

УДК 616.24-007.271-036.12+616.155.3/.34-008.13+579.861.2:622-051

Николенко О. Ю., Майлян Э. А., Костецкая Н. И., Лыгина Ю. А.

ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «ДОНЕЦКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М. ГОРЬКОГО»

ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ У ГОРНОРАБОЧИХ УГОЛЬНЫХ ШАХТ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НОСИТЕЛЬСТВА STAPHYLOCOCCUS AUREUS

РЕФЕРАТ. Цель работы: исследовать ассоциации между наличием инфекции *Staphylococcus aureus* у больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и показателями фагоцитарной активности нейтрофилов.

Материалы и методы. Обследовано 92 горнорабочих угольных шахт, которые находились на стационарном лечении в терапевтическом отделении Республиканского центра профессиональной патологии и реабилитации г. Донецка с диагнозом «хроническая обструктивная болезнь легких». Контрольную группу составили относительно здоровые горнорабочие аналогичного возраста ($n = 40$), длительно контактировавшие с пылью.

Фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови у больных определяли методом с тест-культурой золотистого стафилококка (штамм 209) с подсчетом фагоцитарной активности нейтрофилов и фагоцитарного числа при инкубации клеток с бактериями в течение 30 и 90 мин (соответственно ФАН 30, ФАН 90 и ФЧ 30, ФЧ 90). Также применяли тест с нитросиним тетразолием (НСТ). Полученную от пациентов мокроту и мазки со слизистых оболочек носа и зева использовали для бактериологических исследований.

Результаты. Горнорабочие угольных шахт с хронической обструктивной болезнью легких характеризуются существенно сниженными показателями ФЧ 30 ($p = 0,001$), ФЧ 90 ($p < 0,001$), ФАН 90 ($p = 0,008$). Кроме того, у пациентов с ХОБЛ отмечаются низкие значения индекса активности нейтрофилов в НСТ-тесте ($p < 0,001$). Наличие бактерий *S. aureus* в мокроте и/или мазках со слизистых оболочек носа и зева у больных ХОБЛ сочетается с более низкими значениями ФАН 30 ($p < 0,001$), а также показателей НСТ-теста – процента нейтрофилов, содержащих гранулы диформаза ($p = 0,025$), и среднего количества гранул диформаза в одном нейтрофиле ($p = 0,040$).

Выводы. Полученные результаты исследований необходимо использовать при назначении лечебно-профилактических мероприятий больным с хронической обструктивной болезнью легких среди горнорабочих угольных шахт.

Ключевые слова: фагоцитарная активность нейтрофилов, хроническая обструктивная болезнь легких, золотистый стафилококк.

По данным ВОЗ, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является 3-й лидирующей причиной смерти среди заболеваний легких. Ежегодно от ХОБЛ умирает около 2,8 млн человек, что составляет 4,8 % всех причин смерти среди пациентов с заболеваниями легких [8].

Согласно данным эпидемиологического исследования, проведенного в рамках программы GARD в 12 регионах России и

охватившего 7164 человека (средний возраст 43,4 года), распространенность ХОБЛ среди лиц с респираторными симптомами составила 21,8 % [7].

Основной причиной смерти пациентов с ХОБЛ является прогрессирование основного заболевания. Около 50–80 % больных ХОБЛ умирают от респираторных причин – либо во время обострений ХОБЛ, либо от опухолей легких (от 0,5 до 27 %).

Этиологическую роль в развитии ХОБЛ могут играть профессиональные вредности, пассивное курение, загрязнение воздуха вне помещений. В Европе и Северной Америке доля вклада загрязнения воздуха на рабочем месте в развитие ХОБЛ составляет 15–20 % [5]. Вероятно, этот вклад существенно больше в странах, где профессиональные вредности контролируются менее тщательно. Загрязнение воздуха на рабочем месте биологической, минеральной пылью, газами и дымом ассоциируется с увеличением распространенности ХОБЛ [14].

Бактериальные и вирусные инфекции вызывают большую часть обострений ХОБЛ. В 50–80 % случаев активация патологического процесса при данном заболевании обусловлена именно присоединением бактериальной инфекции. Лишь в 15 % случаев у пациентов с обострившейся легочной патологией отсутствует такой признак, как гнойная мокрота [6, 9, 15].

Выделение патогенных бактерий при стабильной ХОБЛ следует рассматривать как форму хронической инфекции, а не колонизации [10]. Бактериальная инфекция в сочетании с триггерными факторами (загрязнение воздуха и т.д.) индуцирует воспалительный процесс в дыхательных путях и легких, что отражается в виде нарастания симптомов заболевания [11, 12, 16]. Согласно современным представлениям о развитии профессиональной ХОБЛ, именно обострения обеспечивают прогрессирование заболевания [13].

Цель – исследовать ассоциации между наличием инфекции *Staphylococcus aureus* у больных ХОБЛ и показателями фагоцитарной активности нейтрофилов.

Материал и методы

Все обследуемые – горнорабочие угольных шахт, которые находились на стационарном лечении в терапевтическом отделении Республиканского центра профессиональной патологии и реабилитации г. Донецка с диагнозом «хроническая обструктивная болезнь легких» ($n = 92$).

Группа пациентов с ХОБЛ, возраст которых был в от 36 до 70 лет, существенно не отличалась от контрольной группы по показателям как возраста ($52,6 \pm 0,93$ против $53,4 \pm 1,98$ лет; $p = 0,72$), так и рабочего стажа ($21,6 \pm 0,87$ против $23,6 \pm 1,14$ лет; $p = 0,17$). Контрольную группу составили относительно здоровые горнорабочие ($n = 40$), длительно контактировавшие с пылью, которые были отобраны методом случайной выборки, рандомизированы по возрасту.

Исследование проводили соответственно стандартам и принципам Хельсинской Декларации (1975 г. с поправками 2005 г.). Все участники ($n = 132$) данного исследования предоставили письменное добровольное информированное согласие.

Периферическую кровь у пациентов забирали утром натощак. Фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови у больных определяли в методе с тест-культурой золотистого стафилококка (штамм 209). Показатели фагоцитоза исследовали в культуре клеток через 30 и 90 минут инкубации при 37°C . При микроскопии нейтрофилов рассчитывали фагоцитарную активность нейтрофилов (ФАН, процент клеток, вступивших в фагоцитоз) и фагоцитарное число (ФЧ, среднее количество бактерий, расположенных в одной клетке).

Функциональную кислородозависимую активность нейтрофилов исследовали в спонтанном тесте с нитросиним тетразолием (НСТ). При поглощении нейтрофилом НСТ восстанавливается в диформазан, который в виде гранул, нерастворимых в воде и органических растворителях, откладывается внутри клеток. При микроскопии подсчитывали процент нейтрофилов содержащих гранулы диформазана (НСТ %), а также индекс активности нейтрофилов, который показывает среднее количество гранул диформазана в одном нейтрофиле (НСТ-ИАН) [3].

Наряду с забором периферической крови у всех пациентов собиралась мокрота. Пациенты предварительно чистили зубы, язык, десны и полоскали рот кипяченой водой. Полученную от пациентов

мокроту подвергали бактериологическому исследованию. Кроме того, для исследования микрофлоры верхних дыхательных путей у больных брали мазки со слизистых оболочек носа и зева [4].

Выделение и идентификацию бактерий осуществляли в соответствии с приказом № 535 МЗ СССР от 22 апреля 1985 г. с модификацией количественного определения бактерий по методу секторных посевов [2] и согласно общепринятым рекомендациям [1]. Посев материала осуществляли на желточно-солевой агар.

Расчеты проводили с помощью табличного редактора Microsoft Excel и пакетов прикладных программ MedStat и Stadia 6.1. При статистической обработке материала рассчитывали среднее значение ($\bar{X}$) и ошибку средней величины (m). Для сравнения групп использовали критерий Стьюдента, достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты (табл.) свидетельствуют о том, что больные с хронической обструктивной болезнью легких характеризуются существенно сниженными показателями ФЧ 30 ($p = 0,001$) и ФЧ 90 ($p < 0,001$). Наличие хронической обструктивной болезни легких у пациентов сочеталось также с низкими значениями ФАН через 90 минут инкубации нейтрофилов с

тест-культурой золотистого стафилококка штамма 209 ($p = 0,008$).

Следует отметить, что количество нейтрофилов, имеющих гранулы дифформазана в тесте с НСТ, у больных хронической обструктивной болезнью легких определялось на уровне аналогичного показателя контрольной группы ($p = 0,395$). При этом значения НСТ-ИАН у больных с легочной патологией были значительно снижены ($p < 0,001$).

Результаты сравнительного анализа двух групп больных ХОБЛ в зависимости от выявления бактерий *Staphylococcus aureus* в мокроте и/или мазках со слизистых оболочек носа и зева свидетельствуют о том, что в двух сравниваемых группах значения фагоцитарного числа нейтрофилов через 30 и 90 минут инкубации с культурой *S. aureus* существенно не отличались ($p = 0,844$ и $p = 0,551$ соответственно).

Однако у носителей *S. aureus* были существенно снижены показатели ФАН 30 ($p < 0,001$) и определялась близкая к статистической значимости тенденция к более низким значениям ФАН 90 ($p = 0,065$).

Наряду с вышеизложенным положительный тест на *S. aureus* у больных хронической обструктивной болезнью легких сочетался с достоверно сниженными уровнями НСТ % ($p = 0,025$) и НСТ-ИАН ($p = 0,040$).

Таблица. Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов у больных хронической обструктивной болезнью легких

Показатели	Контрольная группа (n = 40)	Больные ХОБЛ (n = 92)	p	Тест на <i>S. aureus</i> у больных ХОБЛ		p
				положительный (n = 50)	отрицательный (n = 42)	
ФЧ 30	12,97 ± 2,43	4,85 ± 0,30	0,001	4,79 ± 0,45	4,94 ± 0,61	0,844
ФЧ 90	26,59 ± 4,40	8,09 ± 0,52	< 0,001	7,67 ± 0,79	8,36 ± 0,84	0,551
ФАН 30, %	37,34 ± 8,96	25,04 ± 2,18	0,180	18,23 ± 3,10	33,71 ± 2,74	< 0,001
ФАН 90, %	79,65 ± 9,63	52,11 ± 3,48	0,008	47,08 ± 5,15	59,76 ± 4,41	0,065
НСТ %	29,20 ± 2,54	25,82 ± 3,04	0,395	17,46 ± 4,02	31,12 ± 4,44	0,025
НСТ-ИАН	0,57 ± 0,05	0,36 ± 0,03	< 0,001	0,32 ± 0,04	0,47 ± 0,06	0,040

Выводы

Горнорабочие угольных шахт с хронической обструктивной болезнью легких характеризуются существенно сниженными показателями ФЧ 30 ($p = 0,001$), ФЧ 90 ($p < 0,001$) и ФАН 90 ($p = 0,008$), полученными при оценке фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови в методе с тест-культурой золотистого стафилококка штамма 209.

Пациенты с хронической обструктивной болезнью легких характеризуются также и низкими значениями индекса активности нейтрофилов в НСТ-тесте ($p < 0,001$).

Наличие бактерий *Staphylococcus aureus* в мокроте и/или мазках со слизистых оболочек носа и зева у больных ХОБЛ сочетается с более низкими показателями ФАН 30 ($p < 0,001$), НСТ % ($p = 0,025$) и НСТ-ИАН ($p = 0,040$). Полученные результаты исследований необходимо использовать при назначении лечебно-профилактических мероприятий больным с хронической обструктивной болезнью легких у горнорабочих угольных шахт.

