

НОВЫЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

Е.В.Проскурнина, М.М.Созарукова, А.М.Полимова,
М.А.Прудникова*, А.С.Аметов*, Ю.А.Владимиров

*Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, РФ; *ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования, Москва, РФ*

Для оценки функциональной активности нейтрофилов применяли хемилюминесцентный метод с последовательной двойной стимуляцией растворимыми стимулами с разным механизмом действия — форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА) и формил-метионил-лейцил-фенилаланином (фМЛФ). В исследовании приняли участие 26 пациентов на пероральной сахароснижающей терапии, у которых кроме функциональной активности нейтрофилов определяли уровень ТБК-активных продуктов, маркеры воспаления, показатели гемокоагуляции и биохимические показатели. Результаты показали в основном снижение активности гранулоцитарного звена иммунной системы у обследованных пациентов.

Ключевые слова: окислительный стресс, активность нейтрофилов, кинетическая хемилюминесценция, сахарный диабет 2-го типа

В литературе имеются противоречивые данные о функциональной активности нейтрофилов при сахарном диабете (СД). Считают, что активность НАДФН-оксидазы повышена в эндотелиальных клетках [6] и в иммунных клетках — моноцитах [8], а нейтрофилы находятся в состоянии прайминга [11] и продуцируют повышенное количество пероксида водорода [5]. Однако есть указания и на то, что активность нейтрофилов снижена как при инсулиннезависимом СД 2-го типа [10], так и при СД 1-го типа у детей [1].

Существуют методы, позволяющие оценить функциональную активность нейтрофилов [2,7,9], в частности, НСТ-тест в разных вариантах [4]. Они относительно просты в исполнении, но не дают возможность оценить динамику синтеза свободных радикалов клетками и требуют выделения чистой популяции фагоцитов.

Адрес для корреспонденции: proskurnina@gmail.com. Проскурнина Е.В.

Хемилюминесцентный (ХЛ) метод отличается простотой, доступностью, информативностью и чувствительностью, широко используется для определения радикалпродуцирующей активности клеток. На кафедре медицинской биофизики МГУ им. М.В.Ломоносова был разработан новый подход к оценке функциональной активности нейтрофилов в цельной крови, основанный на регистрации развития во времени свечения нейтрофилов, стимулированных последовательно двумя веществами с разным механизмом действия [3]. На первом этапе нейтрофилы стимулировали форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА) с внутриклеточным механизмом действия, на втором этапе проводили основную стимуляцию формил-метионил-лейцил-фенилаланином (фМЛФ) с внеклеточным механизмом действия. Двойная стимуляция приводит к максимально полному ответу нейтрофилов, следовательно, к улучшению чувствительности и точности получаемых результатов. Анализ всей кинетической кривой

позволяет значительно повысить информативность метода.

Цель данной работы — оценить функциональную активность нейтрофилов ХЛ-методом с двойной стимуляцией у пациентов с СД 2-го типа.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании участвовали 26 пациентов с СД 2-го типа, которые находились на пероральной сахароснижающей терапии. Средний возраст пациентов — 60.8 ± 7.0 лет, средний стаж диабета — 5.4 ± 3.6 года. Пациенты прошли комплексное клинико-лабораторное обследование (липидный обмен, гликемический контроль, гемокоагуляция, показатели хронического воспаления и окислительного стресса — ТБК-реактивные продукты). Критерии включения в исследование: возраст старше 18 лет, СД 2-го типа, гликемия натощак 6-10 ммоль/л, гликированный гемоглобин <10%; АлАТ, АсАТ, щелочная фосфатаза не превышают верхнюю границу нормы более чем в 2 раза. Критерии исключения: печеночная и/или почечная недостаточность, тяжелая сердечная недостаточность, прием эстрогенов или пероральных контрацептивов, алкогольная или наркотическая зависимость, злокачественные новообразования, выявленные менее чем 5 лет назад, хрипы в легких, беременность и период лактации. Все пациенты подписали информированное согласие на добровольное участие в исследовании, предварительно ознакомившись с его условиями и целями.

Ранее с помощью разработанной методики были обследованы 87 практически здоровых добровольцев (средний возраст 32.4 ± 11 лет), которые составили контрольную группу.

ХЛ-анализ проводили на 12-кюветном хемилюминометре "Lum12" ("ДИСофт"). Использова-

ли люминол, KH_2PO_4 ("Sigma"), раствор Хенкса с глюкозой без красителя (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова), стабилизированный 2 мМ HEPES; фМЛФ, ФМА ("Sigma").

В кювету, содержащую раствор Хенкса и люминол в конечной концентрации 45 мкМ, помещали цельную кровь, собранную в вакутейнеры с гепарином, в конечной концентрации 4.5% (45 мкл на 1 мл раствора в кювете) и регистрировали спонтанную ХЛ в течение 12 мин, затем вносили ФМА (конечная концентрация в кювете 50 нг/мл). После 20 мин инкубации проводили стимуляцию фМЛФ (конечная концентрация 10 мкМ) и регистрировали индуцированный ХЛ-ответ в течение не менее 60 мин.

