

ХИРУРГИЯ



УДК 617.586-085-089: 616.379-008.64-06

ИММУНОКОРРЕГИРУЮЩАЯ ТЕРАПИЯ БОЛЬНЫХ С ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ

М.Д.Дибиров, А.В.Прошин*, Р.У.Гаджимурадов, В.В.Лебедев

*Московский государственный медико-стоматологический университет***Городская клиническая больница №81, Москва, net_proshin@mail.ru*

Проведено сравнительное исследование больных с гнойно-некротическими поражениями нижних конечностей на фоне сахарного диабета с иммунокорректирующей терапией и без нее. Оценку иммунного статуса пациентов осуществляли на фоне терапии полиоксидонием. С целью анализа состояния локального иммунитета исследована морфология раневого процесса.

Ключевые слова: раневой процесс, сахарный диабет, иммунный статус, полиоксидоний

A comparative study of patients with purulonecrotic damages of lower limbs with underlying diabetes mellitus, some of which underwent immunocorrecting therapy, is performed. The patients' immune status assessment is performed during polyoxidonium therapy process. In order to analyze the state of local immunity the wound process morphology is investigated.

Keywords: wound process, diabetes mellitus, immune status, polyoxidonium

Нарушение иммунного статуса представляет одно из патогенетических звеньев каскада патологических процессов при гнойно-некротических формах синдрома диабетической стопы (СДС) [1-3]. Формирующаяся патогенетическая картина при СДС на фоне нарушенной гемодинамики и нарастающего метаболического дисбаланса неизбежно ведет к ряду иммунологических сдвигов, итогом которых является локальный иммунодефицит. Хирургическое лечение больных СДС, сопровождающееся кровопотерей, антибиотикотерапией усугубляет нарушения целого ряда показателей иммунного статуса как на системном, так и на локальном уровнях, ухудшает энергетическое состояние фагоцитов и иммунцитов. Действие фармакотерапевтических средств на фоне подавленной иммунореактивности становится либо слабо эффективным, либо неэффективным, поскольку конечная элиминация инфекционного агента является следствием функционирования защитных (специфических и неспецифических) реакций организма и в том числе системы иммунитета [4,6]. Возникает необходимость исследования и контроля иммунного статуса, а также целесообразность включения в интра- и послеоперационном периоде дополнительных способов и средств иммунокоррекции в комплексное лечение пациентов. Такое многоцелевое воздействие на различные звенья патогенеза осложненных форм СДС может остановить прогрессирование гнойно-некротического процесса у подобного рода пациентов [5].

Материал и методы исследования

Больные были разделены на 2 группы. В 1 группу вошли 112 пациентов, которым проводили традиционную, базовую терапию, включающую в себя оперативные вмешательства и консервативное лечение без иммунокоррекции. Вторую группу составили

174 больных, отобранных методом случайной выборки, в схему лечения которых включали иммунотропную терапию препаратом полиоксидоний. В качестве нормы сравнивались соответствующие показатели 52 здоровых доноров. Обе группы были сопоставимы по полу, возрасту, длительности течения СД, по диагностированным формам диабетической стопы, структуре гнойно-некротических осложнений, а также по наличию сопутствующей патологии.

Курсовая доза полиоксидония составила 72 мг. Препарат вводился больным внутримышечно ежедневно 1 раз в день по 12 мг в течение первых трех суток, в последующем через двое суток по 6 мг в сутки, всего 6 инъекций. Исследование локального иммунитета проводилось с использованием биопсийного материала для гисто- цито- и иммуноцитохимического анализа. Биоптаты фиксировали в 10%-м нейтральном формалине и по общепринятой методике заливали в парафиновые блоки. Изготовленные из парафиновых блоков гистологические срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Препараты изучали и фотографировали с использованием системы микроскоп (DMLB Leica Germany) — видеокамера JVC (USA) — компьютер Pentium IV. Иммунопероксидазным методом с использованием 4-х моноклональных антител исследовали особенности грануляционной ткани в двух группах наблюдений. Изучали те же биоптаты (25 из 48), которые исследовали гистологическим методом. В качестве первичных специфических антител использовали моноклональные антитела производства фирм NOVOCASTRA, DAKO и Lab Vision к маркеру эндотелия сосудов, антигену CD31 (позволяет визуализировать сосуды в тканях) и к коллагену I типа (для оценки качества коллагенообразования), к Т-лимфоцитам-хелперам (CD4) и Т-лимфоцитам-супрессорам и киллерам (CD8).

