

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ АКТИВНОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ НА СОСТОЯНИЕ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ПОСЛЕДУЮЩЕМ РАЗВИТИИ СЕПСИСА У БОЛЬНЫХ С РАСПРОСТРАНЕННЫМ ГНОЙНЫМ ПЕРИТОНИТОМ

© 2018 г. А. А. Савченко^{1*}, А. Г. Борисов¹, Д. Э. Здзитовецкий², И. И. Гвоздев¹

*E-mail: aasavchenko@yandex.ru

¹ФГБНУ Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, обособленное подразделение “НИИ медицинских проблем Севера”, Красноярск, Россия;

²ФГБОУ ВО “Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого” Минздрава России, Красноярск, Россия

Поступила: 29.04.2018. Принята: 04.05.2018

С целью исследования особенностей состояния респираторного взрыва и уровней активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов крови в прогнозе развития абдоминального сепсиса обследовано 50 больных распространенным гнойным перитонитом (РГП) в дооперационном периоде. С 5 по 10 сутки послеоперационного периода у 35 больных (70,0%) развился абдоминальный сепсис, у 15 больных (30,0%) осложнения отсутствовали. С помощью хемилюминесцентного анализа исследовано состояние респираторного взрыва нейтрофилов. С помощью биолуминесцентного метода исследована внутриклеточная активность NAD(P)-зависимых дегидрогеназ. Установлено, что у больных РГП, у которых в динамике послеоперационного периода разовьется сепсис, хемилюминесцентная активность нейтрофилов крови характеризуется пониженным уровнем спонтанного синтеза первичных активных форм кислорода (АФК) и повышенным уровнем спонтанного синтеза вторичных АФК относительно показателей, выявленных у больных без последующего развития осложнений. Особенностью метаболизма нейтрофилов у больных РГП без последующего развития сепсиса является высокая активность анаэробной реакции лактатдегидрогеназы и снижение активности NADP-зависимой декарбокксилирующей малатдегидрогеназы. У больных РГП с последующим развитием сепсиса обнаружен высокий уровень NAD-зависимого оттока субстратов с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена через глутаматдегидрогеназу. С помощью корреляционного анализа установлено, что интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов у больных без последующего развития осложнений зависит от активности анаэробного гликолиза. У пациентов с последующим развитием сепсиса в нейтрофилах крови выявляются конкурентные взаимосвязи между уровнями синтеза первичных и вторичных АФК и активностью ферментов.

Ключевые слова: перитонит, сепсис, нейтрофилы, респираторный взрыв, метаболизм, дегидрогеназы

DOI: 10.7868/S1028722118020077

Адрес: 660022, Красноярск, ул. П. Железняк, 3Г. НИИ медицинских проблем Севера, Савченко Андрей Анатольевич. Тел.: +79059713715. E-mail: aasavchenko@yandex.ru

Авторы:

Савченко А.А., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, обособленное подразделение “НИИ медицинских проблем Севера”, Красноярск, Россия;

Борисов А.Г., к.м.н., в.н.с. лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр

Сибирского отделения Российской академии наук”, обособленное подразделение “НИИ медицинских проблем Севера”, Красноярск, Россия;

Здзитовецкий Д.Э., д.м.н., заведующий кафедрой, кафедра и клиника хирургических болезней им. проф. Ю.М. Лубенского ФГБОУ ВО “Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого” Минздрава России, Красноярск, Россия
Гвоздев И.И., м.н.с. лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, обособленное подразделение “НИИ медицинских проблем Севера”, Красноярск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на достижения в медицине летальность при распространенном гнойном перитоните (РГП), являющаяся главным критерием оценки эффективности применяемых способов лечения, удерживается на уровне 20–30%, а в случае генерализации инфекции и развития полиорганной недостаточности и сепсиса достигает 75,8–100% [1, 2]. Течение РГП, характер и особенности развития гнойных инфекционных осложнений определяются не только тяжестью основного патологического процесса, адекватностью оперативного вмешательства и медикаментозного лечения в послеоперационном периоде, но и зависит от происходящих изменений в системе иммунитета [3, 4].

