

ГЕМАТОЛОГИЯ

© И. А. НОВИКОВА, А. В. ГОМОЛЯКО. 2010

УДК 618.5-002.34431.14-036.12-074

И. А. Новикова, А. В. Гомоляко**ОСОБЕННОСТИ НИТРОКСИДНОГО СТАТУСА ЛЕЙКОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ РЕЦИДИВИРУЮЩИМ ФУРУНКУЛЕЗОМ**

Гомельский государственный медицинский университет

Изучены базальная и стимулированная пирогеналом in vitro нитроксидпродуцирующая способность лейкоцитов в сопоставлении с их кислородпродуцирующей и фагоцитарной активностью у больных хроническим рецидивирующим фурункулезом в стадии ремиссии (n = 62) и обострения (n = 12) заболевания. Установлено, что базальная нитроксидпродуцирующая активность лейкоцитов у больных и здоровых лиц не различалась. В культурах стимулированных лейкоцитов у больных преимущественно наблюдалась извращенная реакция — подавление образования оксида азота вместо повышения, выявляемого у доноров. Выявлено наличие прямой связи между нитроксидпродуцирующей активностью лейкоцитов и показателями НСТ-теста у здоровых лиц и больных в период обострения, но не ремиссии заболевания.

Ключевые слова: оксид азота, хронический рецидивирующий фурункулез

I. A. Novikova, A. V. Gomolyako

LEUKOCYTE NITRIC OXIDE STATUS IN PATIENTS WITH CHRONIC RECURRENT FURUNCULOSIS

The basal and in vitro pyrogenal-stimulated nitric oxide-producing capabilities of leukocytes versus their oxygen-producing and phagocytic activity were studied in patients with chronic recurrent furunculosis during remission (n = 62) and exacerbation (n = 12). The basal nitric oxide-producing activity of leukocytes was found to be similar. The stimulated leukocyte cultures from the patients showed mainly a perverted reaction - suppression of nitric oxide production instead of its increase detectable in donors. A direct correlation was found between the nitric oxide-producing activity of leukocytes and the results of ICT test in healthy individuals and patients during exacerbation rather than remission.

Key words: nitric oxide, chronic recurrent furunculosis

Хронический рецидивирующий фурункулез (ХРФ) представляет собой серьезную проблему практической медицины вследствие широкого распространения, склонности к частым рецидивам и низкой эффективности терапии. Основным этиологическим агентом при этих заболеваниях является золотистый стафилококк (*S. aureus*), который встречается в 60—97% случаев в монокультуре или в ассоциации с другими микроорганизмами [4]. Постоянными или транзиторными носителями *S. aureus* являются до 80% населения [10], однако ХРФ развивается далеко не у всех. В современном аспекте ХРФ рассматривают как проявление вторичной иммунологической недостаточности. Описаны различные дефекты состава и функциональных свойств иммунокомпетентных клеток у больных ХРФ [3].

Важнейшее значение в формировании невосприимчивости организма к стафилококковым поражениям кожи играют нейтрофилы, которые за счет фагоцитоза и переваривания микроорганизмов, дегрануляции, выработки активных форм кислорода (АФК) [11], а также оксида азота (NO) [9, 12] обеспечивают разрушение патогена.

Наименее изученным из них является NO. Известно, что NO регулирует процессы адгезии, хемотаксиса, агрегации нейтрофилов, а в условиях гиперпродукции может вызывать апоптоз самих клеток-продуцентов NO и предопределять развитие негативного ответа иммунной системы на активацию [2]. Роль NO-зависимых механизмов функционирования лейкоцитов при поражениях стафилококковой этиологии не исследована.

Цель настоящей работы — сопоставить нитроксидпродуцирующую активность с другими проявлениями функциональных свойств нейтрофилов у больных ХРФ.

