

ВЛИЯНИЕ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ АКТИВИРОВАННЫХ АУТОЛОГИЧНЫХ ЛИМФОЦИТОВ НА ДИНАМИКУ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА И СОСТОЯНИЕ МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ТРОФИЧЕСКИМИ ЯЗВАМИ НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Михаил Юрьевич СОЛУЯНОВ, Михаил Семенович ЛЮБАРСКИЙ, Олег Анатольевич ШУМКОВ, Дмитрий Владимирович ХАБАРОВ, Наталья Петровна БГАТОВА

ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 4

Цель исследования: изучить состояние местного иммунитета и динамику раневого процесса на фоне местного применения аутологичных лимфоцитов активированных лейкинфероном у пациентов с трофическими язвами на фоне синдрома диабетической стопы. Полученные в результате лимфоцитафереза и активации лейкинфероном лимфоциты путем инъекций в параульцерозные ткани возвращались пациенту. В результате исследования было выявлено, что местное применение активированных аутологичных лимфоцитов положительно сказывается на состоянии местного раневого иммунитета, о чем свидетельствует снижение концентрации провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-4) и уменьшения уровня ЦИК в венозной крови, оттекающей от трофической язвы. Это, в свою очередь, способствует более ускоренному заживлению трофических язв у пациентов с сахарным диабетом.

Ключевые слова: синдром диабетической стопы, лимфоцитаферез, лимфоциты, цитокины.

Рост числа больных сахарным диабетом носит эпидемический характер; по оценкам экспертов ВОЗ, в 2025 г. оно превысит 300 миллионов человек [1]. С увеличением продолжительности жизни больных сахарным диабетом вследствие создания эффективных средств и способов лечения возрастает число поздних осложнений заболевания. Наиболее тяжелым осложнением диабета является синдром диабетической стопы с развитием гнойно-некротических поражений стоп и гангрены. Сложный многофакторный патогенез заболевания не позволяет до настоящего времени найти достаточно адекватные методы консервативного и хирургического лечения синдрома диабетической стопы [2].

В связи с этим проблема лечения хирургических заболеваний, развившихся на фоне сахарного диабета, является одним из важных вопросов современной хирургии. Работами сотрудников НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН доказана существенная роль лимфатической системы в генезе синдрома диабетической стопы [3]. Доказано, что иммунные нарушения при гнойно-некротических осложнениях синдрома диабетической стопы в наибольшей степени выражены при его ишемическом варианте. При этой форме установлены выраженные признаки иммуносупрессии на уровне клеточ-

ного и гуморального, фагоцитарного звеньев иммунной системы, что проявлялось снижением в циркуляции общего числа лимфоцитов, Т-лимфоцитов и их популяций [4]. Эффективность восстановления нарушенных функций организма можно усилить, повышая функции иммунокомпетентных клеток. Одним из подходов является использование активированных лимфоцитов. Новые технологии терапии активированными лимфоцитами успешно используются при лечении некоторых онкологических заболеваний [5]. Несмотря на положительный эффект применения активированных лимфоцитов до настоящего времени не решен вопрос о структурно-функциональной целостности выделенных и обработанных стимулятором клеток. Целью настоящего исследования было изучение ультраструктурной организации выделенных из крови лимфоцитов, обработанных лейкинфероном, а также состояния местного иммунитета и динамики раневого процесса на фоне местного применения аутологичных активированных лимфоцитов.

Материалы и методы

Исследование содержало два блока. Первый блок был посвящен морфологическим методам исследования аутологичных лимфоцитов. Для изучения лимфоцитов в световом микроскопе и просвечивающем режиме электронного микроскопа выделенную из крови взвесь клеток

Солуянов М.Ю. — младш.н.с. лаборатории оперативной лимфологии, e-mail: msoluyanov@mail.ru
Любарский М.С. — чл.-корр. РАМН, д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе
Шумков О.А. — д.м.н., вед.н.с. лаборатории оперативной лимфологии
Хабаров Д.В. — д.м.н., вед.н.с. лаборатории лимфодетоксикации
Бгатова Н.П. — д.б.н., профессор, зав. лабораторией ультраструктурных исследований

