

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ТЕХНОЛОГИИ

УДК 616-002-008.953-092

DOI: 10.17816/pmj39255-60

АНАЛИЗ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ЭКССУДАТА У ПАЦИЕНТОВ С ФЛЕГМОНОЙ ЛИЦА

*А.П. Годовалов**, *Г.И. Штраубе*, *И.А. Боев*

Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера, Россия

ANALYSIS OF PHAGOCYTOTIC ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD AND EXUDATE LEUKOCYTES IN PATIENTS WITH FACIAL PHLEGMON

*A.P. Godovalov**, *G.I. Shtraube*, *I.A. Boev*

E.A. Vagner Perm State Medical University, Russian Federation

Цель. Оценить фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови и экссудата пациентов с флегмоной лица. В настоящее время относительно мало внимания уделяется оценке функциональной активности лейкоцитов периферической крови и экссудата при флегмоне лица, заболеваемость которой характеризуется увеличением числа случаев, особенно среди пациентов с коморбидной патологией.

Материалы и методы. Для исследования фагоцитарной активности лейкоцитов с помощью метода, основанного на оценке поглощения нейтрофилами и моноцитами формализированных эритроцитов барана, получали пробы периферической крови и экссудата от 18 пациентов с диагнозом флегмоны лица. В качестве группы сравнения использовали лейкоциты крови, полученные от 29 практически здоровых доноров.

© Годовалов А.П., Штраубе Г.И., Боев И.А., 2022

тел. +7 342 236 44 85

e-mail: AGodovalov@gmail.com

[Годовалов А.П. (*контактное лицо) – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник ЦНИЛ, доцент кафедры микробиологии и вирусологии; Штраубе Г.И. – доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии; Боев И.А. – стоматолог-хирург, соискатель кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии].

© Godovalov A.P., Shtraube G.I., Boev I.A., 2022

tel. +7 342 236 44 8

e-mail: AGodovalov@gmail.com

[Godovalov A.P. (*contact person) – Candidate of Medical Sciences, leading researcher of Central Scientific Research Laboratory, Associate Professor of Department of Microbiology and Virology; Shtraube G.I. – MD, PhD, Associate Professor, Head of Department of Dental Surgery and Maxillofacial Surgery; Boev I.A. – Exodontist of Clinical Dental Hospital, candidate for a degree, Department of Dental Surgery and Maxillofacial Surgery].

Результаты. Показано, что при флегмоне лица характерно усиление фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови. Наблюдается перераспределение лейкоцитов по числу поглощенных объектов в сторону увеличения активно фагоцитирующих клеток – 4438 ± 721 в 1 мкл (в группе сравнения – 297 ± 67 в 1 мкл; $p = 0,00001$). Однако после миграции в зону патологического процесса лейкоциты теряли свою фагоцитарную активность, и число фагоцитирующих клеток снижалось до $35,0 \pm 8,3$ % (для лейкоцитов периферической крови тех же пациентов – $64,3 \pm 5,4$ %; $p = 0,024$). Изменения фагоцитарной активности лейкоцитов экссудата затрагивали как нейтрофилы, так и моноциты.

Выводы. Таким образом, при флегмоне лица изменения фагоцитарной активности лейкоцитов крови связаны, вероятно, с опосредованным влиянием цитокинов, а в очаге воспаления лейкоциты попадают под прессинг со стороны микроорганизмов. В такой ситуации необходим подбор эффективной иммуностимулирующей терапии.

Ключевые слова. Флегмона лица, фагоцитарная активность, лейкоциты, нейтрофилы, моноциты, экссудат.

Objective. To assess the phagocytic activity of peripheral blood and exudate leukocytes in patients with facial phlegmon. Currently, relatively little attention is paid to assessing the functional activity of peripheral blood and exudate leukocytes in facial phlegmon, the incidence of which is characterized by an increase in the number of cases and, especially, among patients with comorbid pathology.

Materials and methods. To study the phagocytic activity of leukocytes using a method based on the assessment of the absorption of formalinized sheep erythrocytes by neutrophils and monocytes, the samples of peripheral blood and exudate were obtained from 18 patients diagnosed facial phlegmon. Blood leukocytes obtained from 29 healthy donors were used as a comparison group.

