

АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ РАЗЛИЧНОЙ ТЯЖЕСТИ

Муратова Т.А.¹, Аль-Кубайси Ш.С.¹, Ларькова Е.С.¹, Сайгина О.А.¹, Леонтьев А.А.¹, Калабкин Е.А.¹, Летин А.В.¹, Морозов В.В.¹

¹ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», Саранск, e-mail: vap.61@yandex.ru

Активация гранулоцитарных нейтрофилов, развивающаяся при остром панкреатите, сопровождается состоянием респираторного взрыва, приводящего к метаболическим и функциональным изменениям этих клеток и продукции провоспалительных медиаторов для реализации и совершения кооперативных реакций иммунной системы. Проведено клинико-лабораторное исследование 51 пациента с острым панкреатитом, которые были разделены на 2 группы: первая (n=28) – пациенты с острым панкреатитом легкой формы, и вторая (n=23) – больные острым панкреатитом тяжелой степени. Также обследованы здоровые индивидуумы (n=18) обоих полов, в возрасте от 25 до 55 лет. Оценка фагоцитарной активности сегментоядерных нейтрофилов проведена с помощью анализа восстановления нитросинего тетразолия (НСТ), содержания лизосомально-катионных белков и показателей среднего цитохимического коэффициента НСТ-спонтанного теста. Установлено, что на ранних сроках острый панкреатит характеризовался значимым активированием нейтрофильных гранулоцитов, которое модифицировалось в сопряженности с формой тяжести заболевания. При легкой тяжести болезни фагоцитарная активность наблюдалась лишь в первые 4 суток, а к конечным суткам приближалась вплотную к нормальным значениям. Однако в группе с острым панкреатитом тяжелой степени нейтрофильный взрыв сохранился в течение всего исследовательского периода.

Ключевые слова: панкреатит, нитросиний тетразолий, лизосомально-катионные белки, иммунитет, фагоцитоз.

ACTIVITY OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN DIFFERENT SEVERITY OF ACUTE PANCREATIS

Muratova T.A.¹, Al-Kubaisi Sh.S.¹, Larkova E.S.¹, Saigina O.A.¹, Leontiev A.A.¹, Kalabkin E.A.¹, Letin A.V.¹, Morozov V.V.¹

¹National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, e-mail: vap.61@yandex.ru

Granulocyte neutrophil activation, which develops in acute pancreatitis, is accompanied by a state of respiratory explosion, leading to metabolic and functional changes in these cells and production of pro-inflammatory mediators for the realization and implementation of cooperative reactions of the immune system. A clinical and laboratory study of 51 patients with acute pancreatitis was carried out, who were divided into 2 groups: the first (n=28) – patients with mild acute pancreatitis, and the second (n=23) – patients with severe acute pancreatitis. Healthy individuals (n=18) of both sexes, aged 25 to 55 years, were also examined. The assessment of the phagocytic activity of segmented neutrophils was done using the analysis of the restoration of nicrosini tetrazolium (NST), the value of lysosomal-cationic proteins and the average cytochemical coefficient of the NST-spontaneous test. It was found that in the early stages, acute pancreatitis was characterized by significant activation of neutrophilic granulocytes, which was modified in conjunction with the form of the disease severity. In the mild severity, phagocytic activity was observed only in the first 4 days, and by the final days it was close to normal level. However, in the group with severe pancreatitis, a neutrophilic explosion persisted throughout the entire research period.

Keywords: pancreatitis, nicrosini tetrazole, lysosomal cationic proteins, immunity, phagocytosis.

В настоящее время острый панкреатит (ОП) остается одним из проблемных вопросов среди абдоминальных патологий неотложной хирургии. Это обусловлено: деструктивным характером патологии у четверти пациентов с острым панкреатитом; высокой летальностью, которая составляет от 15 до 40% при легкой тяжести (стерильный панкреонекроз) и до 75%

при тяжелой форме (инфицированный панкреонекроз); несвоевременной оценкой степени тяжести, диагностикой и поздним оказанием патогенетического лечения [1].

Согласно концепции ферментативной теории, развитие острого панкреатита начинается с активации энзимов поджелудочной железы по иным или другим причинам, с последующим повреждением своих тканей и их поступлением в кровообращение [2].

Формирование эндогенной ферментативной интоксикации запускает активацию системного воспалительного ответа, что приводит к прогрессированию заболевания и развитию грозных осложнений [3].

Для поддержания гомеостатического состояния внутренней среды требуется иммунный ответ, который заключается в возбуждении защитных реакций организма, усилении механизмов распознавания токсико-действующих веществ, обезвреживании, поглощении и удалении антигенных детерминант [4].

Изменения в системе иммунитета, находясь в обратной зависимости от глубины и распространении патоморфологических изменений в панкреасе, совместно обременяют друг друга и срывают механизм межсистемной регуляции [5]. Полиморфонуклеары, являющиеся классическими фагоцитами, обладают подвижностью, адгезивностью, высвобождением биологически активных веществ и сильного антибактериального агента (миелопероксидаза), способностью к хемотаксису и фагоцитозу и др. [6].

В клинической практике используются оценочные иммунный статус-тесты, основанные на химических свойствах азогидразонов (анализ восстановления нитросинего тетразолия (НТС)) – соединения $(R_1N=N-CR_2=N-NHR_3)$ – в образовании тетразолиевых свободных радикалов, и содержаниях лизосомально-катионных белков (ЛКБ) [7].

Отмечено, что результат НТС-теста позволяет оценить функциональные резервы фагоцитов в результате активации метаболической, пероксидазных и кислородозависимых систем биоцидности. С другой стороны, ЛКБ-тест определяет неэнзимные катионные протеины, признанные самыми агрессивными и многофункциональными по механизму бактерицидного эффекта, и отражает кислородонезависимые реакции биоцидности [8].

Цель исследования: изучить функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов в условиях острого панкреатита различной тяжести.

Материалы и методы исследования

В основу работы входили результаты клинико-лабораторных и инструментальных исследований 51 пациента с острым панкреатитом, рандомизированных по полу, возрасту, давности патологии, этиологии возникновения, степени тяжести, клиническо-лабораторно-инструментальным данным, биохимическим анализам активности нейтрофильных лейкоцитов и разделенных на две группы:

первая (n=28) – в состав которой включены больные ОП легкой тяжести, и вторая группа (n=23) – с тяжелой степенью.

В то же время ряд показателей изучен у здоровых добровольцев (n=18) в возрасте от 24 до 57 лет обоего пола для сравнения с нормой.

Данная работа проведена на кафедре факультетской хирургии Медицинского института МГУ им. Н.П. Огарева, базирующейся в РКБ им. С.В. Каткова, г. Саранск.

Тяжесть пациентов оценена с помощью шкалы APACHE-II при их госпитализации в клинику. При этом отмечено, что сумма полученных баллов у больных I группы составила $3,5 \pm 0,24$ балла, а у II – $11,5 \pm 0,61$ баллов. Известно, что при количестве баллов шкалы более 9 определяется тяжелая форма.

Причиной развития острого панкреатита у пациентов являлось злоупотребление алкоголем и алиментарными факторами (68,6%) и желчнокаменной болезнью (31,4%).

Среди больных мужского возраста был 31 человек, женского – 20. При этом возрастная медиана составила 44 года, а интерквартильный размах 25-75% – 31-57 лет (мужчины – 41 год, ИКР – 26-57 лет, женщины – 48 лет, ИКР – 30-59 лет).

Пациентам данной работы при поступлении в хирургический стационар проведена базисная терапия, в схему которой включены: цитостатический (5-фторурацил по 10–15 мг/кг или циклофосфан по 1–1,5 мг/к), инфузионный (глюкозо-инсулиновые растворы по 800,0 мл 5% глюкозный раствор с инсулином 1 ед. на 4 г сухого вещества глюкозы, раствор Рингера или другой солевой раствор по 800,0 мл), спазмолитический (платифиллин 0,2% – 1,0, папаверин 2% - 2,0 мл, баралгин 2,0–3,0 мл, но-шпа 2% – 2,0 мл по 2–3 раза в сутки), антигистаминный (димедрол 1% - 1,0 мл), антибактериальный (цефазолин 2,0 г на 200 мл раствора хлорида натрия) компоненты.

Тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) является окислительно-восстановительным индикатором. Нитросиний тетразолий, поступая в нейтрофилы, подвергается рекреации и преобразуется в нерастворимый формазан при участии кофермента никотинамидадениндинуклеотида. 0,05 мл венозной крови вносили на лунки планшета, затем добавляли раствор НСТ по 0,05 мл 0,2%. Далее смесь инкубировали в термостате при $t +37,5$ °С на 30 мин. Затем мазок средней толщины делали и фиксировали в растворе метанола на 5 мин. После того докрашивали раствором сафранина (0,5%) по 3–5 мин. Под микроскопом подсчитали 100 сегментоядерных нейтрофилов и определяли процент положительно реагирующих с НСТ клеток.

Содержание лизосомально-катионных белков (ЛКБ) определено с помощью красителей анионного типа (бромфенолового синего). Высушенный мазок венозной крови был фиксирован в течение 60–90 с в 5% сульфосалициловой кислоте и тщательно промыт

дистиллированной водой. Этот мазок окрашивали в растворе бромфенолового синего (0,1%) в течение 1–2 мин., затем промывали в боратном буфере по 4–6 мин. и высушивали. Гранулы катионных протеинов окрашивались в синий цвет. Далее вычисляли средний цитохимический коэффициент (СЦК) с помощью полуколичественного метода и по формуле Астальди-Верга.

Полученные цифровые результаты были обработаны с помощью метода вариационной статистики при использовании критерия t Стьюдента для определения статистической значимости средних величин как в случаях сравнения независимых выборок, так и при соотношении связанных групп. Для этого использовали Microsoft Word 2016, Microsoft Excel 2016 и программу Statistic 12.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Острый панкреатит разного характера течения сопровождался повышенной активацией иммунного ответа с первых суток, причем прослеживалась различная динамика перераспределения пулов нейтрофильных гранулоцитов в сопряженности с тяжестью патологии и периодом принимаемого лечения согласно анализу лизисомально-катионных белков и показателям теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-теста) (рис. 1, 2 и таблица).

Динамика цитохимической активности нейтрофильных гранулоцитов при остром легком панкреатите ($M \pm m$)

Показатель	Норма	Группы исследования	Этапы наблюдения, сут.				
			1	2	3	4	5
НСТ-тест-индуцированный, %	42,47 ±2,67	I (n=28)	51,47 ±3,99	55,49 ±4,25	59,17 ±3,71	61,04 ±2,97	48,13 ±3,46
		II (n=23)	61,33 ±4,65*	69,52 ±5,65*	73,76 ±5,22*	81,11 ±5,04*	74,24 ±5,11*
СЦК НСТ-теста, у.е.	0,66 ±0,04	I (n=28)	1,09 ±0,11	1,16 ±0,04	1,23 ±0,08	1,05 ±0,08	0,75 ±0,02
		II (n=23)	1,48 ±0,09*	1,62 ±0,10*	1,58 ±0,08*	1,75 ±0,06*	1,43 ±0,04*
ЛКБ-тест СЦК, у.е.	1,53 ±0,03	I (n=28)	1,94 ±0,04	1,81 ±0,03	1,76 ±0,02	1,69 ±0,03	1,62 ±0,02
		II (n=23)	2,19 ±0,06*	2,36 ±0,08*	2,47 ±0,06*	2,31 ±0,03*	1,89 ±0,06*

Примечания. Жирный шрифт – достоверность данных по отношению к данным нормы при $p < 0,05$. * – достоверность данных по отношению к данным первой группы при $p < 0,05$.

Согласно результатам спонтанного НСТ-теста установлено, что у пациентов с острым легким панкреатитом в ранние сроки поступления в клинику и через 2, 3 и 4 суток отмечался

прирост содержания лейкоцитов на 17,2, 20,6, 25,4 и 35,7% ($p < 0,05$) соответственно. В последующие сроки содержание лейкоцитов в крови соответствовало нормальным значениям (рис. 1).

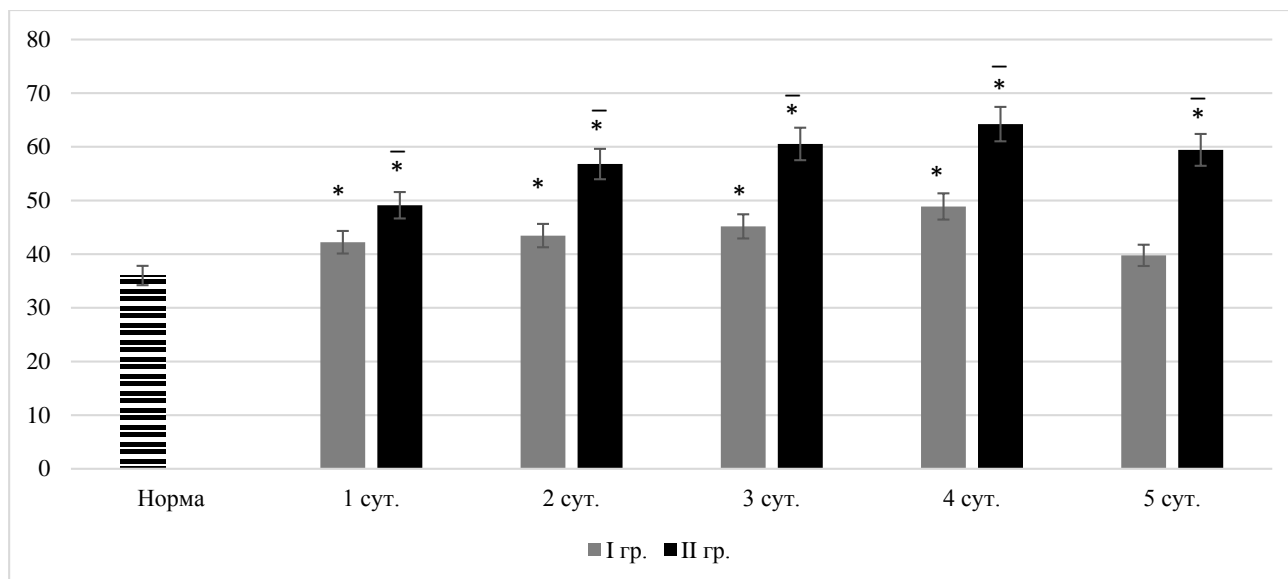


Рис. 1. Динамика спонтанного НСТ-теста при остром панкреатите

*Примечания здесь и далее: * – достоверность данных по отношению к данным нормы при $p < 0,05$;
 – – достоверность данных по отношению к данным первой группы при $p < 0,05$*

Большой клинический интерес по данному же тесту вызвали результаты во второй группе пациентов, у которых был острый панкреатит тяжелой формы, где отмечалось высокое содержание сегментоядерных нейтрофилов на протяжении всего периода наблюдения по отношению к норме на 36,3–78,3% ($p < 0,05$) и первой группе (пациенты с легкой степенью острого панкреатита) на 30,7–49,3% ($p < 0,05$) (рис. 1).

При изучении фагоцитарной активности сегментоядерных гранулоцитов (НГ) по индуцированному НСТ-тесту при остром панкреатите как легкой тяжести, так и тяжелой нами выявлено, что эта функциональная способность была повышена: в первой группе такая реакция фиксировалась на 1-2-3-4-м этапах исследовательского периода на 21,1–39,3% ($p < 0,05$), а к 5-м суткам стандартной терапии приближалось к нормальному ответу (таблица).

Между тем в группе с тяжелым характером заболевания иммунный процесс был активный в течение всех суток на 44,4–90,9% ($p < 0,05$). По данным этого исследования обращаем внимание на то, что реакция иммунной защиты ассоциировалась с тяжестью патологии, так как значение НГ во 2-й группе по данному тесту превышало первую во все время наблюдения на 25,2–54,1% ($p < 0,005$) (таблица).

Систематическое исследование цитохимических особенностей согласно показателям среднего цитохимического коэффициента (СЦК) спонтанного НСТ-теста позволило установить, что у больных острым панкреатитом первой группы он был существенно (на 72,8%) повышен при поступлении и во 2-4-й день проведения стандартного лечения – на 47,4–16,9% ($p < 0,05$) (рис. 2).

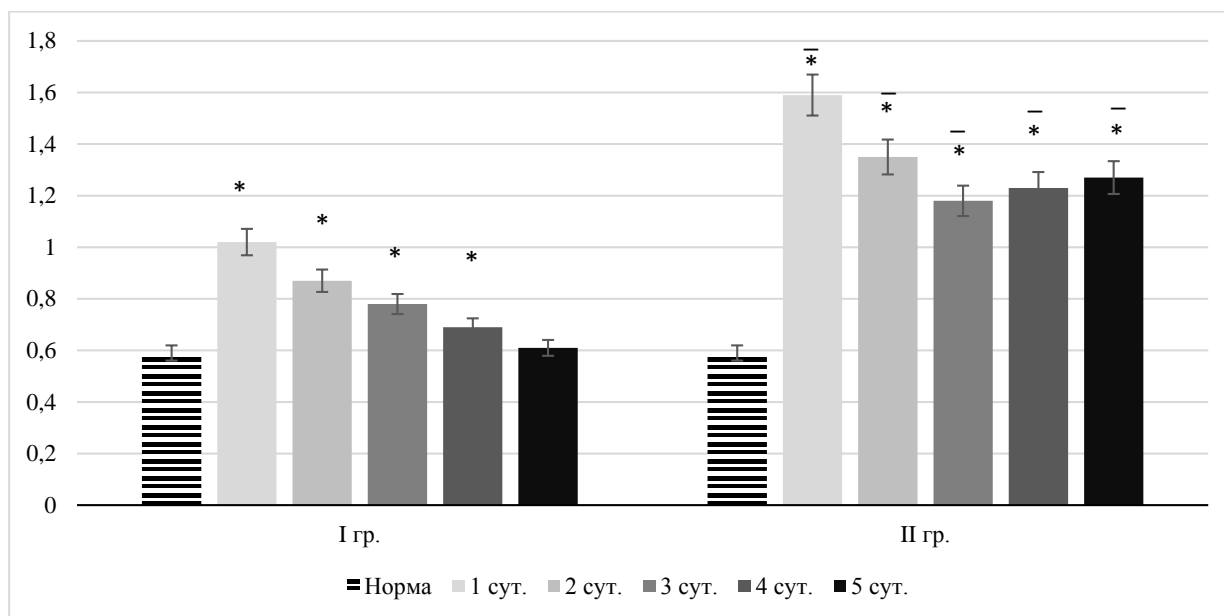


Рис. 2. Динамика СЦК НСТс-теста при остром панкреатите

Прогрессирование течения заболевания несло свое влияние на процесс иммунного ответа в виде усиления интенсивности, поскольку цитохимическая реакция во II группе на всех сутках исследовательского периода преувеличивала нормальный уровень на 169,4–115,2% ($p < 0,05$), а в I группе на 55,8–108,1% ($p < 0,05$) (рис. 2).

Согласно цитохимической реакции индуцированного НСТ-теста установлено, что острый панкреатит сопровождался токсогенной зернистостью нейтрофилов, которая было сопряжена со степенью тяжести, что определяет развитие «метаболического взрыва», активацию пероксидазных систем и отражает кислородозависимые процессы биоцидности. В первой группе результат данного теста превышал нормальный уровень в первые 4 суток на 75,4–59,0% ($p < 0,05$). При этом к последнему этапу исследования активность НГ приближалась вплотную к норме (таблица).

Во второй группе цитохимическая запись была существенно высока на всех сроках наблюдения не только к нормальному уровню – на 124,2–165,1% ($p < 0,05$). Всё-таки значительная активация фагоцитарного процесса в данной группе подтвердилась и при сравнении с результатом первой группой, в которой содержание НСТи-теста было ниже на – 39,6–90,5% ($p < 0,05$) (таблица).

При изучении полученных данных ЛКБ-теста отмечено, что у пациентов с легким острым панкреатитом при госпитализации содержание ЛКБ возросло на 26,7% ($p < 0,001$) по отношению к исходному показателю. Повышенное (на 18,3%) количество их сохранялось и в последующие сутки. Через 3 и 4 суток содержание ЛКБ падало и по сравнению с нормой снижалось на 15,0 и 10,4% ($p < 0,05$) соответственно. В срок 5 суток их уровень приближался к норме (таблица).

При остром панкреатите тяжелой степени выявлено повышение ЛКБ-показателя на первом этапе исследования на 43,1% ($p < 0,05$). Значения данного теста продолжались увеличиваться в последующие сутки (2, 3 и 4-е) на 54,2–61,4% ($p < 0,05$). К концу исследовательского периода результат этого анализа снижался по отношению к норме, но оставался выше на 23,5% ($p < 0,05$).

Выводы

Острый панкреатит уже в первые сроки после поступления пациентов в стационар сопровождается значительной активностью сегментоядерных лейкоцитов, сопряженной со степенью тяжести патологии.

При легкой форме заболевания повышение цитохимической активности нейтрофильных гранулоцитов, в основном за счет кислородозависимых процессов, наблюдается лишь на протяжении первых суток (4) периода исследования. Причем резервные возможности НГ, оцениваемые по СЦК НСТи-теста, снижаются начиная с 3-го дня болезни, а к концу нормализуются.

Наиболее резкие и значимые модификации нейтрофильных гранулоцитов наблюдаются у пациентов с острым тяжелым панкреатитом как в начальный период (1-3-е сутки), так и в конечный (4-5-е сутки). Значительный прирост показателей НСТ-теста, СЦК НСТи-теста и содержания ЛКБ в течение всего наблюдаемого срока заболевания свидетельствует о высокой активации гранулоцитарных нейтрофилов и их функциональном и метаболическом ответе респираторным взрывом на развитие острого воспаления в поджелудочной железе.

Список литературы

1. Барсук А.В., Нарсия В.В., Славинский А.А. Активация нейтрофильных лейкоцитов периферической крови у больных острым панкреатитом // Современные наукоемкие технологии. 2012. № 8. С. 8–9.
2. Галкин А.А., Демидова В.С. Нейтрофилы и синдром системного воспалительного ответа // Журнал имени профессора Б.М. Костюченка. 2015. Т. 2. С. 25–31.

3. Егоров В.И. Кучерявый Ю.А. Заболевания поджелудочной железы: книга для пациентов. М., 2014. 46 с.
4. Zhi-wen Yang, Xiao-xiao Meng, Ping Xu. Central role of neutrophil in the pathogenesis of severe acute pancreatitis. *J. Cell. Mol. Med.* 2015. № 19 (11). P. 2513–2520.
5. Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Кудряцев И.В., Медведов А.Ю., Мошев А.В., Гвоздев И.И. Фенотипический состав и функциональная активность моноцитов у больных острым панкреатитом // *Медицинская иммунология.* 2017. Т. 19. № 1. С. 45–54.
6. Hahn J., Knopf J., Maueröder C., Kienhöfer D., Leppkes M., Herrmann M. Neutrophils and neutrophil extracellular traps orchestrate initiation and resolution of inflammation. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2016. V. 34. P. 6-8.
7. Saluja A., Dudeja V., Dawra R., Sah RP. Early Intra-Acinar Events in Pathogenesis of Pancreatitis. *Gastroenterology.* 2019. V.156 (7). P. 1979–1993.
8. Винник Ю.С., Дунаевская С.С., Антюфьева Д.А. Диагностическая роль интегральных гематологических показателей и хемилюминесценции нейтрофилов при тяжелом остром панкреатите // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2016. № 10. 86–90.