

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов

НЕЙТРОФИЛЫ КАК ИСТОЧНИК ФАКТОРОВ, УВЕЛИЧИВАЮЩИХ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

Е.В. Михальчик^{1}, Д.И. Максимов¹, Е.М. Островский¹, А.В. Яскевич¹, И.И. Власова¹, Т.В. Вахрушева¹, Л.Ю. Басырева¹, А.А. Гусев¹, В.А. Костевич^{1,2}, Н.П. Горбунов^{1,3}, А.В. Соколов^{1,2}, О.М. Панасенко¹, С.А. Гусев¹*

¹Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а; *эл. почта: lemik2007@yandex.ru

²Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург

³Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, 197110, Санкт-Петербург

Окислительный стресс и активацию нейтрофилов, ведущую к повышению содержания в крови миелопероксидазы (МПО), эластазы и нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), относят к патогенетическим механизмам повреждения конечностей при сахарном диабете 2-го типа (СД2). Целью исследования был анализ связи между факторами, характеризующими активацию нейтрофилов, и длительностью начальной фазы заживления раны (фазы воспаления) у больных СД2. Ретроспективно пациенты были разделены на три группы в зависимости от тяжести поражения нижних конечностей: группа 1 (рана на пальце) < группа 2 (рана на стопе) < группа 3 (рана на голени). По сравнению с контрольной группой (здоровые добровольцы) у пациентов при поступлении на лечение были достоверно ($p < 0,05$) повышены уровень глюкозы и гликированного гемоглобина (группы 1-3), СОЭ (группы 1 и 3), содержание нейтрофилов в крови (группы 2 и 3), концентрация МПО в плазме крови (группы 1-3) и концентрация НВЛ в крови (группа 3), а также снижено содержание тиолов плазмы (группы 1-3) и активность глутатионпероксидазы эритроцитов (группы 2 и 3). Продолжительность пребывания в стационаре после операции соответствовала длительности фазы воспаления раневого процесса и коррелировала с содержанием нейтрофилов в крови пациентов до начала лечения ($r = 0,72$, $p < 0,05$). Лейкоцитарный индекс интоксикации зависел от площади раны ($r = 0,59$, $p < 0,05$) и в группах 2 и 3 был достоверно выше, чем в контроле и в группе 1. Выявленная корреляция обусловлена ростом содержания внеклеточной МПО и НВЛ в результате активации и дегрануляции нейтрофилов и нетоза. Таким образом, длительность фазы воспаления при заживлении раны связана с особенностями системного воспаления, ведущего к усилению окислительного/галогенирующего стресса и эндогенной интоксикации.

Ключевые слова: сахарный диабет; диабетическая стопа; миелопероксидаза; нейтрофилы; нейтрофильные внеклеточные ловушки; окислительный/галогенирующий стресс

DOI: 10.18097/PBMC20186405433

ВВЕДЕНИЕ

Синдром диабетической стопы – одно из частых осложнений при сахарном диабете [1], сопровождающееся ростом содержания в крови лейкоцитов [2, 3]. Повышенное образование активных форм кислорода и галогенов нейтрофилами в условиях гликемии [4, 5] на фоне снижения активности антиоксидантных ферментов [6, 7] ведёт к развитию окислительного/галогенирующего стресса [8] и к росту содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). В крови обнаруживается повышенное содержание молекул средней массы [6] и возрастает лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) [2, 9, 10]. Экзоцитоз миелопероксидазы (МПО) и гибель нейтрофилов с образованием нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) создают риск повреждения эндотелия сосудов и нарушения микроциркуляции, что ведет к ухудшению заживления раны [12, 13] и провоцирует усиление местного и системного воспаления.

Логично предположить, что адекватная оценка эндогенной интоксикации и связанных с активацией нейтрофилов показателей (содержание МПО и НВЛ,

маркеров окислительного/галогенирующего стресса) позволит ещё при поступлении прогнозировать длительность пребывания пациентов в стационаре и с учётом масштабов повреждения совершенствовать выбор назначаемых препаратов.

В связи с этим целью исследования был анализ связи между факторами, связанными с активацией нейтрофилов, и продолжительностью фазы воспаления раневого процесса у больных сахарным диабетом 2-го типа (СД2) с повреждениями нижних конечностей разной тяжести.

