

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ И СОСТОЯНИЕ ГЕМОСТАЗА У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ДЕСТРУКТИВНЫМ ПАНКРЕАТИТОМ

**Савченко А.А.^{1,2}, Борисов А.Г.^{1,2}, Здзитовецкий Д.Э.²,
Кудрявцев И.В.^{3,4}, Медведев А.Ю.⁵, Гвоздев И.И.¹, Мошев А.В.¹**

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“, обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

² ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

³ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁵ КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича», г. Красноярск, Россия

Резюме. Целью исследования явилось изучение взаимосвязи между показателями функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов и гемостаза у больных острым деструктивным панкреатитом (ОДП). Обследовано 33 больных ОДП. В качестве контроля обследовано 35 здоровых людей аналогичного возрастного диапазона. Уровень фагоцитоза нейтрофилов определяли методом проточной цитометрии с помощью FITC-меченого стафилококкового белка А. Подсчитывали процент флуоресцирующих нейтрофилов (определяли как фагоцитарный индекс) и средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число). Состояние респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа. У всех обследованных также исследовали состояние коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза. Обнаружено, что у больных ОДП при понижении количества фагоцитирующих нейтрофилов в крови наблюдается снижение интенсивности респираторного взрыва в клетках. Причем спонтанный и индуцированный синтез первичных активных форм кислорода (АФК) в нейтрофилах при ОДП реализуется быстрее, чем у здоровых людей, но интенсивность его значительно ниже. Максимум уровня спонтанного и индуцированного синтеза вторичных АФК в нейтрофилах больных значительно выше, чем у здоровых людей, но быстрый его спад в целом характеризует недостаточность респираторного взрыва в клетках. Снижение фагоцитарной активности нейтрофилов и особенности кинетики синтеза первичных и вторичных АФК может определяться действием поступивших в кровотоки ферментов поджелудочной железы и, соответственно, нарушением функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов. Со стороны гемостаза у больных ОДП обнаружены нарушения только в коагуляционном звене, которые определяются повышением содержания фибриногена, растворимых фибрин-моно-

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика
Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-68-68.
Факс: 8 (812) 234-94-89.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Address for correspondence:

Kudryavtsev Igor V.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-68-68.
Fax: 7 (812) 234-94-89.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Савченко, А.Г. Борисов, Д.Э. Здзитовецкий,
И.В. Кудрявцев, А.Ю. Медведев, И.И. Гвоздев,
А.В. Мошев «Функциональная активность нейтрофильных
гранулоцитов и состояние гемостаза у больных острым
деструктивным панкреатитом» // Медицинская
иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 551-560.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-551-560

For citation:

A.A. Savchenko, A.G. Borisov, D.E. Zdzitovetskiy,
I.V. Kudryavtsev, A.Yu. Medvedev, I.I. Gvozdev, A.V. Moshev
“Functional activity of neutrophils and hemostasis pattern in patients
with acute destructive pancreatitis”, *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 551-560.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-551-560

мерных комплексов и Д-димера в плазме крови при снижении уровня антитромбина III. Подобное изменение содержания показателей коагуляционного звена гемостаза характерно для воспалительных процессов и свидетельствует об активации коагуляционного каскада и о риске возникновения септических осложнений. У больных ОДП значительно увеличивается количество корреляционных связей между показателями функциональной активности нейтрофилов и параметрами гемостаза. Выявленные взаимосвязи при ОДП отражают сонаправленность изменений функциональной активности нейтрофилов (по показателям фагоцитоза и респираторного взрыва) и свертывающей системы крови (по показателям коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного звена). Изменение функциональной активности нейтрофилов и состояния гемостаза при ОДП, а также особенности взаимосвязи их показателей между собой характеризуют патогенез заболевания и определяют механизмы развития осложнений.

Ключевые слова: острый панкреатит, нейтрофилы, гемостаз, функциональная активность, фагоцитоз, респираторный взрыв

FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS AND HEMOSTASIS PATTERN IN PATIENTS WITH ACUTE DESTRUCTIVE PANCREATITIS

Savchenko A.A.^{a, b}, Borisov A.G.^{a, b}, Zdzitovetskiy D.E.^b,
Kudryavtsev I.V.^{c, d}, Medvedev A.Yu.^e, Gvozdev I.I.^a, Moshev A.V.^a

^a Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b Krasnoyarsk State V.F. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

^c Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^d First St. Petersburg State I.P. Pavlov Medical University, Department of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation

^e Krasnoyarsk Inter-District N.S. Karpovich Clinical Hospital for Emergent Medical Care, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. The aim of present study was to investigate relationships between indicators of functional activity of neutrophilic granulocytes, and hemostasis parameters in patients with acute destructive pancreatitis (ADP). The study included thirty-three patients with ADP. 35 healthy persons were examined as a control group. The phagocytosis level in neutrophils was determined by flow cytometry using FITC-labeled staphylococcal protein A. We have calculated the percentage of fluorescent neutrophils as phagocytic index, and average cell fluorescence assumed phagocytic number. The intensity of respiratory burst observed in neutrophil samples was evaluated using chemiluminescence assay. All the persons under study were also tested for blood coagulation and vascular-platelet hemostasis. It was found that the ADP patients with decreased number of phagocytic neutrophils in the blood showed a decrease in respiratory burst intensity in the neutrophils. Moreover, spontaneous and induced synthesis of the primary reactive oxygen species (ROS) in neutrophils of ADP patients proceeded faster than in healthy people, but its intensity was much lower. The maximal level of spontaneous and induced synthesis of secondary ROS in neutrophils of patients was significantly higher than in healthy individuals, but its rapid may be generally characterized by insufficient respiratory burst in these patients. A reduced neutrophil phagocytic activity and kinetic characteristics of primary and secondary ROS synthesis may be attributed to the effects produced by pancreatic enzymes entering blood flow which may alter functional activity of the blood neutrophils. Concerning hemostasis in patients with ADP, some disturbances were found only in the coagulation link which seem to depend on increase in fibrinogen, soluble fibrin monomer complexes and D-dimer in blood plasma, along with reduced antithrombin III levels. Such a change in blood coagulation indexes is typical to inflammatory processes and presumes activation of the coagulation cascade and higher risk of septic complications. In patients with ADP, we have found a significantly increased number of correlations between indicators of functional activity of neutrophils and hemostasis parameters. This analysis revealed a relationship by the patients with ADP reflect some unidirectional changes in functional activity of neutrophils (as phagocytosis and respiratory burst), and blood coagulation parameters (as blood clotting and vascular/platelet links). The changes in functional activity of neutrophils and the state of hemostasis in the ADP

patients, as well as correlations between their alterations are involved into the pathogenesis of this disorder, and determine potential mechanisms for evolving complications.

Keywords: acute pancreatitis, neutrophils, hemostasis, functional activity, phagocytosis, respiratory burst

Исследование выполнено при финансовой поддержке Краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности».

Введение

Острый деструктивный панкреатит (ОДП) в настоящее время остается одной из проблемных областей неотложной абдоминальной хирургии. Несмотря на применение в лечении ОДП современных детоксикационных технологий, разработку новых методов хирургических вмешательств, совершенствование медикаментозной терапии, данная патология характеризуется высокой летальностью: от 15 до 40% при стерильном панкреонекрозе и до 80% при инфицированном панкреонекрозе с гнойно-септическими осложнениями [2, 8, 21].

Согласно ферментативной теории развития острого панкреатита, некротические процессы, эндотоксикоз, полиорганную недостаточность связывают с резкой нефизиологической активацией пищеварительных ферментов в поджелудочной железе с последующим поражением ее тканей этими ферментами и их поступлением в кровотока [15, 17]. Системное повреждение сосудистого эндотелия при ОДП ведет к активации свертывающей системы, что в свою очередь требует запуска механизмов распознавания поврежденных клеток и удаления активированных факторов свертывания из кровотока, в которых ключевую роль играют клетки врожденного иммунитета. Нарушения в системе гемостаза и иммунной системе, находясь в прямой зависимости от глубины патоморфологических изменений в поджелудочной железе, взаимно отягощают друг друга и являют пример срыва межсистемной регуляции [14, 21]. Однако особенности функционирования нейтрофильных гранулоцитов как основных клеток врожденного иммунитета при ОДП до сих пор не изучены.

В связи с этим **целью исследования** явилось изучение взаимосвязи между показателями функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов и гемостаза у больных ОДП.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 33 больных ОДП (19 мужчин и 14 женщин) средней и тяжелой степени тяжести, проходивших лечение в отделениях хирургии и отделении реанимации

и интенсивной терапии КБУЗ «КМКБСМП имени Н.С. Карповича» г. Красноярск. Средний возраст больных составил $46,8 \pm 6,4$ года. Из исследования были исключены больные с ОДП легкой степени и те, у которых ОДП явился осложнением травмы брюшной полости, в том числе и послеоперационный. Исходную степень тяжести состояния больных определяли по шкале SAPS II [13]. Для оценки тяжести ОДП и прогноза развития заболевания применяли шкалу критериев первичной экспресс-оценки тяжести острого панкреатита Санкт-Петербургского НИИ скорой помощи имени И.И. Джанелидзе [1]. Наличие и степень выраженности полиорганной недостаточности исходно и в динамике определяли по шкале SOFA [20]. При оценке степени тяжести синдрома системной воспалительной реакции придерживались критериев ACCP/SCCM [7]. В качестве контроля обследовано 35 здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Уровень фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов определяли методом проточной цитометрии с помощью FITC-меченого (fluorescein isothiocyanate) стафилококкового белка А [3]. Конъюгацию выполняли следующим образом: к стафилококковому белку А (разведен в бикарбонатном буфере, pH = 9,0) добавляли FITC (предварительно растворяли в ДМСО до концентрации 1 мкг/мл), инкубировали в темноте в течение 1 часа, трижды отмывали и по стандарту мутности доводили концентрацию белка до 1 млн/мл. К 100 мкл гепаринизированной крови добавляли 10 мкл FITC-меченого белка А и инкубировали 30 минут при температуре 37 °С. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США). Для гашения адгезированного на поверхности нейтрофилов FITC-меченого белка А к суспензии клеток добавляли раствор трипанового синего (0,2 мг/мл). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США). В каждой пробе анализировали не менее 50000 нейтрофилов. Подсчитывали процент флуоресцирующих нейтрофилов (определяли как фагоцитарный индекс – ФИ) и средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число – ФЧ).

Состояние респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа [5]. В качестве индикаторов хемилюминесценции использовали

люминол и люцигенин. Оценка спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществлялась в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «БЛМ-3607» (Россия). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (T_{max}), максимальное значение интенсивности (I_{max}), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции (Синд.) к площади спонтанной (Спонт.) и определяли как индекс активации (Синд./Спонт.).

У всех обследованных на анализаторе STA-COMPACT (Швейцария) исследовались следующие показатели коагуляционного гемостаза: протромбиновый индекс (ПТИ), содержание фибриногена, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), уровень Д-димера, растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК), антитромбина III (АТ III). На агрегометре LA230-2 БИОЛА (Россия) изучались показатели сосудисто-тромбоцитарного гемостаза: спонтанная агрегация тромбоцитов (САТ) и индуцированная, с применением в качестве индукторов аденозин-дифосфата (АДФ) в дозах 0,1 мкМ и 5 мкМ и адреналина в дозе 10 мкг/мл.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2013 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1 и 3 квартилей ($Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты

Исследование функциональной активности нейтрофилов позволило установить, что у больных ОДП снижен ФИ нейтрофилов относительно контрольных значений (табл. 1). При исследовании интенсивности люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов обнаружено, что у пациентов с ОДП снижено время выхода

на максимум и площадь под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции. При исследовании интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции выявлено, что у больных ОДП повышается максимум интенсивности и снижается площадь под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции.

Изучение состояния коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза позволило установить, что у больных ОДП снижена величина ПТИ и концентрация антитромбина III, но при повышении содержания фибриногена, РФМК и Д-димера, а также при увеличении ТВ (табл. 2).

С помощью корреляционного анализа обнаружено, что у лиц контрольной группы время выхода на максимум спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов положительно взаимосвязан с АЧТВ ($r = 0,66$, $p = 0,039$), тогда как время выхода на максимум индуцированной люминесценции данного типа уже отрицательно коррелирует с уровнем адреналин-индуцированной агрегацией тромбоцитов ($r = -0,64$, $p = 0,044$). Взаимосвязь между индексом активации люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов и содержанием РФМК у лиц данной группы также является отрицательной ($r = -0,72$, $p = 0,019$).

У больных ОДП ФИ нейтрофилов отрицательно взаимосвязан с уровнем Д-димера в сыворотке крови ($r = -0,54$, $p = 0,033$). У данных пациентов площадь под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов положительно коррелирует с уровнем фибриногена ($r = 0,54$, $p = 0,030$ и $r = 0,52$, $p = 0,040$ соответственно), РФМК ($r = 0,54$, $p = 0,030$ и $r = 0,59$, $p = 0,016$ соответственно) и Д-димера ($r = 0,68$, $p = 0,005$ и $r = 0,67$, $p = 0,006$ соответственно). Взаимосвязь между максимумом интенсивности индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов и уровнем адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов также является положительной ($r = 0,70$, $p = 0,003$). Максимум интенсивности зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов положительно взаимосвязан с уровнями АДФ- (при 5 мкМ) и адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов ($r = 0,52$, $p = 0,033$ и $r = 0,57$, $p = 0,022$ соответственно). Площадь под кривой индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у больных ОДП отрицательно коррелирует с уровнем антитромбина III ($r = -0,48$, $p = 0,045$) и положительно – с содержанием РФМК ($r = 0,51$, $p = 0,033$).

ТАБЛИЦА 1. ФАГОЦИТОЗ И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ ОДП, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. PHAGOCYTOTIC ACTIVITY AND LUCIGENIN-DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE (LDCL) OF PERIPHERAL BLOOD NEUTROPHILS (Ne) FROM PATIENTS WITH ACUTE DESTRUCTIVE PANCREATITIS (ADP), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Контроль Healthy control n = 35	ОДП Patients with ADP n = 33	p
Фагоцитоз Phagocytic activity of neutrophils			
ФИ нейтрофилов, % Ne index of phagocytosis, %	54,6 (21,9-89,8)	23,7 (14,9-32,1)	< 0,001
ФЧ нейтрофилов Ne phagocytic number	57,5 (23,8-114,0)	51,4 (45,1-55,5)	
Спонтанная люцигенин-зависимая хемилюминесценция Spontaneous LDCL activity of neutrophils			
Tmax, сек. Tmax, sec	2093 (1425-2881)	1537 (1123-2297)	0,048
I_{max}, о.е. × 10³	7,74 (2,61-16,54)	5,35 (3,61-9,11)	
S, о.е. × сек. × 10⁵ S, o.e. × sec × 10 ⁵	15,16 (3,95-41,11)	0,44 (0,34-0,86)	< 0,001
Зимозан-индуцированная люцигенин-зависимая хемилюминесценция Zymosan-induced LDCL activity of neutrophils			
Tmax, сек. Tmax, sec	1738 (1389-2331)	1311 (1031-1431)	0,006
I_{max}, о.е. × 10³	14,14 (7,59-28,96)	12,69 (9,11-26,19)	
S, о.е. × сек. × 10⁵ S, o.e. × sec. × 10 ⁵	25,16 (10,70-64,61)	1,02 (0,75-1,32)	< 0,001
Синд./Спонт. S _{ind} /S _{sp}	1,77 (1,17-3,11)	2,38 (1,74-4,08)	
Спонтанная люминол-зависимая хемилюминесценция Spontaneous LDCL activity of neutrophils			
Tmax, сек. Tmax, sec	969 (567-1559)	1344 (733-2315)	
I_{max}, о.е. × 10³	10,83 (4,06-30,88)	51,99 (30,22-104,28)	< 0,001
S, о.е. × сек. × 10⁵ S, o.e. × sec. × 10 ⁵	14,91 (4,49-50,94)	4,99 (1,62-9,22)	< 0,001
Зимозан-индуцированная люминол-зависимая хемилюминесценция Zymosan-induced LDCL activity of neutrophils			
Tmax, сек. Tmax, sec	1072 (796-1459)	964 (766-1619)	
I_{max}, о.е. × 10³	21,25 (7,55-62,59)	132,05 (96,59-143,14)	< 0,001
S, о.е. × сек. × 10⁵ S, o.e. × sec. × 10 ⁵	24,34 (9,21-84,16)	11,20 (6,61-21,10)	0,007
Синд./Спонт. S _{ind} /S _{sp}	1,89 (1,34-2,87)	2,50 (1,52-5,20)	

Примечание. Tmax – время выхода на максимум; I_{max} – максимальное увеличение интенсивности; S – площадь под кривой люминесценции; Синд./ Спонт. – соотношение между индуцированной зимозаном и спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции.

Note. Tmax, time to maximum; I_{max}, maximum intensity value, reflecting the maximum reactive oxygen species level synthesis; S, the area under the curve, describing total synthesis of reactive oxygen species during 90 min. LDCL, lucigenin-dependent chemiluminescence; S_{ind}/S_{sp}, the ration between zymosan-induced and spontaneous LDCL.

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ КОАГУЛЯЦИОННОГО И СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНОГО ГЕМОСТАЗА У БОЛЬНЫХ ОДП, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. INDICATORS OF COAGULATION AND VASCULAR-PLATELET HEMOSTASIS FROM PATIENTS WITH ACUTE DESTRUCTIVE PANCREATITIS (ADP), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	Контроль Healthy control n = 57	ОДП Patients with ADP n = 33	p
ПТИ, % Prothrombin index, %	101 (94-113)	89 (82-96)	< 0,001
Фибриноген, г/л Fibrinogen, g/L	2,81 (2,36-3,31)	3,84 (2,97-5,03)	< 0,001
РФМК, мг % SFMC, mg %	7 (5-9)	22 (10-26)	< 0,001
Антитромбин III, % Anti-thrombin III, %	98 (89-103)	88 (73-102)	0,021
ТВ, сек. TT, sec	15,3 (14,2-16,6)	21,6 (19,8-24,1)	< 0,001
АЧТВ, сек. APTT, sec	33,5 (29,4-35,8)	30,4 (27,9-33,9)	
Д-димер, нг/мл D-dimer level, ng/ml	220 (168-220)	936 (566-1420)	< 0,001
Тромбоциты, 10 ⁹ /л Platelets, 10 ⁹ /L	217,5 (187,0-242,1)	201,5 (152,5-285,0)	
АТ с АДФ 5 мкМ, % SPA + ADP 5 μM, %	42,2 (27,6-52,8)	44,2 (31,8-57,7)	
АТ с АДФ 0,1 мкМ, усл. ед. SPA + ADP 0,1 μM, o.e.	1,7 (1,5-2,3)	2,1 (1,6-2,5)	
АТ с адреналином 10 мкг/мл, % SPA + Adrenaline 10 mkg/mL, %	36,9 (21,2-47,9)	44,2 (22,5-62,1)	

Примечание. ПТИ – протромбиновый индекс; РФМК – растворимые фибрин-мономерные комплексы; ТВ – тромбиновое время; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время; АТ – агрегация тромбоцитов; АДФ – аденозиндифосфат.

Note. SFMC, soluble fibrin monomer complex; TT, thrombin time; APTT, activated partial thromboplastin time; SPA, spontaneous platelet aggregation; ADP, adenosine diphosphate.

Обсуждение

Иммунопатогенез ОДП на сегодняшний день во многом рассматривается с позиций системного воспалительного ответа, важную роль в котором осуществляют нейтрофильные гранулоциты [16, 19, 23]. Однако воздействие активированных ферментов поджелудочной железы, поступивших в кровоток, должно модулировать функциональную активность нейтрофилов. Нами обнаружено, что у больных ОДП в 2,3 раза снижен процент фагоцитирующих нейтрофилов периферической крови в сравнении с выявленным у здоровых людей.

Респираторный взрыв, опосредуя процессы фагоцитоза и киллинга, является важным механизмом, лежащим в основе реактивности фагоцитирующих клеток [4, 9, 12]. Уровень синтеза

первичных и вторичных форм кислорода при респираторном взрыве нейтрофилов мы исследовали с помощью двух хемилюминесцентных индикаторов: люцигенина и люминола. Люцигенин окисляется и люминесцирует только под влиянием супероксид-радикала, который определяется как первичная активная форма кислорода (АФК) и синтезируется в системе NADPH-оксидазы [4, 5]. Люцигенин не проходит через мембрану клеток и связывается с супероксид-радикалом только во внеклеточном пространстве. Соответственно, исследование люцигенин-зависимой хемилюминесценции клеток позволяет охарактеризовать состояние активности NADPH-оксидазы и уровень выделения супероксид-радикала для реализации механизма внешнего киллинга у больных ОДП. Обнаружено, что при ОДП при снижении

спонтанного и индуцированного уровней синтеза супероксид-радикала уменьшается время выхода на максимум. Время выхода на максимум характеризует скорость развития респираторного взрыва в случае регуляторного (спонтанной хемилюминесценции) или антигенного воздействия (при зимозан-индуцированной хемилюминесценции) на клетку [4, 5]. Снижение времени выхода на максимум спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции при РП характеризует высокую чувствительность нейтрофилов к воздействию.

Цитотоксическая активность нейтрофильных гранулоцитов определяется уровнем продукции как первичных, так и вторичных АФК (гидроксильный радикал, перекись водорода и др.). В формировании пула вторичных форм кислорода в нейтрофилах принимают участие такие ферменты, как супероксиддисмутаза, каталаза, миелопероксидаза и др. [4, 5, 18]. Люминол способен вступать в хемилюминесцентную реакцию и с первичными, и с вторичными АФК, проникать внутрь клеток и вступать в реакцию в фаголизосомах. Установлено, что у больных ОДП значительно повышается максимум интенсивности спонтанного и зимозан-индуцированного синтеза вторичных АФК, но при снижении площади под кривыми хемилюминесценции. Подобная кинетика синтеза вторичных АФК является оригинальной и определяется быстрым спадом хемилюминесцентной реакции после достижения максимума. Необходимо отметить, что при высокой интенсивности респираторного взрыва в нейтрофилах повышается и максимум интенсивности и площадь под кривой хемилюминесцентной реакции [4]. Особенность кинетики синтеза вторичных АФК в нейтрофильных гранулоцитах больных ОДП, возможно, связана с быстрым расходом метаболитических ресурсов, когда способность клеток к генерации респираторного взрыва высокой интенсивности приводит к истощению метаболитических резервов и, соответственно, быстрому спаду хемилюминесцентной кривой.

При исследовании гемостаза у больных ОДП обнаружены изменения только в коагуляционном звене. У обследованных пациентов обнаружено повышение содержания фибриногена, характерное для воспалительных заболеваний [6, 10]. Повышение количества РФМК и Д-димера при снижении величины ПТИ характеризует активацию коагуляционного каскада у больных ОДП. При этом понижение уровня антитромбина III в плазме крови свидетельствует о риске возникновения тромбоза и развития ассоциированного с ДВС-синдромом сепсиса [11, 22].

Проанализирована корреляционная зависимость между показателями функциональной активности нейтрофилов и параметрами коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у здоровых людей и больных ОДП. Установлено, что у здоровых людей с показателями гемостаза взаимосвязаны только параметры синтеза вторичных АФК нейтрофилами (люминол-зависимая хемилюминесценция). При этом выявляется положительная корреляционная связь между временем выхода на максимум спонтанного синтеза АФК и АЧТВ – показателя, характеризующего эффективность «внутреннего» и общего пути свертывания, тогда как с индексом активации нейтрофилов и временем выхода на максимум индуцированного синтеза вторичных АФК отрицательно взаимосвязаны, соответственно, количество РФМК в плазме и уровень адреналин-индуцированной агрегации.

У больных ОДП обнаружены взаимосвязи показателей гемостаза с параметрами фагоцитоза, а также уровнями синтеза и первичных и вторичных АФК нейтрофилами. Так, между ФИ нейтрофилов обследованных пациентов и содержанием Д-димера выявляется отрицательная взаимосвязь, характеризующая ингибирование фагоцитарной активности при активации процессов фибринолиза. Кинетические показатели активности NADPH-оксидазы нейтрофильных гранулоцитов у больных ОДП только положительно взаимосвязаны с уровнями содержания фибриногена, РФМК, Д-димера и адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов. Кинетические показатели синтеза вторичных АФК отрицательно взаимосвязаны с количеством антитромбина III и положительно – с уровнями РФМК и АДФ- и адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов. Данная система корреляционных связей характеризует сонаправленность процессов дыхательного взрыва нейтрофилов (по уровню синтеза первичных и вторичных АФК) и изменение активности свертывающей системы крови (по показателям коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного звена).

Таким образом, у больных ОДП при понижении количества фагоцитирующих нейтрофилов в крови наблюдается снижение интенсивности респираторного взрыва в клетках. Причем спонтанный и индуцированный синтез первичных АФК в нейтрофилах при ОДП реализуется быстрее, чем у здоровых людей, но интенсивность его значительно ниже. Максимум уровня спонтанного и индуцированного синтеза вторичных АФК в нейтрофилах больных значительно выше, чем у здоровых людей, но быстрый его спад в целом характеризует недостаточность респираторного взрыва в клетках. Снижение фагоци-

тарной активности нейтрофилов и особенности кинетики синтеза первичных и вторичных АФК может определяться действием поступивших в кровотоки ферментов поджелудочной железы и, соответственно, нарушением функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов. Со стороны гемостаза у больных ОДП обнаружены нарушения только в коагуляционном звене, которые определяются повышением содержания фибриногена, РФМК и Д-димера в плазме крови при снижении уровня антитромбина III. Подобное изменение содержания показателей коагуляционного звена гемостаза характерно для воспалительных процессов и свидетельствует об активации коагуляционного каскада и о риске возникновения септических осложнений. У боль-

ных ОДП значительно увеличивается количество корреляционных связей между показателями функциональной активности нейтрофилов и параметрами гемостаза. Выявленные взаимосвязи при ОДП отражают сонаправленность изменений функциональной активности нейтрофилов (по показателям фагоцитоза и респираторного взрыва) и свертывающей системы крови (по показателям коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного звена). Изменение функциональной активности нейтрофилов и состояния гемостаза при ОДП, а также особенности взаимосвязи их показателей между собой характеризуют патогенез заболевания и определяют механизмы развития осложнений.

Список литературы / References

1. Багненко С.Ф., Толстой А.Д., Краснорогов В.Б., Курьгин А.А., Гринев М.В., Лапшин В.Н., Гольцов В.Р. Острый панкреатит (Протоколы диагностики и лечение) // *Анналы хирургической гепатологии*, 2006. Т. 11, № 1. С. 60-66. [Bagnenko S.F., Tolstoy A.D., Krasnorogov V.B., Kurygin A.A., Grinev M.V., Lapshin V.N., Goltsov V.R. Acute pancreatitis (diagnostic protocols and treatment). *Annaly khirurgicheskoy gepatologii = Annals of Surgical Hepatology*, 2006, Vol. 11, no. 1, pp. 60-66. (In Russ.)]
2. Дарвин В.В., Онищенко С.В., Краснов Е.А., Васильев В.В., Лысак М.М., Климова Н.В. Острый деструктивный панкреатит: современное хирургическое лечение // *Анналы хирургической гепатологии*, 2014. Т. 19, № 4. С. 76-82. [Darvin V.V., Onishhenko S.V., Krasnov E.A., Vasilyev V.V., Lysak M.M., Klimova N.V. Acute destructive pancreatitis: current surgical treatment. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii = Annals of Surgical Hepatology*, 2014, Vol. 19, no. 4, pp. 76-82. (In Russ.)]
3. Мазуров Д.В., Пинегин Б.В. Применение проточной цитометрии для оценки поглотительной и бактерицидной функций гранулоцитов и моноцитов периферической крови // *Аллергия, астма и клиническая иммунология*, 1999. № 9. С. 154-156. [Mazurov D.V., Pinegin B.V. Application of flow cytometry for evaluating the absorbency and the antibacterial functions of granulocytes and monocytes of peripheral blood. *Allergiya, astma i klinicheskaya immunologiya = Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 1999, no. 9, pp. 154-156. (In Russ.)]
4. Савченко А.А., Здитовецкий Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов и уровни концентрации цитокинов у больных распространенным гнойным перитонитом // *Цитокины и воспаление*, 2013. Т. 12, № 1-2. С. 115-119. [Savchenko A.A., Zdzitovetskiy D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Neutrophil chemiluminescent activity and cytokine concentration levels in patients with extensive purulent peritonitis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2013, Vol. 12, no. 1-2, pp. 115-119. (In Russ.)]
5. Шкапова Е.А., Куртасова Л.М., Савченко А.А. Показатели люцигенин- и люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у больных раком почки // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2010. Т. 149, № 2. С. 201-203. [Shkapova E.A., Kurtasova L.M., Savchenko A.A. The indicators of the lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence of blood neutrophils by the patients with kidney cancer. *Byulleten eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, Vol. 149, no. 2, pp. 201-203. (In Russ.)]
6. Andreassen S.M., Berg L.C., Nielsen S.S., Kristensen A.T., Jacobsen S. mRNA expression of genes involved in inflammation and haemostasis in equine fibroblast-like synoviocytes following exposure to lipopolysaccharide, fibrinogen and thrombin. *BMC Vet. Res.*, 2015, Vol. 11, p. 141.
7. Bone R.S., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M., Sibbald W.J. American college of Chest Physicians. Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guide lines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.*, 1992, Vol. 20, no. 6, pp. 864-874.
8. Dick J.F. 3rd, Gardner T.B., Merrens E.J. Acute pancreatitis: New developments and strategies for the hospitalist. *J. Hosp. Med.*, 2016, Vol. 11, no. 10, pp. 724-729.
9. El-Benna J., Hurtado-Nedelec M., Marzaioli V., Marie J.C., Gougerot-Pocidallo M.A., Dang P.M. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol. Rev.*, 2016, Vol. 273, no. 1, pp. 180-193.
10. Hoppe B. Fibrinogen and factor XIII at the intersection of coagulation, fibrinolysis and inflammation. *Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 112, no. 4, pp. 649-658.

11. Iba T., Gando S., Saitoh D., Wada H., Di Nisio M., Thachil J. Antithrombin supplementation and risk of bleeding in patients with sepsis-associated disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Res.*, 2016, Vol. 145, pp. 46-50.
12. Kovács I., Horváth M., Kovács T., Somogyi K., Tretter L., Geiszt M., Petheő G.L. Comparison of proton channel, phagocyte oxidase, and respiratory burst levels between human eosinophil and neutrophil granulocytes. *Free Radic. Res.*, 2014, Vol. 48, no. 10, pp. 1190-1199.
13. le Gall J.-R., Lemeshow S., Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA*, 1993, Vol. 270, pp. 2957-2963.
14. Lisman T., Porte R.J. Activation and regulation of hemostasis in acute liver failure and acute pancreatitis. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2010, Vol. 36, no. 4, pp. 437-443.
15. Maheshwari R., Subramanian R.M. Severe acute pancreatitis and necrotizing pancreatitis. *Crit. Care Clin.*, 2016, Vol. 32, no. 2, pp. 279-290.
16. Okamura D., Starr M.E., Lee E.Y., Stromberg A.J., Evers B.M., Saito H. Age-dependent vulnerability to experimental acute pancreatitis is associated with increased systemic inflammation and thrombosis. *Aging Cell*, 2012, Vol. 11, no. 5, pp. 760-769.
17. Singh P., Garg P.K. Pathophysiological mechanisms in acute pancreatitis: Current understanding. *Indian J. Gastroenterol.*, 2016, Vol. 35, no. 3, pp. 153-166.
18. Trujillo M. Analysis of the immunity-related oxidative bursts by a luminol-based assay. *Methods Mol. Biol.*, 2016, Vol. 1398, pp. 323-329.
19. van Bijnen S.T., Wouters D., van Mierlo G.J., Muus P., Zeerleder S. Neutrophil activation and nucleosomes as markers of systemic inflammation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: effects of eculizumab. *J. Thromb. Haemost.*, 2015, Vol. 13, no. 11, pp. 2004-2011.
20. Vincent J.L., Moreno R., Takala J., Willatts S., De Mendonca A., Bruining H., Reinhart C.K., Suter P.M., Thijs L.G. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.*, 1996, Vol. 22, no. 7, pp. 707-710.
21. Vinokurov M.M., Saveliev V.V., Gogolev N.M., Yalynskya T.V. Immunomodulation and treatment of acute destructive pancreatitis in a multidisciplinary surgical hospital. *Wiad. Lek.*, 2015, Vol. 68, no. 4, pp. 582-586.
22. Yasuda N., Goto K., Ohchi Y., Abe T., Koga H., Kitano T. The efficacy and safety of antithrombin and recombinant human thrombomodulin combination therapy in patients with severe sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J. Crit. Care.*, 2016, Vol. 36, pp. 29-34.
23. Zonneveld R., Molema G., Plötz F.B. Measurement of functional and morphodynamic neutrophil phenotypes in systemic inflammation and sepsis. *Crit. Care.*, 2016, Vol. 20, p. 235.

Авторы:

Савченко А.А. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера»; заведующий кафедрой физиологии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Борисов А.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера»; доцент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Authors:

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North; Head, Department of Physiology, Krasnoyarsk State V.F. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North; Assistant Professor, Department of Infections, Krasnoyarsk State V.F. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Здзитовецкий Д.Э. — д.м.н., заведующий кафедрой хирургических болезней им. проф. Ю.М. Лубенского ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, кафедра иммунологии, Санкт-Петербург, Россия

Медведев А.Ю. — врач КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича», г. Красноярск, Россия

Гвоздев И.И. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Мошев А.В. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук“», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Zdzitovetskiy D.E., PhD, MD (Medicine), Head, Yu. M. Lubensky Department of Surgical Diseases, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology) Senior Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; First St. Petersburg State I.P. Pavlov Medical University, Department of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation

Medvedev A.Yu., Doctor Clin. Med., Krasnoyarsk Inter-District N.S. Karpovich Clinical Hospital for Emergent Medical Care, Krasnoyarsk, Russian Federation

Gvozdev I.I., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Moshev A.V., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 15.11.2017
Принята к печати 28.11.2017

Received 15.11.2017
Accepted 28.11.2017