Нейтрофильные гранулоциты являются высокореактивными клетками врожденного иммунитета. Они быстро мобилизуются в очаг воспаления, от их функциональной активности во многом зависит эффективность противомикробной защиты организма [5, 6]. Одним из важных аспектов проявления функциональной активности нейтрофилов является респираторный взрыв, развивающийся при взаимодействии клеток с объектами фагоцитоза, интенсивность которого формируется синтезом активных форм кислорода (АФК) [7, 8, 9]. Учитывая, что все регуляторные и антигенные молекулы реализуют свое воздействие на клетку через рецепторы, влияя на экспрессию генов, модулируя энергетические и пластические реакции, функциональные проявления нейтрофилов не могут не иметь метаболической основы [10, 11].

РГП сопровождается избыточным поступлением в биологические среды организма микробных антигенов и бактериальных токсинов, источниками которых являются гнойно-деструктивные очаги в брюшной полости, перитонеальный экссудат и паралитически измененные петли кишечника [2, 3]. В связи с этим, активность внутриклеточных ферментов в нейтрофилах будет, с одной стороны, определять уровень их реактивности, с другой стороны, — модулироваться нарушениями гомеостаза, развивающимися при инфекционно-воспалительном процессе.

Таким образом, целью исследования явилось изучение особенностей состояния респираторного взрыва и уровней активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов крови в прогнозе развития абдоминального сепсиса у больных РГП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении ретроспективного исследования было обследовано 50 больных РГП (22 мужчин и 28 женщин) внебольничного и госпитального происхождения в дооперационном периоде, проходивших лечение в отделении гнойной хирургии и отделении реанимации и интенсивной терапии КГБУЗ “КМКБСМП имени Н. С. Карповича” г. Красноярска. 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. Забор крови для проведения исследования осуществляли в 1-е сутки госпитализации. С 5 по 10 сутки послеоперационного периода у 35 больных (70,0%) развился абдоминальный сепсис, у 15 больных (30,0%) осложнения отсутствовали. В качестве контроля обследовано 67 здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Нейтрофильные гранулоциты выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-урографина: $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ — для отделения лимфоцитов, $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$ — для выделения нейтрофилов. Состояние респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа [8]. Реакционная смесь для хемилюминесцентной реакции состояла из 20 мкл донорской сыворотки АВ(IV)Rh(–), 50 мкл люцигенина или люминола (Sigma, США) в концентрации 10–5 М, 40 мкл опсонизированного зимозана (в случае определения индуцированной хемилюминесценции), 200 мкл взвеси нейтрофилов (2 млн/мл) и 240 мкл раствора Хэнкса (ПанЭко, Россия) для определения спонтанной хемилюминесценции или 200 мкл раствора Хэнкса — для индуцированной. Выбор двух хемилюминесцентных индикаторов определяется необходимостью выделения в общем пуле активных форм кислорода (оценивается с помощью люминола) объема синтеза супероксид-радикала (определяется с помощью люцигенина). Оценку спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе “БЛМ-3607” (ООО “МедБиоТех”, Красноярск). 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 (Спонт.) и определяли как индекс активации (Синд./Спонт.).

Исследование активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови проведено с помощью биOLUMИнесцентного анализа [10]. Метаболизм нейтрофилов оценивали по активности следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (ГЗФДГ), NADP-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы (NADP-МДГ), NAD- и NADH-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и NADH-ЛДГ), NAD- и NADH-зависимой реакции малатдегидрогеназы (МДГ и NADH-МДГ), NADP- и NADPH-зависимой глутаматдегидрогеназы (NADP-ГДГ и NADPH-ГДГ), NAD- и NADH-зависимой глутаматдегидрогеназы (NAD-ГДГ и NADH-ГДГ), NAD- и NADP-зависимых изоцитратдегидрогеназ (NAD-ИЦДГ и NADP-ИЦДГ, соответственно) и глутатионредуктазы (ГР). Активность NAD(P)-зависимых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на 104 клеток, где 1 Е = 1 мкмоль/мин. Исследование проводили на ферментативном препарате NAD(P): FMNоксидоредуктаза-люцифераза из *Photobacterium leiognathi* (получен в Институте биофизики СО РАН, Красноярск).

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 2000 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 25 и 75 перцентилей (C₂₅ и C₇₅). 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

При исследовании люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови обнаружено, что независимо от развития абдоминального сепсиса при РГП уменьшено время

выхода на максимум спонтанной хемилюминесценции (табл. 1). При этом только у больных, у которых не будет сепсиса, повышен максимум интенсивности спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции относительно контрольных значений и выявленных у лиц с последующим осложнением. Независимо от развития осложнения у больных РГП повышен максимум интенсивности, но снижена площадь под кривой зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов. Только у больных с отсутствием в послеоперационном периоде сепсиса снижен индекс активации люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови относительно контрольного уровня и значений, выявленных у пациентов с последующим развитием сепсиса.

