

## КЛИНИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫМ ГНОЙНЫМ ПЕРИТОНИТОМ В ДИНАМИКЕ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ПЕРИОДА

Савченко А.А.<sup>1</sup>, Черданцев Д.В.<sup>2</sup>, Первова О.В.<sup>2</sup>, Гвоздев И.И.<sup>1</sup>, Борисов А.Г.<sup>1</sup>, Шапкина В.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск

<sup>2</sup> Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск

### РЕЗЮМЕ

Целью исследования явилась оценка клинического состояния и изучение хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного лечения. Степень тяжести состояния больных определяли по шкале SAPS, наличие синдрома системной воспалительной реакции – по критериям ACCP/SCCM. Тяжесть и прогноз заболевания оценивали с помощью Мангеймского индекса перитонита и индекса брюшной полости. Наличие и степень выраженности полиорганной недостаточности при поступлении и в динамике послеоперационного периода определяли по шкале SOFA. Исследование люцигенин- и люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов при перитоните производили при поступлении в стационар, а также на 7-е, 14-е и 24-е сут послеоперационного периода. У обследованных больных с диагнозом «Распространенный гнойный перитонит 2-й степени тяжести» в 96,2% случаев наблюдались различные системные осложнения (третичный перитонит, перфорации полых органов, абсцессы брюшной полости и др.). Летальность среди обследованных составила 22,2%. При исследовании хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов установлено, что у больных перитонитом в до- и послеоперационном периодах интенсивность «дыхательного взрыва» определяется преимущественно уровнем синтеза вторичных активных форм кислорода. Уровень синтеза супероксид-радикала нейтрофилами, находящимися в состоянии относительного покоя, повышается только на 14-сут после операции и снижается до контрольных значений к 21-м сут. При индукции «дыхательного взрыва» уровень синтеза супероксид-радикала повышается на 7-е сут послеоперационного периода и остается высоким до конца наблюдения. За весь период наблюдения уровень синтеза вторичных активных форм кислорода нейтрофилами больных перитонитом повышен на фоне замедленной активации ферментов, обеспечивающих «дыхательный взрыв». К концу периода наблюдения (24-е сут послеоперационного периода) выявляется тенденция к нормализации хемилюминесцентной активности нейтрофилов крови больных перитонитом.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** перитонит, нейтрофилы, хемилюминесценция, активные формы кислорода, супероксид-радикал.

### Введение

Несмотря на совершенствование методов хирургического лечения и использование мощного арсенала средств интенсивной терапии, летальность при распространенном гнойном перитоните (РГП) сохраняется на уровне 32,0–43,9%, а в случае генерализации инфекции и развития полиорганной недостаточности-

достигает 75,8–100% [1, 2]. Течение перитонита, характер и особенности развития гнойных инфекционных осложнений определяются не только тяжестью основного патологического процесса, адекватностью оперативного вмешательства и медикаментозного лечения в периоперационном периоде, но и изменениями, происходящими в системе иммунитета [3–6]. Распространенный гнойный перитонит сопровождается избыточным поступлением в биологические среды организма микробных антигенов и бактериальных токсинов, источниками которых являются гнойно-

✉ Савченко Андрей Анатольевич, тел.: 8-905-971-3715; e-mail: aasavchenko@yandex.ru

деструктивные очаги в брюшной полости, перитонеальный экссудат и паралитически измененные петли кишечника [1, 4].

Нейтрофильные гранулоциты являются ключевыми клетками воспаления и представляют собой высокореактивное звено в иммунной системе. Они первыми мобилизуются в очаг воспаления, от их фагоцитарной активности во многом зависит эффективность противомикробной защиты организма [7–10]. Восприимчивая многочисленным сигналам о дестабилизации внутренней среды, нейтрофилы модулируют свои функции, нацеленные на ее восстановление. Активированные нейтрофилы сами становятся мощными факторами пусковых и регуляторных механизмов каскадных реакций, обеспечивающих развитие воспаления. Это связано с тем, что нейтрофильные гранулоциты способны не только в качестве эффекторов продуцировать цитотоксические молекулы, но и как регуляторные клетки синтезировать широкий спектр различных цитокинов [11, 12]. В связи с этим изучение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов позволит на клеточном уровне охарактеризовать особенности генеза воспалительных процессов при такой тяжелой хирургической патологии, как РГП.

Хемилюминесцентная активность характеризует состояние «респираторного взрыва» нейтрофильных гранулоцитов, которое развивается при взаимодействии клеток с объектами фагоцитоза [11, 13]. Обсуждается значение синтеза ряда активных форм кислорода (АФК) в системе внешнего киллинга [11, 14, 15]. Исследование особенностей хемилюминесцентной активности нейтрофилов у больных РГП позволит охарактеризовать механизмы воспалительного процесса, его регуляцию и в дальнейшем разработать методы прогноза характера течения и исхода заболевания.

Цель исследования – оценить клиническое состояние и изучить хемилюминесцентную активность нейтрофильных гранулоцитов больных РГП в динамике послеоперационного лечения.

## Материал и методы

На базе Красноярского краевого гнойно-септического центра Краевой клинической больницы г. Красноярска обследовано 27 пациентов в возрасте от 30 до 65 лет (средний возраст –  $(49,6 \pm 9,4)$  года) с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП. Из исследования исключали больных перитонитом, развившимся вследствие деструктивного панкреатита, мезентериального тромбоза, злокачественных новообразований брюшной полости IV стадии. Окончатель-

ная верификация диагноза осуществлялась интраоперационно. Степень тяжести состояния больных определяли по шкале SAPS [16], наличие синдрома системной воспалительной реакции – по критериям ACCP/SCCM [17]. Тяжесть и прогноз РГП оценивали с помощью Мангеймского индекса перитонита и индекса брюшной полости [18]. Наличие и степень выраженности полиорганной недостаточности при поступлении в стационар и в динамике послеоперационного периода определяли по шкале SOFA [19].

Забор крови для исследования хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов при РГП производили перед операцией (за 1 день), а также на 7-е, 14-е и 24-е сут послеоперационного периода. В качестве контроля обследовано 67 здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

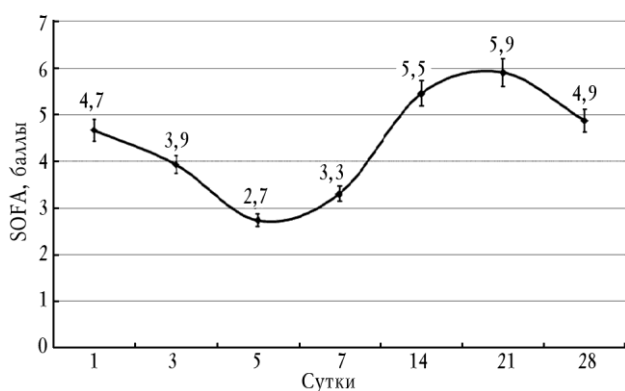
Нейтрофильные гранулоциты выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в двойном градиенте плотности фикографика:  $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$  – для отделения лимфоцитов,  $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$  – для выделения нейтрофилов. Реакционная смесь для хемилюминесцентной реакции состояла из 20 мкл донорской сыворотки AB(IV)Rh(-), 50 мкл люцигенина или люминола (Sigma, США) в концентрации  $10^{-5}$  моль, 40 мкл опсонизированного зимозана (в случае определения индуцированной хемилюминесценции), 200 мкл взвеси нейтрофилов (2 млн на 1 мл) и 240 мкл раствора Хэнкса («ПанЭко», Россия) для определения спонтанной хемилюминесценции или 200 мкл раствора Хэнкса – для индуцированной [20]. Выбор двух хемилюминесцентных индикаторов обусловливается необходимостью выделения в общем пуле активных форм кислорода (оценивается с помощью люминола) объема синтеза супероксид-радикала (определяется с помощью люцигенина) [11, 13, 20]. Оценку спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 мин на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе CL3606 (СКТБ «Наука», Красноярск). Определяли следующие характеристики хемилюминесцентной кривой: время выхода на максимум  $T_{\max}$ , характеризующее скорость развития хемилюминесцентной реакции, максимальное значение интенсивности  $I_{\max}$ , отражающее максимальный уровень синтеза АФК, а также площадь  $S$  под кривой хемилюминесценции, характеризующую суммарный синтез АФК за 90 мин исследования [11, 20]. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции к площади спонтанной ( $S_{\text{инд}}/S_{\text{спонт}}$ ) и определяли как индекс активации.

Все исследования выполнены с информированно-го согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Статистический анализ осуществляли при помощи пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007). Описание выборки производили с помощью подсчета медианы  $Me$  и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей ( $C_{25}$ – $C_{75}$ ). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни, достоверность различий в динамике лечения определяли по критерию Вилкоксона.

## Результаты и обсуждение

Наиболее частыми причинами развития перитонита у обследованных пациентов были острая кишечная непроходимость (25,9% случаев), травмы органов брюшной полости (22,2%), прободная язва желудка и двенадцатиперстной кишки (18,5%), острый аппендицит (14,8%), послеоперационный перитонит (11,1% случаев). У большинства больных распространенный гнойный перитонит сопровождался выраженными системными нарушениями. Показатели шкалы SAPS, превышающие 6 баллов, зарегистрированы у 74% пациентов. У 66,6% больных РГП исходно имелись признаки полиорганной дисфункции согласно интегральной шкале SOFA. При этом отмечено, что начиная с 7-х сут наблюдения значения этого показателя увеличивались и оставались повышенными до конца периода наблюдения (рисунок).



Динамика признаков тяжести общего состояния (SOFA) у больных распространенным гнойным перитонитом

Все пациенты были оперированы в течение 6 ч после установления диагноза РГП, в дальнейшем всем

проводились санационные операции. При первой операции Мангеймский индекс перитонита варьировал от 20,5 до 28,1 балла (в среднем был равен  $(24,7 \pm 3,4)$  балла), индекс брюшной полости составил 13,6 балла, что соответствовало 2-й степени тяжести перитонита.

Объем операции определялся в зависимости от источника перитонита. После устранения источника перитонита оперативным путем производили безаппаратную санацию брюшной полости, назоинтестинальную интубацию, дренирование брюшной полости четырьмя и более силиконовыми дренажами. Операцию заканчивали наложением лапаростомы. Число повторных санаций и сроки открытого ведения брюшной полости зависели от особенностей послеоперационного периода, тяжести перитонита, причин, его вызвавших, а также от индивидуальных особенностей организма больного. Санации выполняли регулярно каждые 36–48 ч. Купирование РГП с очищением раны брюшной стенки от некротических тканей и появлением грануляций служило показанием к закрытию лапаростомы. По требованию релапаротомии выполняли у тех больных, которые были доставлены в экстренном порядке рейсом санитарной авиации из районных больниц, или в случае возникновения послеоперационных осложнений с развитием разлитого перитонита.

