

МЕСТНЫЙ ИММУНИТЕТ ГНОЙНЫХ РАН

Шмагель К.В.¹, Зубарева Н.А.², Ренжин А.В.²

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь

² Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера, г. Пермь

Резюме. Целью настоящего исследования было определение микробного пейзажа и роли факторов иммунитета пустулезного содержимого в развитии локальной гнойной инфекции у хирургических больных. Показано, что в этиологии инфекции ведущая роль принадлежит *Staphylococcus aureus*. Количество клеток крови в гнойнике прямо и достоверно коррелировало с числом живых микробных тел в экссудате. Содержимое гнойных ран по сравнению с чистыми ранами характеризовалось присутствием высоких концентраций IL-1 β и IL-8 и относительно низких концентраций TNF α . Концентрация IgG в пустулезном содержимом вскрытого гнойника в 5 раз превышала уровень IgG жидкости стерильных разрезов. У пожилых людей по сравнению с молодыми в очагах бактериального воспаления меньше вырабатывается TNF α и более активно синтезируется IL-8. Показатели местного иммунитета гнойных очагов и стерильных ран имеют существенные отличия.

Ключевые слова: местный иммунитет, гнойная инфекция, цитокины, иммуноглобулины.

Shmagel K.V., Zubareva N.A., Renzhin A.V.

LOCAL IMMUNITY PATTERNS IN PURULENT WOUNDS

Abstract. The aim of present study was to determine the microbial pattern and a significance of local pustular immune factors for the progression of local pyogenic infection in surgical patients. To these purpose, specific infectious pathogens were identified and scored by means of conventional microbiological methods in the patients with pyogenic inflammatory diseases of skin and subcutaneous fat tissues. The numbers of purulent leukocytes were determined in the pustular exudates, and concentrations of TNF α , IL-1 β , IL-8, IFN- γ , IL-4, IL-1ra, IgM, IgG, and IgA were measured in the samples, using enzyme immunoassay techniques. Appropriate parameters of effluents obtained from "clean" (non-infected) surgical lesions were taken as controls. It has been shown that *Staphylococcus aureus* plays a leading role in etiology of bacterial infections in our patients. The amounts of blood cells in pustular samples showed a direct and significant correlation with number of viable microorganisms derived from the effluent. Purulent wound exudates were characterized by high IL-1 β and IL-8 concentrations, along with relatively low TNF α levels, as compared with "clean" wounds. Mean amounts of IgG in the pustular contents of dissected lesions proved to be five-fold higher that IgG levels in sterile incisions. As compared with young individuals, the elderly persons are characterized by lesser TNF α production, as well as by more active IL-8 synthesis in the areas of bacterial inflammation. The indexes of local immunity show sufficient differences between the areas of suppurative inflammation and sterile wound lesions. (*Med. Immunol., vol. 12, N 4-5, pp 393-398*)

Key words: local immunity, pyogenic infection, cytokines, immunoglobulins.

Введение

Проблема локальной гнойной хирургической инфекции является весьма актуальной [4, 7, 11, 15]. Как правило, развитие заболевания

обусловлено проникновением бактерий в ткани на фоне нарушения целостности кожных покровов. В этиологии инфекции ведущая роль принадлежит *Staphylococcus aureus* [11] особенно его метициллин-резистентным формам, доля которых неуклонно возрастает в течение последних десятилетий [4, 15]. Приблизительно 20% населения постоянно колонизировано *S. aureus*, а 60% подвержено периодической колонизации [7].

Несмотря на то, что инвазия *S. aureus* сопровождается активной реакцией системы иммунитета, данный микроб оказался весьма устойчивым

Адрес для переписки:

Шмагель Константин Владимирович

ИЭГМ УрО РАН,

614081, г. Пермь, ул. Голева, 13.

Тел.: (342) 244-67-12.

Факс: (342) 244-67-11.

E-mail: shmagel@iegm.ru

к действию многих защитных факторов макроорганизма: специфическим антителам [12], лизоциму [5], комплементу [6, 14], кислород-зависимым механизмам бактерицидности [9]. Это в значительной мере объясняет причины обширности формируемых гнойников и выраженности местной деструкции. Сказанное определяет необходимость дальнейшего изучения роли иммунных механизмов в развитии гнойных процессов, особенно их проявлений в локальных защитных реакциях.

Целью настоящего исследования было определение микробного пейзажа и роли факторов иммунитета пустулезного содержимого в развитии локальной гнойной инфекции у хирургических больных.

Материалы и методы

Проведено исследование раневого отделяемого 35 пациентов, находившихся на лечении в отделении экстренной хирургии МУЗ ГKB № 4 г. Перми. Основную группу обследованных больных составили 19 человек (9 женщин и 10 мужчин) с гнойно-воспалительными процессами кожи и подкожной клетчатки. Средний возраст этих больных был $40,2 \pm 4,4$ лет. Нозологическая структура гнойных заболеваний: 13 (68,4%) — флегмоны конечностей, ягодичной и подмышечной областей, 6 (31,6%) — постинъекционные абсцессы. Всем пациентам выполнено вскрытие и дренирование гнойного очага с последующим назначением системной антибактериальной терапии и проведением перевязок. Лечение у всех 19 пациентов сопровождалось положительной клинической и лабораторной динамикой течения воспалительного процесса.

Группа сравнения включала 16 человек (женщин — 11, мужчин — 5), подвергнутых различным

условно-чистым оперативным вмешательствам: холецистэктомия — 5 (31,2%), спленэктомия — 1 (6,2%), аппендэктомия — 2 (12,5%), грыжесечение — 1 (6,2%), ампутация конечности — 5 (31,2%), резекция желудка — 2 (12,5%). Средний возраст обследованных: $47,1 \pm 12,4$ лет. Послеоперационный период протекал без осложнений.

Раневой экссудат у пациентов основной группы забирали с помощью стерильного шприца сразу после выполнения разреза, а затем при проведении перевязок на 1 и 3 сутки после операции.

Подсчет лейкоцитов раневого отделяемого осуществляли в камере Горяева после разведения 3% уксусной кислотой. Дифференциацию клеток проводили в мазках, окрашенных по Романовскому—Гимзе.

Для определения локальных концентраций цитокинов и иммуноглобулинов экссудат центрифугировали (1500 g, 5 мин). Далее использовали оригинальную методику сбора и хранения материала [2]. Надосадочной жидкостью пропитывали стандартные круглые диски хроматографической бумаги диаметром 6 мм и поглотительной емкостью 5 мкл. Затем диски высушивали при комнатной температуре и хранили в герметичной посуде при -20°C . Перед проведением исследования содержимое диска экстрагировали в 100 мкл 0,15M раствора NaCl. Содержание TNF α , IL-1 β , IL-8, IFN γ , IL-4, IL-1ra, IgM, IgG, IgA определяли иммуноферментным анализом с помощью наборов ЗАО «Вектор-Бест».

Микробиологическое исследование гнойных экссудатов было проведено общепринятым методом у 15 больных основной группы (78,9%) сразу после вскрытия гнойника. Положительные результаты посевов получены во всех случаях.

В группе сравнения из-за крайней скудости объема раневого отделяемого удалось оценить только локальные уровни цитокинов и имму-

ТАБЛИЦА 1. КЛЕТочный состав гнойного содержимого, установленный сразу после хирургического вскрытия бактериального очага

Показатели	Лейкоциты	Нейтрофилы	Лимфоциты	Моноциты	Эозинофилы
Относительные значения (%)		68,4 \pm 3,5	17,4 \pm 2,9	10,2 \pm 2,0	3,9 \pm 0,8
Логарифм абсолютных значений (M \pm m)	11,8188 \pm 0,3867	11,3965 \pm 0,4242	9,8028 \pm 0,3077	9,4369 \pm 0,4013	8,9023 \pm 0,4198
Средняя геометрическая и ее границы* ($\times 10^9$ /л)	135,8 (25,2-732,7)	89,0 (14,0-565,5)	18,1 (4,7-69,1)	12,5 (2,3-68,8)	7,4 (1,5-35,3)

Примечание. * — границы средней геометрической представлены в диапазоне $\pm 1\sigma$.

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ КОРРЕЛЯЦИОННОГО АНАЛИЗА ЗАВИСИМОСТИ ЧИСЛЕННОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ЛЕЙКОЦИТОВ В РАНЕ ОТ СТЕПЕНИ ЕЕ ИНФИЦИРОВАННОСТИ

Исследованные связи	Статистические показатели анализа				
	r*	r ²	t _{Стьюд.}	P	N
«Число микробов – Число лейкоцитов»	0,708	0,502	3,47	0,005	14
«Число микробов – Число нейтрофилов»	0,687	0,471	3,27	0,007	14
«Число микробов – Число лимфоцитов»	0,591	0,349	2,54	0,026	14
«Число микробов – Число моноцитов»	0,730	0,533	3,70	0,003	14
«Число микробов – Число эозинофилов»	0,793	0,629	3,68	0,006	10

Примечание.* – коэффициент корреляции Пирсона.

ноглобулинов. Забор материала осуществляли однократно перед завершением операции путем пропитывания бумажных дисков (см. выше) раневым содержимым.

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики [1]. Сравнение средних величин проводили на основе t-критерия Стьюдента. В случаях отсутствия нормального распределения в выборках использовали средние геометрические. Для исследования зависимостей между параметрами применяли корреляционный анализ Пирсона.

Результаты и обсуждение

Посевы гнойного отделяемого показали, что в 93,4% случаев этиологическим фактором инфекции являлся стафилококк: *Staphylococcus aureus* — 73,3%; *Staphylococcus warneri* — 13,3%; *Staphylococcus epidermidis* — 6,6%; *Klebsiella pneumoniae* — 6,6%. При этом количество бактерий при вскрытии гнойника варьировало от 10³/мл до 10⁸/мл (средняя геометрическая — 10,2 x 10⁶/мл).

Подсчет численности лейкоцитов при хирургическом опорожнении очага выявил значительное их накопление в гнойном содержимом (табл. 1). При анализе лейкоцитарной формулы не было обнаружено существенных сдвигов относительного содержания различных типов лейкоцитов, хотя их абсолютные значения были весьма внушительны. Полученные данные свидетельствуют о том, что при гнойном воспалении в зону инфекции мигрируют все типы лейкоцитов.

Зависимость интенсивности миграции в зону воспаления различных типов лейкоцитов от численности бактерий, присутствующих в очаге, была исследована с помощью корреляционного

анализа (табл. 2). Установлено, что количество клеток крови в гнойнике прямо и достоверно коррелировало с числом микробных тел в экссудате. При этом поступление всех основных типов лейкоцитов в зону инфекционного воспаления определялось, главным образом, степенью инфицированности раны.

Сравнение уровней основных провоспалительных цитокинов в раневых экссудатах стерильных и гнойных ран (рис. 1) выявило существенные различия в их концентрациях. В отделяемом ран, произведенных при плановых операциях (в дальнейшем «условно чистых ран»), было отмечено достаточно высокое содержание TNFα (8,5±1,2 нг/мл). IL-1β и IL-8 обнаруживались лишь в следовых концентрациях. В то же время в жидкости гнойников, напротив, были зафиксированы относительно низкие уровни TNFα (в момент вскрытия гнойника в 3 раза ниже, чем в экссудатах условно чистых ран; p < 0,005) и высокие концентрации IL-1β и IL-8 (при вскрытии гнойника, соответственно, 11,3±2,2 нг/мл и 15,1±2,2 нг/мл). Статистические различия для двух последних показателей при сравнении с уровнями тех же цитокинов в условно чистых ранах были высоко достоверны: p << 0,001. В процессе заживления инфицированных ран (период до 3-х суток) в экссудатах отмечалось выраженное снижение содержания всех трех медиаторов воспаления. Таким образом, содержимое гнойных ран по сравнению с условно чистыми ранами характеризуется присутствием высоких концентраций IL-1β и IL-8 и относительно низких концентраций TNFα.

Исследование в экссудатах содержания IFNγ и IL-4 (их уровни могут отражать запрос на дифференцировку хелперных Т-лимфоцитов по Th1-

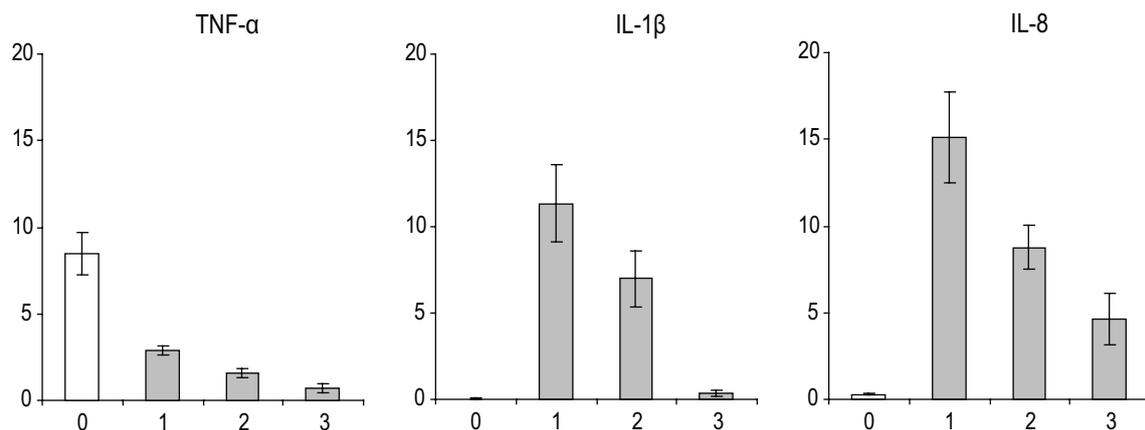


Рисунок 1. Локальные концентрации TNF α , IL-1 β и IL-8 в стерильных и гнойных ранах

Примечание. По осям абсцисс: 0 – чистые раны, 1, 2, 3 – гнойные раны, соответственно, в момент вскрытия гнойника, через 1 сутки и 3 суток после операции; по осям ординат: концентрации цитокинов (нг/мл) в экссудатах.

или Th2-пути) выявило следующие закономерности (рис. 2). В момент вскрытия гнойника концентрация IFN γ в отделяемом была в 2 раза выше по сравнению с соответствующим показателем условно чистых ран. При этом большой разброс данных не позволил выявить статистически значимых различий ($p > 0,05$). Вместе с тем, в гнойных очагах средний уровень IL-4 был достоверно ниже, чем в условно неинфицированных ранах. Дренажирование пустулезных ран и их заживление сопровождалось снижением концентраций IFN γ на фоне стабилизированных уровней IL-4. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что в динамике развития инфекционного воспаления происходят локальные изменения в синтезе различных цитокинов. Примечательно, что быстрое снижение на фоне лечения уровня IL-1 β в гнойном содержимом (рис. 1) сопровождалось столь же интенсивным падением концентрации его рецепторного антагониста IL-1ra (рис. 2).

Поступление иммуноглобулинов в зону воспаления обеспечивает усиление фагоцитарной активности лейкоцитов. Исследование содержания IgM, IgG и IgA в экссудатах показало (рис. 3), что в гнойных очагах по сравнению с чистыми ранами присутствует существенно больше иммуноглобулинов. Это обусловлено, главным образом, притоком IgG. Его концентрация в пустулезном содержимом только что вскрытого гнойника в 5 раз превышала уровень IgG жидкости условно стерильных разрезов (соответственно: $3,4 \pm 0,9$ мг/мл и $0,7 \pm 0,1$ мг/мл; $P < 0,01$). Различий в содержании IgM и IgA в отделяемом условно чистых и гнойных ран обнаружено не было.

Таким образом, полученные результаты показали, что развитие местного гнойного процесса сопровождается не только выраженной миграцией лейкоцитов в зону воспаления, но и повышенным притоком IgG. Вместе с тем, цитокиновый спектр гнойных очагов существенно отличается

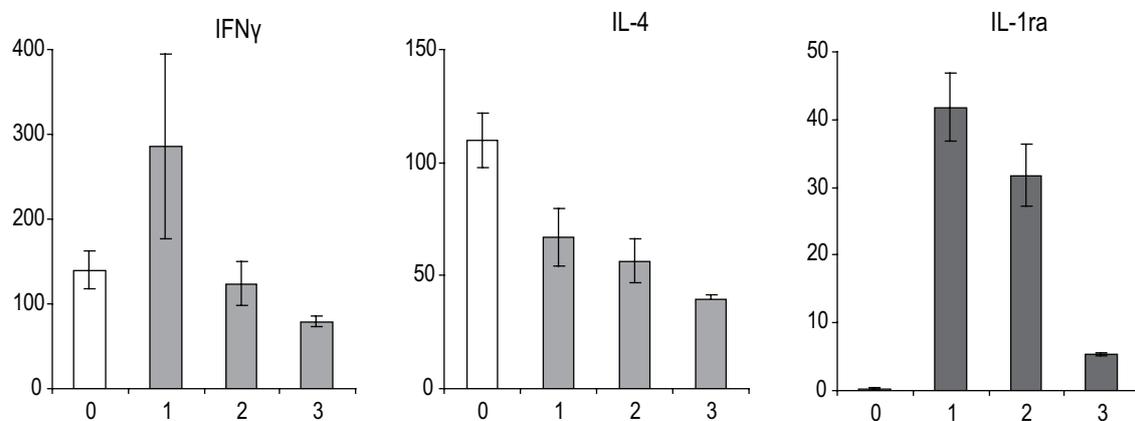


Рисунок 2. Локальные концентрации IFN γ , IL-4 и IL-1ra в стерильных и гнойных ранах

Примечание. По осям абсцисс: 0 – чистые раны, 1, 2, 3 – гнойные раны, соответственно, в момент вскрытия гнойника, через 1 сутки и 3 суток после операции; по осям ординат: концентрации цитокинов - IFN γ (нг/мл), IL-4 (нг/мл) и IL-1ra (нг/мл) – в экссудатах.

от цитокинового спектра условно чистых ран. В пустулезной жидкости присутствуют высокие концентрации IL-1 β , IL-1 α и IL-8. В экссудате условно чистых ран фиксируются их следы. В то же время в условно стерильных ранах обнаруживается больше TNF α и IL-4.

Роль IL-8 в качестве хемоаттрактанта нейтрофилов хорошо известна [8]. Поэтому, его высокое содержание в гнойном очаге представляется вполне логичным. Однако корреляционный анализ связи «концентрация IL-8 - число нейтрофилов» выявил обратную зависимость между этими параметрами. В момент вскрытия гнойника: $r = -0,705$, $P < 0,02$; через сутки: $r = -0,544$, $p < 0,03$. Причина обнаруженного парадокса пока трудно объяснима и требует, на наш взгляд, отдельного исследования. При анализе зависимости численности различных типов лейкоцитов от концентраций других цитокинов была установлена важная роль TNF α (связи с уровнями остальных тестированных цитокинов обнаружено не было). Его локальные уровни у пациентов с гнойными процессами прямо и достоверно коррелировали с числом клеток в очаге воспаления. В момент вскрытия гнойника обнаружены следующие зависимости: «уровень TNF α число лейкоцитов», $r = 0,523$, $p = 0,02$; «уровень TNF α - число нейтрофилов», $r = 0,508$, $p < 0,03$; «уровень TNF α число моноцитов», $r = 0,537$, $p = 0,02$. Через сутки сохранялись первые две зависимости, а последняя сменилась на новую: «уровень TNF α число лейкоцитов», $r = 0,669$, $p < 0,01$; «уровень TNF α число нейтрофилов», $r = 0,644$, $p = 0,01$; «уровень TNF α число лимфоцитов», $r = 0,678$, $p = 0,005$. Следовательно, приток лейкоцитов в очаг гнойного воспаления обусловлен не только действием бактериального фактора (см. табл. 2), но и влиянием TNF α . Важно отметить, что у больных с локальными гнойными инфекциями продукция TNF α и IL-8 зависела от возраста (связь «уровень IL-8 возраст пациентов»: $r = 0,718$, $p = 0,001$; связь «уровень TNF α возраст пациентов»: $r = -0,509$, $p < 0,05$). То есть, у пожилых людей по сравнению с молодыми в очагах бактериального (стафилококкового) воспаления меньше вырабатывается TNF α и более активно синтезируется IL-8.

Разнонаправленное влияние TNF α и IL-8 на миграцию лейкоцитов, установленные нами *in vivo* при развитии гнойной инфекции, их связь с возрастом больных, на наш взгляд, заслуживают внимания.

Повышенное содержание TNF α и IL-4 в условно чистых ранах, скорее всего, является отражением ранней реакции тканей на механическое повреждение. TNF α не только является мощным провоспалительным фактором, но также регулирует процессы регенерации. У мышей

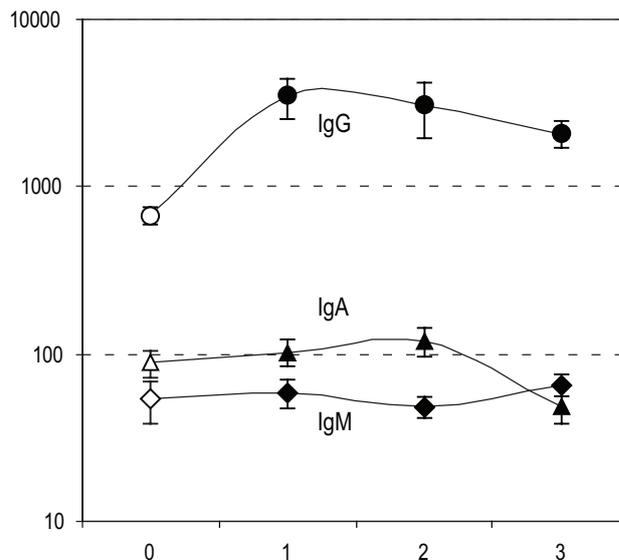


Рисунок 3. Локальные концентрации IgM, IgG и IgA в стерильных и гнойных ранах

Примечание. По оси абсцисс: 0 – чистые раны, 1, 2, 3 – гнойные раны, соответственно, в момент вскрытия гнойника, через 1 сутки и 3 суток после операции; по оси ординат: концентрации иммуноглобулинов в экссудатах (мкг/мл).

с нокаутом гена *tnf α* нарушено заживление кожных ран: наблюдается избыточное образование грануляций, замедлена эпителизация [13]. Повышение уровня IL-4 необходимо для альтернативной активации макрофагов, что в дальнейшем обеспечивает пролиферацию фибробластов и синтез коллагена [10].

Известно, что длительное присутствие высоких концентраций TNF α и IL-1 β в ране блокирует ее заживление. Эти медиаторы усиливают продукцию желатиназ, коллагеназ, металлопротеиназ, что вызывает не только разрушение экстрацеллюлярного матрикса, но также ростовых факторов и их рецепторов [3]. Наличие бактерий в зоне воспаления поддерживает высокий уровень провоспалительных цитокинов. Поэтому опорожнение гнойника с последующим дренированием раны и проведением антибактериальной терапии является важнейшим мероприятием, направленным на заживление инфекционного очага.

Исследование выполнено при поддержке Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

Список литературы

1. Брандт З. Статистические методы анализа наблюдений: Пер. с англ. – М.: Мир, 1975. – 312 с.
2. Шмидт Д.В., Шмагель К.В., Мозговая Л.А., Беляева О.В. Состояние местного иммунитета у больных с хроническим генерализованным па-

- родонитом // Стоматология. – 2008. – № 4. – С. 33-38
3. Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M.S., Brem H., Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing // *Wound Rep. Reg.* – 2008. – Vol. 16. – P. 585-601.
4. Bartlett J.G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections // *Top. HIV Med.* – 2008. – Vol. 16, N 5. – P. 151-155.
5. Bera A., Herbert S., Jakob A., Vollmer W., Gotz F. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus* // *Mol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 55, N 3. – P. 778-787.
6. Cunnion K.M., Zhang H.M., Frank M.M. Availability of complement bound to *Staphylococcus aureus* to interact with membrane complement receptors influences efficiency of phagocytosis // *Infect. Immun.* – 2003. – Vol. 71, N 2. – P. 656-662.
7. Fournier B. and Philpott D.J. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2005. – Vol. 18. – P. 521-540.
8. Kobayashi Y. Neutrophil infiltration and chemokines // *Crit. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 26, N 4. – P. 307-316.
9. Liu G.Y., Essex A., Buchanan J.T., Datta V., Hoffman H.M., Bastian J.F., Fierer J., Nizet V. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 202, N 2. – P. 209-215.
10. Martinez F.O., Helming L., Gordon S. Alternative activation of macrophages: An immunologic functional perspective // *Annu. Rev. Immunol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 451-483.
11. Owens C.D., Stoessel K. Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention // *J. Hosp. Infect.* – 2008. – Vol. 70, Suppl. 2. – P. 3-10.
12. Palmqvist N., Foster T., Tarkowski A., Josefsson E. Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death // *Microb. Pathog.* – 2002. – Vol. 33, N 5. – P. 239-249.
13. Shinozaki M., Okada Y., Kitano A., Ikeda K., Saika S., Shinozaki M. Impaired cutaneous wound healing with excess granulation tissue formation in TNF-null mice // *Arch. Dermatol. Res.* – 2009. – Vol. 301, N 7. – P. 531-537.
14. Wakabayashi G., Gelfand J.A., Jung W.K., Connolly R.J., Burke J.F., Dinarello C.A. *Staphylococcus epidermidis* induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. Comparison to *Escherichia coli*. // *J. Clin. Invest.* – 1991. – Vol. 87. – P. 1925-1935.
15. Whitman T.J. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections // *Dis. Mon.* – 2008. – Vol. 54, N 12. – P. 780-786.
- поступила в редакцию 09.12.2009*
отправлена на доработку 11.01.2010
принята к печати 23.06.2010