

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2018-22(3)-14

УДК: 616-001.4:615.37

## РЕЗУЛЬТАТИ ЦИТОГІСТОХІМІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ У ХВОРИХ З ГНІЙНО-ЗАПАЛЬНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ М'ЯКИХ ТКАНИН НА ТЛІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ

Желіба М.Д., Богачук М.Г.

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

Відповідальний за листування:  
e-mail: maxbogachuc@gmail.com

Статтю отримано 27 червня 2018 р.; прийнято до друку 10 серпня 2018 р.

**Анотація.** У хворих з гнійно-запальними захворюваннями м'яких тканин (ГЗЗМТ) на тлі ЦД 2 типу виявляються стійкі зміни в різних ланках імунної системи. Гіперглікемія, гіперліпідемія, інсулінорезистентність і адаптивна гіперінсулінемія впливають на клітини імунної системи, сприяють розвитку метаболічної імунодепресії з формуванням стійкої імунної дисфункції. Мета дослідження - дослідити й проаналізувати метаболічний стан імунокомпетентних клітин у хворих з гнійно-запальними захворюваннями м'яких тканин на тлі ЦД 2 типу. Дослідження проведено у 47 хворих (основна група) з гнійно-запальними захворюваннями м'яких тканин на тлі цукрового діабету та 20 практично здорових волонтерів (група порівняння) за допомогою цитогістохімічного методу відновлення НСТ, який ґрунтується на визначенні відсоткового складу нейтрофілів, які мають у цитоплазмі гранули формазану. Було вивчено спонтанну реакцію нейтрофілів, а також показники НСТ-тесту при стимуляції нейтрофільних гранулоцитів *in vitro* для оцінки бактерицидного, ресурсного потенціалу та здатності їх до завершеного фагоцитозу. Результати дослідження показали, що зниження рівня активності мієлопероксидази та НСТ-тесту за умов стимуляції нейтрофільних гранулоцитів є ознакою незадовільного стану бактерицидної системи клітин, що може бути причиною гострих запальних процесів в організмі, які супроводжують ЦД 2 типу, що призводить до функціонального виснаження макрофагальної ланки імунного захисту організму. При ГЗЗМТ на тлі ЦД 2 типу порівняно з нормою показники "спонтанного" НСТ-тесту нейтрофілів є високими, що зумовлено наявністю запального процесу. Індекс стимуляції нейтрофілів нижчий в основній групі (в 1,6 рази:  $5,3\% \pm 0,2\%$  в основній групі проти  $8,4\% \pm 0,4\%$  в контрольній відповідно,  $p \leq 0,05$ ), що є показником порівняно слабшої стимуляції тих популяцій нейтрофілів, які відповідали за високі показники в "спонтанному" НСТ-тесті, та порушеного стану клітинного метаболізму. Таким чином, у хворих з цукровим діабетом 2 типу порушення бактерицидної системи захисту організму є однією з причин розвитку інфекційно-запальних процесів.

**Ключові слова:** гнійно-запальні захворювання м'яких тканин, цукровий діабет 2 типу, макрофаги, імунний бактерицидний захист.

### Вступ

У хворих з гнійно-запальними захворюваннями м'яких тканин (ГЗЗМТ) на тлі ЦД 2 типу виявляються стійкі зміни в різних ланках імунної системи [1]. Гіперглікемія, гіперліпідемія, інсулінорезистентність і адаптивна гіперінсулінемія впливають на клітини імунної системи, сприяють розвитку метаболічної імунодепресії, формується стійка імунна дисфункція [2]. Глибина імунопатологічних порушень залежить від ступеня компенсації, тривалості хвороби і є прогностичним критерієм розвитку ускладнень при ЦД 2-го типу. Тому стан функціональної активності імунокомпетентних клітин є напрямком вивчення патогенезу ГЗЗМТ на тлі ЦД 2 типу.

Мета дослідження - дослідити й проаналізувати метаболічний стан імунокомпетентних клітин у хворих з гнійно-запальними захворюваннями м'яких тканин на тлі ЦД 2 типу.

