

## ПОКАЗАТЕЛИ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОЦИТОВ И ПРОФИЛЯ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ ПРИ РОЖИСТОМ ВОСПАЛЕНИИ РАЗЛИЧНОЙ ТЯЖЕСТИ

О. А. Беляева, В. Г. Шендрик, Л. В. Кузнецова

Национальная медицинская академия последиplomного образования имени П. Л. Шупика МЗ Украины, г. Киев

## INDICATORS OF PHAGOCYTOTIC ACTIVITY OF MONOCYTES AND CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH ERYSIPELAS OF VARYING SEVERITY

O. A. Belyaeva, V. G. Shendrik, L. V. Kuznetsova

Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv

В последнее время отмечено увеличение распространенности РВ и склонности его к рецидивированию, что выявляют у 35 — 45% больных [1, 2]. РВ считают тяжелой эпидемической болезнью с опасными осложнениями и высокой летальностью [3, 4]. Убытки от РВ составляют более 10% в структуре экономических затрат на все заболевания стрептококковой этиологии [5]. Летальность при некротической форме РВ составляет от 5,8 до 21% [6, 7].

В настоящее время не существует надежных методов профилактики РВ, не разработаны методы предупреждения рецидивов. Недостаточно внимания уделено нарушениям иммунитета при РВ и их коррекции.

Цель исследования: повысить эффективность лечения больных по поводу РВ и предотвратить возникновение осложнений путем иммунокоррекции с применением иммунодина.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведены иммунологические исследования у 51 больного, которых лечили по поводу РВ в хирургическом отделении КГКБ № 6 в 2014 г. Эритематозная форма РВ выявлена у 22 (43,1%) пациентов, эритематозно-буллезная — у 2 (3,9%), эритематозно-геморрагическая — у 2 (3,9%), буллезно-геморрагическая — у 3 (5,9%), флегмонозная — у 4 (7,9%), некротическая — у 18 (35,3%). Мужчин было 21 (41,7%),

**Реферат**  
Рожистое воспаление (РВ) — тяжелое заболевание, которое сопровождается тяжелыми осложнениями и высокой летальностью. Проведены иммунологические исследования у 51 пациента, которых лечили в клинике по поводу РВ с использованием иммуномодулятора. Отмечены изменения показателей фагоцитарной активности моноцитов (ФАМ) и профиля цитокинов у больных при РВ. Применение в комплексе лечения иммуномодулятора положительно влияло на показатели ФАМ.  
**Ключевые слова:** рожистое воспаление; фагоцитарная активность моноцитов; профиль цитокинов; лечение, иммунокоррекция.

**Abstract**  
Erysipelas (PB) — a serious disease that is accompanied by severe complications and high lethality. The immunological investigations were carry out in 51 patients who were treated at the clinic for erysipelas with an immunomodulator application. Marked changes in the indices of phagocytic activity of monocytes (PHAM) and the cytokine profile in patients with erysipelas were note. Application in complex treatment of immunomodulator give the positive effect on the indices of PHAM.  
**Keywords:** erysipelas; phagocytic activity of monocytes; profile of cytokines; treatment, immunocorrection.

женщин — 30 (58,3%). Возраст больных от 31 года до 86 лет. Поражение плеча и предплечья отмечено у 4 (7,8%), стоп — у 5 (9,8%), бедра — у 1 (2,0%), кисти — у 3 (5,9%), голени — у 38 (74,5%) пациентов.

Диагноз РВ устанавливали на основе анализа клинических проявлений: острое начало, озноб, повышенные температуры тела до 38 — 39 °С, симптомы общей интоксикации, появление областей отека и гиперемии с четкими контурами в виде "языков пламени", образование булл и очагов кровоизлияния. Разгар заболевания отмечали в сроки от нескольких часов до 1 — 2 сут после возникновения первых признаков и характеризовался максимальными общими (интоксикация, лихорадка), а также местными (гиперемия,

отек, буллы) проявлениями. У пациентов диагностированы также сопутствующие заболевания: ишемическая болезнь сердца, атеросклеротический кардиосклероз, гипертоническая болезнь, мерцательная аритмия, сахарный диабет, варикозная болезнь нижних конечностей, посттромбофлебитический синдром, гиперплазия предстательной железы, гломерулонефрит.