У пациентов с СД 2-го типа изучали аналитические показатели — среднюю активность нейтрофила и коэффициент затухания, полученные данные сравнивали с таковыми в контрольной группе.

Полученные данные статистически обрабатывали в программе "Statistica" ("StatSoft").

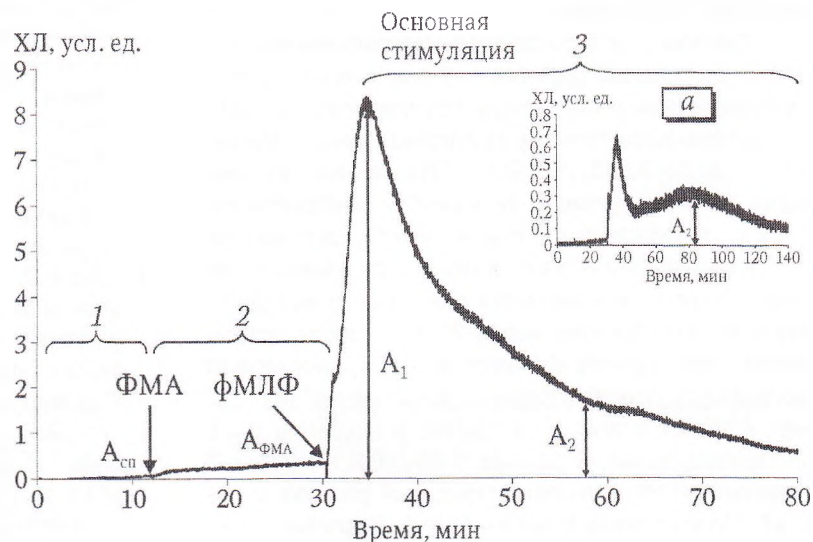
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для 24 пациентов получили кривые ХЛ, аналогичные по форме кривым для практически здоровых людей (рисунок). Для двух пациентов были получены кривые с "медленной" вспышкой (рисунок, а).

Кривая развития ХЛ нейтрофилов состоит из трех частей: спонтанная ХЛ, ХЛ после предстимуляции ФМА, ХЛ после основной стимуляции фМЛФ. Из нее можно рассчитать амплитуду спонтанной ХЛ — $A_{\text{сп}}$ (интенсивность ХЛ на 10-й минуте развития свечения), амплитуду ФМА-стимулированной ХЛ — $A_{\text{ФМА}}$ (интенсивность ХЛ через

Типичная кривая развития ХЛ при двойной стимуляции нейтрофилов у большинства пациентов с СД 2-го типа и практически здоровых людей.

1 — спонтанная ХЛ, 2 — предстимуляция ФМА, 3 — основная стимуляция фМЛФ. Стрелками обозначены моменты добавления стимулов. а — ХЛ-кривая с "медленной" вспышкой, полученная для образца крови пациента с СД.



20 мин после добавления ФМА), амплитуду вспышки фМЛФ-индуцированной ХЛ — A_1 (интенсивность в максимуме пика) и интенсивность ХЛ на спаде быстрой вспышки (A_2), измеренную через 23 мин после пика быстрой вспышки. В некоторых случаях на хемилюминограмме регистрировали дополнительную “медленную” вспышку (рисунок, а), амплитуда которой входила в величину A_2 .

В качестве клинических показателей представляют особый интерес три величины: наличие “медленной” вспышки, значение амплитуды A_1 , нормированное на количество нейтрофилов $n(A^*=A_1/n)$; коэффициент затухания свечения $K_d=A_2/A_1$.

По полученным нами ранее данным “медленная” вспышка свидетельствует о значительной активации сильной напряженности гранулоцитарного звена иммунитета [3]. Наличие ее у двух пациентов можно объяснить тем, что незадолго до обследования они переболели острыми инфекционными заболеваниями (рожа, острое респираторное заболевание).

Амплитуда быстрой вспышки, нормированная на количество нейтрофилов (A^*), может служить характеристикой удельной активности нейтрофила. Данные для контрольной группы (группа А) были проверены на нормальность распределения по критерию Шапиро—Уилка. Распределение статистически значимо отличалось от нормального: $n=87$, $W=0.93709$, $p=0.00037$. Медиана 4.06×10^{-5} В/клетку; интерквартильный размах (А) от 2.47×10^{-5} до 6.05×10^{-5} В/клетку.

В группе А не выявлено статистически значимых различий в зависимости от возраста и пола. Мы предположили, что это справедливо и для пациентов с СД (группа В) и рассматривали объединенную выборку ($N=26$). Медиана 2.18×10^{-5} В/клетку; интерквартильный размах от 1.56×10^{-5} до 2.95×10^{-5} В/клетку.

Группы А и В являются независимыми, поэтому сравнение данных с целью оценки достоверности различий между группами проводили по непараметрическому критерию Манна—Уитни: $U=397.0$; $Z=-3.533$; $p=0.0004$. Эти данные показывают, что различие в активности нейтрофилов между группами было статистически значимым.