После операции все пациенты находились на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии, сроки пребывания зависели от тяжести состояния больного. Перевод в хирургическое отделение производился после стабилизации витальных функций.

Для оценки клинической эффективности проводимого лечения анализировали характер местных и системных осложнений, количество релапаротомий, сроки купирования перитонита, регресс синдрома системной воспалительной реакции, летальность.

Всего обследованным больным перитонитом было выполнено 80 санаций, среднее количество операций на одного больного составило 3,0. Четверым больным (14,8%) потребовались две санационные операции для купирования явлений перитонита. Три санации выполнены у 7 (25,9%) больных, четыре – у 6 (22,2%), при этом неблагоприятный исход наблюдался в трех случаях. У остальных 10 (37,0%) пациентов явления перитонита были купированы, лапаростома закрыта. У 9 (33,3%) больных перитонит носил вялотекущий, плохо купируемый характер, что потребовало выполнения пяти и более санаций. Максимальное количество операций, выполненных у одного больного, составило 11.

Анализ частоты местных и системных осложнений показал, что у пациентов с РГП чаще развивались такие

системные осложнения, как третичный перитонит – у 9 (33,3%) больных, стрессовые перфорации полых органов – у 7 (25,9%), абсцессы брюшной полости – у 6 (22,2%), полиорганная недостаточность, септический шок и пневмония зарегистрированы у 4 (14,8%) пациентов. Летальность среди обследованных больных составила 22,2%.

На 1-е и 7-е сут обследования показатели спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов больных РГП не отличались от контрольных значений (табл. 1). На 14-е сут послеоперационного периода у пациентов РГП в 2,4 раза увеличивалась площадь под кривой хемилюминесценции, на 24-е сут выявлялось снижение максимума интенсивности спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции относительно контрольных значений и до контрольного уровня – площади под кривой хемилюминесценции. Изменение максимума интенсивности и площади под кривой спонтанной и хемилюминесценции характеризует повышенный уровень синтеза супероксид-радикала и отражает активацию нейтрофильных гранулоцитов.

При исследовании показателей зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции

нейтрофильных гранулоцитов установлено соответствие значений, выявленных у больных РГП, контрольным (табл. 2). На 7-е сут послеоперационного периода у обследованных пациентов в 2,4 раза повышается интенсивность максимума интенсивности относительно контрольных значений и существенно увеличивается площадь под кривой хемилюминесценции как относительно контрольных значений, так и диапазона, выявляемого у больных в дооперационном периоде. На 14-е сут послеоперационного периода обнаружено только превышение в 1,5 раза площади под кривой хемилюминесценции, на 24-е сут обследования наблюдается снижение в 3,9 раза максимума интенсивности зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции относительно значений, выявленных у больных РГП в дооперационном периоде, а также увеличение площади под кривой хемилюминесценции, чем у лиц контрольной группы. Кроме того, в указанный период обследования при РГП повышен индекс активации относительно величин, наблюдаемых в дооперационном периоде и на 14-е сут послеоперационного периода.

Таблица 1

Спонтанная люцигенин-зависимая хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов больных распространенным гнойным перитонитом в до- и послеоперационном периоде ( $Me$ , $C_{25}$ – $C_{75}$ )			
Группа	$T_{max}$ , с	$I_{max}$ , о.е. · 10 <sup>3</sup>	$S$ , о.е. · с · 10 <sup>5</sup>
Контроль (67 человек)	2380 (1698–3541)	7,26 (2,92–15,05)	3,12 (1,06–6,91)
<i>Больные распространенным гнойным перитонитом</i>			
Дооперационный период (27 человек)	1775 (1302–2921)	5,57 (1,21–14,08)	4,98 (1,09–16,00)
7-е сут после операции (25 человек)	1694 (1126–2551)	7,36 (2,56–17,23)	4,75 (2,85–12,00)
14-е сут после операции (21 человек)	1844 (891–4115)	8,46 (1,50–12,43)	7,63 (2,12–11,5) $p_1 < 0,001$
24-е сут после операции (21 человек)	2300 (1865–3444)	3,02 (2,08–5,61) $p_4 = 0,048$	3,58 (2,31–10,92) $p_2 = 0,036$

Примечание. Здесь и в табл. 3:  $p_1$  – статистически значимые различия по сравнению с показателями контрольной группы;  $p_2$  – относительно показателей больных, выявленных в дооперационном периоде;  $p_4$  – относительно показателей больных, выявленных на 14-е сут послеоперационного периода.

Таблица 2

Зимозан-индуцированная люцигенин-зависимая хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов больных распространенным гнойным перитонитом в до- и послеоперационном периоде ( $Me$ , $C_{25}$ – $C_{75}$ )				
Группа	$T_{max}$ , с	$I_{max}$ , о.е. · 10 <sup>3</sup>	$S$ , о.е. · с · 10 <sup>5</sup>	$S_{инд}/S_{сп}$
Контроль (67 человек)	2046 (1620–2710)	11,75 (7,58–27,71)	4,85 (2,94–9,94)	1,76 (1,12–3,19)
<i>Больные распространенным гнойным перитонитом</i>				
Дооперационный период (27 человек)	1748 (1489–2653)	7,84 (3,41–27,30)	8,96 (2,14–28,00)	1,79 (1,13–2,51)
7-е сут после операции (25 человек)	1706 (1485–2016)	28,32 (14,79–50,56) $p_1 = 0,033$	25,8 (16,44–27,90) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,012$	4,62 (1,46–8,22)