Всем больным проведено комплексное обследование с применением лабораторных (общий анализ крови и мочи, биохимический анализ крови, определение содержания глюкозы в крови, коагулограмма), а также инструментальных (ЭКГ, рентгенография) методов. Тяжесть состояния больных оценивали на основании определения тяжести

эндогенной интоксикации с использованием лейкоцитарного индекса интоксикации (ЛИИ).

У больных до и после лечения проведены иммунологические исследования, изучено влияние иммуномодулятора (иммодин) на показатели иммунитета. У 6 больных РВ возникло на фоне хронической венозной недостаточности в стадии трофической язвы. У 25 больных (основная группа) в комплексе базисной терапии назначали иммудин, у 26 (группа сравнения) — применяли стандартное лечение. Больные в группах распределены на подгруппы: а — до лечения, б — после лечения. В зависимости от тяжести состояния выделяли РВ легкой степени (I), средней тяжести (II), тяжелое (III). В основной группе РВ легкой степени выявлено у 8 (32%) пациентов, средней тяжести — у 11 (44%), тяжелое — у 6 (24%); в группе сравнения — соответственно у 7 (26,9%), 13 (50%) и 6 (23,1%). В качестве контроля анализировали иммунологические показатели у 20 практически здоровых лиц — доноров крови. Поскольку при РВ легкой степени показатели иммунитета достоверно не изменялись, иммуномодуляторы не назначали, обследование после лечения не проводили. В комплексе лечения всех больных применяли антибактериальную терапию, витаминотерапию, дезинтоксикационную, противовоспалительную, антигистаминную, антикоагулянтную, гепато— и ангиопротекторную терапию. Практически всех больных госпитализировали в неотложном порядке, кровь для анализа иммунологических показателей забирали сразу после госпитализации и в динамике.

Препарат иммудин относится к иммуностропным препаратам, в его состав входит низкомолекулярное вещество, полученное из диализата лейкоцитов периферической крови (сертификат о государственной регистрации от 26.11.08).

Для оценки иммунологической реактивности организма до и после лечения РВ определяли ФАМ. Исследование проводили с использованием оригинального метода [8]. В каче-

стве тест—объекта использовали живую суточную культуру *S. aureus* (штамм 505), в некоторых исследованиях — также культуру *S. pyogenes* (штамм 18), выделенную в очаге воспаления у больного РВ. Определяли такие показатели ФАМ: фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ), индекс переваривания (ИП) [9, 10].

Содержание цитокинов в сыворотке крови определяли спектрофотоколориметрическим методом с использованием набора реактивов для иммуноферментного анализа (ИФА) фирм IBL (Гамбург, Германия) (ИЛ—1 $\beta$ , ИЛ—2, ИЛ—4, ИФН— $\gamma$ ) и Innogenetics NV (Бельгия) (ФНО— $\alpha$ ) на полуавтоматическом спектрофотоколориметрическом анализаторе Statfax фирмы Labsystems (Финляндия). По построенному графику линейной зависимости концентрации исследованных цитокинов от оптической плотности (ОП) определяли содержание веществ в образцах.

Метод ИФА — твердофазный энзимосвязанный иммуносорбентный анализ (ELISA), основанный на принципе бутерброда. Микрогнезда покрыты антителами, направленными на антигенную детерминанту (реагирующая с антителом часть антигена) молекулы антигена (ИФН— $\gamma$ , ИЛ—1 $\beta$ , ИЛ—2, ИЛ—4, ФНО— $\alpha$ ). Аликвоты сыворотки крови пациента инкубировали в центрах, покрытых первичными антителами, любой исследованный антиген связывался с этим антителом. Биотинилированное вторичное антитело (Б—Ат), направленное на другую область молекулы антигена, связывалось с ним, образуя бутерброд. После инкубации несвязанные Б—Ат вымывали. Добавляли конъюгат стрептовидинпероксидазы, который связывался в комплекс с остатком на стенке лунок биотина. После добавления субстрата ТМФ (ферментный субстрат) интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации антигена в пробе. Измеренные значения ОП для стандартов использовали для построения калибровочной кривой, по отношению к которой вычисляли неизвестные пробы. Все исследования

