ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ЛОВУШКИ ПРИ ГНОЙНЫХ ОСЛОЖНЕНИЯХ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

Максимов Д. И., Басырева Л. Ю., Гусев А. А., Вахрушева Т. В., Яскевич А. В., Гусев С. А., Островский Е. М., Панасенко О. М.
ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России

CIRCULATING NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS PATIENTS WITH SUPPURATIVE COMPLICATION

Maximov D. I., Basyreva L. Yu., Gusev A. A., Vakhrusheva T. V., Yaskevich A. V., Gusev S. A., Ostrovsky E. M., Panasenko O. M.
FGBI Federal scientific-clinical center of physico-chemical medicine FMBA Russia

Максимов Дмитрий Игоревич
Maximov Dmitry I.
dmaksimov81@mail.ru

Максимов Дмитрий Игоревич — врач Центра гнойной хирургии и регенераторных технологий

Басырева Лилия Юрьевна — к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории морфологии отдела биофизики

Гусев Александр Анатольевич — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории морфологии отдела биофизики

Вахрушева Татьяна Валентиновна — к.б.н., ст.н.с. лаборатории физико-химических методов исследования и анализа

Яскевич Алеся Викторовна — врач Центра гнойной хирургии и регенераторных технологий

Гусев Сергей Андреевич — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией морфологии отдела биофизики

Панасенко Олег Михайлович — д.б.н., проф, зав. лабораторией физико-химических методов исследования и анализа отдела биофизики

Островский Евгений Михайлович — д.м.н., руководитель Центра гнойной хирургии и регенераторных технологий

Резюме

Цель статьи: сравнение содержания нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) в крови пациентов с сахарным диабетом 2 типа при гнойно-некротических осложнениях различной локализации и в крови здоровых добровольцев.

Основные положения: концентрация НВЛ в крови пациентов в среднем была выше, чем у доноров. С ростом уровня HbA1c наблюдали рост концентрации НВЛ в группе доноров и у пациентов с высоким содержанием НВЛ (n=5). У остальных пациентов концентрация НВЛ с ростом HbA1c снижалась, что свидетельствует о существовании компенсаторного механизма, сдерживающего нетоз в условиях развития воспаления при диабете 2 типа. Высокое содержание НВЛ и прямая корреляция этого показателя с HbA1c наблюдались у пациентов с флегмоной, обширной инфицированной раной, гангреной голени, гнойным медиастенитом. У остальной части пациентов преобладали инфицированные раны, абсцессы, гангрена пальца. Анализ двух клинических примеров иллюстрирует связь между тяжестью воспалительного процесса, включая скорость заживления раны, и концентрацией НВЛ в крови пациентов.

Заключение: проведенное исследование позволяет предположить, что мониторинг концентрации НВЛ в крови в сочетании с оценкой уровня HbA1 у здоровых людей и пациентов с СДТ2 позволит более точно оценивать риск развития различных осложнений, степень тяжести заболевания и длительность постоперационного лечения.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, нетоз, гликированный гемоглобин, гнойно-некротические осложнения, нейтрофильные внеклеточные ловушки

Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2017; 147 (11): 60–63

Summary

Objective of the Paper: Quantitative comparison of neutrophil extracellular traps (NETs) in blood between type 2 diabetes mellitus patients with purulent necrotic complications at various locations and healthy volunteers.

Key Points: NETs concentration in patient blood was, on average, higher than that for healthy subjects. NETs blood concentration in the latter and in patients (n = 5) with high levels of NETs increased as HbA1c increased. For other patients, NETs concentration decreased as HbA1c increased, indicating the existence of a compensatory mechanism to inhibit NETosis in conditions of inflammation in type 2 diabetes mellitus. High NETs levels and a positive correlation between this parameter and HbA1c were observed in patients with phlegmon, vast infected wound, gangrene of lower leg, purulent pyogenic mediastinitis. Infected wounds, abscess, gangrene of finger were predominant among other patients. Analysis of the two clinical examples shows the relationship between inflammation severity, including wound healing speed, and NETs concentration in patient blood.

