

## ЗАВИСИМОСТЬ ФЕНОТИПА Т-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ОТ ИСХОДА РАСПРОСТРАНЕННОГО ГНОЙНОГО ПЕРИТОНИТА

© 2019 г. В. Д. Беленюк<sup>1</sup>, А. А. Савченко<sup>1,2\*</sup>, А. Г. Борисов<sup>1</sup>,  
И. В. Кудрявцев<sup>3</sup>

\*E-mail: aasavchenko@yandex.ru

<sup>1</sup>ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Красноярск, Россия;

<sup>3</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 25.09.2018. Принята: 25.08.2019

С целью исследования фенотипического состава Т-лимфоцитов периферической крови у людей в динамике послеоперационного лечения в зависимости от исхода распространенного гнойного перитонита (РГП) обследовано 38 пациента с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП. Забор крови производили перед операцией (дооперационный период), а также на 7, 14 и 21 сутки послеоперационного периода. Исследование фенотипа Т-лимфоцитов крови проводили методом проточной цитометрии. Установлено, что фенотип Т-лимфоцитов крови у больных РГП в до- и послеоперационном периоде значительно различается в зависимости от исхода заболевания. При благоприятном исходе РГП в дооперационном периоде выявляется повышенное количество общих Т-лимфоцитов, в том числе, с экспрессией CD62L, а также CD4<sup>+</sup>-Т-клеток, прежде всего за счет Treg (включая активированные клетки). Следовательно, повышение количества в крови Treg у больных РГП на пике заболевания является прогностическим признаком благоприятного исхода. Treg регулируют интенсивность воспалительного процесса, что приводит к улучшению клинического состояния больных РГП и, соответственно, повышает вероятность благоприятного исхода заболевания. Фенотип Т-лимфоцитов крови значительно меняется в динамике послеоперационного лечения. Независимо от исхода заболевания у больных значительно снижается содержание Т-клеток, экспрессирующих CD28 и CD62L, а также уровень Т-хелперов и Treg. Только при благоприятном исходе заболевания к концу наблюдаемого периода (21 сутки лечения) в крови повышается количество цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-клеток с экспрессией CD57. Данные изменения фенотипического состава Т-лимфоцитов определяются применением антибиотиков и миграцией клеток в зону воспаления.

**Ключевые слова:** перитонит, Т-лимфоциты, Т-регуляторные клетки, послеоперационный период, исход заболевания

DOI: 10.31857/S102872210007041-0

**Адрес:** 660022, Красноярск, ул. П. Железняк, 3Г, лаборатория клеточно-молекулярной физиологии и патологии, НИИ медицинских проблем Севера, Савченко Андрей Анатольевич. Тел.: +7 905 971-3715. E-mail: aasavchenko@yandex.ru

**Авторы:**

**Беленюк В. Д.**, 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;

**Савченко А. А.**, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красно-

ярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск, Россия; кафедра медицинской биологии ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», 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;

**Кудрявцев И. В.**, к.б.н., с.н.с. отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на постоянное совершенствование методов хирургического лечения, а также увеличения количества препаратов, призванных в кратчайшие сроки купировать воспалительный процесс и активно бороться с инфекцией, неблагоприятный исход гнойно-септических заболеваний до сих пор остается на высоком уровне. По мнению большинства специалистов, одним из наиболее проблемных заболеваний абдоминальной хирургии является распространенный гнойный перитонит (РГП), летальность при котором может варьироваться в пределах от 10 до 30%, а при генерализации воспаления и развитии полиорганной недостаточности достигать 80–90% [1, 2, 3].

