

А.А. Савченко, Д.Э. Здитовецкий, А.Г. Борисов, Н.А. Лузан

ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ С РАСПРОСТРАНЕННЫМ ГНОЙНЫМ ПЕРИТОНИТОМ*НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН (Красноярск)
Красноярский государственный медицинский университет им. В.Ф. Войно-Ясенецкого (Красноярск)*

Исследованы иммунологические показатели у больных с распространенным гнойным перитонитом (РГП). Установлено, что при РГП выявляется дисбаланс в иммунной системе, который характеризуется недостаточностью клеточного звена и повышением активности гуморального. Состояние клеточного звена иммунной системы при РГП определяется снижением количества Т- (прежде всего за счет фракций цитотоксических Т-лимфоцитов и экспрессирующих маркер поздней активации), NK- и NKT-клеток. При этом в периферической крови больных РГП повышается содержание Th₂-клеток и B1-лимфоцитов. Состояние гуморального звена иммунной системы при РГП характеризуется повышением содержания IgA и IgG. С помощью корреляционного анализа и раздельным определением энтропии фенотипического состава лимфоцитов и иммуноглобулинов установлено повышение регуляторного влияния на гуморальное звено иммунной системы.

Ключевые слова: перитонит, лимфоциты, иммуноглобулины

FEATURES OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNITY IN PATIENTS WITH EXTENSIVE PURULENT PERITONITIS

A.A. Savchenko, D.E. Zditovetskiy, A.G. Borisov, N.A. Luzan

*Research Institute of Medical Problems of the North SB RAMS, Krasnoyarsk
State Medical University named after V.F. Voino-Yasenetskiy, Krasnoyarsk*

We investigated immunological parameters in patients with extensive purulent peritonitis (EPP). It is established that the EPP revealed an imbalance in the immune system, which is characterized by a deficiency of cellular part and increased activity of the humoral. Status of cellular immunity is determined by the decrease in the EPP number of T- (primarily through fractions of cytotoxic T-lymphocytes and expressing of late activation marker), NK- and NKT-cells. In the peripheral blood of patients with EPP increases the content of Th₂-cells and B1-lymphocytes. Status humoral immunity in the EPP is characterized by increased Ig A and Ig G levels. With the help of correlation analysis and the separate definition of the entropy of the lymphocytes phenotypic composition and immunoglobulins found an increase in regulatory effect on the humoral immunity.

Key words: peritonitis, lymphocytes, immunoglobulins

Несмотря на достижения в медицине летальность при распространенном гнойном перитоните (РГП), являющаяся главным критерием оценки эффективности применяемых способов лечения, удерживается на уровне 20–30 %, достигая наиболее высоких цифр (50 % и более) при третичном перитоните и перитоните, сопровождающемся развитием полиорганной недостаточности (ПОН) и септического шока [3, 14]. В связи с этим, появляется необходимость поиска новых методов лечения данной патологии.

Активное участие системы иммунитета во многих жизненно важных процессах организма приводит к тому, что нарушения иммунореактивности обуславливают широкое как функциональное, так и структурное (патоморфологическое) многообразие проявлений патологий человека [5]. Показано, что перитонит протекает на фоне иммунодефицита, а в терминальной стадии (полиорганной недостаточности) иммунная недостаточность наиболее выражена [6, 8]. Предполагается, что нарушения в иммунной системе могут иметь решающее значение для возникновения различных осложнений заболевания. В связи с этим, только детальное изучение иммунопатогенеза РГП позволит разработать эффективные методы иммуноактивной терапии.

Целью данного исследования явилось изучение зависимости иммунологических показателей у больных РГП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под нашим наблюдением находились 50 больных с РГП (22 мужчин и 28 женщин) внебольничного и госпитального происхождения, проходивших лечение в отделении гнойной хирургии и отделении реанимации и интенсивной терапии МУЗ «ГКБ № 6 имени Н.С. Карповича» г. Красноярск. Средний возраст больных составил $54,2 \pm 19,2$ года. Из исследования были исключены больные, у которых РГП был осложнением панкреонекроза, неоперабельных онкологических заболеваний органов брюшной области и неоперабельного нарушения мезентериального кровообращения. Исходную степень тяжести больных определяли по шкале SAPSII [11]. Тяжесть РГП исходно определяли по Мангеймскому индексу перитонита (МИП) и индексу брюшной полости (ИБП) [1, 12]. Наличие и степень выраженности ПОН исходно и в динамике определяли по шкале SOFA [13]. При оценке тяжести синдрома системной воспалительной реакции (ССВР) мы придерживались критериев АССР/SCCM [7]. В качестве контроля обследовано 135

здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипа лимфоцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующих панелях: CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5, CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5, CD3-FITC/HLA-DR-PE/CD25-PC5/CD45-PC7, CD4-FITC/CD294-PE/CD45-PC7, CD19-FITC/CD5-PE/CD45-FITC, CD95-FITC/CD19-PE/CD45-PC7. Для удаления эритроцитов пробоподготовку проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора OptiLyse C (Beckman Coulter, USA). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, USA). Концентрацию иммуноглобулинов А, М и G в сыворотке крови определяли методом радиальной иммунодиффузии в агарозном геле по Манчини.

Дополнительно в качестве критерия неопределенности состояния клеточного и гуморального звена иммунной системы высчитывали энтропию популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов (энтропия лимфоцитов) и энтропию концентрации основных классов иммуноглобулинов (энтропия иммуноглобулинов) [4].

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клинические проявления ССВР перед первичной операцией по поводу РГП отмечались у 47 (94,0 ± 3,4 %) больных. Преобладали больные с тяжелыми проявлениями ССВР (тяжелый сепсис и септический шок) – 34 (68,0 ± 6,6 %). Тяжесть состояния по шкале SAPS II составила 29 (16; 37) балла. Выраженность ПОН по шкале SOFA составила 2 (1; 4) балла.

Интраоперационная оценка тяжести РГП дала следующие результаты: МИП в среднем составил 28 (25;33), ИБП среднем 14 (13; 14). С учетом интраоперационной оценки тяжести РГП у 29 (58,0 ± 7,0 %) больных применен «полуоткрытый» метод хирургического лечения РГП с этапными ревизиями и санацией брюшной полости в программном режиме с интервалом 36 – 48 часов.

При исследовании иммунологических показателей обнаружено, что у больных РГП значительно повышено количество лейкоцитов в перифери-

ческой крови, но при снижении процентного содержания лимфоцитов и абсолютного количества CD3⁺-клеток (табл. 1). Кроме того, у больных РГП выявляется понижение относительного и абсолютного количества CD3⁺CD8⁺- и CD3⁺HLA-DR⁺-лимфоцитов, а также определяется снижение процентного уровня CD4⁺CD294⁺-клеток. При исследовании состояния В-клеточного звена иммунной системы обнаружено 2-кратное повышение процентного количества CD19⁺CD5⁺-лимфоцитов. Состояние клеточного звена иммунной системы у больных РГП также характеризуется снижением относительного и абсолютного количества CD6⁺CD56⁺-клеток ($p = 0,046$ и $p = 0,001$, соответственно) и абсолютного уровня CD3⁺CD56⁺-лимфоцитов ($p = 0,033$).

При исследовании содержания в сыворотке крови основных классов иммуноглобулинов и их уровней синтеза обнаружено, что у больных РГП в 1,9 раза повышена концентрация Ig А и в 1,4 раза – концентрация IgG. При этом у больных РГП наблюдается 2-кратное повышение уровня относительного синтеза IgA.

Анализ результатов полученных результатов позволяет определить, что у больных РГП в периферической крови на фоне выраженного повышения количества лейкоцитов (в 2,4 раза) наблюдается снижение процентного содержания лимфоцитов. При этом обнаружена отрицательная взаимосвязь между абсолютным уровнем лимфоцитов и ИБР ($r = -0,36$, $p = 0,045$).

