абсолютного числа моноцитов (табл. 1). Как следует из полученных данных, у лиц, страдающих ИЗСД, реакция нейтрофилов на обострение ХГВС более яркая, чем у лиц без ИЗСД.

При изучении фагоцитарной активности клеток было установлено, что поглощение бактериальных частиц и переваривающая способность нейтрофилов и моноцитов больных 1 и 2 групп

несколько ниже, чем у лиц контрольной группы (табл. 2). При этом у больных 1 группы она была достоверно ниже, чем у больных 2 группы. Более низкая фагоцитарная способность клеток боль-

ных 1 группы наблюдалась и в отношении опсонизированных аутосывороткой бактерий, по сравнению с больными 2 группы и здоровыми лицами (табл. 3). Донорская сыворотка в качестве опсо-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНЫМ СИНУСИТОМ 1 И 2 ГРУПП, $M \pm \sigma$

Показатели		Здоровые лица	Больные ХГВС	
			1 группа	2 группа
Лейкоциты	абс. число/л ($\times 10^9$)	6,3 \pm 0,57	9,2 \pm 0,65*	8,8 \pm 0,64*
Лимфоциты	%	30,9 \pm 1,16	22,5 \pm 1,27*	24,3 \pm 1,26*
	абс. число/л ($\times 10^9$)	1,9 \pm 0,15	1,9 \pm 0,18	1,9 \pm 1,7
Нейтрофилы палочкоядерные	%	2,5 \pm 0,10	6,0 \pm 0,31*	4,8 \pm 0,27*,**
	абс. число/л ($\times 10^9$)	0,15 \pm 0,010	0,55 \pm 0,032*	0,42 \pm 0,012*,**
Нейтрофилы сегментоядерные	%	57,5 \pm 1,19	64,0 \pm 1,21*	61,3 \pm 1,20*,**
	абс. число/л ($\times 10^9$)	3,60 \pm 0,16	5,89 \pm 0,16*	5,39 \pm 0,15*,**
Моноциты	%	7,1 \pm 0,18	6,3 \pm 0,69	6,8 \pm 0,68
	абс. число/л ($\times 10^9$)	0,45 \pm 0,017	0,58 \pm 0,0064*	0,59 \pm 0,012*

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с показателями здоровых лиц; ** – $p < 0,05$ между показателями больных 1 и 2 групп.

ТАБЛИЦА 2. ФАГОЦИТАРНАЯ И БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНЫМ СИНУСИТОМ 1 И 2 ГРУПП И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ, $M \pm \sigma$

Показатели			Нейтрофилы	Моноциты
Фагоцитарное число (ФЧ), %	больные	1 группа	56,1 \pm 6,2*	54,8 \pm 6,5*
		2 группа	64,2 \pm 6,3	60,5 \pm 7,0*
	здоровые лица		75,6 \pm 7,2	76,0 \pm 7,0
Фагоцитарный индекс (ФИ)	больные	1 группа	3,2 \pm 0,4*,**	3,0 \pm 0,4*,**
		2 группа	4,4 \pm 0,4	4,1 \pm 0,5*
	здоровые лица		5,7 \pm 0,6	5,4 \pm 0,6
Число бактерий, выживших после фагоцитоза (БЦ), %	больные	1 группа	17,3 \pm 1,8*,**	18,1 \pm 1,9*,**
		2 группа	8,5 \pm 1,1*	10,3 \pm 1,1*
	здоровые лица		5,0 \pm 0,5	4,8 \pm 0,5

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с показателями здоровых лиц; ** – $p < 0,05$ между показателями больных 1 и 2 групп.

ТАБЛИЦА 3. ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ХГВС 1 И 2 ГРУПП И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ В ОТНОШЕНИИ ОПСОНИЗИРОВАННЫХ БАКТЕРИЙ, $M \pm \sigma$

Показатели	Сыворотка здоровых доноров		Повышение фагоцитоза, %	Аутосыворотка	Повышение фагоцитоза, %	
Нейтрофилы						
Фагоцитарное число (ФЧ), %	больные	1 группа	64,7±7,2*, **, ***	115,3	58,8±6,7**, ***	104,8
		2 группа	80,4±7,9*	125,2	76,9±7,9*	119,7
	здоровые лица		91,5±8,3*	121	91,4±8,3	121
Фагоцитарный индекс (ФИ)	больные	1 группа	5,3±0,6*, **, ***	165,6	3,2±0,3**, ***	0
		2 группа	7,6±0,7*, **	172,7	7,10±0,7*, **	161,3
	здоровые лица		9,6±0,6*	168,4	9,6±0,6	168,4
Моноциты						
Фагоцитарное число (ФЧ), %	больные	1 группа	61,9±7,1**	112,9	58,1±6,5**, ***	106,0
		2 группа	71,4±7,0**	118,0	69,4±7,0**	114,7
	здоровые лица		90,3±8,1	118,8	90,3±8,1	118,8
Фагоцитарный индекс (ФИ)	больные	1 группа	5,0±0,5*, **, ***	166,6	3,1±0,3**, ***	103,3
		2 группа	7,0±0,7*, **	170,7	6,4±0,5*, **	156,0
	здоровые лица		8,7±0,6*	161,1	8,7±0,6*	161,1

Примечания. 1. Повышение (%) фагоцитоза опсонизированных бактерий по сравнению с неопсонизированными бактериями. 2. * – $p < 0,05$ по сравнению с показателями фагоцитоза неопсонизированных бактерий в соответствующей группе обследованных; ** – $p < 0,05$ по сравнению с показателями здоровых лиц; *** – $p < 0,05$ между показателями больных 1 и 2 групп.

ТАБЛИЦА 4. СОДЕРЖАНИЕ CD11b⁺, CD16⁺, CD35⁺ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ И CD14⁺ КЛЕТОК СРЕДИ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНЫМ СИНУСИТОМ, ХРОНИЧЕСКИМ ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНЫМ СИНУСИТОМ 1 И 2 ГРУП И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ, М±σ

Показатели	Здоровые лица	Больные острым ГВС	Больные ХГВС	
			1 группа	2 группа
Нейтрофилы, %	60,0±1,20	73,4±1,80*	70,0±1,22*,**	66,1±1,20*
CD11b ⁺ клетки, %	26,8±3,18	47,1±5,30*	38,7±4,80*,**	42,5±4,91*
CD16 ⁺ клетки, %	32,5±3,83	54,8±6,00*	45,9±5,30*	49,1±5,72*
CD35 ⁺ клетки, %	28,9±3,15	43,7±5,90*	38,7±5,10*	41,2±5,31*
CD14 ⁺ клетки, %	6,1±0,7	5,9±0,2	5,8±0,2	5,9±0,2
Моноциты, %	7,1±0,18	7,0±0,18	6,3±0,69	6,8±0,68

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с показателями здоровых лиц; ** – $p < 0,05$ по сравнению с показателями больных острым гнойным верхнечелюстным синуситом (ГВС).

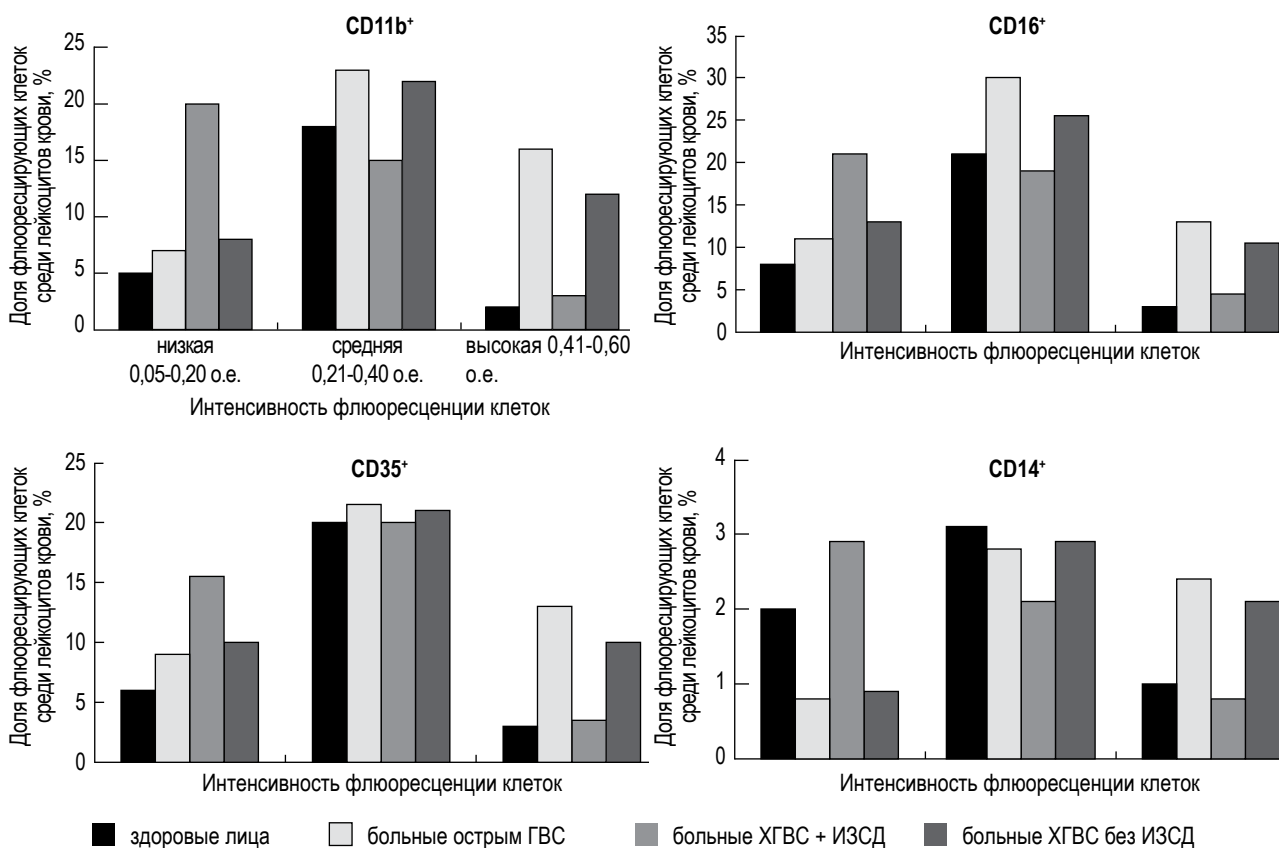


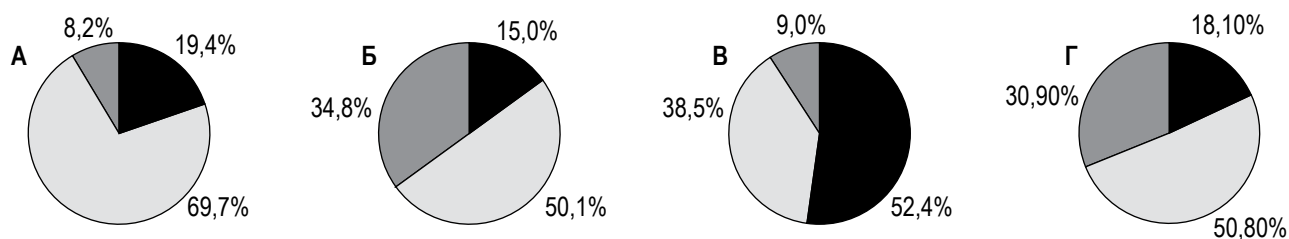
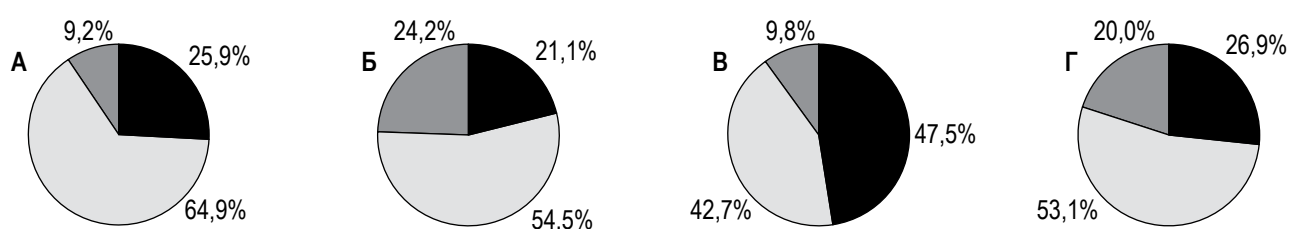
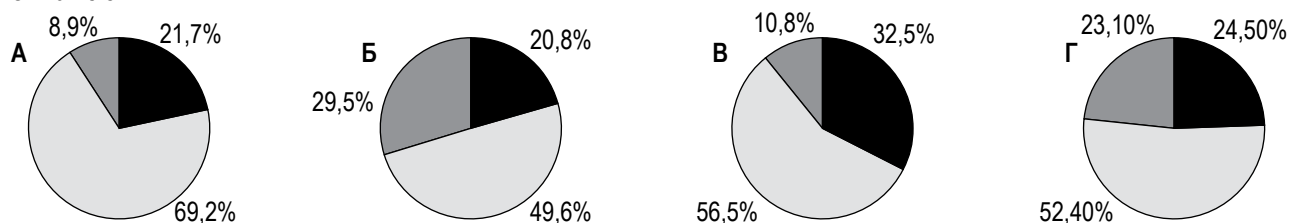
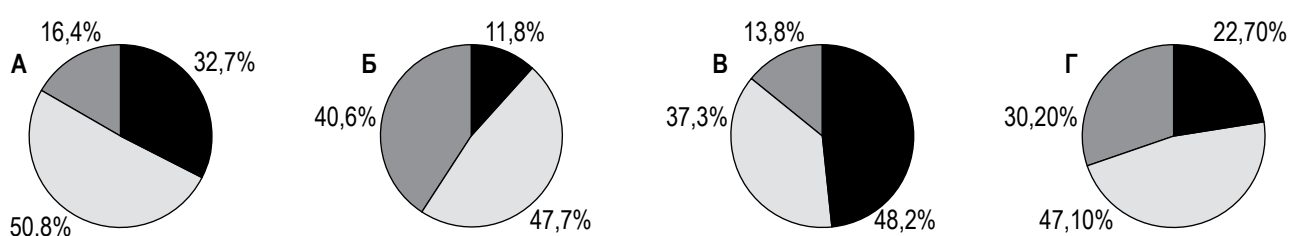
Рисунок 1. Интенсивность флуоресценции клеток, обработанных МАТ анти-CD11b, CD16, CD35, CD14, меченными ФИТЦ, больных острым синуситом, 1 и 2 групп и здоровых лиц

нина повышала фагоцитарную активность клеток больных 2 группы и здоровых лиц в несколько большей степени, чем больных 1 группы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у пациентов с хроническим верхнечелюстным синуситом, страдающих инсулинзависимым сахарным диабетом, снижены как опсонизирующие свойства самой сыворотки, так и фагоцитарная способность клеток; у больных ХГВС без ИЗСД достоверно снижена только фагоцитарная активность. Следует заметить, что при изучении антителообразующей способ-

ности было обнаружено, что у больных страдающих ИЗСД в отличие от больных без ИЗСД, достоверно снижена аффинность продуцируемых антител.

В следующей серии исследований было показано, что биоцидность клеток 1 и 2 групп тесно ассоциирована со сниженной внутриклеточной способностью продуцировать супероксидные радикалы. У пациентов 1 группы показатели индуцированного НСТ-теста составляли $22,7 \pm 2,16\%$, 2 группы – $25,2 \pm 2,34\%$, у здоровых лиц – $28,1 \pm 2,05\%$.

CD11b⁺ клетки**CD11b⁺ клетки****CD16⁺ клетки****CD35⁺ клетки**

■ низкая 0,05-0,20 о.е. □ средняя 0,21-0,40 о.е. ▒ высокая 0,41-0,60 о.е.

А – здоровые доноры Б – больные острой формой В – больные хронической формой Г – больные ХГВС без ИЗСД

Рисунок 2. Распределение клеток по интенсивности флюоресценции среди CD11b⁺, CD16⁺, CD35⁺ и CD14⁺ лейкоцитов больных острым синуситом, 1 и 2 групп и здоровых лиц

Учитывая, что фагоцитарная способность нейтрофилов и моноцитов находится в прямой зависимости от состояния их рецепторного аппарата, нами была исследована экспрессия основных молекул, ответственных за этот процесс. Молекула CD14 является специфическим маркером макрофагов, участвует в активации клеток, связывании бактерий и их фагоцитозе. CD11b/CD18 принимает участие в хемотаксисе и фагоцитозе, индукции респираторного взрыва, адгезии гранулоцитов и макрофагов к сосудистой стенке. CD16 является субъединицей низкоаффинного

Fc-рецептора фагоцитов, участвует в фагоцитозе Ig-опсонизированных микробов. CD35 – рецептор для C4b и C3b, участвует в адгезии клеток и фагоцитозе опсонизированных частиц.

Было показано, что у больных 1 и 2 группы наблюдается повышение числа клеток, экспрессирующих эти молекулы, по сравнению с группой здоровых лиц (табл. 4).

Однако при сравнении полученных данных с показателями больных острым верхнечелюстным синуситом было обнаружено, что количество клеток, экспрессирующих CD14, CD16, CD11b,

CD35, у больных 1 и 2 групп значительно меньше, чем у больных острым верхнечелюстным синуситом, а у лиц с ИЗСД достоверно ниже также плотность экспрессии этих молекул на клетках (рис. 1, 2).

Результаты теста иммунофлюоресценции свидетельствуют о том, что у больных 1 группы практически отсутствуют клетки с высокой степенью флюоресценции, а увеличение доли флюоресцирующих клеток главным образом происходит за счет слабофлюоресцирующих клеток. У больных 2 группы и острым верхнечелюстным синуситом это происходит за счет существенного повышения доли как средне- так и сильнофлюоресцирующих клеток.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что у больных хроническим верхнечелюстным синуситом, страдающих ИЗСД, в несколько большей степени, чем у больных ХГВС без ИЗСД, угнетена фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов, нарушены процессы захвата и киллинга бактерий. У пациентов с ИЗСД в отличие от пациентов без ИЗСД достоверно снижены опсонизирующие свойства сыворотки и плотность экспрессии молекул, ответственных за основные функции фагоцитарных клеток. Выявленные нарушения в фагоцитах больных ХГВС, страдающих ИЗСД, по-видимому, являются следствием структурно-функциональных перестроек их мембран. Проведенное нами ранее хроматографическое изучение фосфолипидного состава мембран нейтрофилов больных ХГВС, страдающих ИЗСД, показало относительное увеличение содержания в них ненасыщенных жирных кислот и нарушение равновесия насыщенные/ненасыщенные жирные кислоты. С помощью флюоресцентных зондов в мембранах этих клеток обнаружено нарушение белок-липидных взаимодействий, повышение полярности липидов, снижение ее микровязкости [5]. Подобные изменения в клетках больных ХГВС, не страдающих ИЗСД, не выявлены.

Представляется, что полученные данные помогут в выборе адекватной иммунокорректирующей терапии больных ХГВС, страдающих ИЗСД.

Список литературы

1. Антонив В.Ф., Кравченко Д.В., Кравченко А.В., Малета И.И., Короткова Т.В. Изменения общего и местного иммунитета у больных с острыми и хроническими гнойными синусита-

ми под воздействием регионарной лимфотропной иммуностимулирующей терапии // Вестн. оториноларингологии. — 1998. — № 3. — С. 28-30.

2. Балаболкин М.И. Состояние и перспективы борьбы с сахарным диабетом // Пробл. эндокринологии. — 1997. — Т. 43, № 6. — С. 3-9.

3. Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К., Виחותь Н.Е. Иммунология: Практикум. — Киев: Выща школа, 1989. — С. 274-275.

4. Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К., Виחותь Н.Е. Иммунология: Практикум. — Киев: Выща школа, 1989. — С. 278-280.

5. Попов Н.Н., Огнивенко Е.В. Физико-химические и биологические свойства мембран нейтрофильных гранулоцитов больных хроническим гнойным верхнечелюстным синуситом, страдающих сахарным диабетом // Журн. эксперим. клинич. медицины. — 2007. — № 3. — С. 8-12.

6. Хмельницкая Н.М., Рязанцев С.В., Кокряков В.Н., Воробьев К.В., Алешина Г.М., Тырнова Е.В., Клячко Л.Л., Косенко В.А., Аль-Махбаши М. Оценка иммунного статуса слизистых оболочек при хроническом риносинусите // Вестн. оториноларингологии. — 1998. — № 4. — С. 47-50.

7. Штерх В., Эммрих И. Определение клеточных маркеров методом мембранной иммунофлюоресценции // Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. — М.: Медицина, 1987. — С. 254-268.

8. Эккерт Р. Разделение клеток иммунной системы // Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. — М.: Медицина, 1987. — С. 244-248.

9. Бесшапочный С.Б., Лобурець В.В. Зміни слизової оболонки верхньощелепної пазухи при хронічному синуситі // X съезд оториноларингологов Украины (Судак, 11-15 мая 2005 г.): Тез. докл. — Киев, 2005. — С. 449-450.

10. Заболотний Д.І., Луценко В.І., Розкладка А.І. Показники електропровідності в репрезентативних біологічно активних точках у хворих на хронічний синусит // Ринологія. — № 2. — 2003. — С. 26-29.

11. Nielsen S.L., Blak F.T., Storgaard V., Obel N. Evaluation of a method for measurement of intracellular killing of staphylococcus aureus in human neutrophil granulocytes // APMIS. — 1995. — N 103. — P. 460-468.

поступила в редакцию 30.06.2007

отправлена на доработку 15.07.2007

принята к печати 25.02.2008