14-е сут после операции (21 человек)	1533 (708–4888)	7,85 (2,48–17,43)	7,33 (1,65–12,10) $p_1 < 0,001$	1,29 (0,69–2,11)
24-е сут после операции (21 человек)	2253 (1622–3756)	7,31 (4,78–12,82) $p_2 = 0,036$	10,81 (8,76–13,50) $p_1 = 0,013$	3,28 (1,40–4,99) $p_2 = 0,049$ $p_4 = 0,047$

При исследовании спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов обнаружено, что у пациентов с РГП в дооперационном периоде в 1,8 раза увеличивается время выхода на максимум, в 3,6 раза повышается максимум интенсивности и в 8,6 раза – площадь под кривой хемилюминесценции (табл. 3). Время выхода хемилюминесценции на максимум определяется длительностью периода наработки субстратов для ферментов, участвующих в «дыхательном взрыве» нейтрофилов [11, 13]. Следовательно, при РГП метаболическая система нейтрофилов более медленно реализует «дыхательный взрыв», что, возможно, обусловлено высоким уровнем синтеза вторичных АФКа. На 7-е и 14-е сут послеоперационного периода у больных РГП остаются повышенными относительно контрольных значений время выхода на максимум, максимум интенсивности и площадь под кривой хемилюминесценции. На 24-е сут обследования также наблюдается повышение времени выхода на максимум и максимума интенсивности спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов относительно контрольных значений, но при снижении величины площади под

кривой хемилюминесценции относительно показателей, выявленных у больных в дооперационном периоде.

При исследовании показателей зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов обнаружено, что у пациентов с РГП в дооперационном периоде в 3,4 раза повышен максимум интенсивности и в 9,7 раза площадь под кривой хемилюминесценции относительно показателей контрольной группы (табл. 4). Подобные особенности индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции выявляются и на 7-е сут послеоперационного периода. На 14-е сут обследования у больных РГП при сохранении повышенных значений максимума интенсивности и площади под кривой хемилюминесценции удлиняется время выхода на максимум относительно контрольного диапазона. На 24-е сут обследования максимум интенсивности только в 2,2 раза превышает контрольные значения, тогда как площадь под кривой хемилюминесценции – в 10 раз, сохраняется длительный период выхода на максимум хемилюминесценции.

Таблица 3

Спонтанная люминол-зависимая хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов больных распространенным гнойным перитонитом в до- и послеоперационном периоде ( $Me$ , $C_{25}$ – $C_{75}$ )			
Группа	$T_{max}$ , с	$I_{max}$ , о.е. · 10 <sup>3</sup>	$S$ , о.е. · с · 10 <sup>5</sup>
Контроль (67 человек)	1009 (615–1583)	8,97 (3,26–22,48)	2,74 (1,13–7,32)
<i>Больные распространенным гнойным перитонитом</i>			
Дооперационный период, (27 человек)	1804 (1133–2398) $p_1 = 0,005$	32,72 (8,79–44,61) $p_1 = 0,005$	23,51 (7,68–48,7) $p_1 < 0,001$
7-е сут после операции (25 человек)	1535 (1324–2685) $p_1 = 0,027$	31,05 (19,86–46,29) $p_1 = 0,002$	44,25 (29,65–58,3) $p_1 < 0,001$
14-е сут после операции (21 человек)	1589 (644–2020) $p_1 = 0,041$	36,73 (14,47–46,13) $p_1 = 0,008$	20,91 (9,59–29,6) $p_1 < 0,001$
24-е сут после операции (21 человек)	2004 (1511–3106) $p_1 = 0,014$	27,91 (12,32–43,26) $p_1 = 0,029$	3,58 (2,31–10,92) $p_2 = 0,049$

Таблица 4

Зимозан-индуцированная люминол-зависимая хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов больных распространенным гнойным перитонитом в до- и послеоперационном периоде ( $Me$ , $C_{25}$ – $C_{75}$ )				
Группа	$T_{max}$ , с	$I_{max}$ , о.е. · 10 <sup>3</sup>	$S$ , о.е. · с · 10 <sup>5</sup>	$S_{инд}/S_{сп}$
Контроль (67 человек)	1122 (814–1526)	18,02 (7,02–36,56)	5,82 (2,08–12,7)	1,73 (1,33–2,53)
<i>Больные распространенным гнойным перитонитом</i>				
Дооперационный период (27 человек)	1549 (684–2035)	60,93 (19,24–108,02) $p_1 = 0,002$	56,65 (17,5–104) $p_1 < 0,001$	2,28 (1,52–3,00)

7-е сут после операции (25 человек)	1230 (878–1604)	78,36 (54,87–97,24) $p_1 < 0,001$	66,21 (57,3–127,5) $p_1 < 0,001$	2,43 (1,09–3,62)
14-е сут после операции (21 человек)	1559 (1130–1889) $p_1 = 0,028$	48,14 (36,72–68,69) $p_1 = 0,010$	46,41 (21,6–62,9) $p_1 < 0,001$	1,27 (1,13–3,13)
24-е сут после операции (21 человек)	1720 (1127–2563) $p_1 = 0,032$	39,46 (23,55–80,77) $p_1 = 0,038$	58,23 (38,06–89,3) $p_1 < 0,001$	1,74 (1,26–2,06)

Течение и исход перитонита во многом определяются эффективностью воспалительных процессов и изменениями функциональной активности клеток, которые принимают участие в процессах воспаления. Нейтрофильные гранулоциты принимают самое активное участие в патогенезе перитонита [4, 21–23]. При этом генерация АФК является важным защитным механизмом, лежащим в основе реактивности данной популяции клеток [11, 13]. Доказано, что люцигенин окисляется и люминесцирует только под влиянием супероксид-радикала, который определяется как первичная активная форма кислорода и синтезируется в системе НАДФН-оксидазы [11, 13]. Следовательно, исследование люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов позволяет охарактеризовать состояние активности НАДФН-оксидазы в нейтрофильных гранулоцитах.

Обнаружено, что у больных РГП в дооперационном периоде уровень синтеза супероксид-радикала нейтрофилами соответствует контрольным значениям. На 7-е сут послеоперационного периода уровень спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции при РГП остается соответствующим контрольным значениям, тогда как активность зимозан-индуцированной хемилюминесценции значительно повышается. Спонтанная хемилюминесценция характеризует интенсивность синтеза АФК нейтрофилами в состоянии относительного покоя, определяющийся регуляторно-температурным воздействием инкубационной среды при термостатировании в кюветном отделении хемилюминесцентного анализатора. Введение в среду инкубации зимозана приводит к активации «дыхательного взрыва», что реализуется в виде высокого уровня синтеза первичных АФК. Соответственно, если в состоянии относительного покоя в нейтрофилах больных перитонитом активность НАДФН-оксидазы соответствует контрольному уровню, то при индукции «дыхательного взрыва» активность ее значительно возрастает. На 14-е сут послеоперационного периода у больных перитонитом активность НАДФН-оксидазы превышает контрольный диапазон как в нейтрофилах, находящихся в состоянии относительного покоя, так и в активированных клетках. На 24-е сут послеоперационного периода в нейтрофилах, находящихся в состоянии относительного покоя, активность

НАДФН-оксидазы снижается до контрольного уровня, тогда как при индукции «дыхательного взрыва» ее активность остается повышенной. При этом индекс активации нейтрофилов, характеризующий уровень метаболических резервов для реализации процессов «дыхательного взрыва», повышается относительно уровня, выявляемого в дооперационном периоде и на 14-е сут после операции.

Цитотоксическая активность нейтрофильных гранулоцитов определяется уровнем продукции как первичных, так и вторичных активных форм кислорода (гидроксильный радикал, перекись водорода и др.). В формировании пула вторичных форм кислорода в нейтрофильных гранулоцитах принимают участие такие ферменты, как супероксиддисмутаза, каталаза, миелопероксидаза и др. [11, 24]. Люминол способен вступать в хемилюминесцентную реакцию и с первичными, и с вторичными АФК [13, 24]. При исследовании спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов установлено, что у больных перитонитом уже в дооперационном периоде возрастает интенсивность синтеза вторичных АФК. При этом происходит замедление развития хемилюминесцентной реакции. Подобное состояние нейтрофилов наблюдается на 7-е и 14-е сут послеоперационного периода. На 24-е сут послеоперационного периода сохраняется длительный период активации ферментов «дыхательного взрыва» и максимум интенсивности синтеза вторичных АФК, но снижается до контрольного уровня площадь под кривой хемилюминесценции. Подобное состояние нейтрофилов пациентов с перитонитом определяется быстрым спадом хемилюминесцентной активности, что связано с истощением метаболических резервов, обеспечивающих «дыхательный взрыв».

При антигенной индукции «дыхательного взрыва» у больных перитонитом также выявляется повышенный уровень синтеза вторичных АФК нейтрофилами крови в дооперационном периоде, который сохраняется на весь послеоперационный период обследования. Однако с 14-х сут послеоперационного периода наблюдается замедление активации ферментов «дыхательного взрыва», что, по-видимому, отражает истощение метаболических резервов и тенденцию к сни-

жению хемилюминесцентной активности нейтрофилов.

## Заключение

Таким образом, у больных распространенным гнойным перитонитом 2-й степени тяжести (по Мангейскому индексу перитонита и индексу брюшной полости) в 96,2% случаев развиваются различные системные осложнения (третичный перитонит, перфорации полых органов, абсцессы брюшной полости и др.). Летальность среди обследованных пациентов составила 22,2%. Количество санационных релапаротомий было напрямую связано с тяжестью перитонита, скоростью регрессии местных интраабдоминальных признаков перитонита. При этом необходимо отметить, что каждое оперативное вмешательство является для организма больного тяжелой травмой, особенно, если оно 3–4-е подряд и более, несмотря на необходимость его проведения, сопряжено с выраженным иммуносупрессивным влиянием, способствует поддержанию и прогрессированию явлений полиорганной недостаточности, увеличению риска развития системных осложнений и снижает вероятность благоприятного исхода.

При исследовании хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов установлено, что у пациентов с перитонитом в до- и послеоперационном периодах интенсивность «дыхательного взрыва» определяется преимущественно уровнем синтеза вторичных АФК. Уровень синтезасупероксид-радикала (наиболее бактерицидная активная форма кислорода) нейтрофилами, находящимися в состоянии относительного покоя, повышается только на 14-е сут после операции и снижается до контрольных значений к 21-м сут. При индукции «дыхательного взрыва» уровень синтеза супероксид-радикала повышается на 7-е сут послеоперационного периода и остается высоким до конца наблюдения. В дооперационном периоде и до окончания срока наблюдения уровень синтеза вторичных АФК нейтрофилами больных перитонитом повышен, но осуществляется на фоне замедленной активации ферментов, обеспечивающих «дыхательный взрыв». Можно заключить, что воспалительная реакция у больных РГП протекает на фоне исходной недостаточности реактивности нейтрофилов за счет пониженного уровня синтеза супероксид-радикала. В ходе лечения уровень синтеза супероксид-радикала повышается. К концу периода наблюдения (24-е сут послеоперационного периода) выявляется тенденция к нормализации хемилюминесцентной активности нейтрофилов крови больных перитонитом.

## Литература

1. Бойко В.В., Криворучко И.А., Тесленко С.Н., Сивожелзов А.В. Распространенный гнойный перитонит. Харьков: Прапор, 2008. 280 с.
2. Piraino B. Today's approaches to prevent peritonitis // Contrib. Nephrol. 2012. V. 178. P. 246–250.
3. Савченко А.А., Зозитовецкий Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Особенности состояния клеточного и гуморального иммунитета у больных с распространенным гнойным перитонитом // Бюл. Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. 2012. № 3. С. 159–163.
4. Савченко А.А., Зозитовецкий Д.Э., Борисов А.Г. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните. Новосибирск: Наука, 2013. 142 с.
5. Schietroma M., Piccione F., Carlei F., Sista F., Cecilia E.M., Amicucci G. Peritonitis from perforated peptic ulcer and immune response // J. Invest. Surg. 2013. V. 26, № 5. P. 294–304.
6. Sista F., Schietroma M., Abruzzese V., Bianchi Z., Carlei F., De Santis G., Cecilia E.M., Pessia B., Piccione F., Amicucci G. Ultrasonic versus standard electric dissection in laparoscopic cholecystectomy in patients with acute calculous cholecystitis, complicated by peritonitis: influence on the postoperative systemic inflammation and immune response. A prospective randomized study // J. Laparoendosc. Adv. Surg. Tech. A. 2014. V. 24, № 3. P. 151–158.
7. Савченко А.А., Борисов А.Г. Основы клинической иммунометаболомики. Новосибирск: Наука, 2012. 263 с.
8. Minar P., Haberman Y., Jurickova I., Wen T., Rothenberg M.E., Kim M.O., Saeed S.A., Baldassano R.N., Stephens M., Markowitz J., Rosh J., Crandall W.V., Heyman M.B., Mack D.R., Griffiths A.M., Baker S.S., Hyams J.S., Kugathasan S., Denson L.A. Utility of Neutrophil Fcγ Receptor I (CD64) Index as a Biomarker for Mucosal Inflammation in Pediatric Crohn's Disease // Inflamm. Bowel Dis. 2014. V. 20, № 6. P. 1037–1048.
9. Taylor A., Tang W., Bruscia E.M., Zhang P.X., Lin A., Gains P., Wu D., Halene S. SRFs required for neutrophil migration in response to inflammation // Blood. 2014. V. 123, № 19. P. 3027–3036.
10. Wright H.L., Moots R.J., Bucknall R.C., Edwards S.W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases // Rheumatology (Oxford). 2010. V. 49, № 9. P. 1618–1631.
11. Куртасова Л.М., Савченко А.А., Шкапова Е.А. Клинические аспекты функциональных нарушений нейтрофильных гранулоцитов при онкопатологии. Новосибирск: Наука, 2009. 184 с.
12. Kasama T., Miwa Y., Isozaki T. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation // Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy. 2005. V. 4, № 3. P. 273–279.
13. Владимиров Ю.А., Проскура Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. 2009. № 49. С. 341–388.
14. Reina E., Al-Shibani N., Allam E., Gregson K.S., Kowolik M., Windsor L.J. The Effect of Plantago major on the Activation of the Neutrophil Respiratory Burst // J. Tradit. Complement. Med. 2013. V. 3, № 4. P. 268–272.
15. Santos E.O., Kabeya L.M., Figueiredo-Rinhel A.S., Marchi L.F., Andrade M.F., Piatasi F., Paoliello-Paschoalato A.B., Azzolini A.E., Lucisano-Valim Y.M. Flavonols modulate the effector functions of healthy individuals' immune complex-stimulated neutrophils: A therapeutic perspective for rheumatoid arthritis // Int. Immunopharmacol. 2014. V. 21, № 1. P. 102–111.
16. 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. V. 270. P. 2957–2963.
17. 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. V. 20, № 6. P. 864–874.
  18. Linder M.M., Wacha H., Feldmann U., Wesch G., Streifensand R.A., Gundlach E. Der Mann–heimer Peritonitis-Index. Ein Instrument zurintraoperativenPrognose der Peritonitis // *Chirurg.* 1987. V. 58. P. 84–91.
  19. Vincent J.L., Moreno R., Takala J., Willatts S., De Mendonça 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. V. 22, № 7. P. 707–710.
  20. Коленчукова О.А., Савченко А.А., Смирнова С.В. Особенности люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим риносинуситом // *Мед. иммунология*. 2010. Т. 12, № 4–5. С. 437–440.
  21. Савченко А.А., Здзитовецкий 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.
  22. Kumar V., Everingham S., Hall C., Greer P.A., Craig A.W. Calpains promote neutrophil recruitment and bacterial clearance in an acute bacterial peritonitis model // *Eur. J. Immunol.* 2014. V. 44, № 3. P. 831–841.
  23. Martino F.K., Filippi I., Giavarina D., Kaushik M., Rodighiero M.P., Crepaldi C., Teixeira C., Nadal A.F., Rosner M.H., Ronco C. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the early diagnosis of peritonitis: the case of neutrophil gelatinase-associated lipocalin // *Contrib. Nephrol.* 2012. V. 178. P. 258–263.
  24. Khan P., Idrees D., Moxley M.A., Corbett J.A., Ahmad F., von Figura G., Sly W.S., Waheed A., Hassan M.I. Luminol-based chemiluminescent signals: clinical and non-clinical application and future uses // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014. V. 173, № 2. P. 333–355.