МЕТОДИКА

В исследовании приняли участие пациенты с диагнозом СД2, проходившие лечение по поводу поражения нижних конечностей в Центре гнойной хирургии и регенераторных технологий клинической больницы № 123 Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины (ФНКЦ ФХМ). Критериями включения в исследование были повышенное содержание глюкозы и гликированного гемоглобина в крови, а также некротические и/или гнойные поражения нижних конечностей в масштабах

* - адресат для переписки

пальца (группа 1), стопы (группа 2) или стопы и голени (группа 3). От всех обследованных получено информированное согласие на участие в исследовании и на забор крови для анализов. Исследование одобрено локальным этическим комитетом. Средний возраст пациентов составил 58±4 лет. Доля женщин во всех группах была 40-50%. Контролем служила группа здоровых добровольцев (n=15), сформированная в соответствии с полом и возрастом пациентов.

Материалом для исследования служили образцы крови, которые забирали утром натощак путём венопункции в вакуумные контейнеры с цитратом натрия. В клинической лаборатории проводили общий анализ крови, а также определяли уровень гликированного гемоглобина и уровень глюкозы. На основе общего анализа крови рассчитывали лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) [11]: $ЛИИ = (ПК + Миел. + Ю. + П. + С.) / (Лимф. + Мон. + Э. + Б.)$, где: ПК – плазматические клетки, Миел. – миелоциты, Ю. – юные, П. – палочкоядерные, С. – сегментоядерные нейтрофилы, Лимф. – лимфоциты, Мон. – моноциты, Э. – эозинофилы, Б. – базофилы.

Сразу после взятия крови готовили стандартизированные мазки. Плазму крови отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 400 g, осадок эритроцитов промывали 0,9%-ным раствором NaCl. Плазму и эритроциты замораживали и до проведения измерений хранили при -80°C. Мазки фиксировали и окрашивали по Маю-Грюнвальду и Романовскому-Гимзе; подсчёт НВЛ в мазках проводили, используя микроскоп Motic B3 ("Motic Asisa", Гонконг) [14]. На основе полученных данных рассчитывали количество НВЛ в 1 мл крови. Содержание тиолов в плазме крови оценивали методом Элмана [15] и нормировали на количество белка, для чего определяли белок плазмы биуретовым методом, используя набор реагентов "Общий белок Агат" (ООО "Агат-Мед", Россия). Содержание МПО в плазме крови оценивали методом ИФА [16]. Активность глутатионпероксидазы (ГП) в лизатах эритроцитов измеряли спектрофотометрически и нормировали на содержание гемоглобина [17].

Результаты представлены как среднее арифметическое с указанием величины стандартного отклонения. Достоверность различий оценивали с помощью пакета программ STATISTICA, используя t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна Уитни.

Таблица 1. Показатели крови пациентов (группы 1-3) до начала хирургического лечения и у здоровых добровольцев (контроль)

Показатели	Пациенты			Контроль
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	
Глюкоза, мМ	9±3*	15±11*	13±5*	6±1
Гликированный гемоглобин, %	9±4*	9±1*	8±2*	6±1
Нейтрофилы, млн/мл	5,0±1,9	6,1±2,7*	9,8±6,1*	3,5±0,9
ЛИИ	1,5±0,4	2,8±1,2*,**	3,5±1,5*,**	1,4±0,4
СОЭ, мм/час	64±20*	54±30	76±14*	32±19
Тиолы в плазме, мкмоль/г белка	4,4±1,3*	3,5±1,1*	3,7±0,9*	5,6±0,8
Активность ГП эритроцитов, Ед/мг гемоглобина	59±16	46±18*	46±12*	68±15

Примечание: * - p<0,05 по Стьюденту относительно здоровых добровольцев; ** - p<0,05 относительно группы 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно шкале Вагнера, степень некротического и гнойно-некротического поражения конечностей у обследованных пациентов с синдромом диабетической стопы соответствовала III-IV стадии и требовала хирургического лечения. В нашем исследовании пациенты были распределены по группам в зависимости от локализации поражения. В группу 1 (n=6) были включены пациенты с повреждением пальца (сухой некроз, сухая гангрена): площадь поражения 1,5–10 см² (медиана 1,5 см²). Группу 2 (n=13) составили больные с раной на стопе: площадь поражения 3–140 см² (медиана 20 см²). В группе 3 (n=10) были пациенты с раной или флегмоной голени (и стопы) или ранами обеих стоп: площадь поражения 15–300 см² (медиана 130 см²). У 30% пациентов была выявлена нейропатическая форма синдрома диабетической стопы.

В таблице 1 приведены показатели крови пациентов при поступлении в стационар (до начала хирургического лечения). У всех больных было повышено содержание глюкозы и гликированного гемоглобина. О развитии воспаления свидетельствовали высокие значения СОЭ. В группах 2 и 3 содержание нейтрофилов в крови было достоверно выше, чем у здоровых добровольцев, при этом число пациентов, у которых абсолютное содержание нейтрофилов превышало норму, составляло 22% в группе 2 и 72% в группе 3. У всех пациентов выявлялась раневая инфекция.

О длительности фазы воспаления раневого процесса можно было судить по продолжительности пребывания пациентов в стационаре. К моменту выписки у пациентов регистрировали очищение раны, формирование грануляционной ткани; при заживлении первичным натяжением – краевую эпителизацию. У двух пациентов проводилась дермопластика расщеплённым лоскутом. Наиболее частым осложнением был краевой некроз, требующий этапной некрэктомии. Сопоставление количества дней, проведённых пациентами в стационаре, с содержанием нейтрофилов в крови пациентов до начала хирургического лечения выявило прямую зависимость между этими показателями (рис. 1).

На развитие эндогенной интоксикации у пациентов указывал рост ЛИИ, который отражает изменение баланса между разными типами лейкоцитов в крови.

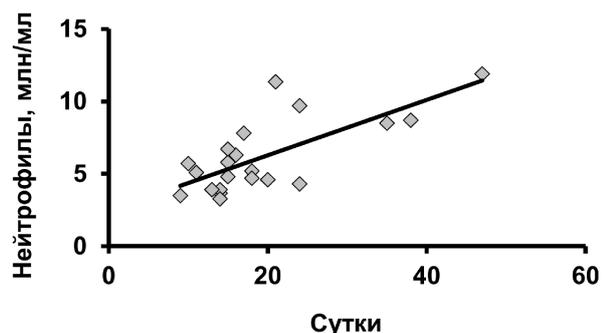


Рисунок 1. Корреляция между содержанием нейтрофилов в крови пациентов до начала хирургического лечения и количеством дней, проведенных в стационаре ($r=0,72$; $p<0,05$).

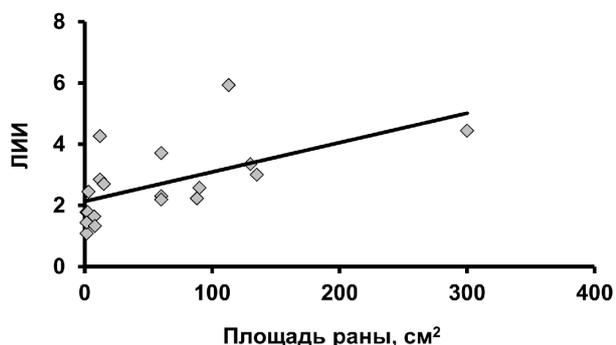


Рисунок 2. Зависимость между площадью раны и ЛИИ до начала хирургического лечения ($r=0,59$; $p<0,05$).

Значения ЛИИ в группах 2 и 3 достоверно отличались от значений в группе 1 и у здоровых добровольцев (табл. 1). При сопоставлении величины ЛИИ и площади раны до начала хирургического лечения была обнаружена прямая зависимость между этими параметрами (рис. 2). При выписке достоверное снижение ЛИИ отмечалось только в группе 3, где его величина уменьшилась почти в 2 раза (до $2,0\pm 0,4$). По-видимому, именно гнойно-некротическая рана являлась основным источником эндогенной интоксикации.

Содержание МПО в плазме образцов крови во всех группах пациентов было достоверно выше, чем у здоровых добровольцев ($p<0,05$), а содержание МПО для группы 3 было выше, чем для группы 2 (рис. 3).

Морфологический анализ мазков крови выявил повышенное содержание НВЛ в группе 3 по сравнению с контролем и группой 1 (рис. 4).

Одним из главных механизмов повреждения клеточных мембран и тканевой деструкции в условиях острого воспаления при диабете считают ПОЛ [10]. НОС1, образуемая в катализируемой МПО реакции окисления ионов хлора, является предшественником свободных радикалов [8], инициирующих ПОЛ, и вызывает снижение активности антиоксидантных ферментов, в том числе ГП эритроцитов. Ранее было показано, что снижение активности ГП и каталазы в крови пациентов с СД2

не является прямым следствием повышенного содержания глюкозы [19]. Как видно из таблицы 1, в группах 2 и 3 активность ГП была достоверно ниже, чем у здоровых добровольцев. Учитывая этот факт, можно предположить, что вероятной причиной снижения активности ГП является диффузия в эритроциты НОС1, которая способна быстро инактивировать ГП [17]. Данное предположение подтверждается обнаруженной нами отрицательной зависимостью между активностью ГП эритроцитов и содержанием МПО в плазме крови пациентов группы 3 (рис. 5).

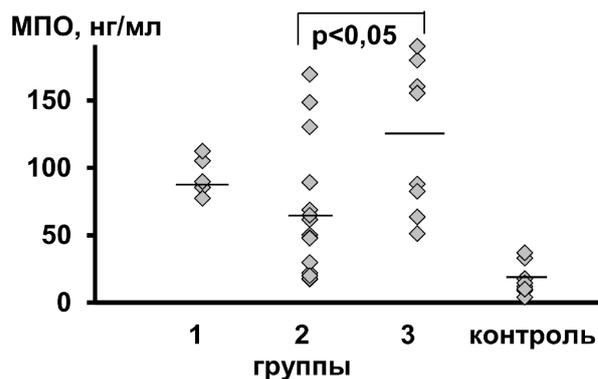


Рисунок 3. Содержание МПО в плазме крови пациентов (группы 1-3) и здоровых добровольцев (контроль). На рисунке отмечены медианы. Достоверность различий рассчитана с использованием U-критерия Манна-Уитни.

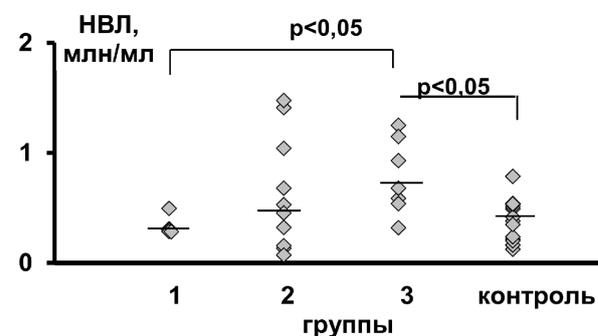


Рисунок 4. Содержание НВЛ в крови пациентов (группы 1-3) и здоровых добровольцев (контроль). На рисунке отмечены медианы. Достоверность различий рассчитана с использованием U-критерия Манна-Уитни.

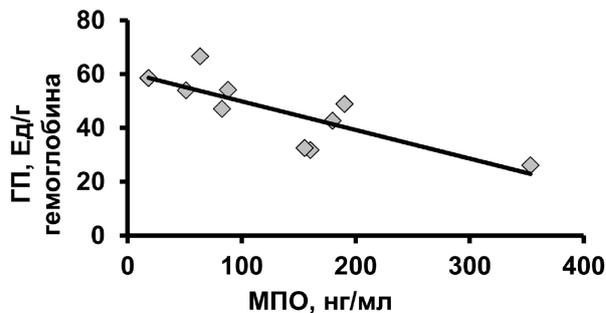


Рисунок 5. Корреляция между активностью ГП в эритроцитах и содержанием МПО в плазме крови пациентов группы 3 ($r=-0,8$; $p<0,05$).

РОЛЬ НЕЙТРОФИЛОВ В ЗАЖИВЛЕНИИ РАН ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Согласно полученным данным, поражение нижних конечностей при синдроме диабетической стопы может вызывать системную воспалительную реакцию, выражающуюся в увеличении содержания нейтрофилов в крови и СОЭ (табл. 1). Ранее было показано, что нейтрофилы и моноциты периферической крови при СД2 продуцируют большее количество НОС1 по сравнению с лейкоцитами здоровых добровольцев [20], а нейтрофилы у пациентов с СД2 обладают большей предрасположенностью к нетозу [13]. Нетоз – это особый вид гибели нейтрофилов, характеризующийся образованием внеклеточных ловушек на основе хроматина и гистонов в комплексе с эластазой и МПО [21].