Материалы и методы. Пациенты. Обследованы 74 больных ХРФ (29 мужчин и 45 женщин в возрасте от 18 до 48 лет) с бактериологически подтвержденной стафилококковой этиологией,

госпитализированных в отделение иммунопатологии и аллергологии ГУ Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека. Из них 62 (84%) пациента находились в стадии ремиссии, 12 (16%) — в стадии обострения фурункулеза. Длительность заболевания составляла от 1 года до 7 лет с частотой рецидивирования не менее 6 раз в год. У 70% больных отмечено непрерывно рецидивирующее течение заболевания; 41% больных являлись носителями *S. aureus* в носу и/или зеве. Контролем служили 26 практически здоровых лиц сопоставимого возраста.

Оценивали интенсивность продукции лейкоцитами NO, кислородных радикалов, а также активность фагоцитоза. Обследование проводили в день поступления больного в отделение до назначения медикаментозной терапии.

Определение NO-продуцирующей активности лейкоцитов. Лейкоциты выделяли из гепаринизированной крови путем седиментации эритроцитов 6% декстраном. Остаток эритроцитов в супернатанте убирали гипотоническим лизисом. Лейкоциты отмывали фосфатно-солевым буфером и суспендировали в питательной среде. В работе использовали суспензии лейкоцитов с содержанием полиморфно-ядерных лейкоцитов $70 \pm 10\%$. Жизнеспособность клеток ($> 95\%$) контролировали в тесте исключения трипанового синего. Для инкубации клеток использовали среду Leibovitz L-15 modified с глутамином ("Flow Lab."), содержащую 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Суспензии лейкоцитов с концентрацией клеток $5 \cdot 10^6$ /мл инкубировали при 37°C в течение 3 ч в 96-луночных плоскодонных планшетах (Nunc) с добавлением стимулятора (пирогенал в конечной концентрации 7 мкг/мл) и без него [1]. Исследование каждой клеточной культуры дублировали. Далее в надосадочной жидкости определяли содержание стабильного конечного метаболита NO — нитрита фотометрически с реактивом Грисса [7]. Дополнительно оценивали функциональный резерв продукции NO, рассчитывая индекс стимуляции (HC_{NO}) по формуле $\text{HC}_{\text{NO}} = \text{NO}_c / \text{NO}_b$, где NO_b — уровень базальной продукции NO, NO_c — уровень продукции NO в ответ на стимуляцию пирогеналом.

Исследование фагоцитоза. Поглотительную способность нейтрофилов определяли в реакции фагоцитоза с использованием убитой нагреванием суспензии *S. aureus* (штамм ATCC 25923) в концентрации 10^* клеток в 1 мл. Кровь (0,1 мл) сме-

Для корреспонденции:

Новикова Ирина Александровна, д-р мед. наук, проф., зав. каф. клин. лаб. диагностики

Адрес: 246000, Беларусь, Гомель, ул. Речицкое шоссе, 121/85

Телефон: +375295162301

E-mail: Ir-nov@yandex.ru

Гомоляко Андрей Викторович, аспирант той же кафедры.

шивали с *S. aureus* (0,1 мл) в U-образных лунках планшеты, инкубировали 30 мин при 37°C с последующим приготовлением окрашенных мазков и оценкой фагоцитарного индекса (ФИ). **НСТ-тест.** Продукцию нейтрофилами АФК оценивали в реакции спонтанного (НСТ₆) и стимулированного суспензией *S. aureus* восстановления нитросинего тетразолия (НСТ_С) с микрошической оценкой в окрашенных мазках процентного содержания диформазанположительных гранулоцитов. Рассчитывали кс фагоцитарного резерва (ИФР) по формуле $\text{ИФР} = \frac{\text{НСТ}_\text{С} - \text{НСТ}_6}{\text{НСТ}_\text{С}}$.

Статистические методы. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Статистический анализ проводили с использованием непараметрических тестов Манна—Уитни и Вилкоксона, а также Спирмена для корреляционного анализа. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. За значения нормы принимали интервал 25-й—75-й перцентили показателей группы здоровых лиц.

Результаты и обсуждение. В культуральных исследованиях выявлено, что лейкоциты больных ХРФ в ремиссии и здоровых лиц в условиях без стимуляции имели сходную NO-продуцирующую активность (см. таблицу).

В то же время ответ на стимуляцию лейкоцитов больных ХРФ и здоровых из контрольной группы был диаметрально противоположным. Лейкоциты здоровых лиц отвечали на пирогенит увеличением продукции NO ($0,48 \pm 0,06$ $\mu\text{M}/\text{л}$ в нестимулированной культуре, $0,69 \pm 0,08$ $\mu\text{M}/\text{л}$ после стимуляции; $p < 0,001$), что в целом соответствует данным других исследователей [12]. Лейкоциты больных ХРФ повышением продукции NO в ответ на стимуляцию не реагировали ($0,42 \pm 0,03$ и $0,40 \pm 0,03$ $\mu\text{M}/\text{л}$ до и после стимуляции). В большинстве (97%) случаев наблюдался негативный нитроксидпродуцирующий ответ лейкоцитов, проявляющийся подавлением продукции NO при воздействии стимулятора.

НС_{NO}, отражающий функциональный резерв продукции NO, в группе больных ХРФ в целом составил $1,03 \pm 0,06$, что достоверно ниже соответствующего значения у здоровых лиц ($2,09 \pm 0,57$; $p < 0,001$). Интересно отметить, что больные ХРФ с негативным NO-продуцирующим ответом отличались от остальных пациентов более низким ИФР ($0,54 \pm 0,03$ и $0,62 \pm 0,03$ соответственно; $p = 0,047$), что указывает на возможную связь нарушений продукции активных форм азота и кислорода.

Таким образом, у больных ХРФ в стадии ремиссии заболевания в отличие от здоровых лиц отсутствует NO-продуцирующий резерв лейкоцитов, что проявляется сниженным ответом на стимуляцию в культуре *in vitro*, а в большинстве случаев — подавлением продукции NO.

Как известно, кроме продукции NO, фагоцитирующие клетки, реализуя кислородзависимую нитроокисность, вырабатывают кислородные радикалы (O_2^- , H_2O_2 , OH и др.), которые являются важными факторами для внутриклеточного киллинга *S. aureus* [11]. Они реагируют с NO, приводя к образованию пероксинитрита и других интермедиатов, обладающих более выраженным бактерицидным эффектом. Продemonстрировано, что цитотоксический эффект нейтрофилов у здоровых лиц при добавлении в культуральную среду NO [5]. Установлено, что именно комбинированное воздействие NO и O_2^- приводит к пролонгированной, но полной гибели *S. aureus*, тогда как по отдельности влияние этих продуктов одновременно и малоэффективно [8]. По-видимому, лишь при сохранении опти-

мального баланса между уровнем продукции АФК, NO и антигенным стимулом возможна полноценная реализация неспецифической бактерицидности фагоцитов. С учетом вышеизложенного мы проанализировали результаты НСТ-теста и поглощательной способности гранулоцитов у обследованных пациентов.

Выявлено повышение показателя спонтанного НСТ-теста у 39 (63%) больных ХРФ, несмотря на то что они обследованы в период ремиссии. Значение НСТ₆ у этих больных составило $22,8 \pm 1,4\%$, что достоверно выше соответствующего показателя у здоровых лиц ($12,2 \pm 1,2\%$; $p < 0,001$). У 28 (45%) пациентов на фоне повышения спонтанного НСТ-теста отмечалось подавление стимулированного НСТ-теста ($50,8 \pm 1,8\%$), поэтому в целом в группе больных ХРФ в ремиссии был снижен резерв продукции O_2^- (ИФР $0,56 \pm 0,02$; $p < 0,001$ в сравнении с контрольной группой). Такие результаты согласуются с данными литературы и могут быть следствием персистенции возбудителя в период ремиссии заболевания [2].

Важно отметить, что у лиц со сниженным кислородпродуцирующим резервом (50 (81%) человек) одновременно отмечалось угнетение поглощательной активности нейтрофилов ($p = 0,026$) в сравнении с остальными пациентами, а также тенденция к снижению ИС_{NO} ($p = 0,052$). Это свидетельствует о том, что, с одной стороны, нарушения активности лейкоцитов при ХРФ касаются сразу нескольких основных их функций, а с другой — указанные изменения могут запускаться общим провоцирующим фактором, возможно, продуктами жизнедеятельности персистирующего *S. aureus*. При этом необходимо подчеркнуть, что негативный NO-продуцирующий ответ даже на фоне снижения кислородпродуцирующего резерва приводил к дисбалансу NO/O_2^- за счет относительного увеличения O_2^- .

Что касается поглощательной активности нейтрофилов, в целом в группе больных ХРФ нарушений не выявлено. Показатель ФИ у больных составил $69 \pm 1,4\%$, в контрольной группе — $71,9 \pm 1,5\%$.

У 12 больных ХРФ мы проследили динамику показателей функциональной активности лейкоцитов в зависимости от стадии заболевания (ремиссия или обострение). При этом не было выявлено значимых различий в NO-продуцирующей активности при обострении заболевания по сравнению с ремиссией. На наш взгляд, это указывает на стойкость нарушения нитроксидпродуцирующей функции лейкоцитов и отражает истощение резерва бактерицидности нейтрофилов как возможную причину реактивации хронического процесса, но, с другой стороны, может объясняться непрерывно рецидивирующим течением, нестойким периодом ремиссии, в течение которого не происходит существенной нормализации свойств лейкоцитов.

Анализ корреляций между уровнем продукции кислородных радикалов и NO-продуцирующей активностью лейкоцитов позволил установить наличие положительной связи между показателем стимулированного НСТ-теста и уровнем базальной ($r = -0,57$; $p = 0,003$) и стимулированной ($r = 0,54$; $p = 0,005$) NO-продукции в группе здоровых лиц. По-видимому, указанные корреляции отражают взаимную регуляцию образования радикалов азота и кислорода в активированных гранулоцитах. В литературе имеются данные о возможном антагонистическом характере взаимоотношений NO и O_2^- вследствие конкуренции за участие НАДФН в образовании данных радикалов [5, 8]. Так, известно, что продуцируемый активированными гранулоцитами NO в физиологической концентрации приводит к повышению образования пероксинитрита и потенцирует образование O_2^- , в то время как высокое содержание NO — подавляет [6].

В отличие от здоровых лиц в группе больных ХРФ в период ремиссии упомянутые связи отсутствовали. С учетом описанных выше нарушений продукции NO и АФК радикальное изменение характера указанных корреляций в ремиссии ХРФ можно рассматривать как нарушение баланса NO/O_2^- вследствие длительной стимуляции лейкоцитов бактериальными продуктами персистирующего возбудителя. В то же время у пациентов в стадии обострения фурункулеза обнаружено наличие положительной корреляции между уровнем базальной продукции NO и показателем спонтанного ($r = 0,78$; $p = 0,038$) и стимулированного ($r = 0,84$; $p = 0,019$) НСТ-теста. Это в целом напоминает корреляции у здоровых лиц, что можно расценивать как тенденцию к нормализации состояния NO/O_2^- — бактерицидной системы лейкоцитов во время реактивации хронического заболевания.