### Матеріали та методи

Досліджено і проаналізовано метаболічний стан імунокомпетентних клітин у 47 хворих з ГЗЗМТ на тлі ЦД 2 типу (основна група), які лікувались в період 2015-2018 років у відділенні гнійно-септичної хірургії МКЛ ШМД м.Вінниці. Середній вік хворих становив  $57,5 \pm 11,3$  років,

13 чоловіків та 34 жінок. Контрольну групу склали 20 практично здорових волонтерів середнім віком  $20,4 \pm 1,3$  роки, 12 - чоловічої та 8 жіночої статі. Окисно-відновну активність нейтрофільних гранулоцитів у нормі та за умов ГЗЗМТ ЦД 2 типу аналізували за допомогою тесту відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тесту) [3]. Цей тест дає інформацію про функціонування одного із ключових ферментів системи фагоцитозу - НАДФ-Н-оксидази, який відповідає за бактерицидний потенціал. Реакція з інтактними нейтрофілами (спонтанна реакція) свідчить про функціональну чутливість нейтрофілів *in vivo*. Було вивчено спонтанну реакцію нейтрофілів, а також показники НСТ-тесту при стимуляції нейтрофільних гранулоцитів *in vitro* для оцінки бактерицидного, ресурсного потенціалу та здатності їх до завершеного фагоцитозу. Для цього використовували цитохімічний метод відновлення НСТ, який ґрунтується на визначенні відсоткового складу нейтрофілів, які мають у цитоплазмі гранули формазану.

### Результати. Обговорення

Отримані результати показали, що при ГЗЗМТ на тлі ЦД 2 типу порівняно з нормою показники "спонтанного" НСТ-тесту нейтрофілів є високими, що зумовлено наяв-

ністю запального процесу. Індекс стимуляції нейтрофілів нижчий в основній групі (в 1,6 рази:  $5,3 \pm 0,2\%$  в основній групі проти  $8,4 \pm 0,4\%$  в контрольній,  $p \leq 0,05$ ), що є показником порівняно слабшої стимуляції тих популяцій нейтрофілів, які відповідали за високі показники в "спонтанному" НСТ-тесті, та порушеного стану клітинного метаболізму, який забезпечує механізм протимікробного захисту й елімінації з організму антигенів. Отримані результати можна аргументувати кількісними та якісними змінами вуглеводних залишків у складі рецепторів мембран сегментоядерних нейтрофілів в основній групі. У результаті реакції, каталізованої мієлопероксидазою, утворюється гіпогалогенід, який призводить до галогенування білкових структур мікробної мембрани, внаслідок чого мембрана руйнується, і мікроби гинуть. Використаний у реакції  $H_2O_2$ , утворюється в результаті окислення глюкозо-6-фосфату в гексозомонофосфатному шунті. Мієлопероксидаза може також працювати і як декарбоксилаза амінокислот. На мікроорганізмів згубно діє як руйнування амінокислот їхньої мембрани, так і виникнення альдегідів, які є для них токсичними речовинами. Активність мієлопероксидази оцінювали на мазках лейкоконцентрату за кількістю мієлопероксидазопозитивних клітин на ~200 лейкоцитів. У результаті досліджень активності мієлопероксидази за кількістю мієлопероксидазопозитивних клітин із високою активністю цього ферменту (+++) в нейтрофільних гранулоцитах контрольної групи та хворих основної групи отримано результати, аналіз яких показав, що при ГЗЗМТ і ЦД 2 типу активність мієлопероксидази практично не змінюється. Однак, під впливом стимуляції, простежується різний ступінь підвищення активності мієлопероксидази у нормі та в разі ГЗЗМТ на тлі ЦД 2 типу. Зниження рівня індукованої активності мієлопероксидази у хворих основної гру-