Список литературы

1. Вишнякова, Л. А. Микробиологические и иммунологические методы диагностики инфекционного процесса при неспецифических заболеваниях легких. Методические рекомендации [Текст] / Л. А. Вишнякова, М. Е. Фаустова. – Л. : Изд-во ВНИИ пульмонологии МЗ СССР, 1990. – 26 с.
2. Приказ МЗ СССР № 535. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений [Электронный ресурс]. – 1985. Режим доступа : <http://base.garant.ru/4171962/>.
3. Справочник медицинские лабораторные технологии / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика, 2002. – Т. 2. – 600 с.
4. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории [Электронный ресурс] : методические указания МУ 4.2.2039-05. – 2005. – Режим доступа : <http://base.garant.ru/4183055/>.
5. An official American Thoracic Society public policy statement: novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease / M. D. Eisner [et al.] // *Am J. Respir. Crit. Care Med.* – 2010. – № 182. – P. 693–718.
6. Aydemir, Y. Relationship between the GOLD combined COPD assessment staging system and bacterial isolation / Y. Aydemir, Ö. Aydemir, F. Kalem // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* – 2014. – Vol. 27, № 9. – P. 1045–1051.
7. Chronic respiratory diseases and risk factors in 12 regions of the Russian Federation / A. G. Chuchalin [et al.] // *Int. J. COPD.* – 2014. – № 12. – P. 963–974.
8. Evidence-informed policy-making / World Health Organization. – 2017. – 129 p. – Режим доступа : <http://www.who.int/evidence>.
9. Mammen, M. J. Macrolide therapy for the prevention of acute exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease / M. J. Mammen, S. Sethi // *Pol. Arch. Med. Wewn.* – 2012. – Vol. 122, № 1–2. – P. 54–59.
10. Matkovic, Z. Chronic bronchial infection in COPD. Is there an infective phenotype? / Z. Matkovic, M. Miravittles // *Respir. Med.* – 2013. – Vol. 107, № 1. – P. 10–22.
11. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype / A. Agusti [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 5. – P. 374–383.
12. Quantitative analysis of pathogens in the lower respiratory tract of patients with chronic obstructive pulmonary disease / H. Wang [et al.] // *BMC Pulm. Med.* – 2015. – № 15. – P. 94.
13. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease / J. R. Hurst [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2010. – 363. – P. 1128–1138.
14. The SAPALDIA Team. Occupational exposure to dusts, gases, and fumes and incidence of chronic obstructive pulmonary disease in the Swiss Cohort Study on Air Pollution and Lung and Heart Diseases in Adults / A. J. Mehta [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2012. – № 185. – P. 1292–1300.
15. Treatment effects of co-amoxiclav (Amoxiclav 2x) in acute exacerbation of severe chronic obstructive pulmonary disease: clinical evaluation / I. Andrijević [et al.] // *Med. Pregl.* – 2011. – Vol. 64, № 3–4. – P. 178–182.
16. Wedzicha, J. A. The role of bronchodilator treatment in the prevention of exacerbations of COPD / J. A. Wedzicha, M. Decramer, T. A. Seemungal / *Eur. Respir. J.* – 2012. – Vol. 40, № 6. – P. 1545–1554.

Nikolenko O. Yu., Maylyan E. A., Kostetskaya N. I., Lygina Yu. A.

*STATE EDUCATIONAL INSTITUTION OF HIGHER PROFESSIONAL EDUCATION
«M. GORKY DONETSK NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY»*

**PHAGOCYTIC ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN COAL MINERS
WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE DEPENDING
ON CARRIAGE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

SUMMARY. Objective: to investigate associations between the presence of *Staphylococcus aureus* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and indicators of phagocytic activity of neutrophils.

Material and methods. There were examined 92 miners of coal mines with COPD. The control group consisted of relatively healthy miners who had been in contact with dust for a long time ($n = 40$) of the same age. The phagocytic activity of peripheral blood neutrophils in patients was determined by the method with the test culture of *Staphylococcus aureus* (strain 209) with the calculation of the phagocytic activity of neutrophils and the phagocytic number during incubation of cells with bacteria for 30 and 90 minutes (FAN 30, FAN 90 and PF 30, PF 90, respectively). The nitroblue tetrazolium test (NBT) was also used. The sputum and swabs from the mucous membranes of the nose and throat obtained from patients were used for bacteriological studies.

Results. Miners of coal mines with chronic obstructive pulmonary disease are characterized by significantly reduced indicators of FC 30 ($p = 0.001$), FC 90 ($p < 0.001$), FAN 90 ($p = 0.008$). In addition, patients with COPD have low values of the neutrophil activity index in the NBT test ($p < 0.001$). The presence of *S. aureus* bacteria in sputum and/or smears from the mucous membranes of the nose and throat in patients with COPD is combined with lower FAN 30 values ($p < 0.001$), as well as NBT test indicators – the percentage of neutrophils containing diformazan granules ($p = 0.025$) and the average the number of diformazan granules in one neutrophil ($p = 0.040$).

Conclusions. The obtained results of the research should be used when prescribing therapeutic and preventive measures for patients with chronic obstructive pulmonary disease in coal mine miners.

Key words: phagocytic activity of neutrophils, chronic obstructive pulmonary disease, *Staphylococcus aureus*.