

## Морфологическое состояние аутолимфоцитов, используемых в терапии трофических язв на фоне синдрома диабетической стопы

Любарский М.С., Шумков О.А., Хабаров Д.В., Бгатова Н.П., Каменская О.В.

## Morphology of autolymphocytes used in the treatment of trophic ulcers in the setting of diabetic foot syndrome

Lyubarsky M.S., Shoumkov O.A., Khabarov D.V., Bgatova N.P., Kamenskaya O.V.

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, г. Новосибирск

© Любарский М.С., Шумков О.А. Хабаров Д.В. и др.

Синдром диабетической стопы (СДС) — одно из самых частых и тяжелых осложнений сахарного диабета (СД). В НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН (г. Новосибирск) разработан способ местного лечения трофических язв и ран на фоне СДС с использованием аутолимфоцитов, обработанных лейкинфероном (ЛФ). Аутолимфоциты были получены при проведении лимфоцитаферезов на сепараторе клеток крови «Haemonetics MCS+». При исследовании ультраструктурной организации выделенных лимфоцитов, обработанных ЛФ, не выявлено нарушений их структурной целостности. Возраста на 50% численная плотность свободных полисомальных рибосом и в 3 раза — объемная плотность везикулярных структур в цитоплазме лимфоцитов. Количество выростов и микроворсинок, образуемых плазматической мембраной, повышалось в 2,4 раза. Таким образом, технологии выделения аутолимфоцитов не приводят к нарушению структуры клеток. Обработка лимфоцитов ЛФ не вызывает повреждения клеток, а способствует развитию структурных изменений, свидетельствующих об активации белок-синтетической функции клеток.

**Ключевые слова:** синдром диабетической стопы, морфология аутолимфоцитов, лимфоцитаферез, лейкинферон.

Diabetic foot syndrome is one of the most often chronic and severe complications of diabetes mellitus. Method of local treatment of trophic ulcers and wounds in the setting of diabetic foot syndrome using autolymphocytes processed by leukiniferon was developed in the Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Novossibirsk). Autolymphocytes were obtained by lymphocytapheresis on the blood cell separator «Haemonetics MCS+». The study of ultrastructural organization of identified lymphocytes processed by leukiniferon did not reveal any disturbances of their structural integrity. Numerical density free polysomal ribosomes increased by 50%. Volumetric density of vesicular structures in cytoplasm of lymphocytes increased by 3 times. Number of excrescences and microvilli formed by plasmatic membrane increased by 2,4 times. Thus, technologies of autolymphocytes identification do not result to damaged structure of cells. Processing of the lymphocytes by leukiniferon does not cause cellular damage but promotes development of structural changes.

Key words: diabetic foot syndrome, morphology of autolymphocytes, lymphocytapheresis, leukiniferon.

УДК 616-002.44:612.112.94

### Введение

Синдром диабетической стопы (СДС) — одно из самых частых и тяжелых осложнений сахарного диабета (СД). Данное состояние включает в себя патологические изменения нервной системы, артериального и микроциркуляторного русла, представляющие непосредственную угрозу развития язвенно-некротических процессов и гангрены стопы [2, 4]. Гнойно-воспалительные и язвенно-некротические процессы являются наиболее неблагоприятным течением этого синдрома. По данным некоторых зарубежных исследователей, язвы на фоне СДС в 84% случаев приводят к низким ампутациям и увеличивают смертность в 2,4 раза в сравнении с больными, страдающими СД без язв [6]. Несмотря на разработанные алгоритмы и консенсусы по терапии СДС, проблема заживления трофических

являются наиболее неблагоприятным течением этого синдрома. По данным некоторых зарубежных исследователей, язвы на фоне СДС в 84% случаев приводят к низким ампутациям и увеличивают смертность в 2,4 раза в сравнении с больными, страдающими СД без язв [6]. Несмотря на разработанные алгоритмы и консенсусы по терапии СДС, проблема заживления трофических

язв и ран на фоне данного осложнения остается актуальной и трудноразрешимой, и поэтому необходим поиск новых методов воздействия на рассматриваемый патологический процесс [7].

В НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН (г. Новосибирск) разработан способ местного лечения трофических язв и ран на фоне СДС. Основными этапами метода являются: 1) выделение популяции аутолимфоцитов на сепараторе клеток крови «Наеонетикс MCS+»; 2) обработка в условиях *in vitro* полученных аутоклеток иммуномодулятором лейкинфероном; 3) введение обработанных аутолимфоцитов субъльцерозно. При использовании клеточной технологии возникает вопрос о структурно-функциональной целостности выделенных и обработанных препаратом аутолимфоцитов.

Цель настоящего исследования — сравнительное изучение ультраструктурной организации выделенных из крови лимфоцитов, обработанных лейкинфероном.

## Материал и методы

Аутолимфоциты получали в ходе сеансов аппаратного лимфоцитафереза на сепараторе клеток крови «Наеонетикс MCS+». Затем часть аутолимфоцитов направлялась на исследование (предварительно в течение 40 мин клетки находились в термостате ТС 1/20 при температуре 37,0—37,5 °С), а основная часть обрабатывалась лейкинфероном в термостате ТС 1/20 при температуре 37,0—37,5 °С в течение 40 мин. Лейкинферон представляет собой препарат человеческого интерферона и других цитокинов, синтезированных лейкоцитами из крови клинически здоровых доноров, проверенных на отсутствие инфекций (ВИЧ, гепатит, сифилис). Ампула содержит 10 000 МЕ противовирусной активности человеческого интерферона- $\alpha$ , фактор ингибиции макрофагов и другие цитокины. Для изучения аутолимфоцитов, как обработанных иммуномодулятором, так и интактных, в световом микроскопе и просвечивающем режиме электронного микроскопа выделенную из крови взвесь клеток фиксировали в 2,5%-м растворе глутаральдегида на фосфатном буфере, затем в 1%-м растворе OsO<sub>4</sub> на фос-

фатном буфере [8], дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали толуидиновым голубым, изучали под световым микроскопом и выбирали необходимые участки для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 35—45 нм на ультратоме LKB-8800, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата, цитратом свинца [9] и изучали под электронным микроскопом JEM-1010 (Япония).

Лимфоциты фотографировали при 6 000-кратном увеличении в электронном микроскопе. Для морфометрического исследования брали 50 клеток, обработанных иммуномодулятором и 50 интактных лимфоцитов. Морфометрию ультраструктурной организации лимфоцитов выполняли в соответствии с общепринятыми принципами и методами при увеличении в 48 000 и использовании открытой тестовой системы [1]. Определяли среднее значение  $M$  исследуемых морфометрических показателей и ошибку среднего  $m$  [5]. Статистическую обработку количественных показателей проводили с помощью  $t$ -критерия Стьюдента, считая различия значимыми при  $p \leq 0,05$ . Критерий Стьюдента был взят на основании тестирования количественного содержания органоидов в активированных и интактных лимфоцитах, в результате которого выявлено, что попарные разности нормально распределены. Если данное условие выполняется и дисперсии наблюдений в группах не слишком различны, то  $t$ -критерий является чувствительным методом для выявления достоверности различий исследуемых признаков [3].

## Результаты исследования

Установлено, что выделенные лимфоциты сохраняли структурную целостность (рис. 1). В цитоплазме клеток были отмечены немногочисленные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулаума, комплекса Гольджи, прикрепленные и свободные полисомальные рибосомы, лизосомы. Немногочисленные митохондрии имели хорошо выражен-

ные кристы. Ядро имело обычное для лимфоцитов распределение гетерохроматина. Плазматическая мембрана лимфоцитов образовывала выросты и микроворсинки (рис. 1).

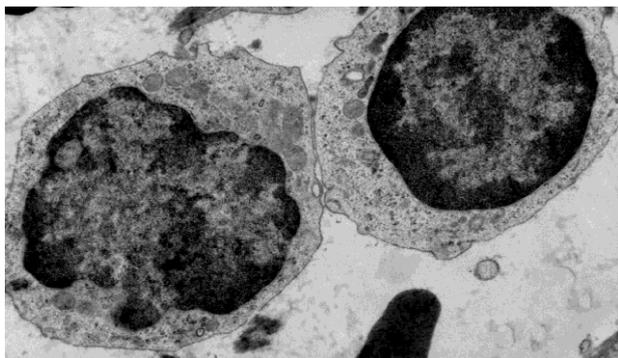


Рис. 1. Ультраструктура выделенных из крови лимфоцитов. Ув. 12 000

При изучении ультраструктуры лимфоцитов, обработанных лейкинфероном, также отмечено сохранение структурной целостности клеток (рис. 2). В цитоплазме последних отмечали большее содержание цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума. На 50% возрастала численная плотность свободных полисомальных рибосом по сравнению с соответствующим показателем необработанных лимфоцитов. Была отмечена тенденция к увеличению объемной плотности митохондрий. Количество выростов и микроворсинок, образуемых плазматической мембраной, повышалось в 2,4 раза (рис. 2). Ядро имело обычное для лимфоцитов распределение гетерохроматина (рис. 2). Объемная плотность везикулярных структур в цитоплазме лимфоцитов возрастала в 3 раза (таблица, рис. 3).

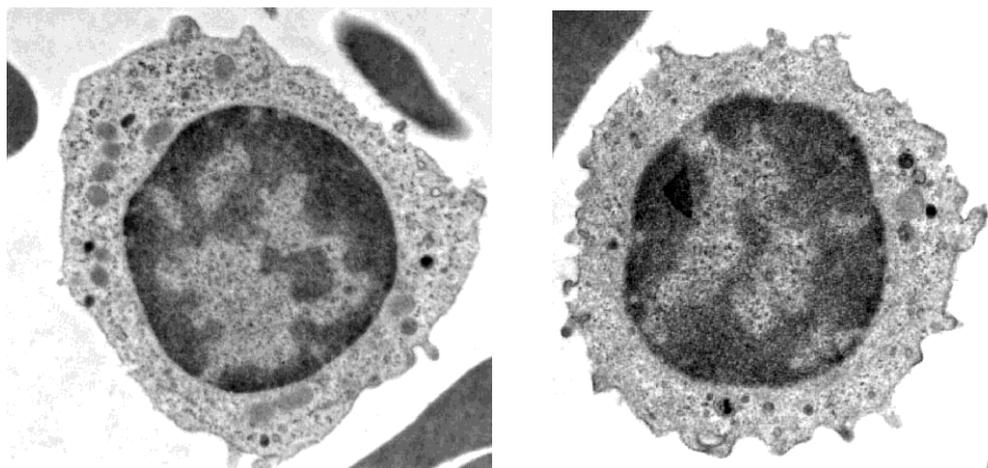


Рис. 2. Ультраструктура выделенных из крови лимфоцитов, активированных лейкинфероном. Ув. 12 000

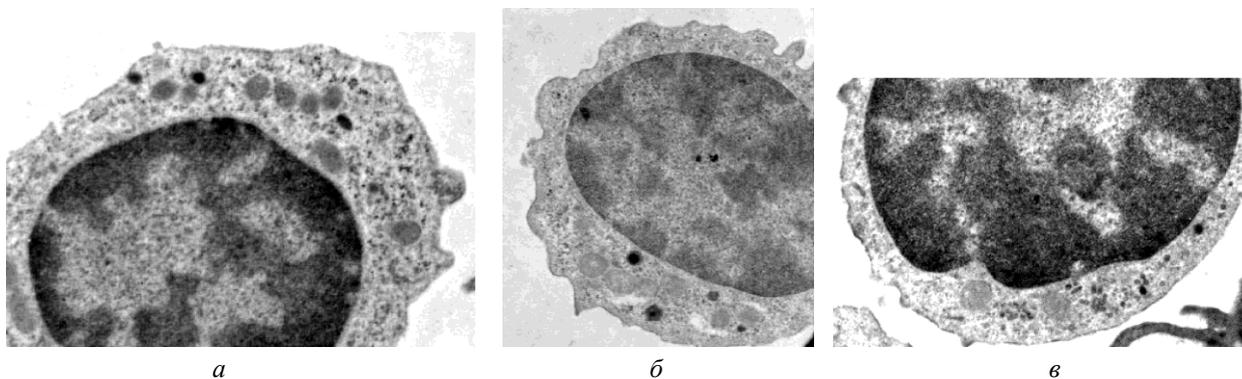


Рис. 3. Фрагменты выделенных лимфоцитов, обработанных лейкоинфероном: *a*, *б* — цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, прикрепленные и свободные полисомальные рибосомы, митохондрии; *в* — многочисленные мелкие везикулы, заполненные электронно-содержимым. Увеличение: *a* — 24 000; *б* — 30 000; *в* — 32 000

**Результаты морфометрического анализа аутолимфоцитов**  
( $M \pm m$ )

Параметр		Контроль	Лейкинферон
Митохондрии	Vv	4,1 ± 0,4	5,8 ± 0,6
	Sv внутр. мембрана	2,8 ± 0,3	2,8 ± 0,2
	Sv наружн. мембрана		
	NA	2,7 ± 0,5	2,4 ± 0,2
ГЭР, Vv		6,4 ± 0,9	4,1 ± 0,8
Рибосомы	Прикрепленные, NA	24,2 ± 3,4	24,9 ± 5,1
	Свободные полисомальные, NA	94,8 ± 5,6	143,5 ± 6,2*
Лизосомы	Vv	2,3 ± 0,5	3,9 ± 0,2
	NA	2,3 ± 0,2	3,6 ± 0,3
Микроворсинки, NA		4,2 ± 0,5	10,1 ± 0,3*
Везикулы, Vv		6,2 ± 0,4	18,8 ± 0,8*

Примечание. Vv — объемная плотность структур (процент от объема цитоплазмы); NA — численная плотность структур (число в тестовой площади); \* — обозначены величины, достоверно отличающиеся от соответствующих показателей в контроле.

### Заключение

Проведенное исследование показало, что технологии выделения аутолимфоцитов на сепараторе клеток крови «Намонетикс MCS+» не приводят к нарушению структуры клеток.

Обработка лимфоцитов лейкоинфероном не вызывает повреждения клеток, а способствует развитию структурных изменений, свидетельствующих об акти-

вации белок-синтетической функции клеток. Поэтому субульцерозное введение аутолимфоцитов, обработанных иммуноактивным препаратом, непосредственно в зону трофического дефекта позволяет им реализовать свое стимулирующее влияние на репарацию, трофику и местный иммунитет.

### Литература

1. Автандилов Г.Г., Невзоров В.П., Невзорова О.Ф. Системный стереометрический анализ ультраструктур клеток. Кишинев: Штиинца, 1984. 166 с.
2. Балаболкин М.И. Диабетология. М., 2000. 672 с.
3. Боровиков В.П. Популярное введение в программу Statistica. Компьютер-Пресс, 1998.
4. Дедов И.И., Анциферов М.Б., Галстян Г.Р., Токмакова А.Ю. Синдром диабетической стопы. М., 1998. 138 с.
5. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: Изд-во МГУ. 1970. С. 27.
6. Goodridge D., Trepman E., Embil J.M. Health-Related quality of life in diabetic patients with foot ulcers: Literature review // № 32 (6). P. 368—377.
7. Lobmann R., Schultz G., Lehnert H. Proteases and the Diabetic Foot Syndrome: Mechanisms and therapeutic implications // Diabetes Care. 2005. № 28. P. 461—471.
8. Milloning G. In Fifth International Congress in Electron Microscopy / Ed. by S.S. Breese. N. Y.: Academic Press, 1962. P. 8.
9. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // J. Cell. Biol. 1963. № 17. P. 208—212.

Поступила в редакцию 21.06.2006 г.

Утверждена к печати 20.11.2006 г.