

Рисунок 2 — Годовая динамика заболеваемости опоясывающим лишаем

Поздние сроки обращения (на 8-14 день и позже от начала заболевания) за медицинской помощью пациентов старших возрастных групп, больных опоясывающим лишаем, определяют их эпидемическую значимость как источников инфекции, имеющих реальную угрозу для людей, восприимчивых к ветряной оспе.

Накопление в организме человека неблагоприятных эффектов воздействия ультрафиолетовой солнечной радиации в течение теплого периода года определяет более высокую заболеваемость опоясывающим лишаем в августе-сентябре.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Исаков, В. А. Герпесвирусные инфекции человека: руководство для врачей / В. А. Исаков, Е. И. Архипова, Д. В. Исаков. — СПб: Спец. лит, 2006. — 301 с.
2. Опоясывающий герпес и постгерпетическая невралгия: профилактика и лечение / L. Anne [et al.] // Российский журнал кожных и венерических болезней. Приложение «Герпес». — 2007. — № 2. — С. 54–57.
3. Лечение герпес-зостерной инфекции и постгерпетической невралгии / Daniel A Carrasco [et al.] // Российский журнал кожных и венерических болезней. Приложение «Герпес». — 2006. — № 1. — С. 28–34.
4. Руководство по геронтологической дерматологии / В. А. Молочков [и др.]. — М.: МОНИКИ, 2004. — С. 330–332.

5. Гомберг, М. А. Опоясывающий лишай как дерматологическая проблема / М. А. Гомберг. // Вестник дерматологии и венерологии. — 2007. — № 5. — С. 18–20.

6. Zoster Incidence in Human Immunodeficiency Virus-Infected Hemophiliacs and Homosexual Men, 1984–1997. / Eric A. Engels [et al.]. // Journ. of Infectious Diseases. — 1999. — Vol. 180. — P. 1784–1789.

7. Карпов, В. В. Особенности течения опоясывающего герпеса у больных ВИЧ, HCV и папилломавирусной инфекцией / В. В. Карпов, Ю. В. Сергеев // Иммунопатология. Аллергология. Инфектология. — 2003. — № 3. — С. 108–111.

8. ACIP Provisional Recommendations for the Use of Zoster Vaccine // Massachusetts Department of Public Health (MDPH). Division of Epidemiology and Immunization. Shingles Vaccine Information [Electronic resource]. — 2007. — Mode of access: <http://www.cdc.gov/nip/vaccine/zoster/default.htm>. — Date of access: 14.09.2007.

9. Показатели распространенности явлений, применяемые в эпидемиологии [Electronic resource]. — 2007. — Mode of access: <http://pubhealth.spb.ru/EpidD/rateratio#rateratio>. — Date of access: 28.12.2007.

10. Лукьянова, Е. А. Медицинская статистика: учебное пособие / Е. А. Лукьянова. — М: Изд-во РУДН, 2002. — 255 с.

11. К эпидемиологии опоясывающего герпеса. Больной опоясывающим герпесом как источник заражения ветряной оспой / А. С. Шишов [и др.] // Журн. микробиол. — 1987. — № 12. — С. 45–50.

12. Rapid contamination of the environments with varicella-zoster virus DNA from a patient with herpes zoster / Yoshikawa Tetsushi [et al.] // J. Med. Virol. — 2001. — Vol. 63, № 1. — P. 64–66.

13. Zak-Prelich, M. The role of solar ultraviolet irradiation in zoster / M. Zak – Prelich [et al.]. // Epidemiol. and Infec. — 2002. — Vol. 129, № 3. — P. 593–597.

Поступила 28.05.2008

УДК 616.5 – 002.34:616.155.3

ПРОДУКЦИЯ ОКСИДА АЗОТА И ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ РЕЦИДИВИРУЮЩИМ ФУРУНКУЛЕЗОМ

И. А. Новикова, А. В. Гомоляко

Гомельский государственный медицинский университет

В статье представлены результаты тестов оценки метаболической, поглотительной и NO-продуцирующей функции лейкоцитов больных хроническим рецидивирующим фурункулезом в период ремиссии заболевания. Показатель стимулированного НСТ-теста у больных был достоверно снижен. Установлен повышенный по сравнению со здоровыми лицами уровень продукции оксида азота мононуклеарными лейкоцитами больных. В отличие от контрольной группы стимуляция пирогеналом лейкоцитов больных не приводила к увеличению продукции оксида азота. Снижение функционального резерва продукции кислородных радикалов и оксида азота у больных хроническим фурункулезом вне обострения может рассматриваться, как отражение функциональной анергии иммунной системы.

Ключевые слова: хронический фурункулез, оксид азота, НСТ-тест, фагоцитоз.

NITRIC OXIDE PRODUCTION AND PHAGOCYTOSIS IN PATIENTS WITH CHRONIC RECURRENT FURUNCULOSIS

I. A. Novikova, A. V. Gomoliako

Gomel State Medical University

In the article the results of evaluation of metabolic, nitric oxide productive functions and phagocytosis of leucocytes in patients with chronic recurrent furunculosis in the remission period of the disease are represented. The results of stimulated NBT-test in patients were significantly decreased. The increased level of nitric oxide production by mononuclear leucocytes of patients in comparison with healthy people was determined. In contrast to the control group the pirogenalum stimulation of patients' leucocytes didn't lead to increasing of nitric oxide production. The decreasing of functional reserve of reactive oxygen radicals and nitric oxide production in patients with chronic furunculosis in the remission period can be interpreted as the reflection of functional energy of immune system.

Key words: chronic furunculosis, nitric oxide, NBT-test, phagocytosis.

Хронический рецидивирующий фурункулез (ХРФ) — достаточно распространенное заболевание, поражающее население трудоспособного возраста и характеризующееся низкой эффективностью терапии. По данным литературы, в 35–40% случаев заболевание имеет непрерывно рецидивирующее течение [1].

Основным возбудителем ХРФ является *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), частота выявления которого, по данным различных авторов, колеблется от 60 до 97% [2]. По данным литературы наличие на коже или на слизистой оболочке носа золотистого стафилококка считается важным фактором развития заболевания. Тем не менее у 30% здоровых людей носительство *S. aureus* не сопровождается развитием заболевания. В то же время не у всех пациентов, страдающих ХРФ, удается выявить *S. aureus* [1, 2].

В настоящее время возникновение ХРФ и его прогрессирование связывают с нарушением нормального функционирования и взаимодействия различных звеньев иммунной системы. У больных ХРФ отмечается нарушение поглотительной, кислород-продуцирующей функции и внутриклеточной бактерицидности нейтрофилов крови, дефицит миелопероксидазы, снижение аффинности сывороточных антител, нарушение адгезии лейкоцитов [1, 3].

В настоящее время важная роль в реализации неспецифической реактивности и специфического иммунного ответа отводится оксиду азота (NO). Известно, что в норме индуцибельная NO-синтаза (iNOS) — фермент лейкоцитов, синтезирующий NO из L-аргинина, практически не обнаруживается в клетках. Нарботка iNOS в иммунокомпетентных клетках происходит как под действием инфекционного агента или его токсинов, так и под влиянием таких медиаторов воспаления, как интерферон- γ , фактор некроза опухоли- α , интерлейкин (IL)-1 β , IL-12. Способностью к выработке NO в ответ

на стимуляцию бактериальными продуктами обладают клетки костного мозга, печени, фибробласты, макрофаги и лейкоциты крови человека [4, 5]. NO регулирует процессы адгезии, хемотаксиса, агрегации нейтрофилов, а в условиях гиперпродукции может вызывать апоптоз самих клеток-продуцентов NO и их микроокружения. Это приводит к нарушению процессов межклеточного взаимодействия и предопределяет развитие «негативного» ответа иммунной системы на активационный стимул [4, 6].

Несмотря на значительное количество работ, посвященных проблеме ХРФ, патогенетические механизмы персистенции возбудителя и рецидивирования заболевания остаются неясными.

Цель работы: изучить NO-продуцирующую, метаболическую и поглотительную активность лейкоцитов больных хроническим рецидивирующим фурункулезом в период ремиссии.

Материалы и методы

Обследовано 30 больных хроническим рецидивирующим фурункулезом, госпитализированных в отделение иммунопатологии РНПЦ РМ и ЭЧ в стадии ремиссии для проведения плановой иммунокоррекции (11 мужчин и 19 женщин в возрасте от 20 до 48 лет). В качестве контрольной группы были взяты 20 здоровых доноров Гомельской областной станции переливания крови сопоставимого возраста.

Исследование проводили при поступлении больного в отделение, до назначения медикаментозной терапии. Материалом для исследования служила гепаринизированная (20 ЕД/мл) венозная кровь. Оценивали NO-продуцирующую, метаболическую и поглотительную активность лейкоцитов.

Продукцию NO определяли в чистой краткосрочной культуре мононуклеарных (МНК) и полиморфноядерных (ПЯЛ) лейкоцитов. Выделение клеток производили с помощью ступенча-

того градиента плотности фикола-урографина (1077/1119). Чистота выделения МНК и ПЯЛ составляла не менее 95%. Мононуклеарные и полиморфноядерные лейкоциты отмывали физиологическим раствором и ресуспендировали в питательной среде в концентрации 5×10^6 /мл. Для культивирования клеток использовали питательную среду Leibovitz L-15 modified с глутамином (Flow Lab), дополненную антибиотиками (пенициллин 100 Ед/мл, стрептомицин 100 мкг/мл). Клеточные суспензии в объеме 0,3 мл инкубировали в 96-луночных планшетах (Nunc) в течение 3 часов при 37°C. В качестве стимулятора продукции NO лейкоцитами использовали препарат пирогенал (липополисахарид *Salmonella typhi*) из расчета 7 мкг/мл клеточной суспензии. Исследование каждой клеточной культуры дублировалось. Жизнеспособность клеток контролировалась в тесте исключения трипанового синего на всех этапах исследований.

Производство оксида азота определяли по накоплению в инкубационной среде нитрит-анионов (NO_2^-). Супернатант смешивали с равным объемом реактива Грисса (0,5% сульфаниламид, 0,05% N-(1-нафтил)-этилендиамин, 4,45% винная кислота). После 20 минут инкубации при комнатной температуре измеряли оптическую плотность реакционной смеси на спектрофотометре при 540 нм против инкубационной среды. Содержание NO_2^- устанавливали по стандартной калибровочной кривой, полученной на основе серии разведений (от 0,2 до 12,5 мкмоль/л) 1 мМ раствора нитрита натрия [7].

Поглотительную способность нейтрофилов определяли в реакции фагоцитоза с использованием суспензии убитых нагреванием *Staphylococcus aureus* (штамм ATCC 25923) в концентрации 10^8 микробных тел/мл с последующим приготовлением окрашенных мазков и оценкой фагоцитарного индекса (ФИ) и фагоцитарного числа (ФЧ).

Метаболическую активность нейтрофилов оценивали в реакции спонтанного и стимулированного *Staphylococcus aureus* восстановления

нитросинего тетразолия (НСТ-тест) с микроскопической оценкой в окрашенных мазках процентного содержания диформаза-положительных гранулоцитов [8].

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета программ «Statistica» 6.0 с использованием непараметрических критериев Манн-Уитни, Спирмена, а также критерия Вилкоксона для связанных групп. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Результаты выражали, как $M \pm s$, где «M» — среднее значение, а «s» — стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

Мононуклеарные и полиморфноядерные лейкоциты периферической крови как доноров, так и больных хроническим рецидивирующим фурункулезом в 3-часовых культурах *in vitro* продуцировали NO. Интенсивность продукции зависела от используемой среды и длительности культивирования. В предварительных исследованиях нами было показано, что наиболее предпочтительной для подобных исследований является среда Leibovitz L-15 вследствие лучшего сохранения в ней функциональных свойств лейкоцитов и более высокого уровня продукции NO [7]. Что касается длительности культивирования, большинство исследователей используют 6–24-часовые культуры клеток. Основанием для этого служат данные о том, что iNOS в неактивированных лейкоцитах отсутствует, а 6–8 часов после действия стимулятора необходимы для активации генов, синтеза м-РНК iNOS и самого фермента [9–12]. Однако мы сочли целесообразным определить продукцию оксида азота за три часа, предположив, что это позволит оценить как «эндогенное примирование» лейкоцитов по уровню базальной продукции, так и функциональный резерв лейкоцитов по уровню стимулированной продукции NO.

Результаты определения NO-продуцирующей активности лейкоцитов в стимулированных и нестимулированных культурах лейкоцитов больных и здоровых лиц представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Базальная и стимулированная продукция оксида азота в 3-часовых культурах МНК и ПЯЛ доноров и больных ХРФ

Культивируемые клетки	Производство оксида азота, мкмоль/л	
	доноры, n = 11	больные, n = 12
МНК, базальная продукция	$0,36 \pm 0,18$	$0,62 \pm 0,22^*$
МНК, стимулированная продукция	$0,51 \pm 0,24^{**}$	$0,68 \pm 0,32$
ПЯЛ, базальная продукция	$0,36 \pm 0,29$	$0,46 \pm 0,30$
ПЯЛ, стимулированная продукция	$0,51 \pm 0,49$	$0,44 \pm 0,367$

* — различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с группой доноров.

** — различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с продукцией NO без стимуляции.

Как видно из приведенной таблицы, МНК и ПЯЛ здоровых лиц продуцировали практически одинаковое количество NO, что отмечалось как в базальных, так и в стимулированных культурах. Под действием пирогенала наблюдалось достоверное увеличение продукции NO мононуклеарными лейкоцитами доноров ($0,36 \pm 0,18$ мкмоль/л в нестимулированной культуре, $0,51 \pm 0,24$ мкмоль/л — после стимуляции, $p = 0,042$). Аналогичный эффект наблюдался и в культуре ПЯЛ, однако только в виде тенденции.

В группе обследованных больных отмечена тенденция к более высокой продукции NO культурами МНК по сравнению с ПЯЛ. Стимуляция пирогеналом не усиливала NO — продуцирующей способности лейкоцитов.

По сравнению со здоровыми лицами продукция NO в нестимулированных культурах МНК больных была достоверно выше ($0,36 \pm 0,18$ и $0,62 \pm 0,22$ мкмоль/л соответственно, $p = 0,017$). По-видимому, повышенный уровень базальной продукции NO лейкоцитами больных ХРФ связан с их предварительной эндогенной активацией бактериальными продуктами.

Проведенное в наших исследованиях одновременное определение базальной и стимулированной NO-продуцирующей активности лейкоцитов позволило в определенной степени оценить их функциональный резерв по продукции NO. При этом выявлено отсутствие такого резерва у лейкоцитов больных хроническим рецидивирующим фурункулезом в отличие от здоровых лиц.

Как известно, кроме продукции NO, фагоцитирующие клетки, реализуя кислород-зависимую цитотоксичность, вырабатывают кислородные радикалы (O_2^- , H_2O_2 , $OH\cdot$, $HOCl$), которые при взаимодействии с NO образуют высокореактивные продукты, такие как NO^- , NO_2 , N_2O_3 , $OONO^-$, обладающие бактерицид-

ным эффектом. Продемонстрировано усиление цитотоксического эффекта нейтрофильных фагоцитов человека при добавлении в культуральную среду доноров оксида азота [13]. S. Kaplan и соавторами при исследовании бактерицидного действия активных форм азота и кислорода в отношении S.aureus установлено, что именно комбинированное воздействие NO и O_2^- приводит к пролонгированной, но полной гибели S.aureus, тогда как по отдельности влияние этих продуктов кратковременно и малоэффективно [14]. С другой стороны, возможен антагонистический характер взаимоотношений NO и O_2^- . Так, в культуральных исследованиях с лейкоцитами животных выявлено подавление продукции кислородных радикалов при усилении синтеза NO [15]. По-видимому, лишь при сохранении оптимального баланса между уровнем продукции активных форм кислорода, оксида азота и антигенного стимула возможно полноценное функционирование клеточного звена неспецифической иммунологической резистентности.

С учетом вышеизложенного, мы проанализировали результаты НСТ-теста и поглотительной способности гранулоцитов у обследованных пациентов. Выявлено достоверное снижение показателя стимулированного НСТ-теста у больных ХРФ по сравнению со здоровыми лицами (56,5 и 45,1% соответственно, $p = 0,005$), что согласуется с литературными данными и может быть следствием персистенции возбудителя в период ремиссии заболевания [8]. Поглотительная активность гранулоцитов у больных ХРФ достоверно не отличалась от здоровых лиц (ФИ 63,3% и 64,0% соответственно).

Нами был проведен анализ корреляционных взаимосвязей между показателями функциональной активности ПЯЛ и NO-продуцирующей активностью лейкоцитов у доноров и больных ХРФ методом парного корреляционного анализа по Спирмену (рисунок 1).

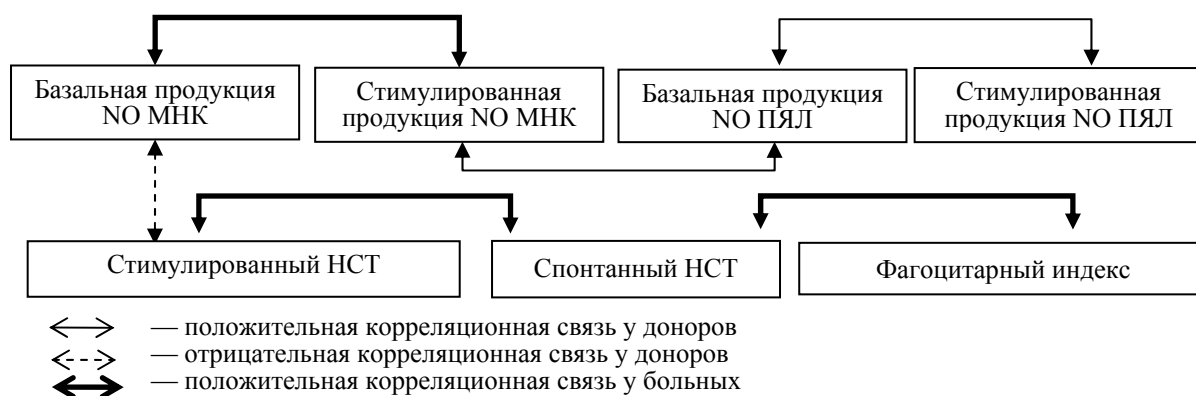


Рисунок 1 — Схема корреляционных связей между показателями продукции NO, фагоцитоза и результатами НСТ-теста у больных и доноров

В группе доноров установлено наличие сильной положительной корреляционной взаимосвязи между уровнем базальной продукции оксида азота ПЯЛ и уровнями стимулированной продукции оксида азота МНК ($R = 0,89$, $p = 0,003$) и ПЯЛ ($R = 0,85$, $p = 0,004$). Кроме того, было выявлено наличие отрицательных взаимосвязей между базальной продукцией NO МНК и стимулированным НСТ-тестом ($R = -0,78$, $p = 0,04$).

В отличие от доноров, в группе больных ХРФ упомянутые корреляционные взаимосвязи отсутствовали. Однако отмечалась сильная положительная взаимосвязь между базальной и стимулированной продукцией NO мононуклеарными лейкоцитами ($R = 0,80$, $p = 0,001$). Также показатели спонтанного НСТ-теста положительно коррелировали со значениями НСТ-теста стимулированного ($R = 0,58$, $p = 0,048$) и фагоцитарным индексом ($R = 0,70$, $p = 0,01$).

По-видимому, корреляционные взаимосвязи между базальной и стимулированной продукцией NO лейкоцитами характеризуют в целом процессы межклеточного взаимодействия и регуляторного влияния МНК. Взаимосвязь между уровнем продукции NO и показателем продукции активных форм кислорода, выявляемым в НСТ-тесте, может отражать участие NO в процессах регуляции образования радикалов азота и кислорода в активированных гранулоцитах, обеспечивающих неспецифическую резистентность.

Таким образом, у больных ХРФ даже в ремиссии заболевания наблюдаются радикальные изменения характера корреляционных связей между показателями, характеризующими функциональную активность лейкоцитов. Одновременно с описанными выше нарушениями NO-продуцирующей функции и истощением резерва продукции оксида азота это может рассматриваться как отражение функциональной анергии иммунной системы вследствие хронической стимуляции бактериальными продуктами.

Выводы

1. Обнаружена способность мононуклеарных и полиморфноядерных лейкоцитов здоровых лиц и больных хроническим рецидивирующим фурункулезом к продукции NO при краткосрочном культивировании в течение 3 часов.

2. NO-продуцирующая активность мононуклеарных и полиморфноядерных лейкоцитов доноров в культуре *in vitro* не различается. Стимуляция пирогеналом приводит к достоверному увеличению продукции NO в культурах мононуклеарных лейкоцитов.

3. NO-продуцирующая активность мононуклеарных лейкоцитов больных хроническим рецидивирующим фурункулезом достоверно выше, чем у здоровых лиц. Различий между

базальной и стимулированной продукцией NO у больных не выявлено, что свидетельствует об отсутствии функционального резерва лейкоцитов по продукции NO.

4. У больных хроническим рецидивирующим фурункулезом вне обострения сохраняются признаки недостаточности метаболической активности нейтрофилов, что подтверждается угнетением, по сравнению со здоровыми лицами, значений стимулированного НСТ-теста.

5. Характер корреляционных взаимосвязей между показателями NO-продуцирующей, метаболической и поглотительной активности лейкоцитов у больных хроническим рецидивирующим фурункулезом вне обострения радикально отличается от здоровых лиц.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Принципы диагностики и лечения хронического рецидивирующего фурункулеза / Н. Х. Сетдикова [и др.] // Лечащий врач. — 2006. — № 5. — С. 44–47.
2. Нарушение иммунитета при рецидивирующем фурункулезе / Н.М. Калинина [и др.] // Цитокины и воспаление [Электронный ресурс]. — 2003. — № 1. — Режим доступа: <http://www.cytokines.ru/russian/2003/1/Contents.php> — Дата доступа: 02.01.2008.
3. Изучение некоторых особенностей иммунного статуса при хроническом фурункулезе / М. И. Карсонова [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2002. — № 3. — С. 67–71.
4. Роль оксида азота в процессе активации Т-лимфоцитов человека, индуцированной бактериальным суперантигеном / Л. В. Сахно [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2000. — Т. 130, № 10. — С. 402–406.
5. Генерация оксида азота лейкоцитами периферической крови в норме и при патологии / П. П. Голиков [и др.] // Пат. Физиология. — 2003. — № 4. — С. 11–13.
6. Mannick, J. B. Immunoregulatory and antimicrobial effects of nitrogen oxides / J. B. Mannick // Proceedings of the American thoracic society. — 2006. — Vol. 3. — P. 161–165.
7. Гомоляко, А. В. Клеточная модель для изучения продукции оксида азота в культуре лейкоцитов *in vitro* / А. В. Гомоляко // Сб. научных статей Республ. научно-практич. конф. «Актуальные проблемы медицины» и 17-й итоговой научной сессии Гомельского гос. мед. университета / Гомельского гос. мед. университет. — Гомель, 2008. — Т. 1 — С. 166–168.
8. Комплексная лабораторная оценка иммунного статуса: учебно-методическое пособие для практических занятий с врачами клин. лаб. диагностики / И. А. Новикова [и др.]. — Витебск, 2003. — 39 с.
9. Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций / С. Я. Проскураков [и др.] // Иммунология. — 2004. — № 4. — С. 9–20.
10. Продукты NO-синтазной активности и воспаление дыхательных путей: метаболизм, патофизиологическая роль при аллергических заболеваниях / Н. А. Филиппова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. — 2006. — № 8. — С. 3–9.
11. NO-синтазы в норме и при патологии различного генеза / Н. К. Зенков [и др.] // Вестник РАМН. — 2000. — № 4. — С. 30–34.
12. Ивашкин, В. Оксид азота в регуляции функциональной активности физиологических систем / В. Ивашкин, О. Драпкина // Российский журнал гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. — 2000. — № 4. — С. 16–21.
13. Effect of nitric oxide donors on oxygen-dependent cytotoxic responses mediated by neutrophils / G. Andonegui [et al.] // The Journal of Immunology. — 1999. — Vol. 162. — P. 2922–2930.
14. Effect of nitric oxide on Staphylococcal killing and interactive effect with superoxide / S. Kaplan [et al.] // Infection and Immunity. — 1996. — Vol. 164, № 1. — P. 69–76.
15. Modulation of Rat Peripheral Polymorphonuclear Leukocyte Response by Nitric Oxide and Arginine / P. Seth [et al.] // Blood. — 1994. — Vol. 84, № 8 — P. 2741–2748.