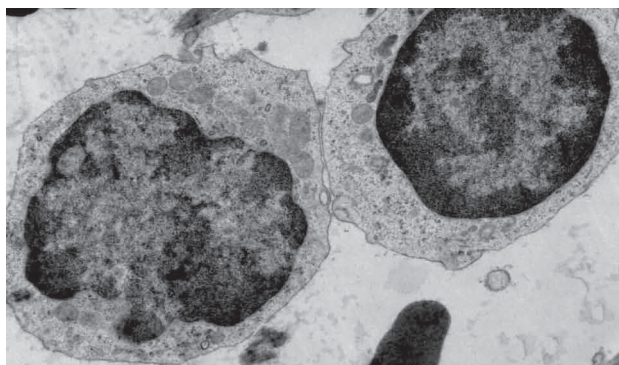


Рис. 1. Ультраструктура выделенных из крови лимфоцитов. Увеличение 12000.

фиксируют в 2,5%-растворе глутаральдегида на фосфатном буфере, затем в 1%-растворе O_5O_4 на фосфатном буфере [6], дегидратируют в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключают в эпон. Из полученных блоков готовят полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивают толуидиновым голубым, изучают под световым микроскопом и выбирают необходимые участки для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала получают ультратонкие срезы толщиной 35–45 нм на ультратоме LKB-8800, контрастируют насыщенным водным раствором уранилацетата, цитратом свинца [7] и изучают в электронном микроскопе JEM 1010. Лимфоциты фотографировали при увеличении 6000 в электронном микроскопе. Морфометрические исследования лимфоцитов выполняли в соответствии с общепринятыми принципами и методами при увеличении 48000 и использовании открытой тестовой системы [8]. Было выявлено, что выделенные лимфоциты сохраняли структурную целостность (рис. 1). В цитоплазме клеток отмечали немногочисленные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, комплекса Гольджи, прикрепленные и свободные полисомальные рибосомы, лизосомы. Немногочисленные митохондрии имели хорошо выраженные кристы. Ядро имело обычное для лимфоцитов распределение гетерохроматина. Плазматическая мембрана лимфоцитов образовывала выросты и микроворсинки (рис. 1). При изучении ультраструктуры лимфоцитов, обработанных лейкинфероном, было отмечено сохранение структурной целостности клеток. В цитоплазме клеток отмечали большее содержание цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума. На 50 % возрастала численная плотность свободных полисомальных рибосом по сравнению с соответствующим показателем необработанных лимфоцитов. Отме-

чалитенденцию к увеличению объемной плотности митохондрий. Повышалось в 2,4 раза количество выростов и микроворсинок, образуемых плазматической мембраной. Ядро имело обычное для лимфоцитов распределение гетерохроматина. Возрастала в 3 раза объемная плотность везикулярных структур в цитоплазме лимфоцитов. Следовательно, технологии выделения лимфоцитов не приводят к нарушению структуры клеток. Обработка лимфоцитов лейкинфероном не вызывает повреждения клеток, а способствует развитию структурных изменений, свидетельствующих об активации белок-синтетической функции клеток.

Второй блок работы, клинический, был посвящен оценке эффективности местного применения активированных аутологичных лимфоцитов. Нами было проведено сравнительное исследование в двух группах больных. Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программы «Microsoft Excel – 1998» на персональном компьютере. Для обработки результатов исследования использовали методы вариационной статистики: вычисление средней арифметической величины (M), среднего квадратичного отклонения (σ), ошибки среднего арифметического (m). Достоверность различий двух выборок оценивалась с помощью критерия Стьюдента (t).

1 группа – контрольная (26 пациентов). Пациенты первой группы получали стандартное лечение трофических язв на фоне сахарного диабета. Местное лечение осуществлялось по стандартным методикам (в первую фазу раневого процесса – повязки с водорастворимыми мазями, во вторую и третью – с растворами антисептиков).

2 группа – основная (23 пациента). Пациенты второй группы на фоне стандартного лечения получали инъекции аутологичных лимфоцитов, активированных лейкинфероном, в ткани вокруг трофической язвы.

Стандартное лечение трофических язв на фоне сахарного диабета включало применение сахароснижающих препаратов для достижения оптимального уровня гликемии, антикоагулянтов (гепарин, фраксипарин) для коррекции ишемии нижних конечностей, препаратов, улучшающих метаболизм в зоне ишемии (актовегин), антибиотиков. Для коррекции диабетической нейропатии использовались препараты альфа-липоевой кислоты (берлитион), витамины группы В. Для коррекции диабетической остеоартропатии были применены разгрузка стопы: постельный режим, изготовление орте-

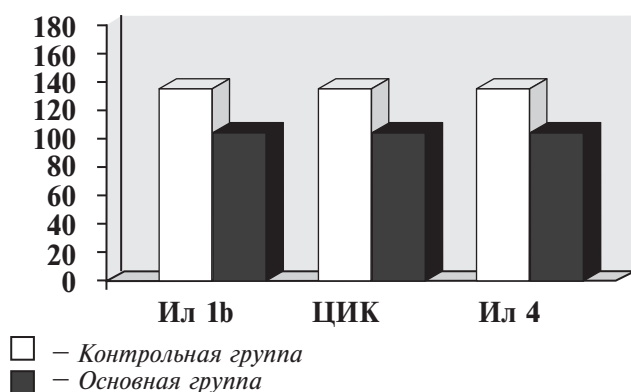


Рис. 2. Исследование цитокинового профиля сыворотки крови

за (лонгеты), уменьшающего нагрузку на стопу при ходьбе, использование костылей. В качестве местного лечения назначались ферментные препараты (имозимаза), куриозин, водорастворимые мази (левомеколь).

Приготовление и модуляция лимфоцитов осуществлялись на сепараторе клеток крови AS-TEC 204 фирмы «Fresenius». Полученные лимфоциты в концентрации 400–1000 клеток/мл экспонировали в течение 1 часа с 20 мг лейкинферона при температуре 24–26 °С. На курс лечения процедура лимфоцитафереза повторялась трижды с интервалом 48–72 часа (патент РФ № 2228204 от 10.05.2004. Способ лечения трофических язв на фоне синдрома диабетической стопы). Лимфоциты хранили в холодильнике при температуре 4 °С.

Полученные в результате лимфоцитафереза и активации лейкинфероном лимфоциты пациента в количестве 400–1000 клеток (8 мл) путем инъекций в параульцерозные ткани возвращались пациенту. Из 4-х точек по периферии трофической язвы проводились инъекции приготовленной смеси лимфоцитов пациента в количестве 100–250 клеток (2 мл) с каждой стороны. Инъекции выполнялись в условиях перевязочной, во вторую и третью фазы раневого процесса.

С целью оценки эффективности воздействия предложенного метода лечения на течение патологического процесса и для проведения сравнительного анализа оказываемого эффекта производилось изучение динамики раневого процесса, цитологическое исследование мазков-отпечатков ран по методу М.П. Покровской и М.С. Макарова. Для оценки состояния местного иммунитета выполнялся забор венозной крови, оттекающей от трофической язвы, с последующим определением в ней концентрации ИЛ-4, ИЛ-1b, ЦИК.

Результаты исследования

При оценке клинических показателей течения раневого процесса было выявлено следующее. Сроки ликвидации перифокального отека и некролиза были во всех группах одинаковыми. Появление грануляционной ткани в язвах ускорялось на 38% в основной группе по сравнению контрольной. Признаки краевой и очаговой эпителизации появлялись в основной группе на 36% ранее, чем в контрольной группе. Полное заживление язв в основной группе ускорилось по сравнению с контрольной группой на 21,3%.

У пациентов, входивших в разные группы исследования, через 21 день лечения было выявлено следующее количество цитогамм регенераторного типа. В группе пациентов, получавших только общепринятое лечение, через 21 день терапии было зарегистрировано только 53,76 % цитогамм регенераторного типа. Выявленный результат свидетельствует о том, что в данной группе только у половины пациентов через 21 день лечения первая фаза раневого процесса перешла во вторую, то есть в фазу, когда происходит регенерация, образование и созревание грануляционной ткани, а в последующем — и эпителизация. В результате исследования мазков-отпечатков пациентов из группы с применением местной клеточной терапии, полученных на 21 день лечения, было обнаружено 74,2 % цитогамм регенераторного типа.

Исследование цитокинового профиля сыворотки, оттекающей от трофической язвы венозной крови, показало, что наиболее выраженным действием в процессе заживления трофических язв обладают активированные аутологичные клетки, что проявляется в купировании иммунновоспалительных реакций, о чем косвенно свидетельствует снижение содержания провоспалительных цитокинов (ИЛ-1b, ИЛ-4) и уменьшение концентрации ЦИК в сыворотке крови (рис. 2).

Вывод

Местное применение активированных аутологических лимфоцитов положительно сказывается на состоянии местного раневого иммунитета, о чем свидетельствует снижение концентрации провоспалительных цитокинов (ИЛ-1b, ИЛ-4) и уменьшение содержания ЦИК в венозной крови, оттекающей от трофической язвы, что в свою очередь способствует ускоренному заживлению трофических язв у пациентов с сахарным диабетом.

Литература

1. Балаболкин М.И. Диабетология. М., 2000. 672.
Balabolkin M.I. Diabetology. M., 2000. 672.
2. Калинин А.П., Рафибеков Д.С., Ахунбаев М.И. Диабетическая стопа. Бишкек, 2000. 284.
Kalinin A.P., Rafibekov D.S., Akhunbaev M.I., Agaev R.A., Akilbekov I.K. Diabetic foot. Bishkek, 2000. 284.
3. Авдонина О.Г. Нарушения гемолимфоциркуляции при синдроме диабетической стопы и их коррекция: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 2002. 19.
Avdonina O.G. Injuries of circulation of blood and lymph at syndrome of diabetic foot and correction of these injuries. Abstract Ph.D. thesis. / O.G. Avdonina. Novosibirsk, 2002. 19.
4. Светлакова И.А. Клинико-иммунологические особенности гнойно-некротических осложнений синдрома диабетической стопы. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Челябинск, 2006.
Svetlakova I.A. Clinical and immune characteristics of purulent necrotic complications of syndrome of diabetic foot. Abstract Ph.D. thesis: Chelyabinsk 2006.
5. Dillman R.O., Barth N.M., VanderMolen L.A. et al. Treatment of kidney cancer with autologous tumor cell vaccines of short-term cell lines derived from renal cell carcinoma // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2001. 16 (1): 47–54.
6. Milloning G. // Fifth International Congress in Electron Microscopy / Ed. S.S. Breese. N. Y.: Acad. Press, 1962: 8.
7. Reinolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. 208–212.
8. Автандилов Г.Г., Невзоров В.П., Невзорова О.Ф. Системный стереометрический анализ ультраструктур клеток. Кишинев: Штиница, 1984. 168.
Avtandilov G.G., Nevzorov V.P., Nevzorova O.F. System stereometric analysis of cellular ultrastructure. Kishinev: Shtinica, 1984. 168.

INFLUENCE OF LOCAL USAGE OF ACTIVATED AUTOLYMPHOCYTES ON DYNAMICS OF WOUND HEALING AND CHARACTERISTICS OF LOCAL IMMUNITY OF PATIENTS WITH TROPHIC ULCERS ON BACKGROUND OF DIABETES MELLITUS

Mikhail Yurievich SOLUYANOV, Mikhail Semenovich LYBARSKIY, Oleg Anatolievich SHUMKOV, Dmitriy Vladimirovich KHABAROV, Natalya Petrovna BGATOVA

SI Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology SB RAMS, Novosibirsk
4, Ac. Timakov str., Novosibirsk, 630117

To investigate the local immunity and dynamics of wound healing while under treatment trophic ulcers on background of diabetic foot syndrome with the use of autolymphocytes, processed by leukoferonum. Autolymphocytes were taken by lymphocytapheresis on separator of blood cell «Haemonetics MCS+». Received autolymphocytes were activated by immunomodulator (leukinoferonum) also they were entered into paraulcerative tissue of the patients by injections. The research has shown that the local usage of activated autolymphocytes has changed local wound immunity positively: level of proinflammatory cytokines (IL-1b, IL-4) and level of circulative immune complex of venous blood, flowing from trophic ulcers has decreased. It determines high speed of healing wound of patients with diabetes mellitus.

Key words: diabetic foot syndrome, lymphocytapheresis, lymphocytes, cytokines.

Soluyanov M.Yu. — researcher, e-mail: msoluyanov@mail.ru

Lubarsky M.S. — Head of the Clinical Department, doctor of Medicine, corresponding member of RAMS, professor

Shumkov O.A. — doctor of Medicine, senior researcher

Khabarov D.V. — doctor of Medicine, senior researcher

Bgatova N.P. — doctor of Bayology, professor