Установлено, что тяжесть течения РГП, а также характер и особенности развития различных сопутствующих осложнений, как правило, определяются не только генезом основного патологического процесса и адекватностью проводимого лечения, но и во многом зависят от изменений, происходящих в системе иммунитета [4, 5]. Значительное количество исследований, посвященных иммунопатогенезу РГП, направлено на характеристику различных клеточных и гуморальных показателей врожденного иммунитета [6, 7]. Доказано, что функциональная активность клеток врожденного иммунитета во многом определяет тяжесть и характер течения РГП. В тоже время, ни в коем случае нельзя пренебрегать важностью изменений, которым подвергаются клетки адаптивного иммунитета и, в частности, Т-лимфоциты, которые осуществляют не только многочисленные эффекторные, но еще и регуляторные функции [8, 9]. Так, в исследовании Wang W. et al. (2018) показано, что такой поверхностный антиген Т-лимфоцитов как TIM-3 (от англ. «T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3» или CD366) является важным негативным регулятором воспаления при перитонитах и может рассматриваться в качестве потенциальной мишени для лечения заболеваний с неконтролируемой активацией воспаления [10]. Другой группой исследователей доказано, что Th17-лимфоциты стимулируют развитие эффективного противобактериального иммунного ответа при перитонитах [11]. Следовательно, детальное изучение изменений состояния Т-клеточного звена приобретенного иммунитета при РГП является весьма перспективной.

**Целью исследования** явилась оценка фенотипического состава Т-лимфоцитов перифериче-

ской крови у людей в динамике послеоперационного лечения в зависимости от исхода РГП.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На базе Красноярского краевого гнойно-септического центра Краевой клинической больницы № 1 обследовано 38 пациентов с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП, в возрасте 25–65 лет (средний возраст пациентов составил 49,6 лет). Из исследования были исключены пациенты, у которых причиной РГП являлись: острый деструктивный панкреатит (панкреонекроз), тотальный мезентериальный тромбоз, онкологические заболевания, туберкулез. Объем оперативного вмешательства и количество санаций определялись лечащим врачом в зависимости от состояния больного. Забор крови производили перед операцией (дооперационный период), а также на 7, 14 и 21 сутки послеоперационного периода. В качестве контроля обследовано 40 относительно здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипа Т-лимфоцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с моноклональными антителами (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: CD62L-FITC/CD127-PE/CD3-ECD/CD25-PC5/CD4-PC7 и CD57-FITC/CD28-PE/CD3-ECD/CD62L-PC5/CD45-PC7. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [12]. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [13]. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, USA) центра коллективного пользования КНЦ СО РАН. В каждой пробе анализировали не менее 50000 лимфоцитов.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования» с поправками 2008 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Выборку описывали 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 (Mann-Whitney U test). Достоверность различий в динамике лечения определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Статистический анализ осуществляли в пакете программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Обнаружено снижение количества общих лимфоцитов у больных РГП в дооперационном периоде независимо от исхода заболевания (табл. 1). В послеоперационном периоде, начиная с 7 суток лечения, уровень лимфоцитов у пациентов с РГП повысился до контрольного диапазона. На 14-е сутки послеоперационного периода у больных с неблагоприятным исходом РГП (группа 2) наблюдается относительное понижение количества лимфоцитов по сравнению с пациентами с благоприятным исходом

заболевания (группа 1). Только у больных с благоприятным исходом заболевания в дооперационном периоде выявляется повышение уровня  $CD3^+$ -лимфоцитов относительно контрольных значений. Начиная с 7-х суток послеоперационного лечения, у лиц данной группы наблюдается снижение уровня Т-клеток до контрольных значений. Только на 21-е сутки лечения у больных РГП относительно контрольного уровня обнаружено понижение содержания  $CD3^+CD28^+$ -клеток. У больных с благоприятным исходом РГП на 14-е и 21-е сутки послеоперационного лечения наблюдается повышение количества  $CD3^+CD57^+$ -лимфоцитов относительно контрольных значений и показателей, выявляемых у пациентов с неблагоприятным исходом заболевания. В дооперационном периоде относительно контрольного диапазона при благоприятном исходе РГП наблюдается повышение количества  $CD3^+CD62L^+$ -клеток, тогда как при неблагоприятном — понижение. На 21-е сутки послеоперационного периода содержание данной фракции лимфоцитов между группами больных выравнивается, но оказывается ниже, чем у лиц контрольной группы.

**Таблица 1.** Содержание Т-лимфоцитов у больных РГП в динамике послеоперационного периода (Me, ( $C_{25}$ – $C_{75}$ ))

Показатель	Группа	Контроль	До операции	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Лимфоциты, $10^9/л$	1	1,70 (0,30–2,28)	0,93*** (0,77–1,31)	1,22 (0,83–1,49)	1,51 (1,17–2,06)	1,47 (0,98–2,28)
	2		0,69*** (0,41–1,28)	0,90 (0,74–1,85)	1,05# (0,65–1,13)	2,08 (1,33–2,83)
$CD3^+$ , %	1	72,7 (68,1–76,7)	76,1* (71,7–82,0)	72,6 (67,2–81,5)	80,0 (70,0–82,6)	76,9 (69,9–89,9)
	2		73,1 (67,0–88,3)	70,7 (63,8–78,9)	78,4 (64,3–83,2)	75,9 (61,0–81,6)
$CD3^+CD28^+$ , %	1	65,0 (56,1–71,4)	68,7 (62,4–75,9)	56,2 (48,4–72,0)	54,3 (49,3–69,1)	36,1** (32,1–38,2)
	2		66,9 (59,9–72,7)	64,6 (50,2–71,4)	60,1 (56,1–69,6)	50,1* (31,0–59,3)
$CD3^+CD57^+$ , %	1	8,5 (4,8–12,3)	8,5 (4,5–16,1)	11,3 (8,2–18,8)	20,1** (11,3–22,6)	27,5** (20,8–29,2)
	2		10,6 (9,5–13,0)	7,8 (4,6–17,2)	7,4# (4,6–10,2)	13,5# (13,0–15,5)
$CD3^+CD62L^+$ , %	1	42,2 (36,7–51,0)	51,2* (47,2–55,0)	48,9 (34,2–54,6)	46,7 (41,0–52,5)	32,5* (27,2–36,0)
	2		38,0*# (34,1–48,1)	35,5 (31,6–48,4)	40,0 (19,1–40,2)	27,0** (23,3–33,4)

**Примечание:** 1 – больные с благоприятным исходом РГП; 2 – больные с неблагоприятным исходом РГП; \* – сравнение с контролем (\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ ); # – сравнение между группами 1 и 2 (# –  $p < 0,05$ , ## –  $p < 0,01$ ).

**Таблица 2.** Содержание CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов у больных РГП в динамике послеоперационного периода (Ме, (C<sub>25</sub>-C<sub>75</sub>))

Показатель	Группа	Контроль	До операции	7 сутки	14 сутки	21 сутки
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , %	1	26,5 (21,7–30,7)	21,2 (14,8–28,3)	22,1 (19,7–31,4)	37,1 (22,9–40,2)	40,9* (32,6–42,0)
	2		23,5 (15,2–27,1)	19,1 (14,7–27,7)	19,5 (16,8–31,3)	33,8 (31,5–36,2)
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> , %	1	24,9 (20,2–29,6)	21,2 (14,8–28,3)	22,0 (19,6–31,3)	37,1* (22,6–40,2)	40,7* (32,5–41,8)
	2		23,5 (15,2–27,0)	19,0 (14,6–27,1)	19,2 (16,6–30,9)	33,5 (31,2–35,8)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , %	1	44,0 (37,7–48,5)	54,0*** (45,6–60,5)	45,1 (37,6–51,6)	46,7 (39,8–50,5)	31,4* (28,5–37,4)
	2		46,4 (42,5–52,3)	42,5 (32,9–50,1)	38,0 (19,1–51,2)	26,3* (25,6–37,4)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> , %	1	29,4 (24,6–35,9)	53,2*** (39,7–83,8)	52,9*** (36,0–78,1)	38,1* (30,8–77,7)	21,2* (18,6–27,8)
	2		32,1 (29,8–46,5)	39,5 (20,5–52,9)	31,1 (28,6–59,9)	26,4 (19,8–68,0)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD127 <sup>Low</sup> CD25 <sup>High</sup> , %	1	5,1 (4,0–6,6)	11,2*** (7,3–15,5)	9,3** (4,8–15,7)	6,3 (4,9–17,0)	3,1* (2,8–4,0)
	2		4,4# (3,0–10,4)	6,2 (2,4–14,7)	6,3 (5,4–26,9)	2,5* (0,3–4,4)
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD127 <sup>Low</sup> CD25 <sup>High</sup> CD62L <sup>+</sup> , %	1	3,8 (2,9–4,9)	7,3*** (5,7–10,4)	6,4*** (4,0–8,6)	5,7* (4,0–11,5)	2,6 (2,3–3,3)
	2		3,4## (2,1–5,5)	3,5 (1,2–6,6)	4,8 (4,2–8,1)	2,2* (0,01–2,8)

**Примечание:** 1 – больные с благоприятным исходом РГП; 2 – больные с неблагоприятным исходом РГП; \* – сравнение с контролем (\* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001); # – сравнение между группами 1 и 2 (# – p<0,05, ## – p<0,01).

Процентное количество CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-клеток у больных РГП в дооперационном и на протяжении первых двух недель послеоперационного периода соответствуют контрольному диапазону (табл. 2). На 21-е сутки лечения только при благоприятном исходе наблюдается повышение количества клеток с данным фенотипом относительно контрольного диапазона. Содержание CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-лимфоцитов в крови у обследованных пациентов в целом соответствует количеству CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-клеток. Только при благоприятном исходе заболевания на 14-е и 21-е сутки лечения наблюдается повышение уровня CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>-клеток относительно контрольного диапазона.

У больных с благоприятным исходом РГП в дооперационном периоде выявляется повышение уровня CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов относительно контрольных значений (см. табл. 2). На 21-сутки послеоперационного лечения у всех

обследованных пациентов независимо от исхода заболевания наблюдается понижение содержания лимфоцитов с данным фенотипом относительно контрольного диапазона. Только при благоприятном исходе инфекционно-воспалительного заболевания в дооперационном и в первые две недели послеоперационного периода относительно контрольных значений выявляется повышение уровня CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>-лимфоцитов. Содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD127<sup>Low</sup>CD25<sup>High</sup>-клеток у больных с благоприятным исходом РГП в дооперационном периоде повышается относительно контрольных значений, при неблагоприятном исходе – понижается. На 7-е сутки послеоперационного лечения количество данных клеток при благоприятном исходе остается на повышенном уровне, на 14-е сутки – соответствуют контрольному диапазону, на 21-е сутки наблюдается понижение их количества относительно контрольного уровня. В первые две

недели послеоперационного периода при неблагоприятном исходе РГП наблюдается соответствие уровня регуляторных Т-клеток с фенотипом  $CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}$  контрольному диапазону, но на 21-е сутки лечения выявляется значительное понижение. Количество  $CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}CD62L^+$ -клеток в крови у больных РГП с благоприятным исходом заболевания в дооперационном периоде значительно превышает контрольный диапазон, содержание остается повышенным в первые две недели послеоперационного периода и понижается до контрольного уровня к 21-м суткам лечения. При неблагоприятном исходе заболевания уже в дооперационном периоде выявляется понижение количества  $CD3^+CD4^+CD127^{Low}CD25^{High}CD62L^+$ -клеток, их содержание восстанавливается до контрольного диапазона в первые две недели послеоперационного лечения, но на 21-е сутки лечения значительно снижается.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Фенотипический состав Т-лимфоцитов у больных РГП в динамике послеоперационного периода значительно меняется, в том числе и в зависимости от исхода заболевания. Так, в дооперационном периоде при благоприятном исходе РГП выявляется повышенное количество Т-лимфоцитов, которое в течение всего наблюдаемого послеоперационного периода снижается до уровня контрольных значений. Тогда как у пациентов с неблагоприятным исходом РГП содержание Т-лимфоцитов в крови на всем протяжении обследования не изменяется и соответствует контрольному диапазону.

В качестве дополнительных молекул, представленных на поверхности Т-лимфоцитов и характеризующих их функциональную активность, были исследованы CD28, CD57 и CD62L. Так, CD28 является гомодимером, принимает участие в формировании «второго» или ко-стимуляционного сигнала для Т-лимфоцитов [14, 15]. Доказано, что стимуляция Т-клеток через Т-клеточный рецептор при отсутствии ко-стимулирующего сигнала от CD28 вызывает развитие толерантности или индукцию апоптоза [16, 17]. Обнаружено, что независимо от исхода РГП у обследованных больных к концу наблюдаемого периода снижается количество Т-лимфоцитов с экспрессией CD28. CD57 (NHK1) — углеводный эпитоп, экспрессированный на ряде клеток иммунной системы. Доказано, что экспрессия CD57 на поверхности зрелых эффекторных цитотоксических Т-лим-

фоцитов характеризует наличие в их цитоплазме гранул, содержащих перфорин и гранзимы [18, 19, 20]. При благоприятном исходе РГП в крови наблюдалось увеличение уровня Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD57, начиная с 14-х суток послеоперационного лечения. У больных с неблагоприятным исходом РГП в до- и послеоперационном периоде не выявляется изменений в количестве Т-клеток с экспрессией CD57. CD62L является мембранным гликопротеидом семейства L-селектинов, который экспрессируется на различных клетках иммунной системы и обеспечивает межклеточные взаимодействия и направленную миграцию Т-лимфоцитов в периферические лимфоидные органы [21, 22]. У больных с благоприятным исходом заболевания в дооперационном периоде установлено превышение количества Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD62L, на 21,3% по сравнению с контрольными значениями и понижение их содержания к концу третьей недели послеоперационного периода в 1,3 раза. В то же время, при неблагоприятном исходе РГП обнаружен низкий уровень  $CD62L^+$ -Т-клеток в дооперационном периоде и на 21-е сутки послеоперационного лечения.

Выявленные изменения в содержании цитотоксических Т-клеток и  $CD4^+$  Т-лимфоцитов у больных в зависимости от исхода РГП. Так, только у пациентов с благоприятным исходом РГП к концу наблюдаемого периода послеоперационного лечения повышается количество цитотоксических Т-лимфоцитов (на 21 сутки) и активированных цитотоксических Т-клеток (с 14 суток). У больных с неблагоприятным исходом РГП количество цитотоксических Т-лимфоцитов в крови (включая активированные) и в до-, и в послеоперационном периоде соответствует контрольным значениям.

В дооперационном периоде при благоприятном исходе заболевания выявляется повышение количества  $CD4^+$ -Т-лимфоцитов, однако к 21-м суткам послеоперационного лечения наблюдается снижение уровня Т-хелперов у лиц данной группы. При неблагоприятном исходе РГП наблюдается только понижение содержания Т-хелперов к концу наблюдаемого периода. В то же время, повышенное в дооперационном периоде количество активированных  $CD4^+$ -Т-лимфоцитов (экспрессирующих CD62L) при благоприятном исходе РГП остается увеличенным в течение 14 дней послеоперационного лечения, тогда как при неблагоприятном исходе заболевания изменений в уровне активирован-

ных Т-хелперов в течение всего наблюдаемого периода не обнаружено.

Важную роль в развитии иммуновоспалительных процессов играют Т-регуляторные клетки (Treg). Интенсивность воспалительных процессов во многом зависит от количества и функциональной активности Treg [23, 24, 25]. При исследовании Treg и активированных Treg (с экспрессией CD62L, CD62L<sup>+</sup>-Treg) обнаружено, что при благоприятном исходе РГП выявляется увеличение количества Treg и CD62L<sup>+</sup>-Treg в дооперационном периоде, сохранение повышенного уровня в начале послеоперационного лечения и понижение содержания на 21-е сутки наблюдаемого периода. При неблагоприятном исходе заболевания обнаружено снижение содержания Treg и CD62L<sup>+</sup>-Treg в дооперационном периоде и на 21-е сутки послеоперационного лечения.

В целом, можно заключить, что динамика фенотипического состава Т-лимфоцитов в крови у больных РГП в до- и послеоперационном периоде имеет выраженные особенности в зависимости от исхода заболевания. При благоприятном исходе РГП наблюдается более выраженные изменения фенотипа Т-клеток в дооперационном периоде (повышение количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов и Treg, включая клетки экспрессирующие CD62L), тогда как при неблагоприятном исходе РГП в указанный период выявляется снижение содержания CD62L<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, Treg и CD62L<sup>+</sup>-Treg. Можно предположить, что именно недостаточность (функциональная и количественная) Treg и приводит к неконтролируемой активности воспалительных процессов при РГП и, соответственно, повышает вероятность неблагоприятного исхода заболевания. В конце послеоперационного лечения наблюдается снижение количества некоторых субпопуляций Т-лимфоцитов (например, Т-хелперов). Такая особенность динамики фенотипического состава Т-лимфоцитов уже слабее зависит от исхода заболевания и, по-видимому, в большей степени определяется применением антибиотиков и миграцией Т-клеток в зону воспаления. В частности, повышение содержания у больных с благоприятным исходом РГП Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD57, также может быть связано применением антибиотиков в динамике послеоперационного периода.

Фенотип Т-лимфоцитов крови у больных РГП в до- и послеоперационном периоде значительно различается в зависимости от исхода заболевания. При благоприятном исходе РГП в дооперационном периоде выявляется повы-

шенное количество общих Т-лимфоцитов, в том числе, с экспрессией CD62L, а также CD4<sup>+</sup>-Т-клеток, прежде всего за счет Treg (включая активированные клетки). Следовательно, повышение количества в крови Treg у больных РГП на пике заболевания является прогностическим признаком благоприятного исхода. Treg регулируют интенсивность воспалительного процесса, что приводит к улучшению клинического состояния больных РГП и, соответственно, повышает вероятность благоприятного исхода заболевания. Фенотип Т-лимфоцитов крови значительно меняется в динамике послеоперационного лечения. Независимо от исхода заболевания у больных значительно снижается содержание Т-клеток, экспрессирующих CD28 и CD62L, а также уровень Т-хелперов и Treg. Только при благоприятном исходе заболевания к концу наблюдаемого периода (21 сутки лечения) в крови повышается количество цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-клеток с экспрессией CD57. Данные изменения фенотипического состава Т-лимфоцитов определяются применением антибиотиков и миграцией клеток в зону воспаления. Установленные особенности фенотипа Т-лимфоцитов в крови у больных РГП в дооперационном периоде и в динамике послеоперационного лечения определяют необходимость разработки методов иммуноактивной терапии для успешного лечения заболевания.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. 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. Immune The immune and metabolic disorders by the widespread purulent peritonitis. Novosibirsk, Nauka, 2013, 9–34].
2. Ding W., Wang K., Liu B., Fan X., Wang S., Cao J., Wu X., Li J. Open Abdomen Improves Survival in Patients With Peritonitis Secondary to Acute Superior Mesenteric Artery Occlusion. *J. Clin. Gastroenterol.* 2017, 51(9), e77-e82.
3. Obi Y., Streja E., Mehrotra R., Rivara M. B., Rhee C. M., Soohoo M., Gillen D. L., Lau W. L., Kovessy C. P., Kallantar-Zadeh K. Impact of Obesity on Modality Longevity, Residual Kidney Function, Peritonitis, and Survival Among Incident Peritoneal Dialysis Patients. *Am. J. Kidney Dis.* 2018, 71(6), 802–813.
4. Mai M., Stengel S., Al-Herwi E., Peter J., Schmidt C., Rubio I., Stallmach A., Bruns T. Genetic variants of TRAF6 modulate peritoneal immunity and the risk of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: A combined prospective-retrospective study. *Sci. Rep.* 2017, 7(1), 4914.

5. Mousa N., Besheer T., Abdel-Razik A., Hamed M., Deiah A. G., Sheta T., Eldars W. Can combined blood neutrophil to lymphocyte ratio and C-reactive protein be used for diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis? Br. J. Biomed. Sci. 2018, 75(2), 71–75.
6. Савченко А.А., Гвоздев И.И., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Мошев А.В. Особенности фагоцитарной активности и состояния респираторного взрыва нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода. Инфекция и иммунитет 2017, 7(1), 51–60. [Savchenko A. A., Gvozdev I. I., Borisov A. G., Cherdancev D. V., Pervova O. V., Kudryavtsev I. V., Moshev A. V. Phagocytic activity and blood neutrophils respiratory burst state features amongst widespread purulent peritonitis patients in the postoperative period dynamics. Russian Journal of Infection and Immunity 2017, 7(1), 51–60.]
7. Cullaro G., Kim G., Pereira M. R., Brown R. S. Jr., Verna E. C. Ascites Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Identifies Spontaneous Bacterial Peritonitis and Predicts Mortality in Hospitalized Patients with Cirrhosis. Dig. Dis. Sci. 2017, 62(12), 3487–3494.
8. Lee J. Y., Kim S. M., Park S. J., Lee S. O., Choi S. H., Kim Y. S., Woo J. H., Kim S. H. A rapid and non-invasive 2-step algorithm for diagnosing tuberculous peritonitis using a T cell-based assay on peripheral blood and peritoneal fluid mononuclear cells together with peritoneal fluid adenosine deaminase. J. Infect. 2015, 70(4), 356–366.
9. Nemzek J. A., Fry C., Moore B. B. Adoptive transfer of fibrocytes enhances splenic T-cell numbers and survival in septic peritonitis. Shock 2013, 40(2), 106–114.
10. Wang W., Shi Q., Dou S., Li G., Shi X., Jiang X., Wang Z., Yu D., Chen G., Wang R., Xiao H., Hou C., Feng J., Shen B., Ma Y., Han G. Negative regulation of Nod-like receptor protein 3 inflammasome activation by T cell Ig mucin-3 protects against peritonitis. Immunology 2018, 153(1), 71–83.
11. Yu W., Yao D., Yu S., Wang X., Li X., Wang M., Liu S., Feng Z., Chen X., Li W., Wang L., Liu W., Ma J., Yu L., Tong C., Song B., Cui Y. Protective humoral and CD4(+) T cellular immune responses of *Staphylococcus aureus* vaccine MntC in a murine peritonitis model. Sci. Rep. 2018, 8(1), 3580.
12. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шести-цветного цитофлуориметрического анализа. Медицинская иммунология 2015, 17(1), 19–26. [Kudryavtsev I. V., Subbotovskaya A. I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. Medical Immunology 2015, 17(1), 19–26.]
13. Sutherland D. R., Ortiz F., Quest G., Illingworth A., Benko M., Nayyar R., Marinov I. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. Cytometry B Clin Cytom. 2018, 94(1), 1–15.
14. Geng L., Liu J., Huang J., Lin B., Yu S., Shen T., Wang Z., Yang Z., Zhou L., Zheng S. A high frequency of CD8(+) CD28(-) T-suppressor cells contributes to maintaining stable graft function and reducing immunosuppressant dosage after liver transplantation. Int. J. Med. Sci. 2018, 15(9), 892–899.
15. Langenhorst D., Haack S., Göb S., Uri A., Lühder F., Vanhove B., Hünig T., Beyersdorf N. CD28 costimulation of T helper 1 cells enhances cytokine release *in vivo*. Front Immunol. 2018, 9, 1060.
16. Marangoni F., Zhang R., Mani V., Thelen M., Ali Akbar N. J., Warner R. D., Aijö T., Zappulli V., Martinez G. J., Turka L. A., Mempel T. R. Tumor tolerance-promoting function of regulatory T cells is optimized by CD28, but strictly dependent on calcineurin. J. Immunol. 2018, 200(10), 3647–3661.
17. Porciello N., Kunkl M., Tuosto L. CD28 between tolerance and autoimmunity: the side effects of animal models. F1000Res. 2018, 7, pii: F1000.
18. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Волков А.Е., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Полевщиков А.В. Анализ уровня экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами различного уровня дифференцировки. Тихоокеанский медицинский журнал 2015, 2, 30–35. [Kudryavtsev I. V., Borisov A. G., Volkov A. E., Savchenko A. A., Serebryakova M. K., Polevshchikov A. V. Analysis of CD56 and CD57 expression levels by cytotoxic T-lymphocytes of different differentiation levels. Pacific Medical Journal 2015, 2, 30–35.]
19. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии. Медицинская иммунология 2015, 17(6), 525–538. [Kudryavtsev I. V., Borisov A. G., Crabinet I. I., Savchenko A. A., Serebryakova M. K. Determination of the main subpopulations of cytotoxic T-lymphocytes by multi-color flow cytometry. Medical Immunology 2015, 17(6), 525–538.]
20. Hu G., Wang S. Prognostic role of tumor-infiltrating CD57-positive lymphocytes in solid tumors: a meta-analysis. Oncotarget 2017, 9(8), 8111–8119.
21. Sopper S., Mustjoki S., White D., Hughes T., Valent P., Burchert A., Gjertsen B. T., Gastl G., Baldauf M., Trajanoski Z., Giles F., Hochhaus A., Ernst T., Schenk T., Janssen J. J., Ossenkoppele G. J., Porkka K., Wolf D. Reduced CD62L expression on T cells and increased soluble CD62L levels predict molecular response to tyrosine kinase inhibitor therapy in early chronic-phase chronic myelogenous leukemia. J. Clin. Oncol. 2017, 35(2), 175–184.
22. Spadaro M., Caldano M., Marnetto F., Lugaresi A., Bertolotto A. Natalizumab treatment reduces L-selectin (CD62L) in CD4+ T cells. J. Neuroinflammation 2015, 12, 146.
23. Савченко А.А., Каспаров Э.В., Арутюнян С.С., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В. Взаимосвязь содержания Th- и T-регуляторных клеток в крови и хемилюминесцентной активности нейтрофилов у больных хроническим эндометритом и аднекситом. Медицинская иммунология 2018, 20(1), 61–72. [Savchenko A. A., Kasparov E. V., Arutyunyan S. S., Borisov A. G., Kudryavtsev I. V., Gvozdev I. I., Moshev A. V. Relationship between the Th and T regulatory cells in blood, and chemiluminescent activity of neutrophils in patients with chronic endometritis and adnexitis. Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya 2018, 20(1), 61–72.]

24. Schmid T., Falter L., Weber S., Müller N., Molitor K., Zeller D., Weber-Steffens D., Hehlhans T., Wajant H., Mostböck S., Männel D. N. Chronic inflammation increases the sensitivity of mouse Treg for TNFR2 co-stimulation. *Front Immunol.* 2017, 8, 1471.
25. Sun G., Hou Y., Gong W., Liu S., Li J., Yuan Y., Zhang D., Chen Q., Yan X. Adoptive induced antigen-specific Treg cells reverse inflammation in collagen-induced arthritis mouse model. *Inflammation* 2018, 41(2), 485–495.

## DEPENDENCE OF THE BLOOD T-LYMPHOCYTES PHENOTYPE FROM THE OUTCOME OF THE WIDESPREAD PURULENT PERITONITIS

© 2019 V. D. Belenjuk<sup>1</sup>, A. A. Savchenko<sup>1,2\*</sup>, A. G. Borisov<sup>1</sup>, I. V. Kudryavtsev<sup>3</sup>

\*E-mail: aasavchenko@yandex.ru

<sup>1</sup>Laboratory of the Cellular Molecular Physiology and Pathology, 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;

<sup>2</sup>Department of Medical Biology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia;

<sup>3</sup>Department of immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russia

Received: 27.02.2019. Accepted: 25.08.2019

The purpose of the research was to study the phenotypic composition of peripheral blood T-lymphocytes in humans in the dynamics of postoperative treatment depending on the outcome of the widespread purulent peritonitis (WPP). 38 patients with acute surgical diseases and abdominal cavity injuries complicated by WPP were examined. Blood sampling was performed before the operation (preoperative period) and also on the 7th, 14th and 21st day of the postoperative period. The study of the phenotype of blood T-lymphocytes was carried out by flow cytometry. It was established that the phenotype of blood T-lymphocytes in patients with WPP in the pre- and post-operative period differs significantly in depending on the outcome of the disease. With a favorable outcome of WPP in the pre-operative period, an increased number of common T-lymphocytes, including expression of CD62L, and CD4<sup>+</sup>-T cells, primarily due to Treg (including activated cells) are detected. Consequently, an increase in the amount of Treg in patients with WPP at the peak of the disease is a prognostic sign of a favorable outcome. Treg regulate the intensity of the inflammatory process that leads to an improvement in the clinical state of patients with WPP and accordingly increases the likelihood of a favorable outcome of the disease. The phenotype of blood T-lymphocytes significantly changes in the dynamics of post-operative treatment. Regardless of the outcome of the disease, the content of T-cells expressing CD28 and CD62L, as well as the T-helper and Treg level, is significantly reduced in patients. Only with a favorable outcome of the disease at the end of the observed period (21 days of treatment) in the blood increases the amount of cytotoxic T-lymphocytes and T-cells with CD57 expression. These changes in the phenotypic composition of T-lymphocytes are determined by the use of antibiotics and the migration of cells into the inflammation zone.

*Key words:* peritonitis, T-regulatory cells, postoperative period, outcome of the disease

### Authors:

**Belenjuk V. D.**, 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;

**Savchenko A. A.**, ✉ doctor of 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; Department of Medical Biology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia;

660022, Krasnoyarsk, P. Dzelezniaka str, 3F. Scientific Research Institute of medical problems of the North. Phone/fax: +7 905971-3715; 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;

**Kudryavtsev I. V.**, PhD (Biology), senior research associate, department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; St. Petersburg, Russia.