Results. It was shown that for patients with phlegmon of the face, an increase in the phagocytic activity of peripheral blood leukocytes is characteristic. There was observed a redistribution of leukocytes according to the number of absorbed objects towards an increase in actively phagocytizing cells – 4438 ± 721 per 1 μ l (in the comparison group – 297 ± 67 per 1 μ l; $p < 0.05$). However, after migration to the foci of the pathological process, leukocytes lost their phagocytic activity and the number of phagocytic cells decreased to 35.0 ± 8.3 % (for peripheral blood leukocytes of the same patients – 64.3 ± 5.4 %; $p < 0.05$). Changes in the phagocytic activity of exudate leukocytes affected both neutrophils and monocytes.

Conclusions. Thus, in patients with phlegmon of the face, changes in the phagocytic activity of blood leukocytes are probably associated with the indirect influence of cytokines, and in the focus of inflammation, leukocytes come under pressure from microorganisms. In such a situation, it is necessary to select an effective immunotropic therapy.

Keywords. Facial phlegmon, phagocytic activity, leukocytes, neutrophils, monocytes, exudate.

ВВЕДЕНИЕ

Флегмона лица относится к гнойным заболеваниям с выраженной воспалительной реакцией. Среди факторов, обуславливающих развитие патологического процесса, существенное место отводится условно-патогенным микроорганизмам [1, 2] и продуктам разрушения тканей человека под влиянием микробных метаболитов. В настоящее время в Пермском крае наблюдается тенденция роста заболеваемости флегмонами лица и увеличение доли пациентов с коморбидной патологией [3]. В такой ситуации иммунная система пациентов испытывает двойной прессинг, как

со стороны микрофлоры, так и от разрушающихся тканей человека.

Относительно мало сведений представлено об изменениях функциональной активности лейкоцитов при развитии флегмоны лица. Например, показано, что на фоне сахарного диабета замедлена регрессия показателей воспаления при флегмоне лица, но не раскрываются механизмы формирования затяжного воспалительного процесса [4]. В то же время среди клеток врожденного иммунитета существенную роль в защите организма от бактериальных агентов играют нейтрофилы и моноциты, которые после распознавания соответствующих структур

микроорганизмов начинают их поглощение для дальнейшего уничтожения [5]. В рутинной лабораторной практике для оценки фагоцитарной активности лейкоцитов предложен метод, основанный на использовании в качестве объектов фагоцитоза формализованных эритроцитов барана (ФЭБ), которые активно поглощаются лейкоцитами периферической крови. Неоспоримыми преимуществами метода являются дифференцированная оценка поглотительной активности лейкоцитов по числу интернализированных объектов, возможность нагружать такие «мишени» разными биологически активными веществами (например опсонинами), а также использовать красители и другие «метки» [6].

Цель исследования – оценить фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови и экссудата пациентов с флегмой лица.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовали пробы периферической крови 18 пациентов с диагнозом флегмоны лица и 29 практически здоровых доноров. На этапе хирургического лечения от пациентов были получены образцы экссудата. Группы были сопоставимы по возрасту. Критерием исключения являлся женский пол, поскольку фагоцитарная активность лейкоцитов человека находится под влиянием со стороны женских половых гормонов, активность которых циклически меняется [7].

Для оценки фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови использовали метод [8], сущность которого в том, что 0,025 мл отмытых формализованных эритроцитов барана (ФЭБ; $100 \cdot 10^6$ в 1 мл в среде 199 с 10 мМ НЕРЕС и 2 мМ L-глутамин) смешивается с 0,025 мл гепаринизированной периферической крови (50 ЕД/мл) в микропробирках с антиадгезивной поверх-

ностью. Образцы инкубируются 20 мин при 37 °С. Оценка числа нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов, фагоцитирующих ФЭБ, проведена на микропрепаратах, окрашенных по методу Романовского – Гимзе. В каждом препарате учитывали не менее 300 фагоцитирующих клеток. Рассчитывали относительное число фагоцитирующих клеток каждого типа, среднее число ФЭБ, приходящееся на одну фагоцитирующую клетку.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета Statistica 7.0. Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро – Уилка. В случае распределения, приближенного к нормальному, использовали *t*-критерий Стьюдента, в остальных случаях – критерий Манна – Уитни. За пороговый уровень значимости принимали величину $p < 0,05$. Результаты представлены в виде среднего и его ошибки ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что фагоцитарная активность лейкоцитов периферической крови у пациентов с флегмой лица статистически значимо выше, чем таковая у здоровых доноров (табл. 1). Наблюдается перераспределение лейкоцитов по числу поглощенных объектов в сторону увеличения активно фагоцитирующих клеток – 4438 ± 721 в 1 мкл (в группе сравнения – 297 ± 67 в 1 мкл; $p = 0,00001$). Число объектов, поглощенных лейкоцитами пациентов, в 9 раз выше, чем аналогичное число для лейкоцитов практически здоровых доноров (16592 ± 2666 и 1803 ± 363 соответственно; $p = 0,00002$).

Указанные изменения фагоцитарной активности лейкоцитов обусловлены стимуляцией как нейтрофильных гранулоцитов, так и моноцитов (табл. 2). При этом при флегме лица существенно увеличивается удельный вклад моноцитов в фагоцитарную

Таблица 1

Показатели фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови пациентов с флегмоной лица

| Показатель | Группа пациентов | Группа доноров | <i>p</i> |
|-----------------------------------|------------------|----------------|----------|
| Процент фагоцитирующих лейкоцитов | 64,3 ± 5,4 | 36,1 ± 4,4 | 0,001 |
| Фагоцитарный индекс лейкоцитов | 2,22 ± 0,20 | 1,38 ± 0,07 | 0,0001 |
| Фагоцитарное число лейкоцитов | 1,49 ± 0,24 | 0,53 ± 0,09 | 0,0001 |

Таблица 2

Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови пациентов с флегмоной лица

| Показатель | Группа пациентов | Группа доноров | <i>p</i> |
|--|------------------|----------------|----------|
| Процент фагоцитирующих нейтрофилов, % | 69,7 ± 7,4 | 37,3 ± 4,8 | 0,001 |
| Число активно фагоцитирующих нейтрофилов в 1 мкл | 3091 ± 647 | 217 ± 48 | 0,0003 |
| Процент фагоцитирующих моноцитов, % | 56,8 ± 4,8 | 35,6 ± 4,2 | 0,008 |
| Число активно фагоцитирующих моноцитов в 1 мкл | 2270 ± 482 | 136 ± 26 | 0,0002 |

активность – до 28,4 ± 6,0 % (у здоровых доноров – 10,2 ± 1,2 %; *p* = 0,005).

Однако после миграции в зону патологического процесса лейкоциты теряли свою фагоцитарную активность. Так, среди лейкоцитов, выделенных из экссудата, число фагоцитирующих клеток было 35,0 ± 8,3 % (для лейкоцитов периферической крови тех же пациентов – 64,3 ± 5,4 %; *p* = 0,024). Число активно фагоцитирующих лейкоцитов в экс-

судате – 15,0 ± 4,9, а в крови – 39,7 ± 6,7 % (*p* = 0,049). Тем не менее число объектов, приходящееся на один «истинный» фагоцит, существенно не различалось в экссудате и крови (1,68 ± 0,31 и 2,22 ± 0,20 соответственно; *p* = 0,178). Изменения фагоцитарной активности лейкоцитов экссудата затрагивали как нейтрофилы, так и моноциты.

Известно, что триггерами для активации поглотительной активности лейкоцитов могут быть разные факторы, среди которых относительно мощными являются компоненты бактериальных клеток и/или продукты их жизнедеятельности [9]. Ранее нами было показано, что при флегмоне лица практически во всех случаях действие такого фактора наиболее выражено [1, 2]. Кроме этого, при флегмоне лица наблюдается эндогенная интоксикация [3], обусловленная разрушающимися тканями, что служит активатором для моноцитов [10]. Именно поэтому у пациентов с флегмоной лица удельный вклад моноцитов в общую фагоцитарную активность лейкоцитов увеличивается. Известно, что микроорганизмы обладают широким набором факторов деструкции тканей человека. Так, только представители рода *Staphylococcus* секретируют гемолизины, липазы, протеазы, гиалуронидазу, нуклеазы и коллагеназу, которые обеспечивают инвазию бактерий в ткани человека [11, 12].

После миграции лейкоцитов в очаг воспаления наблюдается снижение их поглотительной активности, что, вероятно, связано с усилением метаболической функции и проявляется в усилении синтеза токсичных продуктов кислорода и других антимикробных факторов [13, 14]. С другой стороны, в очаге воспаления фагоцитирующие клетки испытывают коллосальный прессинг со стороны микрофлоры [15]. Так, протеазы микроорганизмов, в первую очередь грамтрицательных, успешно инактивируют опсоническую функцию белков системы комплемента и иммуноглобулинов [16]. Наличие капсулы, со-

держатель в большом количестве гиалуроновую кислоту, существенно снижает поглощение микроорганизмов [17]. Значимо угнетает фагоцитарную активность цитотоксины бактерий, как, например, стрептолизин [18].

Выводы

У пациентов с флегмоной лица наблюдается активация поглотительной активности лейкоцитов периферической крови с увеличением доли фагоцитирующих моноцитов, что может быть отражением степени деструкции тканей пациента. После миграции в очаг воспаления поглотительная активность лейкоцитов существенно снижается в силу переключения на синтез токсичных антимикробных продуктов или из-за ингибирующего влияния со стороны микроорганизмов. В такой ситуации необходим подбор эффективной иммуотропной терапии.

Библиографический список

1. Боев И.А., Годовалов А.П. Изучение этиологической структуры возбудителей при флегмоне лица. *Бактериология* 2017; 2 (3): 50–51.
2. Боев И.А., Штраубе Г.И., Антаков Г.И., Годовалов А.П. Некоторые эпидемиологические и микробиологические аспекты заболеваемости флегмонами лица в Пермском крае. *Инфекция и иммунитет* 2017; S: 905.
3. Боев И.А., Штраубе Г.И., Антаков Г.И., Годовалов А.П. Эндогенная интоксикация у пациентов с флегмонами лица. *Клиническая стоматология* 2018; 1 (85): 54–57.
4. Щенин А.В. Особенности показателей иммунитета полости рта у пациентов с флегмонами челюстно-лицевой области на фоне инсулиннезависимого сахарного диабета. *Человек и его здоровье* 2021; 24 (1): 10–18.
5. Blasi F., Tarsia P., Aliberti S. Strategic targets of essential host-pathogen interactions. *Respiration* 2005; 72 (1): 9–25.
6. Platt N., Fineran P. Measuring the phagocytic activity of cells. *Methods. Cell Biol.* 2015; 126: 287–304.
7. Шилов Ю.И., Шилов С.Ю., Жукова А.Е., Барков С.Ю., Петухова А.А. Изменение уровня ацидификации фагосом у крыс в зависимости от фазы эстрального цикла. *Российский иммунологический журнал* 2016; 10 (2): 183.
8. Shilov J.I., Orlova E.G. Role of adrenergic mechanisms in regulation of phagocytic cell functions in acute stress response. *Immunol. Lett.* 2003; 86 (3): 229–33.
9. Sansonetti P. Phagocytosis of bacterial pathogens: implications in the host response. *Semin. Immunol.* 2001; 13 (6): 381–90.
10. Jentho E., Weis S. DAMPs and Innate Immune Training. *Front Immunol* 2021; 12: 699563.
11. Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13 (1): 16–34.
12. Otto M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin. Immunopathol.* 2012; 34 (2): 201–14.
13. Kaufmann S.H.E., Dorhoi A. Molecular Determinants in Phagocyte-Bacteria Interactions. *Immunity* 2016; 44 (3): 476–491.
14. Hipolito V.E.B., Ospina-Escobar E., Botelho R.J. Lysosome remodelling and adaptation during phagocyte activation. *Cell. Microbiol.* 2018; 20 (4): 1–8.
15. Ernst J.D. Bacterial inhibition of phagocytosis. *Cell. Microbiol.* 2000; 2 (5): 379–86.
16. Abreu A.G, Barbosa A.S. How *Escherichia coli* Circumvent Complement-Mediated Killing. *Front. Immunol.* 2017; 8: 452.
17. Kwinn L.A., Nizet V. How group A *Streptococcus* circumvents host phagocyte defenses. *Future Microbiol.* 2007; 2 (1): 75–84.
18. Miyoshi-Akiyama T., Takamatsu D., Koyanagi M., Zhao J., Imanishi K., Uchiyama T. Cytocidal effect of *Streptococcus pyogenes* on mouse neutrophils in vivo and the critical role of streptolysin S. *J. Infect. Dis.* 2005; 192 (1): 107–116.

REFERENCES

1. Boev I.A., Godovalov A.P. Study of the etiological structure of pathogens with facial phlegmon. *Bakteriologija* 2017; 2 (3): 50–51 (in Russian).
2. Boev I.A., Shtraube G.I., Antakov G.I., Godovalov A.P. Some epidemiological and microbiological aspects of the incidence of facial phlegmon in the Perm region. *Infekcija i immunitet* 2017; 5: 905 (in Russian).
3. Boev I.A., Shtraube G.I., Antakov G.I., Godovalov A.P. Endogenous intoxication in patients with facial phlegmon. *Klinicheskaja stomatologija* 2018; 1 (85): 54–57 (in Russian).
4. Shbenin A.V. Features of oral immunity indices in patients with phlegmons of the maxillofacial region against the background of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Chelovek i ego zdorov'e* 2021; 24 (1): 10–18 (in Russian).
5. Blasi F., Tarsia P., Aliberti S. Strategic targets of essential host-pathogen interactions. *Respiration* 2005; 72 (1): 9–25.
6. Platt N., Fineran P. Measuring the phagocytic activity of cells. *Methods. Cell. Biol.* 2015; 126: 287–304.
7. Shilov Ju.I., Shilov S.Ju., Zhukova A.E., Barkov S.Ju., Petubova A.A. Changes in the level of acidification of phagosomes in rats depending on the phase of the estrous cycle. *Rossijskij immunologicheskij zhurnal* 2016; 10 (2): 183 (in Russian).
8. Shilov J.I., Orlova E.G. Role of adrenergic mechanisms in regulation of phagocytic cell functions in acute stress response. *Immunol. Lett.* 2003; 86 (3): 229–33.
9. Sansonetti P. Phagocytosis of bacterial pathogens: implications in the host response. *Semin. Immunol.* 2001; 13 (6): 381–90.
10. Jentho E., Weis S. DAMPs and Innate Immune Training. *Front. Immunol.* 2021; 12: 699563.
11. Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13 (1): 16–34.
12. Otto M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin. Immunopathol.* 2012; 34 (2): 201–14.
13. Kaufmann S.H.E., Dorhoi A. Molecular Determinants in Phagocyte-Bacteria Interactions. *Immunity.* 2016; 44 (3): 476–491.
14. Hipolito V.E.B., Ospina-Escobar E., Botelho R.J. Lysosome remodelling and adaptation during phagocyte activation. *Cell. Microbiol.* 2018; 20 (4): 1–8.
15. Ernst J.D. Bacterial inhibition of phagocytosis. *Cell. Microbiol.* 2000; 2 (5): 379–86.
16. Abreu A.G., Barbosa A.S. How *Escherichia coli* Circumvent Complement-Mediated Killing. *Front. Immunol.* 2017; 8: 452.
17. Kwinn L.A., Nizet V. How group A *Streptococcus* circumvents host phagocyte defenses. *Future Microbiol.* 2007; 2 (1): 75–84.
18. Miyoshi-Akiyama T., Takamatsu D., Koyanagi M., Zhao J., Imanishi K., Uchiyama T. Cytocidal effect of *Streptococcus pyogenes* on mouse neutrophils in vivo and the critical role of streptolysin S. *J. Infect. Dis.* 2005; 192 (1): 107–116.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 26.11.2021

Одобрена: 28.12.2021

Принята к публикации: 18.03.2022

Просьба ссылаться на эту статью в русскоязычных источниках следующим образом: Годовалов, А.П. Анализ фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови и экссудата у пациентов с флегмоной лица / А.П. Годовалов, Г.И. Штраубе, И.А. Боев // Пермский медицинский журнал. – 2022. – Т. 39, № 2. – С. 55–60. DOI: 10.17816/pmj39255-60

Please cite this article in English as: Godovalov A.P., Shtraube G.I., Boev I.A. Analysis of phagocytic activity of peripheral blood and exudate leukocytes in patients with facial phlegmon. *Perm Medical Journal*, 2022, vol. 39, no. 2, pp. 55-60. DOI: 10.17816/pmj39255-60