проводили при температуре 25°C, для оценки результатов ИФА использовали длину волны 450 нм. При спонтанном синтезе клетки крови инкубировали в течение 7 ч при температуре 37°C и стимулировали липополисахаридом (ЛПС) *Escherichia coli* (серотип 055:B5, 10 мкг/мл) "Sigma". Количественное определение синтеза цитокинов проводили через 3 ч от начала инкубации с интервалом 1 ч. Пробирки охлаждали, центрифугировали в течение 10 мин при скорости 800 г, супернатант отбирали и охлаждали. Цитокины выделяли специфическим методом ИФА. Вначале определяли оптимальные параметры стимуляции синтеза цитокинов клетками крови, что позволяло завершить первую фазу эксперимента (инкубацию) в течение 6 — 8 ч [10].

Полученный цифровой материал обработан методом вариационной статистики с определением показателей достоверности по Стьюденту и вероятности различий. Для выявления взаимосвязей между показателями использовали корреляционный анализ. Достоверность результатов считали установленной, если вероятность менее 95% ( $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено иммунологическое исследование показателей ФАМ у больных при РВ. Проанализированы иммунные показатели, характеризующие функциональное состояние моноцитарно—фагоцитарной системы (МФС).

Все показатели были существенно снижены по сравнению с таковыми в норме. Так, ФЧ до лечения было в среднем в 1,6 раза ниже нормы и составляло  $2,5 \pm 0,31$  ( $p < 0,05$ ). После базисной терапии с применением иммудина оно увеличилось в 1,4 раза, достигая значений нормы —  $3,6 \pm 0,04$ , в норме  $4,0 \pm 0,05$  ( $p < 0,05$ ). ФИ до лечения был снижен в 1,9 раза —  $(15,4 \pm 1,6)\%$  по сравнению с таковым в норме —  $(28,8 \pm 2,2)\%$ . После лечения он увеличился в 1,7 раза и составлял  $(26,6 \pm 1,8)\%$ . ИП был в 2,6 раза ниже нормы — со-

Таблица 1. Показатели ФАМ у больных при РВ различной тяжести до и после лечения

Группы обследованных	Период наблюдения	Степень тяжести патологического процесса	Показатели ФАМ ( $\bar{x} \pm m$ )		
			ФЧ	ФИ, %	ИП, %
Здоровые			4,0 ± 0,05	28,8 ± 2,2	26,3 ± 1,2
Основная	До лечения	I	3,6 ± 0,3	26,7 ± 2,3	24,1 ± 1,8
		II	2,5 ± 0,2	18,1 ± 0,15	17,5 ± 0,16
		III	2,0 ± 0,18	15,0 ± 0,2	14,6 ± 0,21
	После лечения	II	3,4 ± 0,16	23,8 ± 0,25	20,8 ± 0,2
		III	3,6 ± 0,3	25,6 ± 0,22	22,8 ± 0,3
Сравнения	До лечения	II	2,6 ± 0,29	18,9 ± 0,19	17,1 ± 0,18
		III	2,9 ± 0,2	17,3 ± 0,16	15,7 ± 0,16
		II	2,8 ± 0,22	19,8 ± 0,2	18,7 ± 0,17
	После лечения	III	3,0 ± 0,25	20,0 ± 0,2	16,5 ± 0,15

Таблица 2. Профиль цитокинов в крови больных при РВ различной тяжести до и после лечения