В нашем исследовании у пациентов с синдромом диабетической стопы было снижено содержание тиолов в плазме крови, а при поражении участка стопы или голени ГП эритроцитов была менее активна, чем у здоровых добровольцев, что указывает на развитие окислительного/галогенирующего стресса. Содержание внеклеточной МПО было повышено у пациентов во всех трех группах (рис. 3), что создаёт угрозу поражения эндотелия сосудов [22]. Кроме того, часть МПО может быть локализована на НВЛ, повышенное содержание которых обнаруживалось у некоторых пациентов с ранами стопы и у пациентов с ранами голени. Накопление в организме продуктов повреждения биомолекул подтверждалось ростом показателя эндогенной интоксикации ЛИИ у пациентов в группах 2 и 3.

Процесс заживления раны характеризуется тремя фазами, перекрывающимися во времени: воспаление, пролиферация, ремоделирование. Длительность пребывания пациентов в стационаре в основном определялась продолжительностью фазы воспаления до начального этапа пролиферации. Фаза воспаления протекает при активном участии нейтрофилов, играющих ключевую роль в защите организма от инфекции. Однако было показано, что нейтрофилы больных сахарным диабетом отличаются сниженной способностью к хемотаксису, очищению раны и к продукции цитокинов и факторов роста, необходимых для нормального заживления раны, что уменьшает эффективность местной воспалительной реакции, в частности при ожогах [23]. В то же время, инфльтрация ткани раны нейтрофилами несёт в себе опасность повреждений за счёт активных форм кислорода и галогенов, вызывающих развитие

окислительного/галогенирующего стресса [8], а также за счёт действия эластазы [13, 24]. Повреждению эндотелия сосудов и ухудшению заживления ран может способствовать образование НВЛ [12, 13], содержащих МПО и эластазу и провоцирующих микрососудистое воспаление, например, при атеросклерозе [25]. Таким образом, при синдроме диабетической стопы рост абсолютного количества нейтрофилов сопровождается развитием окислительного/галогенирующего стресса, опосредуемого активацией и дегрануляцией нейтрофилов и нетозом. В нашем исследовании у пациентов группы 3 и некоторых пациентов группы 2 эти изменения носили системный характер и, по-видимому, приводили к увеличению продолжительности фазы воспаления раневого процесса, провоцируя дальнейшую эскалацию системного воспаления. Сочетанное действие факторов, связанных с изменением функциональной активности нейтрофилов, объясняет выявленную нами прямую зависимость продолжительности пребывания пациентов в стационаре от содержания нейтрофилов в их крови.

Полученные результаты показали, что при поражении стопы и голени ЛИИ повышается на 50% и более по сравнению с нормой, что соответствует среднетяжелой и тяжелой степени эндогенной интоксикации [9]. Даже при значительной неоднородности пациентов по характеру и масштабам поражения конечностей выявляется прямая зависимость между ЛИИ и площадью поражения нижних конечностей.

Суммируя полученные результаты, мы видим (табл. 2), что по мере увеличения масштаба некротических и/или гнойных поражений нижних конечностей в ряду палец - участок стопы - участок голени всё большее число показателей отклоняется от контроля, что подтверждает их роль в развитии синдрома диабетической стопы при СД2. Особо следует отметить статистически достоверное повышение содержания НВЛ в крови пациентов с поражением стопы и голени или обеих стоп (группа 3).

Полученные результаты поднимают вопрос о необходимости проведения аналогичного исследования у пациентов с синдромом диабетической стопы в зависимости от формы и степени повреждения стопы до развития гнойно-некротических поражений с целью снизить риск ампутаций.

Таблица 2. Отклонения от нормы показателей, измеренных в крови пациентов с поражениями в масштабах пальца (группа 1), стопы (группа 2) и голени (группа 3)

Показатели	Группа 1	Группа 2	Группа 3
Нейтрофилы в крови		↑	↑
МПО в плазме	↑	↑	↑
НВЛ в крови			↑
Тиолы в плазме	↓	↓	↓
ГП в эритроцитах		↓	↓
ЛИИ		↑	↑
Гликированный гемоглобин	↑	↑	↑

Примечание: ↑ показатель выше, чем в контроле ($p < 0,05$); ↓ показатель ниже, чем в контроле ($p < 0,05$).

В последнее время метаболические изменения при диабете сравнивают с изменениями, характерными для критических состояний (гипергликемия, нечувствительность тканей к инсулину, отрицательный баланс азота), поэтому травмы (ожоги) на фоне диабета могут выступать в качестве “второго удара”, вызывающего более тяжёлые последствия, чем в отсутствие диабета [23]. В связи с этим необходим поиск новых и/или ревизия известных терапевтических средств для выявления препаратов, способных регулировать нетоз, секрецию МПО нейтрофилами и её активность. В качестве примера можно привести препарат метформин, который широко используется для коррекции гликемии и, как было показано недавно, снижает содержание НВЛ в крови пациентов с диабетом [26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У больных СД2 с повреждениями нижних конечностей содержание нейтрофилов в крови до начала хирургического лечения коррелировало с продолжительностью их пребывания в стационаре, то есть с длительностью первой фазы заживления раны (воспаления). Выявленная корреляция обусловлена ростом содержания внеклеточной МПО и НВЛ в результате активации и дегрануляции нейтрофилов и нетоза. Таким образом, длительность фазы воспаления в заживлении раны связана с особенностями системного воспаления, ведущего к усилению окислительного/галогенирующего стресса и эндогенной интоксикации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Федерального медико-биологического агентства России в рамках государственного заказа, шифр темы “Воспаление”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dalla Paola L., Carone A., Vasilache L., Pattavina M. (2015) *Europ. Heart J., Suppl.* **17** (Suppl A), A64-A68. DOI:10.1093/eurheartj/suv023.
2. Гириш А.О., Долгих В.Т., Лукач В.Н., Мороз В.В., Мальков О.А. (2005) *Общая реаниматология*, **1**(6), 44-48.
3. Teuvov A.A., Baziev A.M., Lovpache Z.N., Teunikova I.S., Chupodal S.M. (2017) *Biomed. Pharmacol. J.*, **10**(4), 1871-1878. DOI: 10.13005/bpj/1306.
4. Ceriello A. (2006) *Endocr. Pract.*, **12** (Suppl1), 60-62.
5. Acharya S.S., Padhy R.K., Rattan R. (2012) *J. Evol. Med. Dental Sci.*, **1**(5), 793-800.
6. Павелкин А.Г., Беляев А.Н. (2013) *Вестник новых мед. технол.*, **20**(3), 26-32.
7. Ullah A., Khan A., Khan I. (2016) *Saudi Pharmaceutical J.*, **24**, 547-553.
8. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. (2013) *Успехи биологической химии*, **53**, 195-244.
9. Тукин В.Н. (2007) *Успехи современного естествознания*, **12**(1), 62-63.
10. Ковальчук Л.В., Потемкин В.В., Балдина Т.Н., Барбин П.Б. (2011) *Вестник эксп. клин. хирург.*, **4**(1), 85-89.
11. Островский В.К., Свитич Ю.Н. (1983) *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*, **131**(11), 21-24.
12. Wong S.L., Demers M., Martinod K., Gallant M., Yanming W., Goldfine A.B., Kahn C.R., Wagner D.D. (2015) *Nat. Med.*, **21**(7), 815-819. DOI: 10.1038/nm.3887.
13. Fadini G.P., Menegazzo L., Rigato M., Scattoloini V., Poncina N., Bruttocao A., Ciciliot S., Mammano F., Ciubotaru C.D., Brocco E., Marescotti M.C., Cappellari R., Arrigoni G., Million R., Vigili de Kreutzenberg S., Albiero M., Avogaro A. (2016) *Diabetes*, **65**(4), 1061-1071. DOI: 10.2337/db15-0863.
14. Basyreva L., Brodsky I., Gusev A., Zhapparova O., Mikhailchik E., Gusev S., Shor D., Dahan S., Blank M., Shoenfeld Y. (2015/2016) *Human Antibodies*, **24**(3-4), 39-44. DOI: 10.3233/HAB-160293.
15. Hu M.-L. (1994) *Methods Enzymol.*, **233**, 380-385.
16. Горудко И.В., Черкалина О.С., Соколов А.В., Пулина М.О., Захарова Е.Т., Васильев В.Б., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М. (2009) *Биоорганическая химия*, **35**(5), 629-639.
17. Гаприлова А.Н., Хмара Н.Ф. (1986) *Лабораторное дело*, №12, 721-724.
18. Aruoma O.I., Halliwell B. (1987) *Biochem. J.*, **248**, 973-976.
19. Jandrić-Balen M., Božikov V., Božikov J., Metelko Ž., Jandrić I., Romić Ž. (2005) *Diabetologia Croatica*, **33**(4), 131-135.
20. Ghosal K., Das S., Aich K., Goswami S., Chowdhury S., Bhattacharyya M. (2016) *Clin. Chim. Acta*, **458**, 144-153. DOI: 10.1016/j.cca.2016.05.006.
21. Jorch S.K., Kubes P. (2017) *Nature Medicine*, **23**(3), 279-287. DOI: 10.1038/nm.4294.
22. Vita J.A., Brennan M.-L., Gocke N., Mann S.A., Goormastic M., Shishebor M.H., Penn M.S., Keaney J.F., Hazen S.L. (2004) *Circulation*, **110**, 1134-1139.
23. Goutos I., Nicholas R.S., Pandya A.A., Ghosh S.J. (2015) *Int. J. Burn Trauma*, **5**(1), 1-12.
24. Wlaschek M., Scharffetter-Kochanek K. (2005) *Wound. Repair Regen.*, **13**(5), 452-461. DOI: 10.1111/j.1067-1927.2005.00065.x.
25. Berezin A. (2016) *Biomed. Res. Ther.*, **3**(5), 618-624. DOI:10.7603/s40730-016-0021-9.
26. Menegazzo L., Scattoloini V., Cappellari R., Bonora B.M., Albiero M., Bortolozzi M., Romanato F., Ceolotto G., Vigili de Kreutzenberg S., Avogaro A., Fadini G.P. (2018) *Acta Diabetologica*, DOI: 10.1007/s00592-018-1129-8.

Поступила: 08. 05. 2018.
Принята к печати: 26. 06. 2018.

NEUTROPHILS AS A SOURCE OF FACTORS THAT INCREASE THE LENGTH
OF THE INFLAMMATORY PHASE OF WOUND HEALING
IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

E.V. Mikhailchik^{1}, D.I. Maximov¹, E.M. Ostrovsky¹, A.V. Yaskevich¹, I.I. Vlasova¹, T.V. Vakhrusheva¹,
L.Yu. Basyreva¹, A.A. Gusev¹, V.A. Kostevich^{1,2}, N.P. Gorbunov^{2,3}, A.V. Sokolov^{1,2}, O.M. Panasenko¹, S.A. Gusev¹*

¹Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,
1a Malaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435 Russia; *e-mail: lemik2007@yandex.ru

²Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, 197376 Russia

³State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint-Petersburg, 197110 Russia

Oxidative stress and neutrophil activation leading to an increase in myeloperoxidase (MPO), elastase and neutrophil extracellular trap (NET) levels in blood are considered as pathogenic mechanisms responsible for the development of extremity damage in people with type 2 diabetes mellitus (T2DM). The aim of this study was to analyze the relationship between factors, associated with neutrophil activation, and the length of the initial phase of wound healing (the inflammatory phase) in T2DM patients. Patients were divided retrospectively into three groups depending on the damage extent: group 1 (wound on toe) < group 2 (wound on foot) < group 3 (wound on lower leg). Compared to the control group (healthy volunteers), T2DM patients at admission to hospital had significantly ($p < 0.05$) increased levels of blood glucose and glycated hemoglobin (groups 1-3), ESR (groups 1 and 3), blood neutrophil count (groups 2 and 3), plasma MPO concentration (groups 1-3) and blood NET concentration (group 3) and decreased levels of plasma thiols (groups 1-3) and erythrocyte glutathione peroxidase activity (groups 2 and 3). The length of hospital stay after surgical procedures corresponded to the length of the inflammatory phase of the wound healing process and correlated with the number of blood neutrophils in patients before surgery ($r = 0.72$, $p < 0.05$). Leukocytic intoxication index depended on wound area ($r = 0.59$, $p < 0.05$), and it was significantly higher for groups 2 and 3 compared to the control group and group 1. The neutrophil count before surgery in T2DM patients with damage in the lower extremities correlated with the length of the inflammatory phase of wound healing. The correlation found can be attributed to an increase in extracellular MPO and NETs, which, in its turn, results from the activation and degranulation of neutrophils and netosis. Thus, the duration of the inflammatory phase of wound healing depends on specific aspects of systemic inflammation increasing oxidative/halogenative stress and intoxication.

Key words: diabetes mellitus; diabetic foot; myeloperoxidase; blood neutrophils; neutrophil extracellular traps; oxidative/halogenative stress