С целью визуализации результата реакции связывания антигена с антителом использовали систему детекции «UltraVision LP Value HRP Polymer» (козы антигенов к кролику и мыши), Lab Vision США. Результат реакции с антителами к коллагену оценивали по общепринятой системе полуколичественным методом в баллах от 0 до 3-х (отсутствие реакции, слабая, умеренная и выраженная реакция), с антителами к Т-лимфоцитам-хелперам, супрессорам/киллерам — по количеству в грануляционной ткани таких клеток в поле зрения при увеличении микроскопа $\times 400$.

Визуализацию раневого процесса осуществляли, ориентируясь на следующие критерии: степень выраженности и продолжительности воспалительных проявлений в области раны (отек, гиперемия, раневой экссудат), состояния дна раны, а также фиксировали сроки появления грануляций, начала эпителизации и заживления раневых дефектов. Анализ раневого процесса проводили комплексно, согласно стадиям его развития. С целью определения уровня фагоцитоза у больных при поступлении на 1-2-е сутки и в динамике на 5-7-21-е сутки от начала лечения определяли спонтанную и стимулированную хемилюминесценцию нейтрофилов (СПХЛ).

В те же сроки у больных исследовали уровень Ig классов А, М, G сыворотки крови.

Результаты исследования и обсуждение

Выявлено, что у больных с гнойно-некротическими осложнениями СДС имеют место изменения как в системе врожденного (снижены фагоцитарное число и фагоцитарный индекс), так и приобретенного иммунитета, которые проявляются нарушением процесса фагоцитоза, Т-лимфопенией, снижением числа как CD4+ клеток, так и соотношения CD4+/CD8+. Результаты нашего исследования в основном совпадают с данными других авторов [1,4,6]. При этом дисбаланс иммунных показателей нарастает с увеличением продолжительности заболевания и с приобретением потребности в инсулине, развитием некомпенсированной гипергликемии, ангиопатии и диабетической нейропатии.

Основные показатели клеточного, гуморального иммунитета, а также системы врожденного иммунитета в показателях иммунного статуса у наблюдаемых больных при поступлении в стационар были достоверно ниже аналогичных показателей от нормы (табл.1). В частности, у больных отмечалась относительная и абсолют-

Таблица 1

Показатели иммунного статуса у больных с гнойно-некротической формой СДС на фоне базовой терапии с иммунокоррекцией полиоксидонием

№ п/п	Показатель	Норма (n=52)	При поступлении (n=286)	1 группа (n=112)	2 группа (n=174)
1.	Лейкоциты в мкл.	8600 $\pm$ 241	8976 $\pm$ 461	8865 $\pm$ 342	8579 $\pm$ 248
2.	Лимфоциты относит. %	30,5 $\pm$ 1,8	18,7 $\pm$ 1,3*	27,1 $\pm$ 2,1	31,9 $\pm$ 1,3**
3.	Лимфоциты абс. (в мкл.)	2347 $\pm$ 123	1432 $\pm$ 114*	1833 $\pm$ 125*	2419 $\pm$ 102**
4.	CD3+(Т-лимфоциты) относит. %	75,3 $\pm$ 0,7	62,0 $\pm$ 3,0*	67,6 $\pm$ 2,3 *	77,3 $\pm$ 2,7**
5.	CD3+ абс. (в мкл.)	1169 $\pm$ 43	669 $\pm$ 56*	1160 $\pm$ 76	1370 $\pm$ 62*/**
6.	CD4+ относит. % (Т-хелперы)	28,0 $\pm$ 0,9	22,0 $\pm$ 0,5*	27,9 $\pm$ 1,3	46,2 $\pm$ 1,3*/**
7.	CD4+ абс. (в мкл.)	692,21 $\pm$ 31,12	461,35 $\pm$ 29,41*	673,27 $\pm$ 54,24	873,62 $\pm$ 51,20*/**
8.	CD8+(цитотоксические Т-лимфоциты) относит. %	20,8 $\pm$ 0,6	17,4 $\pm$ 1,7	18,5 $\pm$ 1,2	21,6 $\pm$ 0,7**
9.	CD8+ абс. (в мкл.)	389,67 $\pm$ 16,17	335,27 $\pm$ 31,26	405,42 $\pm$ 43,2	438,42 $\pm$ 45,2
10.	Иммунорегуляторный индекс CD4+/CD8+	1,78 $\pm$ 0,03	1,38 $\pm$ 0,05*	1,66 $\pm$ 0,07	1,99 $\pm$ 0,03*/**
11.	В-лимфоциты общие отн. (%)	8,90 $\pm$ 1,90	7,60 $\pm$ 1,09	7,81 $\pm$ 1,23	8,87 $\pm$ 1,17
12.	В-лимфоциты общие абс. (мкл)	290,70 $\pm$ 18,00	197,99 $\pm$ 15,55*	244,32 $\pm$ 17,16	298,12 $\pm$ 16,76**
13.	CD19+(В-лимфоциты) относит. %	14,11 $\pm$ 2,30	13,09 $\pm$ 0,13	14,05 $\pm$ 1,17	16,75 $\pm$ 1,07
14.	CD19+ абс. (кл. в мкл.)	475,0 $\pm$ 64,2	367,5 $\pm$ 15,8	177,00 $\pm$ 0,09	362,46 $\pm$ 48,31*
15.	CD20+ (В-лимфоциты) относит. %	15,12 $\pm$ 2,2	14,54 $\pm$ 0,34	14,99 $\pm$ 0,51	15,27 $\pm$ 0,28
16.	CD20+ абс. (кл. в мкл.)	491 $\pm$ 58	428 $\pm$ 43	437 $\pm$ 64	501 $\pm$ 71
17.	IgA г/л	1,12 $\pm$ 0,05	2,09 $\pm$ 0,03*	1,76 $\pm$ 0,02*	1,18 $\pm$ 0,05**
18.	IgG г/л	7,05 $\pm$ 0,09	6,98 $\pm$ 0,07	7,00 $\pm$ 0,05	7,08 $\pm$ 0,07
19.	IgM г/л	1,07 $\pm$ 0,08	1,12 $\pm$ 0,05	1,09 $\pm$ 0,05	1,08 $\pm$ 0,05
20.	Фагоцитарный индекс % (ФИ)	65,7 $\pm$ 3,2	52,2 $\pm$ 2,0*	62,6 $\pm$ 1,2	89,5 $\pm$ 1,3*/**
21.	Фагоцитарное число (ФЧ)	4,3 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,5*	4,9 $\pm$ 0,3	8,6 $\pm$ 0,3*/**
22.	СПХЛ (имп./мин.)	2,8 $\pm$ 0,3 $\times 10^4$	1,8 $\pm$ 0,5 $\times 10^4$ *	2,0 $\pm$ 0,2 $\times 10^4$ *	2,9 $\pm$ 0,5 $\times 10^4$ **

Примечание: *отличия достоверны от нормы; **отличия достоверны от значений 1 группы, при $p < 0,05$.

ная лимфопения $18,7 \pm 1,3\%$ и 1432 ± 114 кл. в мкл, в то время как в норме (у здоровых доноров) относительное и абсолютное содержание лимфоцитов составляло $30,5 \pm 1,8\%$ и 2347 ± 123 кл. в мкл соответственно (при $p < 0,05$). Снижение количества лимфоцитов в основном было связано с уменьшением в 1,2 раза количества CD3+ клеток (Т-лимфоцитов), относительное содержание которых составило $62,0 \pm 3,0\%$ при $p < 0,05$ ($75,3 \pm 0,7\%$ у доноров). Отмечено также снижение относительного и абсолютного содержания кластера CD4+ клеток (Т-хелперов): на 6% и в 1,5 раза соответственно. Определенный вклад в формирование лимфопении внесли и CD8+клетки (цитотоксические лимфоциты), относительное содержание которых уменьшилось в 1,2 раза.

На фоне гнойно-некротических осложнений СДС наблюдается снижение уровня иммунорегуляторного индекса (CD4+/CD8+) с $1,78 \pm 0,03$ (в норме) до $1,38 \pm 0,05$. Содержание CD19+ и CD20+ клеток, представляющих популяции В-лимфоцитов, ответственных за гуморальный иммунитет, имеет также тенденцию к снижению. Среди исследованных иммуноглобулинов выявлено повышение в 1,8 раза IgA, что вызвано нарушением в звене гуморального иммунитета — антителопродуцирующих клеток, а также, очевидно, нарушением элиминации фагоцитами иммунокомплексов. При оценке показателей системы фагоцитоза обращает внимание снижение поглотительной активности фагоцитов: фагоцитарный индекс (ФИ) на фоне выраженных гнойно-некротических изменений и значительной бактериальной обсемененности ран (10^8 - 10^{11} бактериальных тел в 1 грамме ткани) не превышал $52,2 \pm 2,0$, а фагоцитарное число (ФЧ) — $3,1 \pm 0,5$. То есть имеет место снижение защиты эффекторными цитотоксическими клетками. В фагоцитозе ослаблена кислород-зависимая функция процессов фагоцитарного переваривания. СПХЛ (нейтрофилов) снижена в 1,6 раза.

У ряда больных в ранах длительное время (до 30-45 суток) сохранялось гнойное или серозно-гнойное отделяемое, иногда имели место налеты фибрина, выявлялись участки некротической ткани, формирование грануляций протекало медленно, длительное время отсутствовала краевая эпителизация. Гнойный процесс имел затяжное течение, что связано со снижением функциональной активности фагоцитов, в частности функции презентации и дисбалансом в системе Т-лимфоцитов. Снижение CD3+CD4+, уменьшение индекса иммунорегуляции CD4+/CD8+ приводило к нарушению поглощения микробов, некротизированных тканей в ране, а также стимуляции фагоцитами Т-лимфоцитов. Высказано мнение, что в качестве индукторов пролиферации клеток в органах и тканях выступают Т-хелперы. Регенерация тканей имеет зависимость от соотношения в организме CD4+/CD8+ [2]. Падение этого соотношения за счет уменьшения CD3+CD4+ резко снижает способность Т-лимфоцитов к стимуляции пролиферации, а это, в свою очередь, сказывается на регенераторных потенциях тканей в раневом процессе у исследованных нами пациентов.

Таким образом, совокупность данных клинической картины заболевания и результатов лабораторных исследований (формирование относительной и абсо-

лютной лимфопении; дисбаланс параметров иммунного статуса) подтверждают наличие у больных гнойно-некротическими осложнениями СДС вторичной иммунной недостаточности, индуцированной формы с преимущественным поражением Т-клеточного звена (снижены CD3+; CD4+; CD4+/CD8+) и врожденного звена иммунитета (снижены ФЧ и ФИ), а также и вовлечением в патологию гуморального ответа иммунной системы.

В 1-й группе больных, получавших базовую комплексную терапию без коррекции состояния иммуноотропным препаратом, отмечена положительная динамика как клинического состояния, так и лабораторных показателей. У пациентов этой группы отмечалось повышение как относительного, так и абсолютного содержания иммунокомпетентных клеток (лимфоцитов) в 1,4 и 1, 2 раза соответственно, по сравнению с этими же показателями у пациентов при поступлении в стационар, однако восстановления показателей иммунного статуса до нормы не происходило. Не достигал значений нормы и иммунорегуляторный индекс: его показатель у пациентов 1-й группы составлял $1,66 \pm 0,07$, против $1,78 \pm 0,03$ (у здоровых доноров). Отставали от нормы показатели Т-клеточного, гуморального иммунитета и состояния фагоцитоза (табл.1).

Неоднозначно порой протекал раневой процесс. У пациентов 1-й группы бактериальная обсемененность раневой поверхности на 7-е сутки составляла 10^8 - 10^{10} бактериальных тел в 1 грамме ткани, в то время как у больных 2-й группы — 10^6 - 10^8 бактерий в грамме ткани. Включение полиоксидония в схему лечения больных сахарным диабетом с гнойно-некротическими осложнениями СДС привело к уменьшению тяжести клинических проявлений (более раннее исчезновение признаков полиорганной дисфункции, в более короткие сроки достигали компенсации СД, что однозначно приводило к снижению количества осложнений и рецидивов, а также летальности пациентов). У больных отмечалось улучшение общего состояния уже после первого введения препарата. На третьи сутки у всех больных имело место уменьшение симптомов интоксикации, снижение лихорадки, происходила нормализация показателей гемограммы (табл.1). На фоне введения полиоксидония отмечено сокращение длительности течения первой фазы раневого процесса на двое-трое суток, очищение раны от гнойно-некротических тканей происходило на 7-8-е сутки (а не на 11-14-е сутки, как у больных 1 группы). Первые очаговые грануляции появлялись на 4-5-е сутки и активно развивались к 10-12-м суткам (у пациентов 1 группы появление грануляционной ткани отмечено на 9-12-е сутки и максимальное ее развитие к 12-17-м суткам). Дополнение к базовой терапии иммуноотропного препарата полиоксидония приводило к восстановлению иммунологических показателей: относительное и абсолютное содержание лимфоцитов становилось сопоставимым с нормой. Под влиянием полиоксидония произошло не только восстановление пониженных у пациентов при поступлении уровней CD3+ и CD4+ лимфоцитов в периферической крови, но их содержание превышало цифровые показатели нормы, что, очевидно, связано со стимулирующим

влиянием препарата на иммунокомпетентные клетки. Относительное и абсолютное содержание CD4+ лимфоцитов у 2-й группы пациентов превышало в 1,7 и 1,3 раза этот показатель у пациентов 1-й группы, а также в 1,8 и 1,9 раза соответственно — у больных при поступлении. Повышался относительный и абсолютный уровень В-лимфоцитов у больных 2-й группы в 1,1 раза по сравнению с больными 1-й группы, а также в 1,2 и 1,5 раза соответственно по сравнению с этим уровнем у пациентов при поступлении. Содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови пациентов 2-й группы было сравнимо с показателями нормы. Содержание иммуноглобулина IgA г/л (ответственного за местный иммунитет), повышенного у пациентов с гнойно-некротическими осложнениями СДС (как демонстрация дисбаланса иммунорегуляторных клеток), также возвращалось к значениям нормы и свидетельствовало о восстановлении иммунного статуса и прекурсоров, продуцирующих иммуноглобулины. На фоне введения полиоксидония отмечено значительное улучшение состояния системы фагоцитов: ФИ у пациентов 2-й группы увеличился в 1,4 раза по сравнению с показателями 1-й группы и в 1,7 раза по сравнению с показателями пациентов при поступлении. Показатель СПХЛ нейтрофилов у пациентов 2 группы превышал в 1,4 раза значения больных 1-й группы и в 1,6 раза — у больных при поступлении. ФЧ у пациентов 2 группы увеличилось в 2,1 раза по сравнению со 1 группой и в 2,8 раза по сравнению с показателями пациентов при поступлении, т. е. активизируется поглотительная активность фагоцитов, усиливается образование активных форм кислорода и бактерицидность нейтрофилов.

Заключение

Таким образом, сравнительный анализ лечения пациентов с включением в базовую терапию иммуномодулирующего препарата полиоксидония позволяет рекомендовать его к использованию в комплексной терапии больных сахарным диабетом с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы. Введение полиоксидония приводит к восстановлению нарушенных показателей как кле-

точного, так и гуморального иммунитета, а также системы фагоцитов, то есть активизирует все звенья иммунной системы.

1. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Кремская В.М. Лечение сахарного диабета и его осложнений. М.: Медицина, 2005. 510 с.
2. Земляной А.Б., Юсупов И.А., Кисляков В.А. Состояние цитокиновой системы при гнойно-некротических и рецидивирующих гнойно-некротических осложнениях синдрома диабетической стопы и возможности иммуномодуляции // Трудный пациент. 2011. №10. С.36-42.
3. Прошин А.В. Состояние иммунного статуса и динамика раневого процесса у больных с осложненными формами синдрома диабетической стопы // Вестн. Новг. гос. ун-та. 2012. №67. С.74-77.
4. Липин А.Н., Белевитин А.Б., Срабионов В.О. Способы коррекции нарушений иммунитета у больных с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы // Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2008. №4. С.19-23.
5. Greenhalgh D.G. Wound healing and diabetes mellitus // J. Clin. Plast.Surg. 2003. Vol.30. №1. P.37-45.
6. Крепкогорский Н.В., Скороходкина О.В., Славин Л.Е. Динамика показателей иммунного статуса у больных с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы на фоне лечения рекомбинантным IL-2 // Медицинская иммунология. 2006. Т.8. №2-3. С.112.

Bibliography (Transliterated)

1. Balabolkin M.I., Klebanova E.M., Kreminskaja V.M. Le-chenie saharnogo diabeta i ego oslozhnenij. M.: Medicina, 2005. 510 s.
2. Zemljanoj A.B., Jusupov I.A., Kislyakov V.A. Sostojanie citokinovoj sistemy pri gnojno-nekroticheskix i recidivirujushhih gnojno-nekroticheskix oslozhnenijah sindroma diabeticheskoj stopy i vozmozhnosti immunomoduljacji // Trudnyj pacient. 2011. №10. S.36-42.
3. Proshin A.V. Sostojanie immunnogo statusa i dinamika ranevogo processa u bol'nyh s oslozhnennymi formami sindroma diabeticheskoj stopy // Vestn. Novg. gos. un-ta. 2012. №67. C.74-77.
4. Lipin A.N., Belevitin A.B., Srabionov V.O. Sposoby korrekcii narushenij immuniteta u bol'nyh s gnojno-nekroticheskimi formami sindroma diabeticheskoj stopy // Vestnik Rossijskoj Voenno-meditsinskoj akademii. 2008. №4. S.19-23.
5. Greenhalgh D.G. Wound healing and diabetes mellitus // J. Clin. Plast.Surg. 2003. Vol.30. №1. P.37-45.
6. Krepkogorskij N.V., Skorohodkina O.V., Slavin L.E. Dinamika pokazatelej immunnogo statusa u bol'nyh s gnojno-nekroticheskimi oslozhnenijami sindroma diabeticheskoj stopy na fone lechenija rekombinantnym IL-2 // Medicinskaja immunologija. 2006. T.8. №2-3. S.112.