Группы обследованных	Период наблюдения	Степень тяжести патологического процесса	Показатели, пг/мл ( $\bar{x} \pm m$ )				
			ИЛ-1 $\beta$	ИЛ-2	ФНО- $\alpha$	ИЛ-6	ИЛ-4
Здоровые			20,8 ± 1,4	28,4 ± 1,2	37,6 ± 1,3	29,8 ± 1,5	48,3 ± 1,8
Основная	До лечения	I	18,5 ± 1,1	26,2 ± 1,9	36,3 ± 2,1	32,3 ± 2,2	45,2 ± 2,9
		II	41,1 ± 2,1	40,5 ± 1,8	75,1 ± 1,9	40,8 ± 1,8	54,3 ± 2,2
		III	60,2 ± 4,1	55,2 ± 2,2	80,1 ± 3,0	45,6 ± 3,9	59,5 ± 3,5
	После лечения	I	19,5 ± 1,6	25,6 ± 2,1	38,9 ± 2,6	30,8 ± 2,1	46,5 ± 3,0
		II	28,1 ± 1,9	32,9 ± 2,8	64,3 ± 3,9	31,2 ± 2,4	52,1 ± 3,6
		III	43,7 ± 2,2	40,8 ± 3,1	65,0 ± 3,5	25,0 ± 2,7	50,5 ± 3,8
Сравнения	До лечения	II	42,0 ± 2,0	39,9 ± 2,0	74,9 ± 4,1	41,2 ± 2,0	55,1 ± 2,9
		III	58,5 ± 3,8	55,0 ± 2,1	85,0 ± 2,9	46,2 ± 3,5	58,8 ± 3,9
		II	40,2 ± 3,1	37,4 ± 2,7	70,5 ± 3,2	39,9 ± 3,2	53,2 ± 3,6
	После лечения	III	56,3 ± 2,8	50,0 ± 3,6	80,5 ± 4,0	42,1 ± 3,5	55,3 ± 3,8

ответственно ( $10,2 \pm 0,6$ ) и ( $26,3 \pm 1,2$ )%. После лечения он увеличился в 2,5 раза — до ( $25,5 \pm 0,8$ )% ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, до лечения у больных отмечали значительное угнетение фагоцитарной реакции.

Изучены иммунные показатели ФАМ у больных при РВ различной тяжести (табл. 1).

У больных основной группы при РВ легкой степени показатели ФАМ незначительно отличались от таковых в норме ( $p > 0,05$ ). Поэтому в последующем их анализировали только при РВ средней тяжести и тяжелом. ФЧ, ФИ и ИП у больных при РВ средней тяжести до лечения были в 1,6, 1,5 и 1,5 раза ниже таковых в крови здоровых доноров ( $p < 0,05$ ). После терапии как при РВ средней тяжести, так и тяжелой наметилась тенденция к нормализации этих показателей. Так, при РВ средней тяжести ФЧ увеличилось в 1,4 раза, ФИ — в 1,3 раза, ИП — в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ). С большей силой закономерность к

нормализации показателей ФАМ проявилась после лечения пациентов при тяжелом РВ: ФЧ увеличилось в 1,8 раза по сравнению с таковым до лечения, ФИ — в 1,7 раза, ИП — в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ). В группе сравнения изменения были в основном незначительные (недостовверные), независимо от тяжести патологического процесса.

Следовательно, показатели ФАМ в крови больных при РВ различной тяжести до лечения были достоверно ниже нормы. После лечения с использованием иммодина отмечена тенденция к нормализации показателей, особенно при тяжелом РВ. Стандартное лечение слабо влияло на активность ФАМ ( $p > 0,05$ ).

На современном этапе при многих инфекционных болезнях существенное внимание ученые уделяют профилю цитокинов крови, поскольку именно они играют ведущую роль в регуляции иммунных процессов в организме [11 — 13].