Коэффициент затухания рассчитывали как отношение интенсивности свечения в максимуме к интенсивности через 23 мин после достижения максимума (именно в это время может возникнуть дополнительная “медленная” вспышка). Для величины K_d в группе А медиана 0.43, интерквартильный размах 0.35-0.64, в группе В медиана 0.16, интерквартильный размах 0.12-0.28. По критерию Манна—Уитни различия меж-

ду группами являются статистически значимыми: $U=182.0$; $Z=5.72$; $p<0.0001$. Предположительно, более низкие значения K_d у пациентов свидетельствуют о более быстром истощении нейтрофилов после действия стимула.

Сопоставление результатов, полученных для пациентов с СД и здоровых добровольцев, позволило сделать следующие выводы. В целом у обследованных пациентов с компенсированным СД 2-го типа функциональная активность нейтрофилов статистически значимо ниже таковой у практически здоровых людей, что свидетельствует о недостаточности в ряде случаев функции нейтрофильного звена иммунной защиты у пациентов с СД 2-го типа. Известно, что пациенты с СД по невыясненным причинам больше подвержены инфекциям, особенно стафилококковым поражениям кожи и инфекциям мочевыводящих путей. Также у них высок риск социально значимых инфекций (в частности, туберкулеза). Возможно, полученные данные помогут внести ясность в эту проблему.

Таким образом, метод оценки функциональной активности нейтрофилов с двойной стимуляцией может использоваться для оценки функционального состояния иммунной системы у пациентов с СД.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 14-15-00375).

ЛИТЕРАТУРА

1. Барычева Л.Ю., Эрдни-Горяева Н.А., Александрович Г.А. Функциональное состояние нейтрофильных гранулоцитов и маркеры апоптоза при сахарном диабете 1 типа у детей // Сахарный диабет. 2014. № 3. С. 77-82.
2. Земсков В.М., Барсуков А.А. Изучение функционального состояния фагоцитов человека: кислородный метаболизм и подвижность клеток. Методические рекомендации. М., 1988.
3. Образцов И.В., Годков М.А., Полимова А.М., Дёмин Е.М., Проскурина Е.В., Владимиров Ю.А. Оценка функциональной активности нейтрофилов цельной крови методом двустадийной стимуляции: новый подход к хемилюминесцентному анализу // Рос. иммунол. журн. 2015. Т. 9, № 18. С. 418-424.
4. Allen R.C., Sjernholm R.L., Steele R.H. Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972. Vol. 47, N 4. P. 679-684.
5. Gorudko I.V., Kostevich V.A., Sokolov A.V., Shamova E.V., Buko I.V., Konstantinova E.E., Vasiliev V.B., Cherenkevich S.N., Panasenko O.M. Functional activity of neutrophils in diabetes mellitus and coronary heart disease:

- role of myeloperoxidase in the development of oxidative stress // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012. Vol. 154, N 1. P. 23-26.
6. Gray S.P., Di Marco E., Okabe J., Szyndralewicz C., Heitz F., Montezano A.C., de Haan J.B., Koulis C., El-Osta A., Andrews K.L., Chin-Dusting J.P., Touyz R.M., Wingler K., Cooper M.E., Schmidt H.H., Jandeleit-Dahm K.A. NADPH oxidase 1 plays a key role in diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis // *Circulation*. 2013. Vol. 127, N 18. P. 1888-1902.
 7. Guerra B.A., Otton R. Impact of the carotenoid astaxanthin on phagocytic capacity and ROS/RNS production of human neutrophils treated with free fatty acids and high glucose // *Int. Immunopharmacol.* 2011. Vol. 11, N 12. P. 2220-2226.
 8. Han F., Chen Y.X., Lu Y.M., Huang J.Y., Zhang G.S., Tao R.R., Ji Y.L., Liao M.H., Fukunaga K., Qin Z.H. Regulation of the ischemia-induced autophagy-lysosome processes by nitrosative stress in endothelial cells // *J. Pineal Res.* 2011. Vol. 51, N 1. P. 124-135.
 9. Ijdo J.W., Mueller A.C. Neutrophil NADPH oxidase is reduced at the Anaplasma phagocytophilum phagosome // *Infect. Immun.* 2001. Vol. 72, N 9. P. 5392-5401.
 10. Nishizawa Y., Amakata Y., Fushiki S., Nagano F., Yoshio-ka F., Nosaka S., Nishizawa Y. Improvement of an impaired chemiluminescence response to formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in neutrophils from patients with non insulin dependent diabetes mellitus by recombinant human granulocyte-colony stimulating factor // *In vivo*. 1999. Vol. 13, N 4. P. 319-325.
 11. Omori K., Ohira T., Uchida Y., Ayilavarapu S., Batista E.L. Jr, Yagi M., Iwata T., Liu H., Hasturk H., Kantarci A., Van Dyke T.E. Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase // *J. Leukoc. Biol.* 2008. Vol. 84, N 1. P. 292-301.

Получено 13.02.15