Поступила в редакцию 21.06.2014 г.

Утверждена к печати 12.11.2014 г.

**Савченко Андрей Анатольевич** (✉) – д-р мед. наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (г. Красноярск).

**Черданцев Дмитрий Владимирович** – д-р мед. наук, профессор зав. кафедрой и клиникой хирургических болезней им. проф. А.М. Дыхно ИПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск).

**Первова Ольга Владимировна** – д-р мед. наук, доцент кафедры и клиники хирургических болезней им. проф. А.М. Дыхно ИПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск).

**Гвоздев Иван Игоревич** – мл. науч. сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (г. Красноярск).

**Борисов Александр Геннадьевич** – канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (г. Красноярск).

**Шапкина Валерия Анатольевна** – ассистент кафедры и клиники хирургических болезней им. проф. А.М. Дыхно ИПО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск).

✉ **Савченко Андрей Анатольевич**, тел.: 8-905-971-3715; e-mail: aasavchenko@yandex.ru

## CLINICAL STATUS AND CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH ADVANCED PURULENT PERITONITIS IN THE DYNAMICS OF POSTOPERATIVE PERIOD

Savchenko A.A.<sup>1</sup>, Cherdantsev D.V.<sup>2</sup>, Pervova O.V.<sup>2</sup>, Gvozdev I.I.<sup>1</sup>, Borisov A.G.<sup>1</sup>, Shapkina V.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation*

<sup>2</sup> *Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation*

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the clinical condition and to study the chemiluminescent activity of



granulocytes of patients with widespread purulent peritonitis in the dynamics of post-operative treatment. The severity of the patients was determined by the SAPS scale, the presence of systemic inflammatory response syndrome was assessed by the criteria of the ACCP/SCCM. Severity and prognosis of the disease was evaluated using the Mannheim peritonitis index and the index of abdominal cavity. The severity of multiple organ failure at admission to the hospital and in postoperative period dynamics were determined by the scale of the SOFA. The study of lucigenin- and luminal-dependent chemiluminescence of neutrophils in peritonitis were taken on admission to the hospital, and on the 7th, 14th and 24th day of the postoperative period. There were a variety of systemic complications (tertiary peritonitis, perforation of hollow organs, abscesses of the abdominal cavity and other) in patients with widespread purulent peritonitis 2nd severity in 96,2% of cases. The mortality rate among patients amounted to 22.2%. It was found in the study of neutrophils chemiluminescent activity that intensity of the "respiratory burst" in pre- and postoperative periods in patients with peritonitis is defined mainly by the synthesis level of secondary reactive oxygen species. The level of synthesis of superoxide radicals by neutrophils in a state of relative dormancy, increased by 14 days after the operation and is reduced to the reference level to the 21st day. In the preoperative period and before the end of the observation level of synthesis of secondary reactive oxygen species by neutrophils of patients with peritonitis was increased, but is on the background of the slow activation of enzymes, providing a "respiratory burst". Trend towards normalization of neutrophils chemiluminescent activity in the blood of patients with peritonitis by the end of the observation period (24th day of the postoperative period).

**KEY WORDS:** peritonitis, neutrophil chemiluminescence, reactive oxygen species.

*Bulletin of Siberian Medicine, 2014, vol. 13, no. 6, pp. 10–19*

#### References

- Boiko V.V., Krivoruchko I.A., Teslenko S.N., Sivozhelezov A.V. *Rasprostranennyj gnojnyj peritonit* [Generalized purulent peritonitis]. Kharkov, Prapor Publ., 2008. 280 p. (in Russian).
- Piraino B. Today's approaches to prevent peritonitis. *Contrib. Nephrol.*, 2012, vol. 178, pp. 246–250.
- Savchenko A.A., Zdzitovetsky D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Osobennosti sostojanija kletocnogo i gumoral'nogo immuniteta u bol'nyh s rasprostranennym gnojnym peritonitom [Peculiarities of cellular and humoral immunity status in patients with extensive purulent peritonitis]. *Bjulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra SO RAMN*, 2012, no. 3, pp. 159–163 (in Russian).
- Savchenko A.A., Zdzitovetsky D.E., Borisov A.G. *Immunometabolicheskie narushenija pri rasprostranennom gnojnom peritonite* [Immunometabolic violations during generalized purulent peritonitis]. Novosibirsk, Science Publ., 2013. 142 p. (in Russian).
- Schietroma M., Piccione F., Carlei F., Sista F., Cecilia E.M., Amicucci G. Peritonitis from perforated peptic ulcer and immune response. *J. Invest. Surg.*, 2013, vol. 26, no. 5, pp. 294–304.
- Sista F., Schietroma M., Abruzzese V., Bianchi Z., Carlei F., De Santis G., Cecilia E.M., Pessia B., Piccione F., Amicucci G. Ultrasonic versus standard electric dissection in laparoscopic cholecystectomy in patients with acute calculous cholecystitis, complicated by peritonitis: influence on the postoperative systemic inflammation and immune response. A prospective randomized study. *J. Laparoendosc. Adv. Surg. Tech. A.*, 2014, vol. 24, no. 3, pp. 151–158.
- Savchenko A.A., Borisov A.G. *Osnovy klinicheskoi immunometabolomiki* [Basis of clinical immunometabolomics]. Novosibirsk, Science Publ., 2012. 263 p. (in Russian).
- Minar P., Haberman Y., Jurickova I., Wen T., Rothenberg M.E., Kim M.O., Saeed S.A., Baldassano R.N., Stephens M., Markowitz J., Rosh J., Crandall W.V., Heyman M.B., Mack D.R., Griffiths A.M., Baker S.S., Hyams J.S., Kugathasan S., Denson L.A. Utility of Neutrophil Fcγ Receptor I (CD64) Index as a Biomarker for Mucosal Inflammation in Pediatric Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2014, vol. 20, no. 6, pp. 1037–1048.
- Taylor A., Tang W., Bruscia E.M., Zhang P.X., Lin A., Gaines P., Wu D., Halene S. SRFs required for neutrophil migration in response to inflammation. *Blood*, 2014, vol. 123, no. 19, pp. 3027–3036.
- Wright H.L., Moots R.J., Bucknall R.C., Edwards S.W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*, 2010, vol. 49, no. 9, pp. 1618–1631.
- Kurtasova L.M., Savchenko A.A., Shkapova Ye.A. *Klinicheskie aspekty funkcional'nyh narushenij nejtrofil'nyh granulocitov pri onkopatologii* [Clinical aspects of functional disorders of polymorphonuclear granulocytes in oncopathology]. Novosibirsk, Science Publ., 2009. 184 p. (in Russian).
- Kasama T., Miwa Y., Isozaki T. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy*, 2005, vol. 4, no. 3, pp. 273–279.
- Vladimirov Yu.A., Proskurina Ye.V. Svobodnye radikaly i kletocnaja hemiljuminescencija [Free radicals and cellular chemiluminescence]. *Uspehi biologicheskoi himii*, 2009, no. 49, pp. 341–388 (in Russian).
- Reina E., Al-Shibani N., Allam E., Gregson K.S., Kowolik M., Windsor L.J. The Effects of Plantago major on the Activation of the Neutrophil Respiratory Burst. *J. Tradit. Complement. Med.*, 2013, vol. 3, no. 4, pp. 268–272.
- Santos E.O., Kabeya L.M., Figueiredo-Rinhel A.S., Marchi L.F., Andrade M.F., Piatesi F., Paoliello-Paschoalato A.B., Azzolini A.E., Lucisano-Valim Y.M. Flavonols modulate the effector functions of healthy individuals' immune complex-stimulated neutrophils: A therapeutic perspective for rheumatoid arthritis. *Int. Immunopharmacol.*, 2014, vol. 21, no. 1, pp. 102–111.
- 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.

17. 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.
18. Linder M.M., Wacha H., Feldmann U., Wesch G., Streifensand R.A., Gundlach E. Der Mann–heimer Peritonitis-Index. Ein Instrument zurintraoperativen Prognose der Peritonitis. *Chirurg.*, 1987, vol. 58, pp. 84–91.
19. Vincent J.L., Moreno R., Takala J., Willatts S., De Mendonça 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.
20. Kolenchukova O.A., Savchenko A.A., Smirnova S.V. Osobennosti ljuminol- i ljucigenin-zavisimoj hemiljuminescencii nejtrofil'nyh granulocitov u bol'nyh hronicheskim rinosinusitom [Features of luminol- and lucigenin-induced chemiluminescence of neutrophilic granulocytes in patients with chronic rhinosinusitis]. *Medicinskaya immunologiya – Russian Journal of Medical Immunology*, 2010, vol. 12, no. 4–5, pp. 437–440 (in Russian).
21. Savchenko A.A., Zdzitovecky D.Ye., Borisov A.G., Luzan N.A. Hemiljuminescentsnaya aktivnost' nejtrofil'nyh granulocitov i urovni koncentracii citokinov u bol'nyh rasprostranennym gnojnym peritonitom [Neutrophil chemiluminescent activity and cytokine concentration levels in patients with extensive purulent peritonitis]. *Citokiny i vospalenie – Cytokines & inflammation*, 2013, vol. 12, no. 1–2, pp. 115–119 (in Russian).
22. Kumar V., Everingham S., Hall C., Greer P.A., Craig A.W. Calpains promote neutrophil recruitment and bacterial clearance in an acute bacterial peritonitis model. *Eur. J. Immunol.*, 2014, vol. 44, no. 3, pp. 831–841.
23. Martino F.K., Filippi I., Giavarina D., Kaushik M., Rodighiero M.P., Crepaldi C., Teixeira C., Nadal A.F., Rosner M.H., Ronco C. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the early diagnosis of peritonitis: the case of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Contrib. Nephrol.*, 2012, vol. 178, pp. 258–263.
24. Khan P., Idrees D., Moxley M.A., Corbett J.A., Ahmad F., von Figura G., Sly W.S., Waheed A., Hassan M.I. Luminol-based chemiluminescent signals: clinical and non-clinical application and future uses. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014, vol. 173, no. 2, pp. 333–355.

**Savchenko Andrei A.** (✉), Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Cherdantsev Dmitry V.**, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Pervova Olga V.**, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Gvozdev Ivan I.**, Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Borisov Aleksandr G.**, Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation.

**Shapkina Valeriya A.**, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

✉ **Savchenko Andrei A.**, Ph. +7-905-971-3715; e-mail: aasavchenko@yandex.ru