Данные исследования свидетельствовали о достоверном повышении уровня провоспалительных цитокинов у больных при РВ. Уровень ИЛ-1 $\beta$  до лечения был достоверно увеличен в среднем в 2,6 раза и составлял ( $53,6 \pm 3,2$ ) пг/мл, у здоровых лиц — ( $20,8 \pm 1,4$ ) пг/мл ( $p < 0,05$ ); ФНО- $\alpha$  — ( $80,5 \pm 2,3$ ) пг/мл, что в 2,1 раза выше уровня у здорового человека — ( $37,6 \pm 2,9$ ) пг/мл ( $p < 0,05$ ); ИЛ-2 — ( $47,5 \pm 3,1$ ) пг/мл, что в 1,67 раза выше, чем в норме — ( $28,4 \pm 1,6$ ) пг/мл ( $p < 0,05$ ). Уровень противовоспалительного ИЛ-4 до лечения был увеличен в 1,23 раза и составлял ( $59,6 \pm 3,0$ ) пг/мл, в норме — ( $48,3 \pm 1,8$ ) пг/мл ( $p > 0,05$ ). Лечение РВ с использованием в комплексе базисной терапии иммодина оказалось эффективным, содержание цитокинов уменьшилось (табл. 2).

Анализ данных свидетельствовал о достоверном повышении уровня провоспалительных цитокинов и

умеренном повышении — противовоспалительных, по сравнению с таковым в норме. Уровень ИЛ—1 $\beta$  до лечения зависел от тяжести заболевания. При РВ легкой степени выявлено незначительное уменьшение всех показателей ( $p > 0,05$ ). Их достоверное снижение отмечено при РВ средней тяжести и тяжелом. При РВ средней тяжести уровень ИЛ—1 $\beta$  снизился в 1,46 раза ( $p < 0,05$ ), ИЛ—2 — в 1,23 раза ( $p < 0,05$ ), ФНО— $\alpha$  — в 1,17 раза ( $p > 0,05$ ), ИЛ—6 — в 1,31 раза ( $p < 0,05$ ), ИЛ—4 — в 1,04 раза ( $p > 0,05$ ). Более эффективно лечение с применением иммолина повлияло на тяжелое РВ. Содержание ИЛ—1 $\beta$ , ИЛ—2, ФНО— $\alpha$ , ИЛ—6 и ИЛ—4 уменьшилось соответственно в 1,38, 1,35, 1,23, 1,8 и 1,18 раза по сравнению с таковым до лечения ( $p < 0,05$ ). При стандартной терапии существенные изменения показателей не выявлены.

При стимуляции клеток ЛПС концентрация ФНО— $\alpha$ , ИЛ—1 $\beta$ , ИЛ—2, ИЛ—4 увеличивалась, как минимум, через 3 ч. Доказано, что за 6 ч инкубации клетки способны выделять увеличенное количество цитокинов. Синтез цитокинов за это время не достигал максимума, но достоверно отличался ( $p < 0,001$ ) при синтезе стимулирующем и спонтанном. Такая продолжительность инкубации достаточна для определения синтеза цитокинов, что позволило сравнивать иммунокомпетентные клетки у больных при РВ и здоровых до достижения динамического равновесия между секрецией и актива-

цией цитокинов. Способность клеток крови синтезировать ФНО— $\alpha$  при стимуляции ЛПС была значительно выше по сравнению с таковой в таких же клетках у здоровых лиц. Полученные результаты соответствуют данным литературы о способности клеток крови больных при РВ синтезировать провоспалительные цитокины в большем объеме *in vitro*, а также увеличению содержания провоспалительных цитокинов. Наибольшие различия у больных при РВ и здоровых лиц выявлены при сравнении спонтанной секреции ФНО— $\alpha$ , ИЛ—1 $\beta$ , ИЛ—4, которая включает их базальный синтез и синтез, стимулированный ЛПС *E.coli*, индуцированный минимальным влиянием, что неизбежно при взятии крови. Клетки здоровых доноров в покое продуцировали небольшое количество цитокинов, их синтез клетками крови больных при РВ без дополнительной стимуляции был на уровне ЛПС—индуцированного синтеза клетками крови здоровых доноров крови.

Таким образом, у больных при РВ средней тяжести и тяжелом отмечено угнетение иммунитета.

Уровень провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в крови больных при РВ средней тяжести и тяжелом до лечения был значительно выше, чем в норме. Применение в комплексе базисной терапии иммолина оказывало положительное влияние на показатели ФАМ и профиль цитокинов.

## Выводы

1. У больных при РВ различной тяжести обнаружено угнетение функциональной активности МФС (уменьшение показателей ФАМ, особенно ИП) ( $p < 0,05$ ). Наименьшие изменения показателей ФАМ выявлены в крови больных при РВ легкой степени, максимальные — при тяжелом РВ.

2. Лечение РВ различной тяжести по-разному влияло на показатели ФАМ. При базисной терапии в комплексе с иммолином отмечены незначительные изменения иммунитета в крови больных при РВ легкой степени ( $p > 0,05$ ) и нормализация показателей ФАМ — при РВ средней тяжести и тяжелом ( $p < 0,05$ ).

3. У больных при РВ средней тяжести и тяжелом выявляли существенное повышение уровня в крови провоспалительных цитокинов — ФНО— $\alpha$ , ИЛ—1 $\beta$ , ИЛ—2 и ИЛ—6 ( $p < 0,05$ ) и умеренное повышение — противовоспалительного цитокина ИЛ—4 ( $p < 0,05$ ).

4. Включение в комплекс лечения РВ средней тяжести и тяжелого иммолина обеспечивало нормализацию профиля цитокинов у пациентов.

5. Применение только базисной терапии достоверно не влияло на показатели ФАМ и профиль цитокинов в крови ( $p > 0,05$ ), следовательно, не способствовало улучшению состояния пациентов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Stevens D. L. Treatments for skin and soft-tissue and surgical site infections due to MDR Gram-positive bacteria / D. L. Stevens // *J. Infect.* — 2009. — Vol. 59, suppl. 1. — P. 32 — 39.
2. Swartz M. N. Cellulitis and subcutaneous tissue infections / M. N. Swartz // *Principles and Practice of Infectious Diseases*; eds. G. L. Mandell, J. F. Bennet, R. Dollin. — N. Y., 1995. — 4—th ed. — P. 909 — 928.
3. Гальперин Э. А. Рожа: учеб. пособие / Э. А. Гальперин, Р. Р. Рыскинд. — М.: Медицина, 1976. — 176 с.
4. Кортев А. И. Рожа / А. И. Кортев, В. Н. Дроздов // *Очерки инфекционных и схожих болезней. Инфекции и врачебные ошибки. Маски инфекционных болезней*; под ред. А. И. Кортева. — М., 1997. — 368 с.
5. Бубнова Н. А. Результаты оценки иммунного статуса у больных рожистым воспалением / Н. А. Бубнова, М. А. Шатиль // *Амбул. хирургия.* — 2005. — № 3. — С. 40 — 42.
6. Фролов А. И. Проблемы стрептококковой инфекции в хирургии / А. П. Фролов // *Материалы Всерос. конгр. "Человек и здоровье"*. — Иркутск, 2004. — С. 147 — 148.
7. Стручков В. И. Антибиотики в хирургии / В. И. Стручков. — М.: Медицина, 1973. — 303 с.
8. Фролов В. М. Определение фагоцитарной активности моноцитов периферической крови у больных рожей / В. М. Фролов, Н. А. Пересадин, И. Я. Пшеничный // *Лаб. дело.* — 1990. — № 9. — С. 27 — 29.
9. Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология / Г. Н. Дранник. — К.: Полиграф Плюс, 2010. — 4—е изд. — 552 с.
10. Кузнецова Л. В. Клінічна та лабораторна імунологія / Л. В. Кузнецова, В. Д. Бабаджан, В. М. Фролов. — К.: Полиграф плюс, 2012. — 922 с.
11. Бережная Н. М. Иммунология злокачественного роста / Н. М. Бережная, В. Ф. Чехун. — К.: Наук. думка, 2005. — 791 с.
12. Кетлинский С. А. Цитокины / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев. — СПб.: Фолиант, 2008. — 552 с.
13. Тихонова Т. А. Иммунитет. Иммунная система: метод. пособие / Т. А. Тихонова. — Дубна: Межд. ун—т ПОЧ, 2007. — 52 с.