Таким образом, при ХРФ как в период обострения, так и в ремиссии заболевания имеются стойкие нарушения образования лейкоцитами важнейших факторов бактерицидности — NO

Показатели функциональной активности лейкоцитов больных ХРФ в период ремиссии в сравнении со здоровыми лицами

Показатель	Контроль (n=26)	Больные ХРФ
NO ₆ , $\mu\text{M}/\text{л}$	$0,48 \pm 0,06$	$0,42 \pm 0,03$ (48)
NO _С , $\mu\text{M}/\text{л}$	$0,69 \pm 0,08$	$0,40 \pm 0,03^*$ (48)
ИС _{NO}	$2,09 \pm 0,57$	$1,03 \pm 0,06^{**}$ (48)
НСТ ₆	$12,2 \pm 1,2$	$22,8 \pm 1,4^{**}$ (62)
НСТ _С , %	$54,9 \pm 2,0$	$50,8 \pm 1,8$ (62)
ИФР	$0,78 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,02^{**}$ (62)
ФИ, %	$71,9 \pm 1,5$	$69,0 \pm 1,4$ (62)

Примечание. В скобках указано число больных. Достоверность различий по сравнению с контролем: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,001$.

и АФК. Проведенное нами исследование позволило установить кардинально различный тип реагирования лейкоцитов здоровых лиц и больных ХРФ на стимуляцию бактериальным антигеном. Нейтрофилы здоровых лиц отвечают увеличением одновременно и продукции NO, и радикалов кислорода (возможно, вследствие достаточной доступности НАДФН и отсутствия конкуренции NO-синтазы и НАДФ-оксидазы за этот субстрат), что в конечном итоге увеличивает их бактерицидный потенциал. Лейкоциты больных ХРФ преимущественно образуют O₂- на фоне негативной NO-продукции, что приводит к дисбалансу NO/O₂- и изменяет их способность к уничтожению микроорганизмов. Можно предположить, что такой бактерицидный профиль нейтрофилов будет достаточным для киллинга лишь чувствительных к O₂- каталаза-негативных микроорганизмов. В случае интернализации патогенов в клетки, не обладающие достаточной НАДФ-оксидазной активностью, отсутствие местного увеличения NO, продуцируемого лейкоцитами в очаге воспаления, и последующего проникновения этой липофильной молекулы внутрь инфицированной клетки может служить одной из причин стойкой персистенции *S. aureus*, вялого течения и непрерывного рецидивирования фурункулеза. По-видимому, комплексная оценка нитроксидного статуса лейкоцитов и их кислородпродуцирующей активности целесообразна для выявления дефектов фагоцитарного звена у больных ХРФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новикова И. А., Гомоляко А. В. // Пробл. здоровья и экол. - 2008. - Т. 17, № 3. - С. 138-143.
2. Сахно Л. В., Леплина О. Ю., Норкин М. Н. и др. // Бюл. экспер. биол. - 2000. - Т. 130, № 10. - С. 402-406.
3. Сетдикова Н. Х., Латышева Т. В. // Иммунология. — 2000. - № 3. - С. 48-50.
4. Сетдикова Н. Х., Манько К. С., Латышева Т. В. // Лечащий врач. — 2005. - № 6. - С. 44—47.
5. Andonegui C, Trevani A. S., Gamberale R. et al. // J. Immunol. - 1999. - Vol. 162. - P. 2922-2930.
6. Chang-i! Lee, Miura K., Liu X. et al. // J. Biol. Chem. — 2000. - Vol. 275. - P. 38965-38972.
7. Green L. C, Wagner D. A., Glogowski J. et al. // Anal. Biochem. - 1982. - Vol. 126. - P. 131-138.
8. Kaplan S. S., Lancaster J. R., Basford R. E. et al. // Infect, and Immun. - 1996. - Vol. 164. - P. 69-76.
9. Klink M., Cedzynski M., Swierzko A. St. et al. // J. Med. Microbiol. - 2003. - Vol. 52. - P. 303-308.
10. Kluytmans J., van Belkum A., Verbrugh H. // Clin. Microbiol. Rev. - 1997. - Vol. 10. - P. 505-520.
11. Molne L., Verdrengh M., Tarkowski A. // Infect, and Immun. - 2000. - Vol. 68, N 11. - P. 6162-6167.
12. Wheeler M. A., Smith S. D., Guillermo G.-C. et al. // J. Clin. Invest. - 1997. - Vol. 99. - P. 110-116.

Поступила 18.08.09