Фенотипический состав лимфоцитов в крови у больных РГП характеризуется снижением абсолютного количества Т-лимфоцитов и повышением содержания В1-клеток. В1-лимфоциты являются минорной фракцией В-клеток крови, локализируются преимущественно в брюшной и плевральной полости, синтезируют Ig М и Ig А к бактериальным антигенам [2, 5]. Особенностью В1-клеток также является их способность выполнять роль антиген-презентирующих клеток. Состояние Т-клеточного иммунитета у больных характеризуется снижением относительного и абсолютного количества цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-клеток с маркером поздней активации (HLA-DR-рецептор). Кроме того, при РГП обнаружено повышение в периферической крови процентного уровня Th₂-клеток (CD4⁺CD294⁺-лимфоциты). Th₂-лимфоциты, вырабатывая комплекс цитокинов (прежде всего, интерлейкин-3, интерлейкин-4, интерлейкин-5), стимулируют пролиферацию активированных В-лимфоцитов, тем самым стимулируя гуморальный иммунитет [5, 10]. Необходимо отметить, что только у больных РГП обнаружена положительная взаимосвязь между количеством В1-клеток и уровнем Th₂-лимфоцитов ($r = 0,60$, $p = 0,023$). Более того, только у больных с РГП выявляется взаимосвязь относительного количества Th₂-лимфоцитов с процентным содержанием CD3⁺CD25⁺-клеток ($r = 0,69$, $p < 0,001$). Следовательно, иммунопатогенез РГП характеризуется регуляторными процессами, при которых уровень экспрессии

Иммунологические показатели больных РГП (Me, C₂₅ – C₇₅)

Показатели	Контроль, n = 156		Перитонит, n = 50		p
	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	5,75	4,75–7,50	13,75	9,00–16,25	< 0,001
Лимфоциты, %	36,0	29,0–45,0	12,5	10,0–17,0	< 0,001
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	2,11	1,52–2,75	1,75	1,38–2,57	
CD3 ⁺ , %	66,9	60,0–72,0	66,2	55,9–71,1	
CD3 ⁺ , 10 ⁹ /л	1,34	0,96–1,83	1,07	0,84–1,53	0,049
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	42,0	34,0–48,0	40,0	31,0–45,6	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,80	0,53–1,19	0,61	0,48–0,99	
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	27,0	21,0–33,0	21,8	16,7–27,0	0,007
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,56	0,36–0,82	0,37	0,20–0,60	0,003
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	11,9	7,0–16,5	14,3	6,3–31,3	
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,17	0,11–0,34	0,27	0,09–0,58	
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	15,0	9,8–20,0	3,6	2,2–7,2	< 0,001
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , 10 ⁹ /л	0,33	0,22–0,50	0,05	0,04–0,13	< 0,001
CD4 ⁺ CD294 ⁺ , %	12,6	11,9–15,0	24,4	8,8–32,5	0,047
CD4 ⁺ CD294 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,49	0,17–0,59	0,37	0,20–0,70	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,50	1,11–1,93	1,75	1,30–2,43	
CD19 ⁺ , %	14,0	9,0–17,0	14,9	11,3–18,0	
CD19 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,26	0,17–0,39	0,24	0,18–0,39	
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , %	0,9	0,6–1,0	1,8	1,0–2,9	0,012
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,02	0,01–0,04	0,03	0,02–0,06	
CD19 ⁺ CD95 ⁺ , %	0,7	0,1–0,9	1,0	0,1–1,4	
CD19 ⁺ CD95 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,01	0,005–0,02	0,01	0,005–0,03	
CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	19,0	13,5–22,0	14,5	9,2–19,2	0,046
CD16 ⁺ CD56 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,39	0,25–0,55	0,19	0,12–0,39	0,001
CD3 ⁺ CD16 ⁺ , %	4,6	2,6–11,18	4,5	1,9–8,5	
CD3 ⁺ CD16 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,19	0,07–0,32	0,07	0,03–0,19	0,033
IgA, г/л	2,07	1,32–3,20	3,85	2,54–4,61	< 0,001
IgM, г/л	1,20	0,58–1,80	0,72	0,58–1,23	
IgG, г/л	11,11	8,60–15,00	15,50	8,23–21,70	0,016
IgA/CD19+, нг/клетку	7,14	4,02–14,56	14,02	8,55–19,52	0,004
IgM/CD19+, нг/клетку	4,68	2,45–9,17	3,02	2,65–5,54	
IgG/CD19+, нг/клетку	44,64	26,57–73,68	55,10	27,11–97,63	

маркера ранней активации Т-клеток совпадает с изменением содержания в крови больных V1- и Th₂-лимфоцитов.

Состояние клеточного звена иммунитета при РГП также характеризуется снижением количества NK- и NKT-клеток. NKT-лимфоциты относят к клеткам врожденного иммунитета [5, 9]. Помимо цитотоксической функции они являются практически единственным источником интерферона-γ на первом этапе реакции внедрения патогенов.

Состояние гуморального звена иммунной системы при РГП характеризуется увеличением концентрации IgA и IgG, а также уровнем от-

носительного синтеза IgA. Данная гуморальная реакция определяется поражением слизистых при РГП с наличием бактериальной инфекции. Выявляются особенности корреляционных взаимосвязей между гуморальным и клеточными звеньями иммунной системы в контроле и при РГП. Так, у лиц контрольной группы не выявлены взаимосвязи между содержанием лимфоцитов различного фенотипа и концентрацией иммуноглобулинов различных классов, тогда как при РГП обнаружена отрицательная взаимосвязь между процентным содержанием CD3⁺CD4⁺-клеток и концентрацией Ig G (r = -0,45, p = 0,033). Также

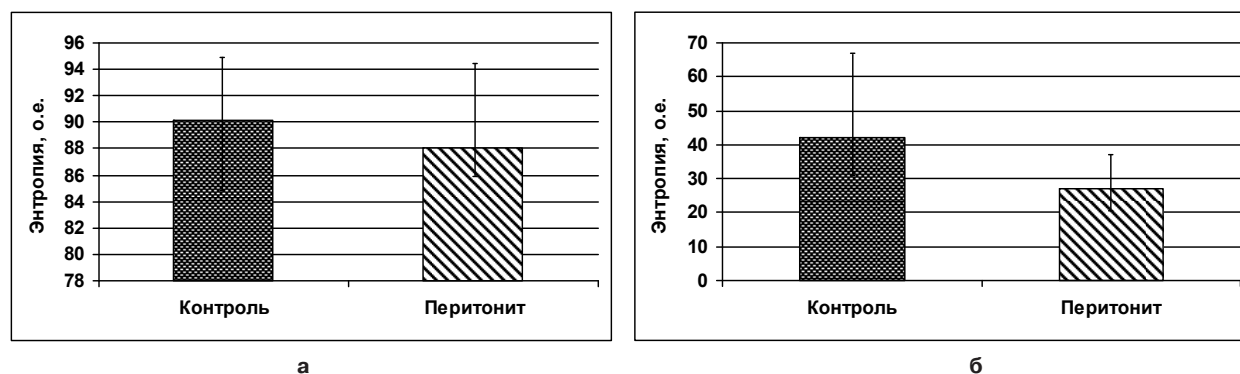


Рис. 1. Уровни энтропии клеточного (а) и гуморального (б) звеньев иммунной системы в контроле и при РГП.

необходимо отметить, что если у лиц контрольной группы с уровнями относительного синтеза IgA, IgM и IgG отрицательно коррелирует относительное количество CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов (соответственно, $r = -0,17, p = 0,046$; $r = -0,28, p < 0,001$; $r = -0,22, p = 0,010$), то у больных РГП процентное содержание CD3⁺CD8⁺-клеток положительно взаимосвязано с уровнями относительного синтеза IgA и IgG (соответственно, $r = 0,48, p = 0,029$ и $r = 0,55, p = 0,009$). У лиц контрольной группы с уровнем содержания В-лимфоцитов в крови положительно взаимосвязано количество CD3⁺CD8⁺- и CD16⁺/56⁺-клеток (соответственно, $r = 0,20, p = 0,010$ и $r = 0,16, p = 0,039$). В то же время, у больных РГП выявляются положительные взаимосвязи процентного содержания В-лимфоцитов с относительным количеством CD3⁺CD4⁺-клеток ($r = 0,41, p = 0,027$), активированных Т-клеток ($r = 0,40, p = 0,035$) и соотношением CD4⁺/CD8⁺ ($r = 0,46, p = 0,015$). Следовательно, у больных РГП наблюдается усиление регуляторного влияния клеточного звена на гуморальный иммунитет. При этом также появляются взаимосвязи между эффекторными показателями клеточного и гуморального иммунитета (между содержанием цитотоксических Т-лимфоцитов и уровнями относительного синтеза иммуноглобулинов).

