

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ

**Савченко А.А.^{1,2}, Борисов А.Г.^{1,2}, Здзитовецкий Д.Э.²,
Кудрявцев И.В.^{3,4,6}, Медведев А.Ю.⁵, Мошев А.В.¹, Гвоздев И.И.¹**

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

² ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

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

⁴ ФГАУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

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

⁶ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Целью исследования явилось изучение особенностей субпопуляционного состава и функциональной активности моноцитов у больных острым панкреатитом. Обследовано 33 больных острым панкреатитом средней и тяжелой степени тяжести. В качестве контроля обследовано 35 здоровых людей аналогичного возрастного диапазона. Исследование фенотипа моноцитов крови проводили методом проточной цитометрии. Уровень фагоцитоза моноцитов определяли методом проточной цитометрии с помощью FITC-меченного стафилококкового белка А. Подсчитывали процент флуоресцирующих моноцитов (определяли как фагоцитарный индекс) и средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число). Показатели фагоцитоза определяли как в общей фракции моноцитов, так и в отдельных субпопуляциях (CD14⁺CD16⁻, CD14^{dim}CD16⁺ и CD14^{low}CD16⁺). Состояние респираторного взрыва моноцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа. Использовали два индикатора (люцигенин и люминол) для оценки уровня синтеза первичных и вторичных активных форм кислорода. У больных острым панкреатитом установлены изменения в субпопуляционном составе моноцитов в крови и их функциональной активности. Изменения в субпопуляционном составе моноцитов при остром панкреатите определяются увеличением количества провоспалительных клеток в крови (CD14^{low}CD16⁺) при сохранении содержания «классических» (CD14⁺CD16⁻) и «неклассических» (CD14^{dim}CD16⁺) фракций на уровне контрольного диапазона. Предполагается, что высокое содержание провоспалительных моноцитов формирует патогенетическое «кольцо», характеризующее положительную взаимную стимуляцию местного (в ткани поджелудочной железы) и системного (за счет моноцитов крови) воспаления. По-видимому, именно формирование подобного взаимного стимулирования воспалительных процессов и определяет низкую эффективность противовоспалительной терапии острого панкреатита. Особенности функциональной активности моноцитов у больных острым панкреатитом характеризуются снижением фагоцитарной активности и снижением ин-

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-29-29.
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) 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Савченко, А.Г. Борисов, Д.Э. Здзитовецкий,
И.В. Кудрявцев, А.Ю. Медведев, А.В. Мошев, И.И. Гвоздев
«Фенотипический состав и функциональная активность
моноцитов у больных острым панкреатитом»
// Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 1. С. 45-54.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-45-54

© Савченко А.А. и соавт., 2017

For citation:

A.A. Savchenko, A.G. Borisov, D.E. Zdzitovetskiy, I.V. Kudryavtsev,
A.Yu. Medvedev, A.V. Moshev, I.I. Gvozdev "Phenotypic profile
and functional activity of monocytes in the patients with acute
pancreatitis", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 45-54.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-45-54

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-45-54>

тенсивности респираторного взрыва. Снижение фагоцитарной активности моноцитов выявляется для всех субпопуляций клеток. Понижение интенсивности респираторного взрыва моноцитов при остром панкреатите определяется низким фоновым и индуцированным синтезом первичных и вторичных активных форм кислорода. При этом у больных острым панкреатитом выявляется дисбаланс в метаболических резервах моноцитов для синтеза первичных и вторичных активных форм кислорода, который может формироваться как за счет патологического влияния на клетки высокого уровня панкреатических ферментов в крови, так и за счет повышения концентрации провоспалительных цитокинов. Субпопуляционный дисбаланс моноцитов и снижение их функциональной активности при остром панкреатите может являться иммунопатогенетической основой для развития панкреонекроза и сепсиса.

Ключевые слова: перитонит, динамика послеоперационного периода, нейтрофилы, фагоцитоз, респираторный взрыв, активные формы кислорода

PHENOTYPIC PROFILE AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF MONOCYTES IN THE PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS

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

^a Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

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

^d Far Eastern Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

^e N.S. Karpovich Inter-district Critical Care Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

^f The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of this study was to evaluate some features of subpopulational profile and functional activity of monocytes in patients with acute pancreatitis. The study included 33 subjects with acute pancreatitis of middle-to-severe degree. Thirty-five healthy age-matched people served as a control group. The study of monocyte phenotype was performed by flow cytometry. Phagocytic ability of monocytes was determined by flow cytometry, by means of FITC-labeled staphylococcal protein A. We assessed percentage of fluorescent monocytes (defined as phagocytic index), like as average cell fluorescence (phagocytic number). The phagocytic indexes were determined for a total monocyte fraction, and well as for distinct cell subpopulations (CD14⁺CD16⁻, CD14^{dim}CD16⁺ и CD14^{low}CD16⁺). Intensity of respiratory burst in the monocytes was evaluated with chemiluminescence analysis. We used two indicators (lucigenin and luminol) to assess production of primary and secondary reactive oxygen species. In the patients with acute pancreatitis, we have found certain changes in blood monocyte subpopulations and their functional activity. The changes in monocyte subpopulations in acute pancreatitis were characterized by increased numbers of inflammatory cell forms in blood (CD14^{low}CD16⁺), along with while near-normal contents of the cells with «classic» (CD14⁺CD16⁻) and «non-classical» phenotype (CD14^{dim}CD16⁺), having been within reference ranges. It is assumed that high levels of pro-inflammatory monocytes may produce a pathogenetic «circuit» which is characterized by positive mutual stimulation of monocyte-mediated inflammation in local (pancreatic) and blood compartments. Apparent development of such mutual induction of inflammatory events may determine a low efficiency of anti-inflammatory therapy in acute pancreatitis. The functional characteristics of the monocytes in patients with acute pancreatitis are defined as a decrease in phagocytic activity and low respiratory burst intensity. Reduced phagocytic activity of monocytes was detectable in all the cellular subpopulations. Decreased intensity of monocytic respiratory burst in acute pancreatitis depends on low background and induced synthesis of both primary and secondary reactive oxygen species. Thus the patients with acute pancreatitis exhibit imbalanced with respect to synthesis of primary and secondary reactive oxygen species in the monocytes may result from specific action of circulating pancreatic enzymes upon the cells, or due to increased concentrations of pro-inflammatory cytokines. The imbalance between the monocyte subpopulations and reduction of their functional activity in acute pancreatitis may represent an immunopathogenetic basis for development of pancreatic necrosis and sepsis.

Keywords: peritonitis, post-surgical period, neutrophils, phagocytosis, respiratory burst, reactive oxygen species

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

Введение

На сегодняшний день острый панкреатит (ОП) входит в число наиболее часто встречающихся острых хирургических заболеваний органов брюшной полости и составляет в структуре «острого живота» 28-45% [1, 13]. Летальность от деструктивного панкреатита (пакреонекроз), который является наиболее тяжелой формой ОП, уже длительное время не меняется и составляет 18-25% [2, 21]. При этом пакреонекроз является достаточно распространенной патологией – в странах Европы он развивается у 15-20%, а в России, по разным данным, – у 25-44% пациентов с ОП [1, 13, 21]. Все это определяет необходимость поиска новых, более эффективных, патогенетически ориентированных методов лечения ОП.

При ОП запускается каскад воспалительных реакций, затрагивающий все системы, приводящий к значительным сдвигам в гомеостазе, развитию системного воспаления и к полиорганной недостаточности [1, 20, 23]. Одной из клеточных популяций, принимающих активное участие в воспалении, являются моноциты. Необходимо отметить, что моноциты, с одной стороны, играют ведущую роль в реализации реакций врожденного иммунитета (фагоцитоз, продукция активных форм кислорода, выделение медиаторов, дифференцировка в макрофаги), с другой стороны – в регуляции и запуске реакций адаптивного иммунитета (за счет синтеза иммунорегуляторных цитокинов и в качестве антигенпрезентирующих клеток) [3, 6, 16].

Моноциты крови долгое время рассматривались в качестве единой группы клеток. Однако на основании функциональной активности и экспрессии некоторых поверхностных антигенов подразделяются на несколько различных популяций [3, 6, 9]. Так, по уровням экспрессии рецепторного комплекса для бактериального липосахариды CD14 и высокоаффинного рецептора Fc γ CD16 циркулирующие моноциты можно разделять как минимум на две популяции. Клетки, экспрессирующие только CD14, принято называть «классическими моноцитами». Это фракция активно фагоцитирующих клеток, в норме они составляют до 95% от общего числа циркулирующих моноцитов. Моноциты, об-

ладающие фенотипом CD14^{low}CD16⁺, определяются как «неклассические» [15, 26]. Увеличение количества последних имеет место при различных патологических процессах, включая сепсис, острые и хронические воспалительные заболевания вирусной и бактериальной этиологии и т.д. В ряде случаев выделяют дополнительную группу моноцитов с фенотипом CD14^{dim}CD16⁺ или CD14⁺⁺CD16⁺, которые принято называть «промежуточными» [15].

Среди функциональных проявлений моноцитов, важную роль играет респираторный взрыв, который реализуется в виде синтеза первичных и вторичных активных форм кислорода (АФК) и развивается при взаимодействии клеток с объектом фагоцитоза [6, 9, 18]. Обсуждается значение синтеза ряда АФК в системе внешнего киллинга.

Важную роль в патогенезе ОП играют ферменты поджелудочной железы, попавшие в кровь и токсически воздействующие на клетки [1, 13, 20]. Подобное воздействие на моноциты может привести к изменению их функциональной активности, что, соответственно, повлияет на течение воспалительной реакции и клиническое состояние больных.

Таким образом, целью исследования явилось изучение особенностей субпопуляционного состава и функциональной активности моноцитов у больных ОП.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 33 больных ОП (19 мужчин и 14 женщин) средней и тяжелой степени тяжести, проходивших лечение в отделениях хирургии и отделении реанимации и интенсивной терапии КБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича» г. Красноярск. Средний возраст больных составил 46,8 \pm 6,4 года. Из исследования были исключены больные с ОП легкой степени и те, у которых ОП явился осложнением травмы брюшной полости, в том числе и послеоперационный. Исходную степень тяжести состояния больных определяли по шкале SAPS II [17]. Для оценки тяжести ОП 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 [24]. При оценке степени тяжести синдрома системной воспалительной реакции придерживались критериев ACCP/SCCM [11].

В качестве контроля обследовано 35 здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипа моноцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA), меченных PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующей панели: CD14-PE/CD45-ECD/HLA-DR-PC5/CD16-PC7. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [4]. Подготовку образцов периферической крови для анализа осуществляли по стандартной методике [7]. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, USA) [19]. В каждой пробе анализировали не менее 50000 моноцитов.

Уровень фагоцитоза моноцитов определяли методом проточной цитометрии с помощью FITC-меченного (fluorescein isothiocyanate) стафилококкового белка А [5]. Конъюгацию выполняли следующим образом: к стафилококковому белку А (разведен в бикарбонатном буфере, рН = 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-меченного 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 моноцитов FITC-меченного белка А к суспензии клеток добавляли раствор трипанового синего (0,2 мг/мл). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (BeckmanCoulter, USA). В каждой пробе анализировали не менее 50000 моноцитов. Подсчитывали процент флуоресцирующих моноцитов (определяли как фагоцитарный индекс – ФИ) и средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число – ФЧ). Показатели фагоцитоза определяли как в общей фракции моноцитов, так и в отдельных субпопуляциях (CD14⁺CD16⁻, CD14^{dim}CD16⁺ и CD14^{low}CD16⁺).

Моноциты периферической крови получали стандартным методом адгезии к плоским поверхностям из мононуклеарных клеток, выделенных из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077$) [14]. Состояние респираторного взрыва моноцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа [8]. В качестве индикаторов хемилюминесценции использовали люминол и люцигенин. Оценка спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществлялась в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе CL3606 (Россия). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (Tmax), максимальное значение интенсивности (Imax), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции (Синд.) к площади спонтанной (Сспонт.) и определяли как индекс активации (Синд./Сспонт.).

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 ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты

При исследовании содержания и цитометрической оценки субпопуляционного состава моноцитов в крови у больных ОП обнаружено, что у обследуемых пациентов относительно контрольных значений снижено процентное количество, но повышено абсолютное содержание общих моноцитов (табл. 1). Такая особенность соотношения процентного и абсолютного уровня клеток связана со значительным повышением количества лейкоцитов в периферической крови у больных (Me = $16,00 \times 10^9$ /л, $Q_{0,25}$ = $12,10 \times 10^9$ /л и $Q_{0,75}$ = $19,40 \times 10^9$ /л) относительно контрольного

диапазона ($Me = 5,75 \times 10^9/\text{л}$, $Q_{0,25} = 4,78 \times 10^9/\text{л}$ и $Q_{0,75} = 7,20 \times 10^9/\text{л}$). У больных ОП повышено абсолютный уровень моноцитов с фенотипом $CD14^+CD16^-$, а также относительное и абсолютное содержание клеток с фенотипом $CD14^{\text{dim}}CD16^+$.

Исследование фагоцитарной активности позволило установить, что у больных ОП относительно контрольных значений значительно снижено ФИ общей фракции моноцитов (см. табл. 1). Также обнаружено, что у обследованных пациентов ФИ снижен у моноцитов с фенотипом $CD14^+CD16^-$ (в 2,3 раза по сравнению с контролем) и $CD14^{\text{dim}}CD16^+$ (в 2,5 раза), тогда как у фракции моноцитов с фенотипом $CD14^{\text{low}}CD16^+$

снижена величина и ФИ (в 2,1 раза) и ФЧ (в 2,7 раза).

При исследовании активности люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов установлено, что у больных ОП снижены максимумы интенсивности и площади под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции по сравнению с показателями контрольной группы (табл. 2). Причем снижение показателей относительно нормы индуцированной хемилюминесценции более выражено, чем спонтанной, что приводит к понижению у обследованных пациентов индекса активации люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов.

ТАБЛИЦА 1. ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ПОКАЗАТЕЛИ ФАГОЦИТОЗА МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. PHENOTYPIC PROFILE AND PHAGOCYTOSIS IN PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS, MEDIAN VALUES ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	Контроль, n = 35 Control	Острый панкреатит, n = 33 Acute pancreatitis	p
Моноциты Monocytes, %	6,00 (4,0-8,0)	4,4 (2,2-6,9)	0,048
Моноциты Monocytes, $10^9/\text{L}$	0,35 (0,18-0,51)	0,45 (0,29-0,79)	0,017
$CD14^+CD16^-$, %	75,8 (66,3-85,8)	73,6 (58,1-86,5)	
$CD14^+CD16^-$, $10^9/\text{L}$	0,27 (0,12-0,44)	0,40 (0,22-1,33)	< 0,001
$CD14^{\text{dim}}CD16^+$, %	8,7 (4,1-14,4)	17,0 (11,3-23,5)	< 0,001
$CD14^{\text{dim}}CD16^+$, $10^9/\text{L}$	0,03 (0,01-0,07)	0,08 (0,05-0,17)	0,008
$CD14^{\text{low}}CD16^+$, %	3,8 (2,5-6,0)	3,1 (1,0-8,9)	
$CD14^{\text{low}}CD16^+$, $10^9/\text{L}$	0,01 (0,005-0,03)	0,01 (0,005-0,01)	
ФИ моноцитов PhI (monocytes), %	40,26 (11,77-83,11)	8,68 (5,82-12,13)	< 0,001
ФЧ моноцитов Phagoc. number (monocytes)	65,5 (24,8-103,0)	93,8 (37,6-99,1)	
ФИ $CD14^+CD16^-$ PhI $CD14^+CD16^-$, %	12,50 (4,54-26,50)	5,36 (3,46-9,48)	0,039
ФЧ $CD14^+CD16^-$ Phagoc. number $CD14^+CD16^-$	55,1 (39,9-80,5)	65,5 (52,0-68,7)	
ФИ $CD14^{\text{dim}}CD16^+$ PhI $CD14^{\text{dim}}CD16^+$, %	37,50 (14,28-50,71)	15,00 (11,11-24,71)	0,026
ФЧ $CD14^{\text{dim}}CD16^+$ Phagoc. number $CD14^{\text{dim}}CD16^+$	175,0 (43,9-342,0)	112,0 (52,2-250,0)	
ФИ $CD14^{\text{low}}CD16^+$ PhI $CD14^{\text{low}}CD16^+$, %	30,76 (15,94-40,00)	14,28 (8,33-33,33)	0,038
ФЧ $CD14^{\text{low}}CD16^+$ Phagoc. number $CD14^{\text{low}}CD16^+$	32,6 (21,6-175,0)	12,0 (7,8-36,4)	0,016

Note: PhI, phagocytic index.