Conclusion: This study suggests that monitoring blood levels of NETs alongside HbA1 levels in healthy subjects and type 2 diabetes mellitus patients with allow more accurate assessment of the risk of various complications, the disease severity and the duration of post-surgical treatment

Key words: type 2 diabetes mellitus, NETosis, glycated haemoglobin, purulent necrotic complications, neutrophil extracellular traps

Eksperimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya 2017; 147 (11): 60–63

Введение

Сахарный диабет 2 типа (СД2Т) ассоциируется с хроническим воспалением низкой интенсивности, в основе которого лежит активация врожденной системы иммунитета [1]. Нейтрофилы, являясь составной частью врожденной системы иммунитета, выступают в качестве первой линии клеточной защиты против инфекции [2]. Антимикробное действие нейтрофилов реализуется через дегрануляцию, продукцию активных форм кислорода (АФК) и галогенов (АФГ), и нетоз, означающий формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) [3,4]. НВЛ представляют собой фибриллярную структуру, состоящую из хроматина, гистонов и антимикробных протеинов из гранул нейтрофилов, в том числе миелопероксидазы [4].

Вследствие неспецифического действия на биологические мишени АФК/ АФГ и НВЛ могут повреждать эндотелий сосудов и ткани, усиливая воспаление и становясь активным звеном патогенетических механизмов [5–9]. К наиболее частым осложнениям СД2Т относятся ранние сердечно-сосудистые заболевания, нейропатии, нефропатии и случаи инфекции [10,11], развивающиеся даже на фоне коррекции уровня гликемии [12].

Целью исследования была оценка содержания НВЛ у пациентов, страдающих СД2Т, при развитии гнойно-некротических процессов различной локализации, в сравнении со здоровыми добровольцами.

Материал и методы исследования

В исследовании приняли участие доноры и пациенты с диагнозом СД2Т, поступившие в Центр гнойной хирургии и регенераторных технологий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России с ноября 2016 г. по март 2017 г. До начала исследования от всех больных и здоровых лиц получено информированное согласие на участие в исследовании и заборе крови для анализов. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Кровь у всех участников исследования забиралась утром натощак путем венопункции в вакуум-контейнеры с цитратом натрия. В клинической лаборатории проводили общий анализ крови, определяли уровень гликированного гемоглобина, базовый уровень глюкозы, креатинин, мочевину, билирубин, активность аспартатаминотраснферазы (АСТ), аланинаминотраснферазы (АЛТ). Сразу после взятия крови готовили стандартизированные мазки, которые фиксировали по Маю-Грюнвальду, окрашивали по Романовскму и на микроскопе Motic B3 (Motic Asisa, Hong Kong) проводили подсчет количества лейкоцитов и НВЛ [13]. Полученные данные использовали для расчета лейкоцитарной формулы и количества НВЛ в 1 мкл крови (НВЛ/мкл).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ STATISTICA 6.0.

Результаты и обсуждение

В исследовании приняли участие 17 доноров и 26 пациентов с диагнозом СД2Т с гнойно-некротическими осложнениями в виде флегмон различной локализации, гангрены пальцев, стопы и голени (Таблица 1). О выраженной воспалительной реакции в группе пациентов свидетельствовало повышение содержания лейкоцитов в крови, при этом достоверно увеличивалось содержание мочевины и креатинина.

Величина концентрации НВЛ у пациентов в среднем в 1,7 раза превышала показатель для здоровых добровольцев ($p<0,05$) (рис. 1).

При сопоставлении данных о доле гликированного гемоглобина и содержании НВЛ у доноров обнаруживалась достоверная положительная корреляция ($r = 0,84$ $P<0,001$) между этими показателями (данные представлены в виде звездочек на рис. 2). При объединении данных для доноров и пациентов обнаружилось, что у части пациентов зависимость между концентрацией НВЛ и долей гликированного гемоглобина имела тот же характер (темные ромбы, рис. 2).

Для остальных пациентов зависимость была обратной и с ростом доли гликированного гемоглобина концентрация НВЛ в крови снижалась (светлые ромбы на рис. 2).

Однозначной зависимости между уровнем глюкозы и концентраций НВЛ не наблюдали ни у доноров ($r=0,2$; $P>0,05$), ни у пациентов ($r= – 0,14$; $P>0,05$).

Можно предположить, что ответная реакция нейтрофилов в виде нетоза при развитии осложнений СД2Т может происходить по двум сценариям. В рамках первого сценария скорость образования НВЛ будет превышать скорость их деградации и элиминации (темные ромбы на рис. 2). При втором

Таблица 1.
Характеристика участников исследования. Данные представлены в виде медианы; в скобках указаны минимальное и максимальное значения.

Параметры	Доноры	Пациенты
Мужчины	5	14
Женщины	12	12
Возраст (годы)	57 (44–67)	61,5(44–77)
HbA1c (%)	5,8(5,1–6,5)	8,1 (6,2–11,7) **
БУГ (ммоль/л)	5,2 (4,7–6,6)	9,6 (5,6–25,0)**
Креатинин (мкмоль/л)	92 (78–115)	115(71–355)*
Мочевина (ммоль/л)	5,3 (3,5–6,6)	7,7(2,7–28,6)*
Билирубин (мкмоль/л)	6,5 (4,7–19,3)	10,1(2,7–27,3)
АСТ (МЕ/л)	21,1 (13,8–39,8)	22,4(13,4–54,2)
АЛТ (МЕ/л)	21,8 (10,5–37,5)	23,0(11,4–78,5)
Лейкоциты в 1 мкл.	6300(3670–7750)	8550(5400–24450)*

Примечания:
HbA1c – гликированный гемоглобин, БУГ – базовый уровень глюкозы, АСТ – аспартатаминотраснфераза, АЛТ – аланинаминотраснфераза. *P<0,05; **P<0,01 относительно группы доноров (по критерию Манна-Уитни).

Рисунок 1.
Концентрация НВЛ в крови доноров и пациентов с СД2Т. На рисунке отмечены медианы. *P<0,05 по критерию Манна-Уитни.

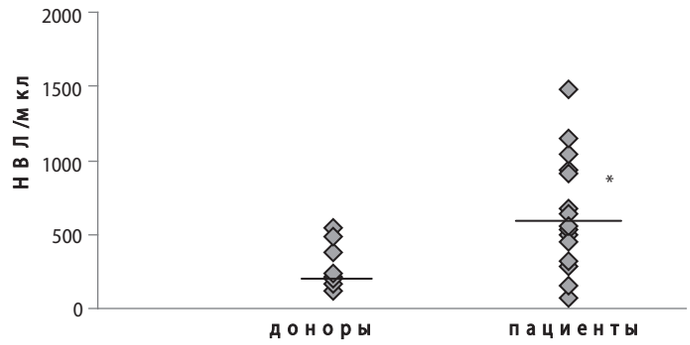
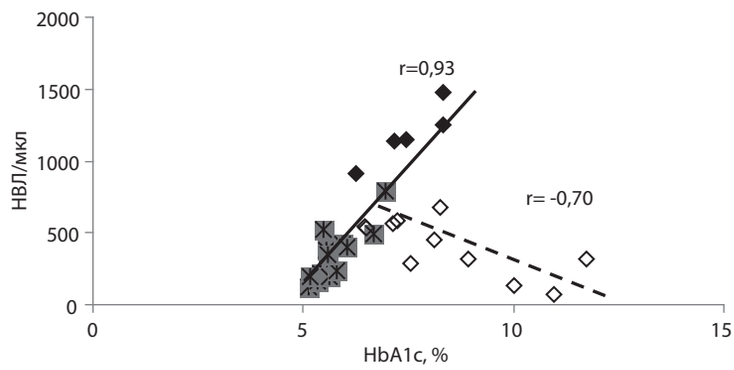


Рисунок 2.
Корреляционные зависимости между концентрацией НВЛ и содержанием гликированного гемоглобина в крови доноров и пациентов с СД2Т. Приведены линии тренда: сплошная линия отражает корреляцию для доноров (звездочки) и пациентов с высоким содержанием НВЛ (темные ромбы); пунктирная линия – корреляцию для пациентов с содержанием НВЛ на уровне доноров (светлые ромбы). Достоверность корреляций p<0,05.