Используя в качестве обобщенного показателя дестабилизации клеточного и гуморального иммунитета энтропию, установлено, что энтропия популяционного состава лимфоцитов при РГП не отличается от контрольного диапазона, тогда как энтропия гуморального звена иммунной системы у больных РГП в 1,6 раза ниже, чем в контрольной группе (рис. 1). Обращает внимание, что энтропия клеточного звена иммунной системы значительно выше, чем гуморального (как в группе контроля, так и при РГП). Кроме того, если коэффициент вариации клеточного звена в контроле составляет 7,7 и при РГП – 18,5, то коэффициент вариации гуморального иммунитета у лиц контрольной группы составляет 73,5 и при РГП – 58,3. Такое соотношение уровней энтропии характеризует большую регуляторную зависимость гуморального звена иммунной системы, которая значительно возрастает при РГП, что связано с иммунопатогенезом

заболевания и, соответственно, высоким уровнем скоординированности гуморальных реакций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у больных РГП выявляется дисбаланс в иммунной системе, который характеризуется недостаточностью клеточного звена и повышением активности гуморального. Состояние клеточного звена иммунной системы при РГП определяется снижением количества Т- (прежде всего за счет фракций цитотоксических Т-лимфоцитов и экспрессирующих маркер поздней активации), NK- и NKT-клеток. При этом в периферической крови больных РГП повышается содержание Th₂-клеток и В1-лимфоцитов. Состояние гуморального звена иммунной системы при РГП характеризуется повышением содержания IgA и IgG. С помощью корреляционного анализа и отдельным определением энтропии фенотипического состава лимфоцитов и иммуноглобулинов установлено повышение регуляторного влияния на гуморальное звено иммунной системы. Полученные результаты исследования определяют необходимость стимулировать клеточное звено иммунной системы для повышения эффективности лечения и восстановления после острого воспалительного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Савельев В.С., Филимонов М.И., Гельфанд Б.Р. Программируемый перитонеальный лаваж в лечении распространенного перитонита // *Анналы хирургии*. – 1996. – № 3. – С. 25 – 29.
2. Сидорова Е.В. В-1 лимфоциты. Происхождение, дифференцировка, функции // *Успехи современной биологии*. – 2009. – Т. 129, № 1. – С. 27 – 38.
3. Суковатых Б.С., Блинков Ю.Ю., Букреева А.Е. Применение иммобилизованных форм гипохлорита натрия в комплексном лечении распространенного гнойного перитонита // *Вестн. хирургии им. И.И. Грекова*. – 2011. – Т. 170, № 6. – С. 32 – 36.
4. Тихончук В.С, Ушаков И.Б., Карпов В.Н., Зуев В.Г. Возможности использования интегральных показателей периферической крови человека // *Воен.-мед. журн.* – 1992. – № 3. – С. 27 – 31.

5. Ярилин А.А. Иммунология. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 752 с.
6. Bierhoff M., Krutwagen E., van Bommel E.F., Verburgh C.A. Listeria peritonitis in patients on peritoneal dialysis: two cases and a review of the literature // Neth. J. Med. — 2011. — Vol. 69, N 10. — P. 461 — 464.
7. Bone R.S., Balk R.A.B., Cerra F.B. 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, N 6. — P. 864 — 874.
8. Broughton A., Verger C., Goffin E. Pets-related peritonitis in peritoneal dialysis: companion animals or Trojan horses? // Semin. Dial. — 2010. — Vol. 23, N 3. — P. 306 — 316.
9. Godfrey D.I., Rossjohn J. New ways to turn on NKT cells // J. Exp. Med. — 2011. — Vol. 208, № 6. — P. 1121 — 1125.
10. Harris N., Gause W.C. To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminthes // Trends Immunol. — 2011. — Vol. 32, N 2. — P. 80 — 88.
11. 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. — P. 2957 — 2963.
12. Linder M.M., Wacha H., Feldmann U. Der Mannheimer Peritonitis-Index. Ein Instrument zur intraoperativen Prognose der Peritonitis // Chirurg. — 1987. — N 58. — P. 84 — 91.
13. Vincent J.L., Moreno R., Takala J. 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, N 7. — P. 707 — 710.
14. Wiest R., Krag A., Gerbes A. Spontaneous bacterial peritonitis: recent guidelines and beyond // Gut. — 2012. — Vol. 61, N 2. — P. 297 — 310.

Сведения об авторах

Савченко Андрей Анатольевич — руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии им. проф. А.Т. Пшоники ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г; тел.: (3912) 125-263; e-mail: aasavchenko@yandex.ru)

Здзитовецкий Дмитрий Эдуардович — заведующий кафедрой хирургических болезней им. проф. Ю.М. Лубенского ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого», кандидат медицинских наук, доцент

Борисов Александр Геннадьевич — ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, кандидат медицинских наук

Лузан Наталья Алексеевна — младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН