

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С СЕПСИСОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСХОДА

© 2018 г. А. Ю. Савочкина¹, Л. Р. Пыхова¹, О. С. Абрамовских¹,
А. Е. Полторака², Е. А. Четвернина¹

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия;

²ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», Челябинск, Россия

Поступила: 07.05.2018. Принята: 18.06.2018

Проведен сравнительный анализ функциональной активности нейтрофилов периферической крови у больных с сепсисом в зависимости от исхода на последние сутки. Объектом исследования послужила периферическая кровь пациентов с сепсисом. Выявлено увеличение общего количества лейкоцитов, нейтрофильных внеклеточных сетей и активности внутриклеточного кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов у умерших больных по сравнению с группой живых.

Ключевые слова: сепсис, нейтрофилы, нейтрофильные внеклеточные ловушки

DOI: 10.31857/S102872210002419-5

Адрес: 454092, Челябинск, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Савочкина Альбина Юрьевна.

Тел.: +79127725806. **E-mail:** alina7423@mail.ru

Авторы:

Савочкина А. Ю., д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия;

Пыхова Л. Р., старший лаборант Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия;

Абрамовских О. С., д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия;

Полторака А. Е., врач-хирург хирургического отделения № 1 ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», Челябинск, Россия;

Четвернина Е. А., ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день в мире существует большое количество тяжелых, приводящих к ле-

тальному исходу заболеваний. Среди них сепсис занимает далеко не последнее место и даже случается чаще, чем сердечные и онкологические заболевания. Еще в конце мая Всемирная организация здравоохранения призвала все государства, которые входят в ее состав, направить свои усилия на борьбу с сепсисом, болезнью, которую иногда называют «самым страшным убийцей, о котором вы не слышали». Несмотря на существующие терапевтические стратегии, методы диагностики и возможности антибактериальной терапии при сепсисе, каждую минуту от него погибает 14 человек, а ежегодно от него умирает больше людей, чем от рака простаты, молочной железы и ВИЧ вместе взятых.

Под сепсисом сейчас принято понимать такое состояние, при котором иммунный ответ организма на инфекцию приводит к дисфункции органов и зачастую к полиорганной недостаточности. Такое состояние может наступить или тогда, когда инфекция сильнее, чем иммунный ответ организма, или тогда, когда в ходе работы иммунных клеток повышается уровень воспаления в организме.

Если говорить об иммунном ответе организма на инфекцию важно помнить, что первой линией защиты организма является именно врожденный иммунитет. Наибольший вклад в системе

противоинфекционной защиты организма отводится нейтрофилам, которые рассматриваются как высокопрофессиональные «убийцы», составляющие «отряд быстрого реагирования» на различные патогены [1]. Нейтрофильным гранулоцитам в настоящее время отводится важная роль в развитии и поддержании воспалительных процессов, что обусловлено продукцией ими различных медиаторов воспаления [2].

На сегодняшний день известно, что помимо способности нейтрофилов к фагоцитозу и дегрануляции, они способны после активации выбрасывать во внеклеточное пространство сетеподобные структуры, в состав которых входят гистоны, ДНК, а также различные ферменты и белки гранул. Эти структуры получили название «нейтрофильные внеклеточные ловушки» (Neutrophil Extracellular Traps, NETs или НВЛ) [3]. С одной стороны ловушки способны эффективно уничтожать и задерживать распространение различных патогенов, с другой стороны, как цитотоксические структуры, они могут оказывать повреждение соседних клеток, что будет усиливать воспаление.

Исходя из этого, **целью** настоящего исследования явилось изучение показателей функциональной активности нейтрофилов периферической крови у больных с сепсисом в зависимости от исхода заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Южно-Уральского государственного медицинского университета. Все участники исследования (родственники пациентов) подписывали информированное согласие на добровольное собственное участие в проведении научного исследования.

В исследование включены пациенты с установленным диагнозом сепсиса, обоюбого пола, находящиеся в отделениях гнойной реанимации и интенсивной терапии ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» и МАУЗ ОТКЗ «Городская клиническая больница № 1». Диагноз выставлялся на основании клинических и лабораторных исследований врачами отделения.

Материалом для исследования послужили 142 образца периферической крови септических больных. В группу исследования вошли 18 женщин и 17 мужчин в возрасте от 18 до 80 лет с установленным диагнозом сепсиса. Все больные были разделены на 2 группы в зависимо-

сти от исхода заболевания. 1 группа – больные с сепсисом с благоприятным исходом (n=20). 2 группа – больные с сепсисом с неблагоприятным исходом (летальным исходом) (n=15).

Сбор периферической крови у пациентов осуществляли в пробирку с литий гепарином в объеме 5 мл в динамике с момента постановки диагноза до исхода заболевания.

Проводили подсчет общего количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы по методу Николаевой Н. М. в счетной камере Горяева.

Исследование фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови проводили с помощью световой микроскопии по методу Фрейдлина (Фрейдлин И. С., 1984).

Лизосомальную активность нейтрофилов оценивали по интенсивности люминесценции лизосом нейтрофилов, окрашенных акридиновым оранжевым, с помощью люминесцентной микроскопии.

Оценку внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов периферической крови проводили с помощью НСТ-теста. Постановку НСТ-теста проводили в модификации М. К. Виксмана и А. Н. Маянского (1979 г.).

Подсчет нейтрофильных внеклеточных ловушек проводили при помощи световой микроскопии. Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ Statistica 10.0. Для анализа показателей обеих групп использовали непараметрический статистический критерий Mann-Whitney U-test. Различия в группах считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе проведения вышеописанных методик было выявлено несколько различий, имеющих статистическую значимость, а часть показателей имела тенденцию к увеличению в группе больных с неблагоприятным исходом (**табл. 1**).

Проведенное иммунологическое исследование позволило установить достоверное увеличение общего количества лейкоцитов периферической крови у больных с неблагоприятным исходом (в 2 раза) (**рис. 1**).

Установлено достоверное увеличение абсолютного количества НВЛ (в 4,8 раз) и относительного (в 2,6 раза) количества НВЛ у умерших больных с сепсисом (**рис. 2, рис. 3**).

При подсчете лейкоцитарной формулы было выявлено достоверное увеличение палочкоядерных нейтрофилов (в 2 раза).

Таблица 1. Показатели общего количества лейкоцитов и функциональной активности нейтрофилов у больных с сепсисом в зависимости от исхода на последние сутки

Показатели	Больные с сепсисом, последние сутки	
	Больные с благоприятным исходом (M±m)	Больные с неблагоприятным исходом (M±m)
Общее количество лейкоцитов, 10 ⁹ /л	8,03±0,81	16,04±2,34*
ИСЛЛ (индекс суммарной люминесценции лизосом), у.е.	658,08±12,5	580,18±29,97
Подсчет лейкоцитарной формулы		
Палочкоядерные нейтрофилы	5,93±0,59	12,1±1,82*
Сегментоядерные нейтрофилы	74,35±1,3	69,6±2,91
Юные/миелоциты	2,5±0,83	2,2±0,53
Лимфоциты	10,43±1,33	9,33±1,56
Моноциты	5,15±1,3	5,8±0,95
Подсчет НВЛ		
НВЛ, %	7,75±1,8	19,78±2,71*
НВЛ, 10 ⁹ /л	0,68±0,19	3,32±0,69*
Фагоцитоз		
Активность фагоцитоза, %	58,58±5,43	70,78±5,21
Фагоцитарное число, у.е.	20,42±2,81	30,67±4,29
НСТ-тест		
НСТ-тест спонтанный, %	41,92±2,36	70,67±1,03*
НСТ-тест спонтанный, у.е.	1,04±0,13	1,38±0,21
НСТ-тест индуцированный, %	52,75±2,39	81,22±1,53*
НСТ-тест индуцированный, у.е.	1,43±0,12	1,67±0,19

Примечание: * – статистически значимые отличия по сравнению с группой больных с благоприятным исходом, $p < 0,05$.

Результаты спонтанного и индуцированного НСТ-теста у больных с неблагоприятным исходом также повышены (в 1,7 и 1,5 раз соответственно).

Наблюдалась тенденция к снижению ИСЛЛ у септических больных с летальным исходом.

Показатели поглотительной активности нейтрофилов (активность фагоцитоза и фагоцитарное число) у больных с летальным исходом также имели тенденцию к увеличению.

ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании установлено, что показатели функциональной активности нейтрофилов и общее количество лейкоцитов у септических больных с неблагоприятным исходом при сравнении с аналогичными у выживших отличаются

и характеризуются увеличением. Аналогичные данные были получены при сравнении данных показателей у больных с сепсисом на первые сутки после постановки диагноза [4].

Обращает на себя внимание тот факт, что при летальном исходе происходит резкое возрастание НВЛ на последние сутки. Это говорит о том, что чрезмерное образование сетей ДНК, содержащих различные медиаторы воспаления, может вызвать локальные аутоиммунные реакции с повреждением тканей [5], а токсичность ферментов лизосом и метаболитов кислорода, присутствующих во внеклеточных сетях, ведет к повреждению эндотелия, появлению очагов внутрисосудистого воспаления, что наряду с действием микроорганизмов и их токсинов, приводит к развитию полиорганной недостаточности и наступлению смерти [2].

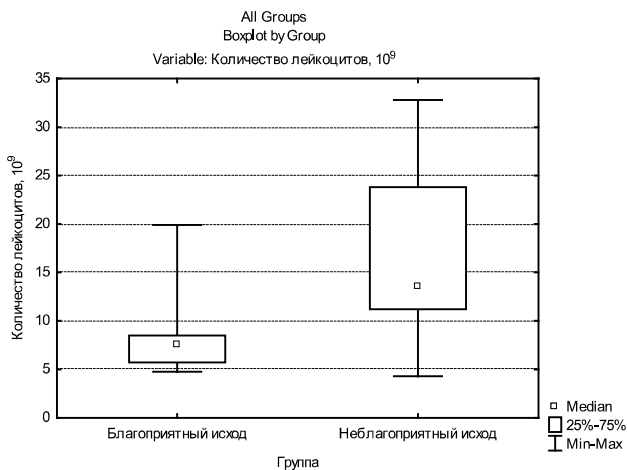


Рис. 1. Общее количество лейкоцитов периферической крови у септических больных с благоприятным и неблагоприятным исходом на последние сутки

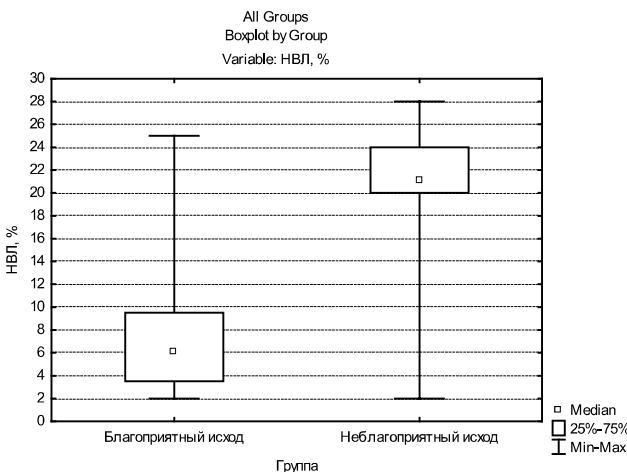


Рис. 2. Относительное количество НВЛ у септических больных с благоприятным и неблагоприятным исходом на последние сутки

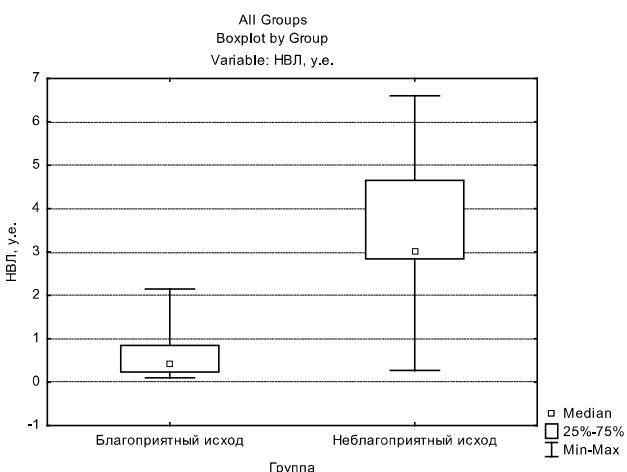


Рис. 3. Абсолютное количество НВЛ у септических больных с благоприятным и неблагоприятным исходом на последние сутки

Все вышеприведенные исследования позволяют нам сделать следующие **выводы**:

Нейтрофильные внеклеточные ловушки представляют собой один из важных механизмов противомикробной защиты при сепсисе, биологическая роль которого не менее важна, чем способность к фагоцитозу и секреции медиаторов. Однако гиперактивация иммунной системы и резкое увеличение нейтрофильных сетей несет негативный характер и, как правило, приводит к летальному исходу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгушин И. И., Андреева Ю. С., Савочкина А. Ю. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. РАМН, Москва 2009, 11. [Dolgushin I. I., Andreeva Y. S., Savochkina A. Y. Neutrophil traps and methods for assessing functional status of neutrophils. RAMN, Moscow, 2009, 11. Russian]
2. Долгушин И. И., Торопова Л. Р., Савочкина А. Ю., Абрамовских О. С., Четвернина Е. А., Полторак А. Е. Динамика изменения показателей функциональной активности нейтрофилов у больных сепсисом с неблагоприятным исходом. Российский иммунологический журнал 2017, 11(20), 2, 295–296. [Dolgushin I. I., Toropova L. R., Savochkina A. Y., Abramovskikh O. S., Chetvernina E. A., Poltorak A. E. Dynamics of changes functional parameters of neutrophils in septic patients with a favorable outcome. Russian journal of immunology 2017, 11(20), 2, 295–296. Russian]
3. Brinkmann V., Rechard V., Goosmann C. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 2004, 303, 1532–1535.
4. Долгушин И. И., Торопова Л. Р., Савочкина А. Ю., Абрамовских О. С., Привалова Г. Р. Оценка функциональной активности нейтрофилов периферической крови у больных с сепсисом на первые сутки после постановки диагноза. Российский иммунологический журнал 2015, 9(18), 2(2), 22–23. [Dolgushin I. I., Toropova L. R., Savochkina A. Y., Abramovskikh O. S., Privalova G. R. Determination of the functional activity of peripheral blood neutrophils from septic patients on first day of diagnostics. Russian journal of immunology 2015, 9(18), 2(2), 22–23. Russian]
5. Wright H. J., Matthews J. B., Chapple I. L., Ling-Mountford N., Cooper P. R. Periodontitis Associates with a Type I IFN Signature in Peripheral Blood Neutrophils. Journal of Immunology 2008, 181(8), 5775–5784.

**COMPARATIVE ANALYSIS OF THE INDICATORS OF THE FUNCTIONAL
ACTIVITY OF NEUTROPHILS PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS
WITH SEPSIS DEPENDING ON THE EXODUSION**

© 2018 A. Y. Savochkina¹, L. R. Pykhova¹, O. S. Abramovskikh¹,
A. E. Poltorak², E. A. Chetvernina¹

¹South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

²Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russia

Received: 07.05.2018. **Accepted:** 18.06.2018

A comparative analysis of the functional activity of peripheral blood neutrophils in patients with sepsis was performed depending on the outcome for the last 24 hours. The subject of the study was the peripheral blood of patients with sepsis. An increase in the total number of leukocytes, neutrophil extracellular traps and the activity of intracellular oxygen-dependent neutrophil metabolism in deceased patients as compared with the group of live cells was revealed.

Key words: neutrophils, sepsis, neutrophil extracellular traps

Authors:

Savochkina A. Y., ✉ Ph.D. Professor of the department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

454092, Chelyabinsk, South Ural State Medical University. Phone: +79127725806; **E-mail:** alina7423@mail.ru

Pykhova L. R., Senior laboratory assistant of the central research laboratory South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

Abramovskikh O. S., Ph.D. Professor of the department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

Poltorak A. E., doctor surgeon of surgical department № 1 Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russia;

Chetvernina E. A., Assistant of the department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia.