

УДК 616.4.5-001-03

**ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ
ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПРИ РАЗВИТИИ
ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ КОЖИ НА ФОНЕ ДИАБЕТА**

Эргашев О.Н., Лагвилава Т.О., Виноградов Ю.М., Зиновьев Е.В.

*Комитет по здравоохранению Ленинградской области, Санкт-Петербург;
ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург*

Оценено влияние иммуномодуляторов (тималин, иммунофан, полиоксидоний, ликопид, деринат, ронколейкин) на исходы гнойно-некротических поражений кожи на фоне диабета у мелких лабораторных животных (крыс). Показано, что включение иммуностропных препаратов на основе натрия дезоксирибонуклеата из молок осетровых рыб (деринат), рекомбинантного интерлейкина-2 человека (ронколейкин) в состав комплексной терапии сепсиса при тяжелых гнойно-некротических процессах снижает тяжесть интоксикации, уменьшает тяжесть проявлений системного воспаления и органной дисфункции. Установлено, что двукратное введение ронколейкина повышает выживаемость животных на 50% ($p < 0,01$), т.е. в 2,6 раз. Иммуномодулирующее действие препаратов выражается в восстановлении количества и функциональной активности Т-лимфоцитов (в т.ч. увеличении Т-хелперов, уменьшении Т-супрессоров), повышении уровней иммуноглобулинов, снижении уровня циркулирующих иммунных комплексов.

Ключевые слова: сахарный диабет, синдром диабетической стопы, иммуномодуляторы

**ASSESSMENT OF SPECIFIC PHARMACOLOGICAL ACTION
OF IMMUNOMODULATORS ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY
OF IMMUNOCOMPETENT CELLS IN THE DEVELOPMENT
OF PURULENT-NECROTIC SKIN LESIONS ON THE BACKGROUND OF DIABETES**

Ergashev O.N., Lagvilava T.O., Vinogradov Y.M., Zinoviev E.V.

*Health Committee of the Leningrad region, St. Petersburg;
St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg*

The effect of immunomodulators (timalin, Immunofan, Polyoxidonium, Liko – PID derinat, roncoleukin) for all major necrotic skin lesions with diabetes in small laboratory animals (rats). It is shown that the inclusion of immuno-based preparations of sodium dezoksiribonukleata sturgeon roe (derinat), a recombinant human interleukin-2 (roncoleukin) in the complex therapy for severe sepsis, necrotic processes reduces the severity of intoxication, reduces the severity of systemic inflammation and organ dysfunction. Found that the introduction of double roncoleukine increases survivability by 50% ($p < 0,01$), ie 2,6 times. Immunomodulatory effects of drugs is expressed in restoring the number and functional activity of T-lymphocytes (including an increase of T-helper cells, T suppressor decrease) increase in immunoglobulin levels, reduced levels of circulating immune complexes.

Keywords: diabetes mellitus, diabetic foot syndrome, immunomodulators

В последнее десятилетие XX века пристальное внимание специалистов, участвующих в лечении больных сахарным диабетом (СД), обращено к гнойно-некротическим поражениям кожи при синдроме диабетической стопы (СДС). Это обусловлено ростом данного заболевания, с одной стороны, и неудовлетворенностью врачей результатами лечения – с другой [2].

Сложный многофакторный патогенез заболевания не позволяет до настоящего времени найти достаточно адекватные методы консервативного и хирургического лечения синдрома диабетической стопы. Отмечается пролонгация фазы воспаления с преобладанием процессов экссудации, приводящих к увеличению объема вторичного некроза, замедляется формирование грануляционного вала, что вместе с незавершенным фагоцитозом облегчает проникновение ми-

кроорганизмов в ткани и размножение их в стенках раны [2, 3].

При синдроме диабетической стопы наблюдаются иммунологические нарушения клеточного противомикробного иммунитета с дисбалансом иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов и нарушением функциональной активности неспецифических факторов защиты. Существует определенная связь этих изменений с патогенетическим типом сахарного диабета, а также более высокая их выраженность в регионе воспаления по отношению к данным в системном кровотоке. Иммунологические нарушения являются одним из патогенетических звеньев патологического процесса при синдроме диабетической стопы. Это определяет не только необходимость их своевременного выявления, но и коррекции посредством включения в комплексное ле-

чение таких больных иммунокорригирующей терапией [1, 7].

Проведение иммунокоррекции должно основываться на наличии клинических симптомов иммунодефицита и результатах лабораторного обследования больных. Необходим динамический контроль иммунного статуса больного при проведении иммунокорригирующей терапии. Тактика последней зависит от наличия острого или хронического гнойно-воспалительного процесса. Применение иммуномодуляторов при острых гнойно-воспалительных процессах у больных сахарным диабетом оправдано, поскольку они входят в группу риска по иммунологической недостаточности. При хроническом вялотекущем воспалительном процессе целесообразно применение иммуностимуляторов [2, 5, 7].

Цель исследования: оценить специфическое фармакологическое действие иммуномодуляторов на функциональную активность иммунокомпетентных клеток при развитии гнойно-некротического поражения кожи на фоне диабета.

Материал и методы исследований

Опыты проведены на 76 половозрелых белых мышах-самцах линии BALB массой 16–18 г. Животных получали из питомника «Рапполово» (С.-Петербург), в течение 2 недель их выдерживали в карантине.

Все манипуляции с животными проводили под ингаляционным эфирным наркозом, в ряде серий экспериментов – после внутримышечного введения кетамина и дроперидола из расчета 70 и 1 мг/кг массы, соответственно.

Тяжелый сахарный диабет у животных воспроизводили путем однократного внутривнутрибрюшинного введения 170 мг/кг мезоксалилмочевины (аллоксана) после 48-часового голодания на фоне нормальных показателей уровня глюкозы крови во время двухнедельного карантина на стандартном рационе вивария. Метод основан на способности аллоксана избирательно повреждать β -клетки островков поджелудочной железы у большинства видов животных, в т.ч. и при диффузном строении органа, – отмечается у мелких лабораторных животных, в частности крыс – по методике А.С. Шалимова.

После развития клинической картины сахарного диабета у животных по оригинальной методике (рационализаторское предложение ВмедА) моделировали обширные гнойно-некротические процессы кожи спины, при этом осуществляли иссечение кожи до собственной фасции на площади 10% поверхности тела и контаминацию раны микробной взвесью, содержащей 10^9 микробных тел культуры золотистого стафилококка штамма 209-Р. Для приготовления микробной взвеси использовалась суточная агаровая культура, которая смывалась стерильным физиологическим раствором и подбиралась по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича таким образом, чтобы в 1 мл смыва содержалось 10^9 микробных клеток.

Для расчета площади поверхности кожи животных использовали формулу М. Лее (цитир. по Н.И. Кочетыгову, 1964):

$$S = 12,54 \cdot M^{0,66},$$

где S – поверхность тела, см^2 ; M – масса тела животного, кг.

Для оценки эффективности и отбора иммуномодуляторов (тималин, иммунофан, полиоксидоний, ликолипид, деринат, ронколейкин), наиболее пригодных для включения в состав комплексной терапии тяжелых гнойно-некротических поражений кожи на фоне декомпенсированного диабета, животным курсом в ранние сроки их моделирования гнойной раны и аллоксанового диабета (как указано выше) вводили внутрь или внутримышечно спустя 30 мин или 5 ч. Животным группы контроля внутримышечно вводили эквивалентный объем 0,9% раствора хлорида натрия (плацебо).

С целью изучения иммунного статуса определяли относительную массу иммунокомпетентных органов (тимуса, селезенки общепринятым весовым методом), число АОК и Е-РОК в селезенке, реакцию ГЗТ в экспериментальных группах с учетом способа иммунотерапии.

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты оценки исходов тяжелого гнойно-некротического процесса на фоне декомпенсированного сахарного диабета с учетом способа иммунотерапии, дозировки препаратов и сроков их введения, определяемые по величине летальности (выживаемости) крыс, приводим в табл. 1. Установлено, что однократное введение тималина, ликолипида, иммунофана, полиоксидония и дерината в среднетерапевтических дозах снижает показатель летальности экспериментальных животных при тяжелом гнойно-некротическом процессе на фоне декомпенсированного диабета не более чем на 10% ($p > 0,05$). Однократная инъекция же ронколейкина повышала выживаемость крыс в этих условиях на 20% ($p > 0,05$). Двукратное введение тималина с интервалом 0,5 и 5 часов в этих условиях сопровождалось снижением выживаемости животных на 5% ($p > 0,05$). Ликолипид, введенный дважды, не оказал терапевтического эффекта, показатель летальности животных в этой группе животных не изменился и соответствовал 40%. В случаях двукратного введения иммунофана или полиоксидония в сроки 0,5 и 5 часов после воздействия выживаемость животных увеличилась на 15% ($p > 0,05$). Двукратное введение дерината в эти же сроки повысило выживаемость крыс до 55% ($p > 0,05$). Двукратное введение ронколейкина через 0,5 и 5 ч при тяжелом гнойно-некротическом поражении

кожи на фоне декомпенсированного диабета увеличило выживаемость животных на 50% ($p < 0,01$). Полученные результаты убедительно свидетельствуют, что из перечня исследованных иммуотропных препаратов при тяжелом гнойно-некротическом процессе на фоне экспериментального аллоксанового диабета наиболее эффективными оказались препараты деринат и ронколейкин, применение же последнего достоверно повышает выживаемость животных в 2,6 раз.

Таблица 1

Влияние иммуномодуляторов на исходы гнойно-некротического процесса при сахарном диабете ($M \pm m$)

Экспериментальная группа, количество животных в группе	Схема введения		Выживаемость, %
	доза	срок, ч	
Плацебо, $n = 9$	1 мл	0,5	30 ± 9
		0,5; 5	30 ± 7
Тималин, $n = 9$	0,05 мг/кг	0,5	40 ± 7
		0,5; 5	35 ± 6
Липоцид, $n = 9$	0,15 мг/кг	0,5	40 ± 8
		0,5; 5	40 ± 9
Имунофан, $n = 9$	1,5 мкг/кг	0,5	40 ± 9
		0,5; 5	45 ± 7
Полиоксидоний, $n = 9$	0,2 мг/кг	0,5	40 ± 8
		0,5; 5	45 ± 8
Деринат, $n = 9$	15 мг/кг	0,5	40 ± 6
		0,5; 5	55 ± 8
Ронколейкин, $n = 9$	25 000 ед./кг	0,5	50 ± 7
		0,5; 5	80 ± 9^1

Примечание. ¹ – различия достоверны ($p < 0,01$) по сравнению с плацебо (0,9% NaCl).

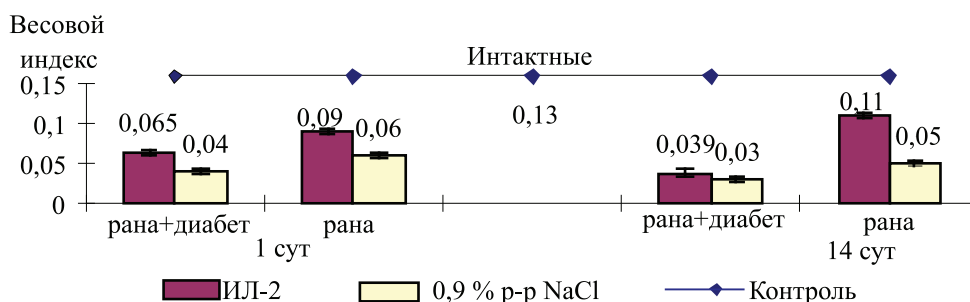


Рис. 1. Относительная масса тимуса мышей после воспроизведения гнойной раны и сахарного диабета при введении ронколейкина

В условиях длительной декомпенсированной гипергликемии ронколейкин оказывал положительное влияние на формирование гуморального иммунного ответа – при курсовом введении мышам ронколейки-

С учетом положительного влияния ронколейкина на исходы тяжелых гнойно-некротических процессов на фоне декомпенсированного диабета предполагалось, что его введение может позволить снизить иммуносупрессию при развитии декомпенсированной гипергликемии.

Результаты экспериментов показали, что через 15 суток после воспроизведения тяжелого гнойно-некротического процесса на фоне декомпенсированного диабета наблюдались типовые неспецифические изменения со стороны центральных и периферических органов иммунной системы. Происходило снижение относительной массы тимуса (на 30%, $p > 0,05$) при одновременном увеличении относительной массы селезенки (на 50%, $p < 0,05$).

В то же время, ронколейкин препятствовал снижению массы лимфоидных органов животных при тяжелых гнойно-некротических процессах на фоне диабета. Из данных рис. 1 следует, что у мышей, которым через 0,5 и 4 ч после воспроизведения гнойной раны и диабета внутрибрюшинно вводили ронколейкин, относительная масса тимуса спустя сутки была на 62,5% ($p < 0,05$) выше, чем после введения солевого изотонического раствора. Сопоставимая степень «прироста» относительной массы тимуса (50%, $p < 0,05$) наблюдалась в этот срок у животных без диабета, у которых воспроизводилась гнойная рана. В то же время, необходимо отметить, что спустя 14 суток после развития тяжелого гнойно-некротического процесса на фоне диабета различия относительной массы тимуса мышей, получавших и не получавших интерлейкин-2, не превышали 30% ($p < 0,05$), тогда как введение цитокина животным с гнойной раной, но без диабета, предупреждало редукцию тканевых структур тимуса.

на спустя сутки число АОК на селезенку составляло в среднем $15,8 \cdot 10^3$, тогда как у животных с тяжелым гнойно-некротическим поражением кожи на фоне развившегося диабета, не получавших данный ци-

токин, оно не превышало $1,3 \cdot 10^3$ ($p < 0,05$). Значительно меньшее угнетение гуморального иммунного ответа на тимусзависимый антиген наблюдалось под влиянием ронколейкина при изолированной гнойной ране у животных, не страдавших диабетом. Через 14 суток после изолированной вос-

произведения гнойной раны у животных, не страдавших диабетом, число АОК на селезенку у мышей контрольной группы снижалось в среднем в 2,4 раза (с $49,7 \cdot 10^3$ до $20,4 \cdot 10^3$, $p < 0,05$). После введения ИЛ-2 число АОК на селезенку было $38,7 \cdot 10^3$ ($p < 0,05$) (рис. 2).

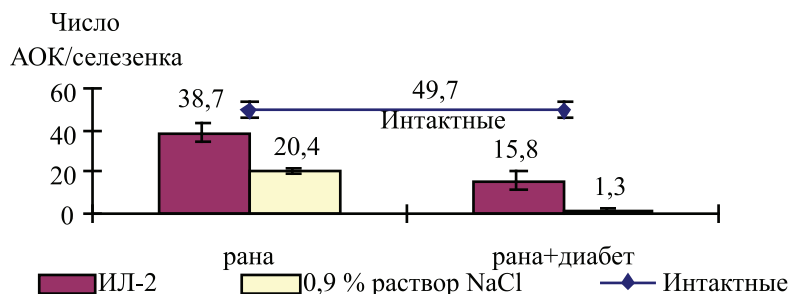


Рис. 2. Продукция АОК у мышей спустя 14 суток после воспроизведения гнойной раны и сахарного диабета при введении ронколейкина

Применение ронколейкина способствовало восстановлению параметров Т-клеточного иммунитета, значительно нарушенного в условиях развития гнойно-некротического поражения кожи на фоне тяжелого диабета.

Как показано на рис. 3, у мышей спустя две недели в ответ на развитие тяжелого гнойно-некротического поражения кожи при декомпенсированном диабете происходило снижение формирования ГЗТ (с 38,4 до

11%). Введение ронколейкина препятствовало угнетению Т-клеточного реагирования. Индекс реакции ГЗТ составлял в среднем 22% ($p < 0,05$). На фоне изолированной гнойной раны, не осложненной гипергликемией, применение ронколейкина приводило к более выраженной стимуляции формирования ГЗТ. Индекс реакции в этом случае восстанавливался с 18 до 32% ($p < 0,05$), что практически соответствовало значениям, установленным у интактных животных.

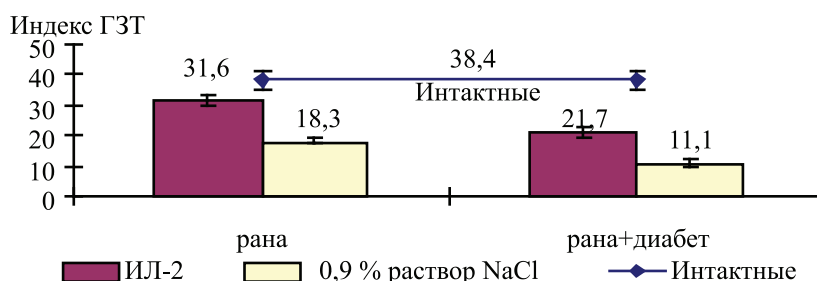


Рис. 3. Параметры ГЗТ у мышей спустя 14 суток после воспроизведения гнойной раны и сахарного диабета при введении ронколейкина

Корректирующее влияние ронколейкина на дисфункцию факторов клеточного иммунитета мышей при гнойных ранах на фоне декомпенсированного диабета прослеживалось на уровне метаболической активности макрофагов (табл. 2), данные которой позволяют заключить, что спустя сутки после развития гнойного поражения кожи при экспериментальном сахарном диабете у мышей, леченных ронколейкином, способность макрофагов отвечать генерацией активных форм кислорода на корпускулярный стимул (зимозан) возрастала более чем на 20% ($p < 0,05$) по сравнению с животными, получавшими солевой изо-

тонический раствор, не содержащий цитокин. Спонтанная НСТ-активность при этом не изменялась. Как следствие, наблюдалось достоверное повышение метаболического резерва фагоцитов (с 5 до 35,6%, $p < 0,05$). У животных без гипергликемии, у которых воспроизводили гнойную рану на коже спины, спонтанная окислительно-восстановительная активность макрофагов после введения ронколейкина также сохранялась на высоком уровне и соответствовала значениям, установленным у нелеченных травмированных мышей. В то же время, индуцированная НСТ-активность макрофагов под влиянием ронколейкина возрас-

тала более значительно, чем при гнойной ране на фоне диабета (на 51%, $p < 0,05$). Это обеспечивало увеличение сниженного

гнойно-некротическим поражением кожи функционального резерва фагоцитов с 10 до 97,4% ($p < 0,05$).

Таблица 2

Метаболическая активность макрофагов мышей спустя сутки после воспроизведения гнойно-некротического процесса в коже на фоне декомпенсированного диабета с учетом введения ронколейкина

Группа наблюдения, число особей	Средние значения величины (M ± m)					
	НСТ-активности макрофагов, ед.				метаболического резерва, %	
	спонтанной		индуцированной			
	ИЛ-2	0,9% NaCl	ИЛ-2	0,9% NaCl	ИЛ-2	0,9% NaCl
Рана, n = 10	0,076 ± 0,002	0,078 ± 0,002	0,15 ± 0,007*	0,086 ± 0,004	97,4 ± 4,5 *	10,2 ± 0,8
Рана + диабет n = 10	0,073 ± 0,002	0,078 ± 0,003	0,099 ± 0,002**	0,082 ± 0,003	35,6 ± 0,8 ***	5,1 ± 0,3 **
Контроль, n = 10	0,06 ± 0,004		0,092 ± 0,003		53,3 ± 4,2	

Примечание: * – различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с группой мышей, получавших 0,9% NaCl; ** – различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с группой мышей с изолированной гнойной раной.

Выводы

Таким образом, замещение хелперной функции Т-лимфоцитов ронколейкином можно считать важным компонентом ранней терапии тяжелых гнойно-некротических процессов на фоне декомпенсированного диабета, т.е. пациентов с диабетической стопой, в т.ч. и пожилого возраста. Иммуномодулирующие эффекты ронколейкина реализуются посредством компенсации механизмов, общих по патогенезу с посттравматическими изменениями, и в значительно меньшей степени связаны с коррекцией нарушений, обусловленных как токсико-резорбтивной лихорадкой, так и декомпенсированной гипергликемией. Не изменяя уровень миелосупрессии, а также степень посттравматической индукции провоспалительных цитокинов, введение ронколейкина положительно влияет на динамику восстановления клеточного и гуморального иммунного ответа в ранний период развития тяжелого гнойно-некротического процесса при диабете. Тем не менее, в условиях декомпенсированной гипергликемии иммунокорректирующие свойства ронколейкина остаются ниже, чем при гнойной ране, не осложненной развитием декомпенсированного диабета.

Список литературы

1. Аникин А.И. Значение оценки микроциркуляторных нарушений в хирургическом лечении гнойно-некротических поражений при синдроме диабетической стопы: дис. ... канд. мед. наук. – М., 2009. – С. 146–556.
2. Грекова Н.М., Бордуновский В.Н. Хирургия диабетической стопы // Медпрактика. – М., 2009. – 187 с.
3. Дедов И.И., Удовиченко О.В., Галстян Г.Р. Диабетическая стопа. – М., 2005. – 175 с.
4. Светухин А.М., Земляной А.Б. Комплексное хирургическое лечение гнойно-некротических форм диабетиче-

ской стопы // Избранный курс лекций по гнойной хирургии. – М., 2007. – С. 153–171.

5. Andersen C.A. Diabetic limb preservation: defining terms and goals // J. Foot Ankle Surg. – 2010. – №1. – P. 106–107.
6. Lored R.A., Garcia G., Chhaya S. Medical imaging of the diabetic foot // Clin Podiatr Med Surg. – 2007. – №3. – P. 397–424.
7. Moini M., Rasouli M.R., Heidari P., Mahmoudi H.R., Rasouli M. Role of early surgical revascularization in the management of refractory diabetic foot ulcers in patients without overt ischemic limbs // Foot Ankle Surg. – 2008. – №2. – P. 74–81.

References

1. Anikin A.I. Znachenie ocenki mikrocirkuljatornyh narushenij v hirurgicheskom lechenii gnojno-nekroticheskix porazhenij pri sindrome diabeticeskoy stopy // Diss. kand. med. nauk. M., 2009. pp. 146–556.
2. Grekova N.M., Bordunovskij V.N. Hirurgija diabeticeskoy stopy // «Medpraktika–M». M., 2009. 187 p.
3. Dedov I.I., Udovichenko O.V., Galstjan G.R. Diabeticeskaja stopa // M., 2005. 175 p.
4. Svetuhin A.M., Zemljanoj A.B. Kompleksnoe hirurgicheskoe lechenie gnojno-nekroticheskix form diabeticeskoy stopy // Izbrannyj kurs lekcij po gnojnoj hirurgii. M., 2007. pp. 153–171.
5. Andersen C.A. Diabetic limb preservation: defining terms and goals // J. Foot Ankle Surg. no. 1. 2010. pp. 106–107.
6. Lored R.A., Garcia G., Chhaya S. Medical imaging of the diabetic foot // Clin Podiatr Med Surg. no. 3. 2007. pp. 397–424.
7. Moini M., Rasouli M.R., Heidari P., Mahmoudi H.R., Rasouli M. Role of early surgical revascularization in the management of refractory diabetic foot ulcers in patients without overt ischemic limbs // Foot Ankle Surg. no. 2. 2008. pp. 74–81.

Рецензенты:

Ткаченко А.Н., д.м.н., профессор кафедры травматологии, ортопедии и ВПХ ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, г. Санкт-Петербург;
 Дергунов А.В., д.м.н., профессор, профессор кафедры патологической физиологии ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова», г. Санкт-Петербург.

Работа поступила в редакцию 26.10.2012.