Обнаружено, что максимум интенсивности люминол-зависимой спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов при РГП повышен относительно контрольных значений (см. табл. 1). При этом у больных с отсутствием осложнений послеоперационного периода максимум интенсивности данной кривой выше, чем у пациентов, у которых развивается сепсис. Максимум интенсивности зимозан-индуцированной и индекс активации люминол-зависимой хемилюминесценции повышен у больных РГП относительно контрольных значений независимо от развития осложнений в послеоперационном периоде. В то же время площадь под кривой люминол-зависимой индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов повышена только у больных, у которых в послеоперационном периоде развивается абдоминальный сепсис.

При исследовании активности NAD- и NADP-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови обнаружено, что независимо от развития абдоминального сепсиса при РГП относительно контрольных значений снижается активность Г6ФДГ, ЛДГ и NADP-ГДГ (табл. 2). Также независимо от последующего развития сепсиса у больных РГП в нейтрофилах повышается активность NADP-ИЦДГ, NADH-ЛДГ и NADH-МДГ. Однако у пациентов с последующим развитием сепсиса внутриклеточная активность NADH-ЛДГ ниже, чем у пациентов без последующего развития сепсиса. У больных РГП без последующего развития сепсиса в нейтрофилах понижена активность NADP-МДГ как относительно диапазона, так и выявленного у пациентов с последующим развитием сепсиса. У больных РГП с последующим развитием сепсиса в нейтрофилах повышена активность NADPH-ГДГ как относительно контрольного

Таблица 1. Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов у больных РГП в прогнозе развития сепсиса (Me, C₂₅–C₇₅)

Показатели	Контроль <i>n</i> = 67 1		Без развития сепсиса, <i>n</i> = 15 2		С развитием сепсиса, <i>n</i> = 35 3	
	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅
Спонтанная люцигенин-зависимая хемилюминесценция						
Tmax, сек.	2718	2010–3791	1651	1193–2606	2028	1136–2531
			<i>p</i> ₁ = 0,010		<i>p</i> ₁ = 0,001	
Imax, о.е. × 10 ³	5,68	2,55–14,06	42,07	10,07–76,31	13,47	2,23–31,85
			<i>p</i> ₁ = 0,002		<i>p</i> ₂ = 0,043	
S, о.е. × сек. × 10 ⁵	2,28	0,96–5,85	2,20	1,34–7,84	1,81	0,17–4,34
Зимозан-индуцированная люцигенин-зависимая хемилюминесценция						
Tmax, сек.	2064	1676–2722	2020	1401–2186	2172	1008–2550
Imax, о.е. × 10 ³	12,87	7,83–27,64	25,91	17,10–47,40	22,98	9,13–35,90
			<i>p</i> ₁ = 0,031		<i>p</i> ₁ = 0,026	
S, о.е. × сек. × 10 ⁵	4,53	2,52–8,22	2,49	1,41–4,44	2,80	1,20–6,28
			<i>p</i> ₁ = 0,048		<i>p</i> ₁ = 0,049	
Синд./ Спонт.	2,04	1,20–3,60	1,04	0,34–1,77	1,78	1,20–6,28
			<i>p</i> ₁ = 0,031		<i>p</i> ₂ = 0,041	
Спонтанная люминол-зависимая хемилюминесценция						
Tmax, сек.	1003	609–1574	1097	863–1168	1138	895–1373
Imax, о.е. × 10 ³	8,68	3,81–23,08	26,71	12,38–37,48	31,92	18,17–46,61
			<i>p</i> ₁ = 0,015		<i>p</i> ₁ < 0,001 <i>p</i> ₂ = 0,049	
S, о.е. × сек. × 10 ⁵	2,70	1,13–7,55	2,45	0,56–3,29	3,41	1,94–7,00
Зимозан-индуцированная люминол-зависимая хемилюминесценция						
Tmax, сек.	1117	805–1489	1052	955–1348	1009	708–1377
Imax, о.е. × 10 ³	17,93	7,02–36,56	34,56	18,45–76,75	66,78	47,07–97,81
			<i>p</i> ₁ = 0,007		<i>p</i> ₁ < 0,001	
S, о.е. × сек. × 10 ⁵	5,74	1,97–11,20	6,76	1,60–9,10	8,60	4,10–11,30
					<i>p</i> ₁ = 0,029	
Синд./ Спонт.	1,72	1,33–2,53	2,75	1,63–5,34	2,24	1,50–3,43
			<i>p</i> ₁ = 0,026		<i>p</i> ₁ = 0,043	

Примечание: *p*₁ – статистически значимые различия с показателями контрольной группы; *p*₂ – статистически значимые различия с показателями больных РГП, у которых не будет сепсиса.

Таблица 2. Активность NAD- и NADP-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови у больных РГП в прогнозе развития сепсиса (Me, C₂₅–C₇₅)

Показатели	Контроль <i>n</i> = 67 1		Без развития сепсиса <i>n</i> = 15 2		С развитием сепсиса <i>n</i> = 35 3	
	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅	Me	C ₂₅ –C ₇₅
Г6ФДГ	0,86	0,12–4,16	0,01	0,005–0,30	0,04	0,01–0,58
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	
ГЗФДГ	0,54	0,07–1,68	0,38	0,08–1,03	0,61	0,30–1,35
ЛДГ	11,45	1,44–43,03	0,01	0,005–1,12	0,01	0,001–0,17
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	
NADP-МДГ	0,02	0,01–0,77	0,007	0,005–0,01	0,02	0,01–0,14
			$p_1 = 0,024$		$p_2 = 0,008$	
NADP-ГДГ	0,12	0,05–0,83	0,02	0,01–0,04	0,02	0,01–0,05
			$p_1 = 0,019$		$p_1 = 0,004$	
NADP-ИЦДГ	1,18	0,18–2,79	5,39	0,55–10,13	7,95	2,16–16,22
			$p_1 = 0,039$		$p_1 = 0,002$	
МДГ	4,01	0,85–10,31	4,48	0,74–13,10	8,51	0,96–18,61
NAD-ГДГ	0,53	0,12–1,42	0,46	0,13–1,08	0,42	0,18–1,36
NAD-ИЦДГ	0,05	0,01–1,85	3,40	0,01–7,64	4,92	1,57–6,79
			$p_1 = 0,009$		$p_1 < 0,001$	
NADH-ЛДГ	0,24	0,10–10,23	18,32	2,15–70,01	3,98	1,05–23,40
			$p_1 = 0,010$		$p_1 = 0,025$ $p_2 = 0,018$	
NADH-МДГ	12,60	2,05–53,34	73,87	35,22–127,13	47,41	12,16–96,33
			$p_1 < 0,001$		$p_1 = 0,037$	
ГР	1,02	0,27–3,30	1,15	0,31–2,98	1,04	0,19–2,45
NADH-ГДГ	5,31	1,02–16,39	8,20	2,52–21,03	25,78	8,78–53,67
					$p_1 = 0,012$ $p_2 = 0,044$	
NADPH-ГДГ	45,29	7,13–88,71	30,85	11,20–39,59	30,35	8,78–62,48

Примечание: то же, что и для табл. 1.

уровня, так и значений, выявленных у пациентов без последующего развития сепсиса.

С помощью корреляционного анализ исследована взаимосвязь показателей респираторного взрыва в нейтрофилах и внутриклеточная активность NAD(P)-зависимых дегидрогеназ. Установлено, что у лиц контрольной группы активность ГР нейтрофилов

отрицательно взаимосвязана с максимумом интенсивности спонтанной ($r = -0,63, p = 0,002$) и зимозан-индуцированной ($r = -0,75, p < 0,001$) люцигенин-зависимой хемилюминесценции, тогда как активность НАДФИЦДГ положительно – с площадью под кривой спонтанной ($r = 0,52, p = 0,015$) и максимумом интенсивности индуцированной ($r = -0,75, p < 0,001$)

хемилюминесценции. Активность NADP-МДГ нейтрофилов у лиц данной группы положительно коррелирует с максимумом интенсивности и площадью под кривой спонтанной ($r = 0,27$, $p = 0,043$ и $r = 0,35$, $p = 0,008$, соответственно) и зимозан-индуцированной ($r = 0,30$, $p = 0,028$ и $r = 0,40$, $p = 0,003$, соответственно) люминол-зависимой хемилюминесценции, также как активность МДГ положительно – с максимумом интенсивности спонтанной ($r = 0,38$, $p = 0,004$) и площадью под кривой ($r = 0,33$, $p = 0,013$) индуцированной хемилюминесценции.