ТАБЛИЦА 2. ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. CHEMILUMINESCENCE OF MONOCYTES IN THE PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS, MEDIAN VALUES (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль, n = 35 Control	Острый панкреатит, n = 33 Acute pancreatitis	p
Спонтанная люцигенин-зависимая хемилюминесценция Spontaneous lucigenin-dependent chemiluminescence			
Tmax, sec	2014 (1452-2604)	3359 (935-4853)	
I _{max} , OE × 10 ³	0,67 (0,40-1,51)	0,32 (0,26-0,39)	0,003
S, OE × sec. × 10 ⁵	0,79 (0,49-1,95)	0,19 (0,14-0,45)	< 0,001
Зимозан-индуцированная люцигенин-зависимая хемилюминесценция Zymosan-induced lucigenin-dependent chemiluminescence			
Tmax, sec	1835 (1576-2842)	1480 (905-2896)	
I _{max} , OE × 10 ³	2,89 (1,12-9,42)	0,50 (0,37-1,05)	< 0,001
S, OE × sec × 10 ⁵	4,23 (1,14-12,37)	0,34 (0,21-0,93)	< 0,001
Синд./ Спонт. S induced/ S spont	3,61 (1,65-8,03)	1,50 (1,10-3,05)	0,013
Спонтанная люминол-зависимая хемилюминесценция Spontaneous luminol-dependent chemiluminescence			
Tmax, sec	1810 (660-2575)	711 (244-4892)	
I _{max} , OE × 10 ³	6,29 (1,52-15,10)	0,33 (0,28-0,42)	< 0,001
S, OE × sec × 10 ⁵	6,89 (1,70-13,21)	0,21 (0,15-0,39)	< 0,001
Зимозан-индуцированная люминол-зависимая хемилюминесценция Zymosan-induced luminol-dependent chemiluminescence			
Tmax, sec	1150 (973-1808)	979 (631-1561)	
I _{max} , OE × 10 ³	11,60 (5,85-45,20)	3,13 (0,84-13,43)	0,042
S, OE × csec × 10 ⁵	11,53 (4,49-39,86)	2,21 (0,53-5,82)	0,006
Синд./ Спонт. S induced/ S spont	2,89 (1,72-3,80)	4,51 (2,18-19,64)	0,037

Исследование параметров респираторного взрыва моноцитов с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции позволило установить, что у больных ОП относительно показателей контрольной группы снижаются максимумы интенсивности и площади под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции. Однако, в данном случае показатели спонтанной хемилюминесценции понижены более выражено относительно контрольных значений, чем показатели индуцированной, что привело к увеличению величины индекса активации люминол-зависимой хемилюминесценции моноцитов у больных ОП.

Обсуждение

Воспалительная реакция у больных ОП характеризуется снижением процентного содержания моноцитов и увеличением их абсолютного количества за счет значительного выброса лейкоцитов. Функциональные особенности моноцитов в значительной степени определяются их субпопуляционным составом. Так, «классические» моноциты (CD14⁺CD16⁻) являются эффекторными клетками с высоким уровнем фагоцитоза и низким уровнем синтеза провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли-α и интерлейкин-1) [3, 9]. Именно для этих клеток характерна высокая активность респираторного взрыва [6].

«Неклассические» моноциты (CD14^{low}CD16⁺) являются небольшими по размеру клетками с низким уровнем фагоцитарной и оксидазной активности, что также сочетается с пониженной интенсивностью респираторного взрыва. На их поверхности экспрессированы молекулы CX3CR1, CD11c и HLA-DR, что позволяет им активно мигрировать через эндотелий и дифференцироваться в макрофаги и дендритные клетки [15, 26]. Субпопуляция «промежуточных» моноцитов с фенотипом CD14^{dim}CD16⁺ за счет активной продукции провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1, IL-6) определяется как провоспалительная [15].

В периферической крови больных ОП выявляется увеличение абсолютного содержания «классических» моноцитов, что, безусловно, связано с выбросом лейкоцитов в кровь при воспалительной реакции и соответствующим повышением абсолютного уровня общей фракции моноцитов. Содержание «неклассических» моноцитов сохраняется на уровне контрольного диапазона. Однако повышено количество «промежуточной» фракции моноцитов с провоспалительной функцией. Необходимо отметить, что важную роль в патогенезе ОП играет активация генов TNF α , IL-6, IL-8 и фактора активации тромбоцитов в ацинарных клетках поджелудочной железы [12, 22, 25]. В течение нескольких часов концентрация данных цитокинов в ткани поджелудочной железы возрастает, что определяет приток активированных клеток врожденного иммунитета и соответствующую стимуляцию воспаления. В связи с этим повышение количества провоспалительных моноцитов формирует патогенетическое «кольцо», которое определяет положительную взаимостимуляцию местного и системного воспаления при ОП: секреция провоспалительных цитокинов в ацинарных клетках поджелудочной железы стимулирует развитие местной воспалительной реакции, а также повышение количества провоспалительных моноцитов в крови, которые синтезируют провоспалительные цитокины и, соответственно, стимулируют активность системного и местного воспаления.

Выход в кровь панкреатических ферментов, безусловно, не может не повлиять на функциональную активность клеток, в том числе и на моноциты. Обнаружено, что при ОП снижен процент фагоцитирующих моноцитов в крови (ФИ). При этом выявляется снижение ФИ по всем субпопуляциям моноцитов. Причем для фракции CD14⁺CD16⁻ моноцитов характерно наиболее выраженное снижение уровня фагоцитирующих

клеток (в 4,6 раза по сравнению с контрольным уровнем). Тогда как количество фагоцитирующих CD14^{dim}CD16⁺ моноцитов снижается в 2,5 раза, а CD14^{low}CD16⁺ клеток – в 2,2 раза. При этом именно у провоспалительных моноцитов снижается и ФЧ, что указывает на снижение фагоцитарной активности самих моноцитов с фенотипом CD14^{low}CD16⁺.

Другим проявлением функциональной активности моноцитов является респираторный взрыв. Интенсивность респираторного взрыва исследована с помощью двух хемилюминесцентных индикаторов: люцигенина и люминола. Люцигенин окисляется и люминесцирует только под влиянием супероксид-радикала, который определяется как первичная АФК и синтезируется в системе НАДФН-оксидазы [6, 8, 10]. Необходимо также отметить, что люцигенин не проникает через клеточные мембраны. Соответственно, исследование люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов позволяет охарактеризовать состояние активности НАДФН-оксидазы цитоплазматической мембраны моноцитов. Обнаружено, что у больных ОП снижена фоновая и индуцированная интенсивность синтеза первичных АФК моноцитами крови. Причем индукция респираторного взрыва зимозаном не привела к повышению уровня синтеза первичных АФК, что отразилось на снижении величины индекса активации люцигенин-зависимой хемилюминесценции.

Цитотоксическая активность моноцитов определяется уровнем продукции как первичных, так и вторичных АФК (гидроксильный радикал, перекись водорода и др.). В формировании пула вторичных АФК принимают участие такие ферменты, как супероксиддисмутаза, каталаза, миелопероксидаза и др. Люминол способен вступать в хемилюминесцентную реакцию как с первичными, так и с вторичными АФК, хорошо проникает через различные клеточные мембраны, в том числе и лизосомальные [6, 8, 10]. У больных ОП выявляется снижение спонтанного и индуцированного уровня синтеза вторичных АФК, но с увеличением величины индекса активации люминол-зависимой хемилюминесценции.

Индекс активации характеризует уровень метаболических резервов для реакций синтеза соответствующих АФК. Снижение данного показателя при синтезе первичных АФК моноцитами крови у больных ОП определяется понижением уровня наработки НАДФН в клетках, что, прежде всего, может быть связано с ингибированием пентозофосфатного цикла (основного внутриклеточного процесса синтеза НАДФН).

В то же время повышение величины индекса активации люминол-зависимой хемилюминесценции моноцитов у больных ОП определяется индуцированной активацией ферментов синтеза вторичных АФК, прежде всего, в лизосомах клеток. Подобный дисбаланс может определяться как нарушениями физиологии моноцитов при ОП за счет высокой концентрации панкреатических ферментов в крови, так и регуляторными процессами, а именно высоким уровнем провоспалительных цитокинов [1, 13, 20].

Таким образом, у больных ОП установлены изменения в субпопуляционном составе моноцитов в крови и их функциональной активности. Изменения в субпопуляционном составе моноцитов при ОП определяются увеличением количества провоспалительных клеток в крови при сохранении содержания «классических» и «неклассических» фракций на уровне контрольного диапазона. Предполагается, что высокое содержание провоспалительных моноцитов формирует патогенетическое «кольцо», характеризующее положительную взаимную стимуляцию местного (в ткани поджелудочной железы) и системного (за счет моноцитов крови) воспаления. По-

видимому, именно формирование подобного взаимного стимулирования воспалительных процессов и определяет низкую эффективность противовоспалительной терапии ОП. Особенности функциональной активности моноцитов у больных ОП характеризуются снижением фагоцитарной активности и снижением интенсивности респираторного взрыва. Снижение фагоцитарной активности моноцитов выявляется для всех субпопуляций клеток. Понижение интенсивности респираторного взрыва моноцитов при ОП определяется низким фоновым и индуцированным синтезом первичных и вторичных АФК. При этом у больных ОП выявляется дисбаланс в метаболических резервах моноцитов для синтеза первичных и вторичных АФК, который может формироваться как за счет патологического влияния на клетки высокого уровня панкреатических ферментов в крови, так и за счет повышения концентрации провоспалительных цитокинов. Субпопуляционный дисбаланс моноцитов и снижение их функциональной активности при ОП может являться иммунопатогенетической основой для развития панкреонекроза и сепсиса.

Список литературы / References

1. Багненко С.Ф., Толстой А.Д., Краснорогов В.Б., Курыгин 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., Gol'tsov 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. Багненко С.Ф., Гольцов В.Р., Савелло В.Е., Вашетко Р.В. Классификация острого панкреатита: современное состояние проблемы // *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*, 2015. Т. 174, № 5. С. 86-92. [Bagnenko S.F., Gol'tsov V.R., Savello V.E., Vashetko R.V. Classification of acute pancreatitis: modern state of the problem. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova = Grekov Clinical Surgery Bulletin*, 2015, Vol. 174, no. 5, pp. 86-92. (In Russ.)]
3. Головкин А.С., Матвеева В.Г., Кудрявцев И.В., Григорьев Е.В., Великанова Е.А., Байракова Ю.В. Субпопуляции моноцитов крови при неосложненном течении периоперационного периода коронарного шунтирования // *Медицинская иммунология*, 2012. Т. 14, № 4-5. С. 305-312. [Golovkin A.S., Matveeva V.G., Kudryavtsev I.V., Grigoriev E.V., Velikanova E.A., Bairakova Y.V. Blood monocyte subpopulations during uncomplicated coronary artery bypass surgery. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 4-5, pp. 305-312. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2012-4-5-305-312>
4. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа // *Медицинская иммунология*, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-19-26>
5. 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.)]

6. Савченко А.А., Борисов А.Г., Модестов А.А., Мошев А.В., Кудрявцев И.В., Тоначева О.Г., Кошечев В.Н. Фенотипический состав и хемилюминесцентная активность моноцитов у больных почечно-клеточным раком // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 2. С. 141-150. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Modestov A.A., Moshev A.V., Kudryavtsev I.V., Tonacheva O.G., Koshcheev V.N. Monocytes subpopulations and chemiluminescent activity in patients with renal cell carcinoma. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 2, pp. 141-150. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-2-141-150>
7. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» (Проект) // Медицинская иммунология, 2012, Т. 14, № 3. С. 255-268. [Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standardized technology «Research of lymphocytes subpopulation composition in peripheral blood using flow cytometry analyzers» (Draft). *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2012-3-255-268>
8. 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. [Shkarova 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.)]
9. Appleby L.J., Nausch N., Midzi N., Mduluzi T., Allen J.E., Mutapi F. Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. *Immunol. Lett.*, 2013, Vol. 152, no. 1, pp. 32-41.
10. Benbarek H., Ayad A., Deby-Dupont G., Boukraa L., Serteyn D. Modulatory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of equine neutrophils. *Vet. Res. Commun.*, 2012, Vol. 36, no. 1, pp. 29-33.
11. 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.
12. Cen Y., Liu C., Li X., Yan Z., Kuang M., Su Y., Pan X., Qin R., Liu X., Zheng J., Zhou H. Artesunate ameliorates severe acute pancreatitis (SAP) in rats by inhibiting expression of pro-inflammatory cytokines and Toll-like receptor 4. *Int. Immunopharmacol.*, 2016, Vol. 38, pp. 252-260.
13. Choi S.B., Bae G.S., Jo I.J., Wang S., Song H.J., Park S.J. Berberine inhibits inflammatory mediators and attenuates acute pancreatitis through deactivation of JNK signaling pathways. *Mol. Immunol.*, 2016, Vol. 74, pp. 27-38.
14. Gordon S. Targeting a monocyte subset to reduce inflammation. *Circ. Res.*, 2012, Vol. 110, no. 12, pp. 1546-1548.
15. Hristov M., Schmitz S., Nauwelaers F., Weber C. A flow cytometric protocol for enumeration of endothelial progenitor cells and monocyte subsets in human blood. *J. Immunol. Methods*, 2012, Vol. 381, no. 1-2, pp. 9-13.
16. Lauvau G., Loke P., Hohl T.M. Monocyte-mediated defense against bacteria, fungi, and parasites. *Semin. Immunol.*, 2015, Vol. 27, no. 6, pp. 397-409.
17. 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.
18. Lundberg S., Lundahl J., Gunnarsson I., Jacobson S.H. Atorvastatin-induced modulation of monocyte respiratory burst *in vivo* in patients with IgA nephropathy: a chronic inflammatory kidney disease. *Clin. Nephrol.*, 2010, Vol. 73, no. 3, pp. 221-228.
19. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 191-200.
20. Maheshwari R., Subramanian R.M. Severe Acute Pancreatitis and Necrotizing Pancreatitis. *Crit. Care Clin.*, 2016, Vol. 32, no. 2, pp. 279-290.
21. Sato K., Monden K., Ueki T., Tatsukawa M., Sadamori H., Sakaguchi K., Takakura N. A case of pancreatic arteriovenous malformation identified by investigating the cause of upper abdominal pain associated with acute pancreatitis. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi*, 2016, Vol. 113, no. 7, pp. 1223-1229.

22. Schmidt A.I., Seifert G.J., Lauch R., Wolff-Vorbeck G., Chikhladze S., Hopt U.T., Wittel U.A. Organ-specific monocyte activation in necrotizing pancreatitis in mice. *J. Surg. Res.*, 2015, Vol. 197, no. 2, pp. 374-381.
23. Singh P., Garg P.K. Pathophysiological mechanisms in acute pancreatitis: Current understanding. *Indian J. Gastroenterol.*, 2016, Vol. 35, no. 3, pp. 153-166.
24. 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.
25. Yang Z.W., Meng X.X., Xu P. Central role of neutrophil in the pathogenesis of severe acute pancreatitis. *J. Cell Mol. Med.*, 2015, Vol. 19, no. 11, pp. 2513-2520.
26. Ziegler-Heitbrock L. Monocyte subsets in man and other species. *Cell Immunol.*, 2014, Vol. 289, no. 1-2, pp. 135-139.

Авторы:

Савченко А.А. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Борисов А.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Здзитовецкий Д.Э. — д.м.н., заведующий кафедрой ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Кудрявцев И.В. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток; 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

Мошев А.В. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Гвоздев И.И. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Authors:

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

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North; V.F. Voino-Yasenetsky State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

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

Medvedev A.Yu., Clinical Doctor, N.S. Karpovich Inter-district Critical Care Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

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

Поступила 26.07.2016
Принята к печати 29.08.2016

Received 26.07.2016
Accepted 29.08.2016