сценарии скорость деградации и элиминации НВЛ будет преобладать над скоростью их образования (светлые ромбы на рис. 3). Природа таких механизмов пока неясна. Небольшой объем выборки не позволяет однозначно утверждать, что высокая концентрация НВЛ способствует (или сопутствует) развитию гнойно-некротических осложнений, однако следует отметить, что высокий уровень содержания НВЛ и его положительная корреляция с долей гликированного гемоглобина наблюдались у пациентов с флегмоной, обширной инфицированной раной, гангреной голени, гнойным медиастенитом. У остальной части пациентов преобладали инфицированные раны, абсцессы, гангрена пальца.

В качестве примера рассмотрим типичную историю болезни пациента с высоким уровнем НВЛ в крови (1409 НВЛ/ мкл).

Больная Т., 61 года. Установлен клинический диагноз: обширная гнилостно-некротическая флегмона правой стопы. Операция – вскрытие флегмоны 07.03.2017 г. Хирургическая обработка гнойного очага (ХОГО) правой стопы от 14.03.2017 г, ХОГО правой стопы и экзартикуляция 1 пальца правой стопы и 1 плюсневой стопы. Наложение VAC – системы (вакуумной терапии). Сахарный диабет II типа. Индивидуальный целевой уровень компенсации гликированного гемоглобина до 7.5 % (гликемия натощак 7.5 ммоль/л, после еды – 10 ммоль/л). Диабетическая дистальная полинейропатия 3 ст., диабетическая микро-, микроангиопатия, диабетическая нефропатия ХБП 3 б. Синдром диабетической стопы (СДС), нейроишемическая форма. ИБС, стенокардия напряжения 2ФК. Атеросклеротический кардиосклероз. Гипертоническая болезнь 2 ст. Артериальная гипертензия 2 ст., риск 4. Стенозирующий атеросклероз артерий нижних конечностей. Дислипидемия, остаточные явления перенесенного ОНМК. Ожирение 1 ст, ИМТ 31 кг/м2.

Состояние при поступлении средней степени тяжести. По подошвенной поверхности имеется рана 12х5 см после вскрытия флегмоны от 07.03.2017 г., дно покрыто гнойно-некротическими тканями, отделяемое гнойное. При обследовании выявлено: гликемический профиль – 4.6–9 ммоль/л; HbA1C в крови – 10.69 %.

Выполнено дуплексное сканирование артерий ног (УЗДГ): заключение – эхографические признаки субтотальной окклюзии артерий ног с двух сторон.

Больной выполнена операция – вскрытие флегмоны 07.03.2017 г. Хирургическая обработка гнойного очага правой стопы от 14.03.2017 г. В результате проведенного лечения отмечен выраженный клинический эффект в виде купирования болевого синдрома, уменьшения в размере раны стопы до 7х3 см, активное развитие грануляционной ткани в центре, эпителизация с краев раны подошвенной части стопы. Время нахождения в стационаре составило 31 койко-день.

Иная картина наблюдается у пациентов с низким уровнем НВЛ в крови (319 НВЛ/ мкл).

Больной Р., 61 года. Установлен клинический диагноз: инфицированные раны правой голени. Сахарный диабет II типа. Индивидуальный целевой уровень компенсации гликированного гемоглобина до 8 % (гликемия 8–11 ммоль/л).Диабетическая дистальная полинейропатия, диабетическая микро-, микроангиопатия, диабетическая нефропатия.

Состояние при поступлении удовлетворительное. При осмотре по передней поверхности правой голени в средней трети имеются множественные раневые дефекты 2.0х1.0 см, дно покрыто фибрином, отделяемое серозно-гнойное, скудное. Отмечен умеренный отек голени и стопы, регионарного лимфаденита нет.

При обследовании выявлено: гликемический профиль – 8.0–12 ммоль/л; HbA1c в крови – 11.72 %. В результате проведенного лечения отмечен выраженный клинический эффект в виде купирования болевого синдрома, полной эпителизации раневых дефектов. Время нахождения в стационаре составило 14 койко- дней.

Полученные результаты согласуются с данными авторов, показавших, что при диабете НВЛ препятствуют заживлению ран [14], оказывают провоспалительное [15] и прокоагулянтное действие [16].

Возможно, для пациентов с высокой концентрацией НВЛ необходимы мероприятия, направленные на снижение их содержания, в том числе, и путем применения препаратов, снижающих активность нейтрофилов и/или ускоряющих разрушение НВЛ.

Длительность заболевания СД2Т и высокий уровень гликемии вызывают значительные гнойно-некротические повреждения конечностей. В свою очередь, выраженные воспалительные изменения ведут к ухудшению состояния пациентов, значимым изменениям гомеостаза и к значительному увеличению концентрации НВЛ, которые могут играть роль в развитии ангиопатии различного уровня и тяжести и усугублять течение сопутствующих заболеваний.

При публикации материалов данной статьи отсутствует конфликт интересов

Литература

1. *Wellen K. E., Hotamisligil G. S.* Inflammation, stress, and diabetes. J. Clin Invest. 2005; 115 (5): 1115–1111.
2. *Mantovani A., Cassatella M. A., Costantini C., Jaillon S.* Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. Nat Rev Immunol. 2011; 11 (8): 519–531.
3. *Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S. et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004; 303 (5663): 1532–1535.
4. *Brinkmann V., Zychlinsky A.* Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? J. Cell Biol. 2012; 198 (5): 773–83.
5. *Ma A. C., Kubes P.* Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellu-lar traps (NETs) in sepsis. J. Thromb Haemost. 2008; 6 (3): 415–20.
6. *Villanueva E., Yalavarthi S., Berthier C. C., Hodgin J. B., Khandpur R., Lin A. M. et al.* Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. J. Immunol. 2011; 187 (1): 538–52.
7. *Marin-Esteban V., Turbica.I, Dufour G., Semiramoth N., Gleizes A., Gorges R. et al.* Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli strain C1845 induces neutro-phil extracellular traps that kill bacteria and damage human enterocyte-like cells. Infect Immun. 2012; 80 (5): 1891–9.
8. *Simon D., Simon H. U., Yousefi S.* Extracellular DNA traps in allergic, infectious, and autoimmune diseases. Allergy. 2013; 68 (4): 409–16.
9. *Панасенко О. М., Горудко И. В., Соколов А. В.* Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах. Успехи биологической химии. 2013; 53: 195–244. [Panasenko O. M., Gorudko I. V., Sokolov A. V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. Biochemistry (Moscow). 2013; 78(13): 1466–1489.]
10. *Fernandez-Real J. M., Pickup J. C.* Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. Diabetologia. 2012; 55: 273–8.
11. *Peleg A. Y., Weerarathna T., McCarthy J. S., Davis T. M.* Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. Diabetes/metabolism research and reviews. 2007; 23: 3–13.
12. *Miyoshi A.. Yamada M., Shida H., Nakazawa D., Kusunoki Y., Nakamura A. et al.* Circulating neutrophil extracellular trap levels in well-controlled type 2 diabetes and pathway involved in their formation iInduced by high-dose glucose. Pathobiology. 2016; 83: 243–251.
13. *Basyreva L., Brodsky I., Gusev A., Zhapparova O., Mikhalchik E., Gusev S. et al.* The effect of intravenous immunoglobulin (IVIG) on ex vivo activation of human leukocytes. Human Antibodies 2015/2016; 1: 1–6.
14. *Fadini G., Menegazzo L., Rigato M., Scattolini V., Poncina N., Bruttocao A.* NETosis delays diabetic wound healing in mice and humans. Diabetes 2016; 65: 1061–1071.
15. *Delgado-Rizo V., Martínez- Guzmán M. A., Iñiguez-Gutierrez L., García-Orozco A., Alvarado-Navarro A., Fafutis-Morris M.* Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview. Front. Immunol. 2017; 8: 81.
16. *Fuchs T. A., Brill A., Duerschmied D., Schatzberg D., Monestier M., Myers D. D. Jr. et al.* Extracellular DNA traps promote thrombosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107(36): 15880–5.