пи свідчить про порушення бактерицидної системи захисту організму, що і є однією з причин розвитку інфекційно-запальних процесів. Зростання активності ферменту в обох варіантах у випадку наявності імуностимулюючого фактору за умов фагоцитозу є ознакою значного ресурсного потенціалу мієлопероксидази азурофільних гранул. Одночасно, зростання активності мієлопероксидази - наслідок індукованого метаболічного вибуху, в процесі якого активуються мембранні оксидази, та стимулюється окислення глюкози в гексозомонофосфатному шунті. Тому пригнічення внутрішньоклітинного перетравлення мікроорганізмів, як наслідок інертності дії у відповідь з боку мієлопероксидази в гранулоцитах крові в разі ЦД 2 типу, можна пояснити порушенням процесу дегрануляції, оскільки цей процес є енергоємним. Як відомо, гліколіз у поліморфоядерних лейкоцитах дає ~95% усієї енергії, і саме гліколіз зазнає значних порушень у разі ЦД.

### Висновки та перспективи подальших розробок

1. Основою патогенезу хірургічних діабетичних ускладнень, а саме гнійно-запальних захворювань м'яких тканин, є виявлені зміни бактерицидної активності сегментоядерних нейтрофілів.

2. Зниження рівня активності мієлопероксидази та НСТ-тесту за умов стимуляції нейтрофільних гранулоцитів є ознакою незадовільного стану бактерицидної системи клітин, що може бути причиною гострих запальних процесів в організмі, які супроводжують ЦД 2 типу, що призводить до функціонального виснаження макрофагальної ланки імунного захисту організму.

Подальші поглиблені дослідження у обраному напрямку можуть сприяти формуванню нових прогностичних критеріїв перебігу патологічного процесу та нових підходів до його лікування.

### Список посилань

1. Луніна, Н. В., Степаненко, В. В. & Коваль, С. Б. (2001). Функціональний стан моноцитів і деякі механізми його регуляції при розвитку стрес-реакції. *Фізіологічний журнал*, 47 (4), 30-35.
2. Мазуров, Д. В., Пинегин, Б. В. & Андронова, Т. М. (2001). Изучение моноцитов периферической крови человека. *Клеточная иммунология*, 3, 21-23.
3. Stoika, R. S., Kashchak, N. I., Lutsik-Kordovsky, M. D., Boyko, M. & Tsyrlunyk, A. (2001). In vitro response of phagocytic cells to immunomodulating agents. *Med. Sci. Monit.*, 7 (4), 652-658. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11433191>.

### References

1. Lunina, N. V., Stepanenko, V. V. & Koval, S. B. (2001).

Funktsionalnyi stan monotsytiv i deaki mekhanizmy yoho rehuliatcii pry rozvytku stres-reaktsii [Functional state of monocytes and some mechanisms of its regulation in the development of stress-reaction]. *Fiziologichnyi zhurnal - Physiological journal*, 47 (4), 30-35.

2. Mazurov, D. V., Pinegin, B. V. & Andronova, T. M. (2001). Izuchenie monocitov perifericheskoy krovi cheloveka [The study of human peripheral blood monocytes]. *Kletochnaya immunologiya - Cellular Immunology*, 3, 21-23.

3. Stoika, R. S., Kashchak, N. I., Lutsik-Kordovsky, M. D., Boyko, M. & Tsyrlunyk, A. (2001). In vitro response of phagocytic cells to immunomodulating agents. *Med. Sci. Monit.*, 7 (4), 652-658. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11433191>.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ЦИТОГИСТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

Желиба Н.Д., Богачук М.Г.

**Аннотация.** У больных с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей (ГВЗМТ) на фоне СД 2 типа развиваются стойкие изменения в различных звеньях иммунной системы. Гипергликемия, гиперлипидемия, инсулинорезистентность и адаптивная гиперинсулинемия влияют на клетки иммунной системы, способствуют развитию метаболической иммунодепрессии с формированием стойкой иммунной дисфункции. Цель исследования - проанализировать метаболическое состояние иммунокомпетентных клеток у больных с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей на фоне СД 2 типа. Исследование проведено у 47 больных (основная группа) с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей

на фоне сахарного диабета, и 20 практически здоровых добровольцев (группа сравнения) с помощью цитогистохимического метода восстановления НСТ, основанный на определении процентного состава нейтрофилов, которые имеют в цитоплазме гранулы формазана. Изучено спонтанную реакцию нейтрофилов, а также показатели НСТ-теста при стимуляции нейтрофилов *in vitro* для оценки бактерицидного, ресурсного потенциала и способность их к завершению фагоцитозу. Результаты исследования показали, что снижение уровня активности миелопероксидазы и НСТ-теста в условиях стимуляции нейтрофилов является признаком неудовлетворительного состояния бактерицидной системы клеток, что может быть причиной острых воспалительных процессов в организме, которые сопровождают СД 2 типа, приводит к функциональному истощению макрофагального звена иммунной защиты организма. При ГВЗМТ на фоне СД 2 типа по сравнению с нормой показатели "спонтанного" НСТ-теста нейтрофилов высокие, что обусловлено наличием воспалительного процесса. Индекс стимуляции нейтрофилов ниже в основной группе (в 1,6 раза:  $5,3 \pm 0,2\%$  в основной группе против  $8,4 \pm 0,4\%$  в контрольной,  $p \leq 0,05$ ), что является показателем сравнительно слабой стимуляции тех популяций нейтрофилов, которые отвечали за высокие показатели в "спонтанном" НСТ-тесте, и нарушенного состояния клеточного метаболизма. Таким образом, у больных с сахарным диабетом 2 типа достоверно констатируются нарушения бактерицидной системы защиты организма, что и является одной из причин развития инфекционно-воспалительных процессов.

**Ключевые слова:** гнойно-воспалительные заболевания мягких тканей, сахарный диабет 2 типа, макрофаги, иммунная бактерицидная защита.

#### RESULTS OF CYTOCHEMICAL INVESTIGATION OF NEUTROPHIL GRANULOCYTES IN PATIENTS WITH PURULENT-INFLAMMATORY DISEASES OF FINE TISSUES ON THE TYPE 2 DIABETES MELLITUS

**Zheliba M.D., Bohachuk M.H.**

**Annotation.** Patients with purulent-inflammatory diseases of soft tissues on the background of diabetes type 2 are resistant changes in various parts of the immune system. Hyperglycemia, hyperlipidemia, insulin resistance and adaptive hyperinsulinemia affect the cells of the immune system, promote the development of metabolic immunosuppression with the formation of stable immune dysfunction. The purpose of the study to investigate and analyze the metabolic state of immunocompetent cells in patients with purulent-inflammatory diseases of soft tissues on the background of DM type 2. The study was conducted in 47 patients (the main group) with purulent-inflammatory diseases of soft-tissue on the background of diabetes mellitus, and 20 healthy volunteers (the comparison group) using the cytohistochemical restoration method of NST based on the percentage composition of neutrophils that have cytoplasm of formazan granules. The spontaneous neutrophil response was studied, as well as the parameters of the NST-test in stimulation of neutrophil granulocytes *in vitro* to assess the bactericidal, resource potential and their ability to complete phagocytosis. Results of the study showed that the decrease in the activity of myeloperoxidase and the NST-test in the conditions of stimulation of neutrophil granulocytes is a sign of unsatisfactory state of the bactericidal system of cells, which may be the cause of acute inflammatory processes in the body that accompany type 2 diabetes, which leads to functional exhaustion of the macrophage level of the immune body protection. At GZZMT against the background of DM 2 type compared with the norm, the "spontaneous" NST-test of neutrophils is high, which is due to the presence of inflammatory process. The index of stimulation of neutrophils is lower in the main group (1.6 times:  $5.3 \pm 0.2\%$  in the main group versus  $8.4 \pm 0.4\%$  in the control,  $p \leq 0.05$ ), which is an indicator of a relatively weaker stimulation of those populations of neutrophils that were responsible for high indices in the "spontaneous" NST test, and the impaired state of cellular metabolism. So, in patients with type 2 diabetes, a violation of the bactericidal system of organism protection, which is one of the causes of the development of infectious and inflammatory processes.

**Keywords:** purulent-inflammatory diseases of soft tissues, type 2 diabetes mellitus, macrophages, immune bactericidal defense.