У больных РГП без последующего развития сепсиса обнаружена взаимосвязи между активностью ГР отрицательно взаимосвязана и максимумом интенсивности спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции ($r = -0,65$, $p = 0,040$), активностью ГЗФДГ и площадью под кривой данной хемилюминесцентной кривой ($r = 0,71$, $p = 0,022$) и активностью NADP-МДГ и площадью под кривой индуцированной хемилюминесценции ($r = -0,70$, $p = 0,024$). Кроме того, у пациентов данной группы выявлены положительные корреляции активности ГЗФДГ с максимумом интенсивности спонтанной ($r = 0,73$, $p = 0,025$) и площадью под кривой спонтанной ($r = 0,88$, $p = 0,002$) и индуцированной ($r = 0,80$, $p = 0,010$) люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов, а также отрицательная взаимосвязь между активностью NADP-МДГ и площадью под кривой спонтанной хемилюминесценции ($r = -0,73$, $p = 0,025$).

У больных РГП с последующим развитием сепсиса активность NADP-ИЦДГ нейтрофилов отрицательно взаимосвязана с площадью под кривой спонтанной ($r = -0,50$, $p = 0,033$) и максимумом интенсивности индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции $r = -0,51$, $p = 0,030$), а также выявляется положительная корреляция между активностью ГР и максимумом интенсивности индуцированной хемилюминесценции ($r = 0,51$, $p = 0,043$). Кроме того, у пациентов данной группы активность NADP-МДГ отрицательно коррелирует с максимумом интенсивности спонтанной ($r = -0,50$, $p = 0,025$) и индуцированной ($r = -0,50$, $p = 0,033$) люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов, а активность МДГ также отрицательно – с максимумом интенсивности спонтанной хемилюминесценции ($r = -0,57$, $p = 0,010$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Течение и исход перитонита во многом определяется эффективностью воспалительных процессов и изменениями функциональной активности нейтрофилов как основной популяцией клеток, принимающих участие в процессах воспаления. Респираторный взрыв является важным защитным механизмом, лежащим в основе реактивности данной популяции клеток [7, 8, 9]. Установлено, что у больных РГП, послеоперационный период которых будет протекать без осложнений, уровень спонтанного синтеза первичных АФК нейтрофилами крови выше, чем у здоровых людей и больных с последующим развитием сепсиса. Реакция НАДФН-оксидазы на индукцию респираторного взрыва зимозаном при РГП не значительна, однако при отсутствии развития осложнений основного заболевания выявляется снижение индекса активации. Уровень спонтанного синтеза вторичных АФК нейтрофилами крови у больных без сепсиса в послеоперационном периоде выше, чем у здоровых лиц, но ниже, чем у больных с сепсисом. Индукция синтеза вторичных АФК под воздействием зимозана более выражена у пациентов с РГП, у которых послеоперационный период будет осложнен сепсисом. При этом бактерицидная активность нейтрофилов в большей степени определяется синтезом вторичных АФК [7].

Исследуемые NAD(P)-зависимые дегидрогеназы нейтрофилов занимают ключевые позиции на разных метаболических путях клетки, характеризуя основные обменные процессы. Так, Г6ФДГ является ключевым и инициализирующим ферментом пентозофосфатного цикла, от активности которого зависит широкий спектр синтетических процессов [10, 12]. Соответственно, снижение активности фермента в нейтрофилах больных РГП определяет значительную недостаточность реакций пластического обмена. С активностью NADP-МДГ связывают интенсивность реакций липидного анаболизма и катаболизма ксенобиотиков [10]. Обнаружено, что у больных РГП с последующим развитием сепсиса активность фермента значительно снижена, тогда как у пациентов, у которых в процессе лечения развивается данной осложнение, активность NADP-МДГ соответствует контрольному уровню. Также нами исследованы уровни активности NADP-зависимых глутаматдегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназы. Активность первого фермента, принимающего участие в процессах

внутриклеточного обмена азота, при РГП снижается, активность NADP-ИЦДГ – повышается.

Так как пентозофосфатный цикл является конкурентом гликолизу за субстрат, можно предположить, что при снижении активности Г6ФДГ интенсивность субстратного потока по гликолизу возрастет. Действительно, у больных РГП в нейтрофилах активность анаэробной реакции ЛДГ (NADH-ЛДГ) повышается относительно контрольных значений, причем у пациентов без последующего развития сепсиса ее активность значительно выше, чем у пациентов с последующим развитием сепсиса. Следовательно, у больных РГП, послеоперационный период которых пройдет без осложнений, нагрузка АТФ в гликолизе более выражена, чем у пациентов с последующим развитием сепсиса.

Нейтрофилы являются клетками, осуществляющими свою функцию преимущественно в анаэробных условиях. Однако их метаболизм также зависит от состояния обменных процессов в митохондриях [13]. Обнаружено, что активность NAD-ИЦДГ в нейтрофилах крови у больных РГП повышена независимо от наличия/отсутствия последующих осложнений. Фермент является лимитирующим интенсивность субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот, который в значительной степени определяет активность аэробного дыхания [10]. Однако активность МДГ (другой фермент лимонного цикла) в нейтрофилах больных не изменена. Кроме того, у обследованных пациентов обнаружено повышение активности NADH-зависимой реакции МДГ, которая является ключевой в системе малат-аспартатного шунта митохондрий [11]. Подобный дисбаланс может значительно снизить энергетические возможности клеток и, безусловно, повлиять на их функциональную активность.

Цикл трикарбоновых кислот является анаэробным, соединяющим все основные метаболические процессы в клетке. В связи с этим можно предположить, что снижение интенсивности субстратного потока в промежутке между NAD-ИЦДГ и МДГ связана с выведением субстратов с лимонного цикла. Данная особенность зафиксирована в нейтрофилах у больных РГП с последующим развитием сепсиса. Обнаружено, что в клетках у лиц данной группы значительно повышается активность NADH-ГДГ, что отражает отток субстратов с лимонного цикла на реакции аминокислотного обмена.

С помощью корреляционного анализа мы оценили влияние активности NAD(P)-зависимых

дегидрогеназ на интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов. Установлено, что у здоровых людей в нейтрофилах крови активность NADPH-оксидазы (определяющая состояние люцигенин-зависимой хемилюминесценции за счет синтеза супероксид-радикала) положительно взаимосвязана с активностью NADP-ИЦДГ и отрицательно – с ГР. Уровень синтеза вторичных АФК в нейтрофилах у лиц данной группы положительно коррелирует с активностью NADP-МДГ. Выявленные корреляционные связи характеризуют стимулирующее влияние ферментов, синтезирующих NADPH, на состояние респираторного взрыва. У больных РГП без последующего развития сепсиса уровень синтеза первичных и вторичных АФК нейтрофилами только отрицательно взаимосвязан с активностью ГР и NADP-МДГ. И если в первом случае отрицательную взаимосвязь также можно рассматривать в качестве наличия конкурентных взаимоотношений за кофермент, то во втором случае инверсия (по сравнению с выявленной у здоровых людей) корреляционной связи отражает нарушения в метаболических механизмах поддержания респираторного взрыва в нейтрофилах. В то же время, исходя из особенностей корреляционных связей, у больных РГП с последующим развитием сепсиса в нейтрофилах крови выявляются еще большие нарушения в метаболических механизмах поддержания респираторного взрыва. Так, у пациентов данной группы с уровнем синтеза первичных и вторичных АФК положительно взаимосвязана активность ГР и отрицательно – NADP-МДГ и NADP-ИЦДГ. Данные взаимосвязи отражают отсутствие конкурентных взаимодействий активности NADPH-оксидазы с активностью ГР, но их появление с уровнями активности NADPH-синтезирующих ферментов.

Как уже отмечалось, функциональная активность нейтрофилов зависит от их энергетического статуса. Обнаружено, что если у здоровых людей активность МДГ положительно взаимосвязана с синтезом вторичных АФК, то у больных РГП без последующего развития сепсиса с уровнем синтеза первичных и вторичных АФК также положительно взаимосвязана активность ГЗФДГ. Данный фермент за счет продуктов липидного катаболизма осуществляет субстратную стимуляцию гликолиза [13]. У больных РГП с последующим развитием сепсиса выявлена отрицательная взаимосвязь активности МДГ с уровнем синтеза первичных АФК. Данная взаимосвязь является противоположной по знаку выявленной у здоровых лиц и отражает

наличие конкурентных взаимодействий между метаболизмом митохондриального компартмента и активностью NADPH-оксидазы.

Таким образом, установлено, что у больных РГП увеличивается интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов крови за счет активации синтеза как первичных, так и вторичных АФК. У больных РГП, у которых в динамике послеоперационного периода развивается абдоминальный сепсис, хемилюминесцентная активность нейтрофилов крови характеризуется пониженным уровнем спонтанного синтеза первичных АФК и повышенным уровнем спонтанного синтеза вторичных АФК относительно показателей, выявленных у больных без последующего развития осложнений. Уровни синтеза первичных и вторичных АФК нейтрофилами при индукции респираторного взрыва зимозаном незначительно различаются в группах больных РГП в зависимости от последующего развития сепсиса в послеоперационном периоде. Метаболизм нейтрофилов у больных РГП характеризуется снижением интенсивности пластических процессов за счет низкой активности Г6ФДГ и дисбалансом активности ферментов митохондриального компартмента. Особенностью метаболизма нейтрофилов у больных РГП без последующего развития сепсиса является высокая активность анаэробной реакции ЛДГ и снижение активности NADP-МДГ. У больных РГП с последующим развитием сепсиса обнаружен высокий уровень NAD-зависимого оттока субстратов с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена через глутаматдегидрогеназу, что может повлиять на активность аэробного дыхания нейтрофилов. С помощью корреляционного анализа установлено, что интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов у больных без последующего развития осложнений зависит от активности анаэробного гликолиза. У пациентов с последующим развитием сепсиса в нейтрофилах крови выявляются конкурентные взаимосвязи между уровнями синтеза первичных и вторичных АФК и активностью ферментов. Установленные различия в состоянии респираторного взрыва и активности ферментов в нейтрофилах у больных РГП в зависимости от последующего развития сепсиса определяют возможность разработки метода прогноза развития осложнений и разработки иммуноактивной терапии в послеоперационном периоде РГП.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Краевого государственного автономного учреждения “Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности” в рамках реализации проекта “Подготовка к серийному производству биохемилюминесцентного комплекса”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Лебедев Н.В., Климов А.Е., Агрба С.Б., Гайдукевич Е.К. Комбинированная система прогнозирования исхода перитонита. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова 2017, 9, 33–37. [Lebedev N.V., Klimov A.E., Agrba S.B., Gaydukevich E.K. Combined system for predicting the outcome of peritonitis. Surgery. Journal of them. N.I. Pirogov 2017, 9, 33–37.]
2. Niu B., Kim B., Limketkai B.N., Sun J., Li Z., Woreta T., Chen P.H. Mortality from Spontaneous Bacterial Peritonitis Among Hospitalized Patients in the USA. Dig. Dis. Sci. 2018, 63(5), 1327–1333.
3. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните. Новосибирск, Наука, 2013, 9–34. [Savchenko A.A., Zdzitoveckij D. Je., Borisov A.G. The immune and metabolic disorders by the widespread purulent peritonitis. Novosibirsk, Nauka, 2013, 9–34.]
4. Fernandez J.U., Millrine D., Jones S.A. Tracking Competent Host Defence to Chronic Inflammation: An In Vivo Model of Peritonitis. Methods Mol. Biol. 2018, 1725, 65–75.
5. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.Л. Гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1. Инфекция и иммунитет 2017, 7(3), 219–230. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.L. Thenevlook at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 1. Russian Journal of Infection and Immunity 2017, 7(3), 219–230.]
6. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? Front Physiol. 2018, 9, 113.
7. Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Борисов А.Г. Методы оценки и роль респираторного взрыва в патогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний. Инфекция и иммунитет 2017, 7(4), 327–340. [Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Borisov A.G. Methods of estimation and the role of respiratory burst in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases. Russian Journal of Infection and Immunity 2017, 7(4), 327–340.]
8. Шкапова Е.А., Куртасова Л.М., Савченко А.А., Зюков Р.А., Крылова Г.Н. Сравнительный анализ функциональной активности нейтрофильных

- гранулоцитов крови больных почечно-клеточным раком до и после оперативного лечения. Клиническая лабораторная диагностика 2004, 1, 39–41. [Shkapova E.A., Kurtasova L.M., Savchenko A.A., Zukov R.A., Krylova G.N. Comparative analysis of the functional activity of neutrophilic granulocytes in patients with renal cell carcinoma before and after surgical treatment. Clinically laboratory diagnostics 2004, 1, 39–41.]
9. Stålhammar M.E., Douhan Håkansson L., Sindelar R. Bacterial N-formyl Peptides Reduce PMA- and Escherichia coli-Induced Neutrophil Respiratory Burst in Term Neonates and Adults. Scand. J. Immunol. 2017, 85(5), 365–371.
 10. Савченко А.А. Определение активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах биолюминесцентным методом. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2015, 159(5), 656–660. [Savchenko A.A. Evaluation of NAD(P)-Dependent Dehydrogenase Activities in Neutrophilic Granulocytes by the Bioluminescent Method. Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2015, 159(5), 656–660.]
 11. Richer B.C., Salei N., Laskay T., Seeger K. Changes in Neutrophil Metabolism upon Activation and Aging. Inflammation 2018, 41(2), 710–721.
 12. Bantug G.R., Galluzzi L., Kroemer G., Hess C. The spectrum of T cell metabolism in health and disease. Nat. Rev. Immunol. 2018, 18(1), 19–34.
 13. McCracken J.M., Kinkead L.C., McCaffrey R.L., Allen L.A. Francisella tularensis Modulates a Distinct Subset of Regulatory Factors and Sustains Mitochondrial Integrity to Impair Human Neutrophil Apoptosis. J. Innate Immun. 2016, 8(3), 299–313.

FEATURES OF INTRACELLULAR ENZYMES ACTIVITY INFLUENCE ON THE RESPIRATORY BURST STATE OF NEUTROPHILES AT THE FOLLOWING DEVELOPMENT OF SEPSIS IN PATIENTS WITH WIDESPREAD PURULENT PERITONITIS

© 2018 A. A. Savchenko^{1*}, A. G. Borisov¹, D. J. Zdzitovecki², I. I. Gvozdev¹

*E-mail: aasavchenko@yandex.ru

¹Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center” of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;


²Department and Clinic of Surgical Diseases named after prof. Yu. M. Lubensky of the Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia

Received: 29.04.2018. **Accepted:** 04.05.2018

The purpose of the research was to study the features of the respiratory burst activity and NAD(P)-dependent dehydrogenases activities in blood neutrophils in the forecast of the development of abdominal sepsis in patients with widespread purulent peritonitis (WPP). The study involved 50 patients with WPP in the preoperative period. Abdominal sepsis was developed by 35 patients (70.0%) from 5 to 10 days postoperative period, 15 patients (30.0%) hadn't complications. The respiratory burst condition of blood neutrophils was examined using a chemiluminescent assay. Intracellular activity of the NAD(P)-dependent dehydrogenases was researched with using bioluminescent methods. It was found that patients with WPP whose dynamics of the preoperative period will develop sepsis the chemiluminescent activity of blood neutrophils was characterized by a reduced level of spontaneous synthesis of the primary reactive oxygen species (ROS) and elevated levels of spontaneous synthesis of secondary ROS relative of the indicators identified in patients without subsequent complications. The feature of neutrophil metabolism in WPP patients without subsequent development of sepsis was high activity of the anaerobic lactate dehydrogenase reaction and decrease in activity of the NADP-dependent decarboxylating malate dehydrogenase. In patients with WPP and the subsequent development of sepsis was found high level of NAD-dependent substrates outflow citric acid cycle in the reaction of amino acid metabolism via glutamate dehydrogenase that may affect the activity of aerobic respiration in the neutrophils. Using correlation analysis was found that the intensity of the neutrophils respiratory burst in patients with no subsequent complications depends on the activity of anaerobic glycolysis. Patients with subsequent development of sepsis in the blood neutrophils were detected competitive relationship between the levels of primary and secondary ROS synthesis and enzyme activity.

Key words: peritonitis, sepsis, neutrophils, respiratory burst, metabolism, dehydrogenases

Authors:

Savchenko A. A.,  MD (Medicine), professor, head of the Laboratory of the Cellular Molecular Physiology and Pathology of the Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center” of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia; 660022, Krasnoyarsk, P. Geleznyaka street, 3G. Phone: +79059713715 (mob.).
E-mail: aasavchenko@yandex.ru;

Borisov A. G., PhD, leading researcher, Laboratory of the Cellular Molecular Physiology and Pathology of the Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center” of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;

Zdzitovecki D. J., MD (Medicine), head of the Department and Clinic of Surgical Diseases named after prof. Yu. M. Lubensky of the Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia;

Gvozdev I. I., junior researcher, Laboratory of the Cellular Molecular Physiology and Pathology of the Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center” of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia.