МАРКЕРЫ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ МЕСТНОМ И РАСПРОСТРАНЁННОМ ПЕРИТОНИТЕ

Е.В. Михальчик[1]*, И.В. Бородина[1], И.В. Власова[2], Т.В. Вахрушева[1], Н.П. Горбунов[1], О.М. Панасенко[1], С.М. Титкова[3], М.В. Ануров[3], Г.Б. Ивахов[3], И.В. Ермаков[3], А.В. Теплышев[4], Д.В. Клинов[1]

[1]Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а; *эл. почта: lemik2007@yandex.ru
[2]Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Институт регенеративной медицины, 119998, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2
[3]Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
[4]Городская клиническая больница №1 имени Н.И. Пирогова, 119049, Москва, Ленинский просп., 8, корп. 10

Прогрессирование гнойно-воспалительного процесса при любой острой хирургической абдоминальной патологии приводит к развитию местного или распространённого перитонита. Потенциальными предикторами осложнений могут быть показатели, характеризующие степень и особенности воспалительной реакции в крови — содержание цитокинов, активность нейтрофилов, состоятельность антиоксидантого звена. У пациентов с неосложнённой патологией (группа 1, n=8), местным перитонитом (группа 2, n=9) и распространённым перитонитом (группа 3, n=9) при поступлении в хирургическое отделение (до операции), немедленно после операции и через сутки, а также у здоровых добровольцев (норма, n=12) измеряли люминол-зависимую хемилюминесценцию (ХЛ) крови, активированную форбол-12-миристат-13-ацетатом, и концентрацию ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, миелопероксидазы (МПО) и тиолов в плазме крови. По данным иммуноферментного анализа, во всех временных точках концентрация цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-10, а также МПО в группе 3 была выше, чем у здоровых добровольцев и пациентов групп 1 и 2. Величина ХЛ крови у всех пациентов более чем в 5 раз увеличивалась по сравнению с нормой, а у пациентов группы 2 — по сравнению с группой 1. В группе 3 выявлялись пациенты как с максимальными, так и с минимальными из всех зарегистрированных значений ХЛ, что может быть следствием прайминга и истощения нейтрофилов соответственно. У этих же пациентов содержание тиолов снижалось в 3 и более раз по сравнению с нормой. У пациентов с летальным исходом в течение первых суток после операции (группа 3, n=2) отмечено либо снижение ХЛ до нулевых значений на фоне высокого содержания ИЛ-8 и ИЛ-6 и низкого (в 3 и более раз ниже нормы) уровня тиолов, либо ХЛ ответ, 20-кратно превышающий норму, при полном истощении пула тиолов в плазме. Однозначной зависимости между показателями в плазме и активностью нейтрофилов не было. Это означает, что панель показателей для прогноза и/или ранней диагностики инфекционных осложнений при острой хирургической патологии должна включать в себя различные биомаркеры воспалительного ответа: цитокиновый профиль (ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10), МПО и активность нейтрофилов, антиоксидантную ёмкость плазмы (концентрацию тиолов).

Ключевые слова: перитонит; маркеры воспаления; интерлейкины; миелопероксидаза; хемилюминесценция; тиолы

DOI: 10.18097/PBMC20206605411

ВВЕДЕНИЕ

Осложнённая интраабдоминальная инфекция (ИАИ) развивается в результате инфекционного процесса, который, начиная с поражённого органа, охватывает брюшную полость, вызывая местный или распространённый перитонит. Прогрессирование системного воспалительного ответа может привести к сепсису и последующему летальному исходу.

К медиаторам воспаления при ИАИ относятся некоторые интерлейкины (ИЛ), обладающие про- или противовоспалительной активностью. Их рассматривают в качестве потенциальных маркеров выраженности ИАИ, перспективных для диагностики, прогноза и мониторинга состояния пациентов с интраабдоминальным воспалением. Ранее группе исследователей и хирургов удалось найти связь между степенью выраженности ИАИ и содержанием в плазме крови пациентов некоторых цитокинов – ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 [1].

Эффективность иммунной реакции в борьбе с инфекцией во многом зависит от функционального состояния нейтрофилов. Различают особенности фенотипа нейтрофилов, характеризующие их состояние как прайминг, активацию и истощение [2].

Статус нейтрофилов оценивают по их способности к фагоцитозу [3] и образованию активных форм кислорода (АФК) [4]. Антибактериальная эффективность иммунной системы на ранней стадии воспаления зависит от активности нейтрофилов, способных к фагоцитозу, синтезу антимикробных пептидов и протеаз, а также к быстрой генерации АФК. Рост стимулирующих воздействий (цитокины, эндотоксины, бактерии) может приводить к истощению их функциональной активности вследствие дегрануляции и нарушения внутриклеточных сигнальных путей [2], выражающемуся в иммунном параличе. ИЛ-8 может усиливать образование нейтрофилами АФК [5], которые в условиях окислительного стресса повреждают белки, в том числе, в плазме крови. При ИАИ снижается концентрация тиолов, основная доля которых приходится на альбумин, причём это происходит не только в результате их окисления, но и вследствие снижения концентрации альбумина за счёт нарушения проницаемости сосудов и выхода его в интерстиций; возможен также тиоловый обмен между альбумином и другими белками [6]. Кроме того, альбумин относится к негативным белкам острой фазы воспаления, то есть его синтез печенью под действием провоспалительных цитокинов снижается [7].

Цель исследования заключалась в выявлении ключевых маркеров и/или предикторов ИАИ у пациентов с острой хирургической абдоминальной патологией на основании оценки содержания цитокинов, функциональной активности нейтрофилов и содержания тиолов в крови до начала лечения (до операции).

МЕТОДИКА

Исследование выполнено у 26 хирургических пациентов, оперированных в экстренном порядке по поводу ИАИ на базах кафедры факультетской хирургии Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова. В исследование были включены пациенты с подтвержденным диагнозом ИАИ, давшие информированное согласие на участие в исследовании (табл. 1). Критериями исключения были: языковой барьер; физический статус, соответствующий классу V по шкале ASA; септический шок при поступлении. Всем пациентам была выполнена операция, объём которой определялся установленным диагнозом. После интраоперационной верификации диагноза пациентов разделили на 3 группы: группа 1 (неосложнённые формы острого аппендицита и холецистита); группа 2 (острый аппендицит или холецистит, осложнённые местным перитонитом); группа 3 (острый аппендицит, холецистит, дивертикулит или перфорация ЖКТ, осложнённые распространённым перитонитом). Группу сравнения составили 12 здоровых добровольцев обоего пола (табл. 1), показатели в этой группе использовали в качестве нормы.

Объектом исследования была венозная кровь, полученная с использованием ЭДТА в качестве антикоагулянта. Взятие крови осуществляли при поступлении пациентов (точка “до операции”), непосредственно по окончании операции (точка “после операции”) и через сутки после операции (точка “1 сутки”). При поступлении образцов в лабораторию (не позднее 3 ч после забора) немедленно отбирали аликвоты для анализа методом хемилюминесценции (ХЛ), а остальную часть крови центрифугировали (400 *g*, 20 мин), отделяя плазму. Плазму повторно центрифугировали (900 *g*, 20 мин), замораживали и хранили при -80°C до момента анализа.

Измерение ХЛ крови проводили в полной среде Кребса-Рингера с 20 мМ люминолом с помощью люминометра Lum-1200 (“Дисофт”, Россия) в непрерывном режиме при 37°С, разведение крови в кювете составляло 1:25 (по объёму). В течение 2 мин измеряли величину спонтанной ХЛ, после чего активировали клетки добавлением форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА, 10 нг/мл) и продолжали измерения до выхода показателя на плато. Для сравнения образцов использовали максимальную интенсивность ХЛ ответа на ФМА, то есть амплитуду (ХЛ, В) [8].

Концентрацию цитокинов в плазме крови измеряли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью стандартных наборов производства “Цитокин” (Россия) и “Вектор-Бест” (Россия) с линейным диапазоном чувствительности 10-500 пг/мл, согласно инструкции производителя с использованием плашечного ридера Multiscan Ascent (“Thermo Electron”, Финляндия). Концентрацию миелопероксидазы (МПО) определяли методом ИФА [9] с использованием для градуировки высокоочищенной МПО из нейтрофилов человека [10], моноклонального антитела (2F7) против МПО и моноклонального антитела MPO18, конъюгированного с пероксидазой из корней хрена; линейный диапазон чувствительности составлял 3-25 нг/мл.

Концентрацию тиолов определяли методом Эллмана с использованием спектрофотометра Shimadzu UV-1700 (“Shimadzu”, Япония) [11].

Данные представляли в виде медианы, указывая минимальное и максимальное значение, либо среднего значения ± стандартное отклонение.

Таблица 1. Состав групп обследованных пациентов и здоровых добровольцев

	Группа 1 Неосложнённые формы	Группа 2 Местный перитонит	Группа 3 Распространённый перитонит	Здоровые добровольцы
n, число пациентов	8	9	9	12
Мужчины/женщины, соотношение	4/4	4/5	3/6	6/6
Возраст (медиана, минимум и максимум), лет	41 (28÷64)	28 (18÷56)	56 (33÷86)	42 (29÷65)
Источник ИАИ: - острый аппендицит - острый холецистит - перфорация ЖКТ - дивертикулит - ОКН*	 6 2 — — —	 7 1 1 — —	 1 — 5 2 1	—
Длительность заболевания >24 ч	1 (12.5%)	4 (44%)	7 (78%)	—
Число летальных исходов	—	—	2	—

Примечание: *ОКН — острая кишечная непроходимость.

Статистическую обработку проводили с помощью программ Statistica 12, используя непараметрические критерии Манна-Уитни и Уилкоксона или *t*-критерий Стьюдента для несвязанных выборок. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

До начала хирургического лечения (точка “до операции”) у пациентов всех групп была повышена концентрация ИЛ-10 и МПО в плазме (по сравнению со здоровыми добровольцами). Достоверное повышение концентрации ИЛ-6 регистрировалось в группах 2 и 3. Общей тенденцией было увеличение концентрации ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-6 и МПО в ряду: группа 1 ≤ группа 2 ≤ группа 3. Значения в группе 3 достоверно отличались от групп 1 и/или 2 (табл. 2).

Общей закономерностью во всех группах была корреляция между концентрацией ИЛ-6 и ИЛ-8 (в логарифмических координатах) (рис. 1). Аналогичная закономерность наблюдалась и после операции ($r=0,8$; $p<0,01$) (см. Дополнительные материалы).

ХЛ активность крови отражает способность циркулирующих нейтрофилов продуцировать АФК и галогены в ответ на стимуляцию *in vitro*. Амплитуда ХЛ ответа во всех группах возрастала по сравнению с нормой до операции (табл. 2), при этом в группе 2 ХЛ активность была достоверно выше, чем в группе 1.

Мы проанализировали связь между величиной ХЛ крови и логарифмом концентрации ИЛ-8 в плазме до начала операции (рис. 2).

В группе 1 зависимость между этими показателями была практически линейной ($r=0,92$). В группе 2 возрастал разброс точек относительно линии тренда, а в группе 3 при log[ИЛ-8, пг/мл]>1,5 значения ХЛ оказывались существенно ниже аппроксимирующей прямой; эти значения не учитывались при расчёте корреляции (выделенная овалом область на рисунке 2).

Таким образом, в условиях острой воспалительной реакции системного характера происходит качественное изменение свойств циркулирующих нейтрофилов. Фактически, по данным ХЛ анализа, пациенты группы 3 разделились на две подгруппы: с низким уровнем ХЛ цельной крови и с высоким уровнем (не ниже верхнего предела в подгруппе 1) (табл. 3). Показатели в подгруппе 3-1 оказались на уровне значений, полученных в группе 1.

Таблица 2. Результаты анализа крови пациентов до операции

	ИЛ-8, пг/мл	ИЛ-10, пг/мл	ИЛ-6, пг/мл	МПО, нг/мл	Тиолы в плазме, мкмоль/л	ХЛ крови, В
Группа 1	1,3 (0,6÷4,7)	7,8* (3,2÷19,8)	11,4 (0,7÷46,4)	46,6* (30÷72)	180* (161÷251)	12* (9÷22)
Группа 2	1,8 (0,4÷4,7)	13,3* (2,2÷23,3)	16,4* (3,6÷94,3)	35,8* (12,6÷96,0)	223 (180÷232)	21*[,1] (7÷44)
Группа 3	24,7 *[,1,2] (0,8÷430)	28,7*[,1] (4,1÷120)	514*[,1,2] (11,4÷2238)	91,5*[,1,2] (40,5÷282)	175* (10÷289)	19* (0÷70)
Нормальные значения	1,4 (0,7÷1,4)	2,4 (0,2÷11,3)	8,6 (0,1÷21,4)	19,6 (13,5÷40,5)	251 (175÷332)	2,5 (1,6÷5,7)

Примечание: Представлены медианы, в скобках указаны минимальное и максимальное значения. Достоверность различий рассчитана по критерию Манна-Уитни: * — $p<0,05$ относительно нормы, 1 — $p<0,05$ относительно группы 1, 2 — $p<0,05$ относительно группы 2.

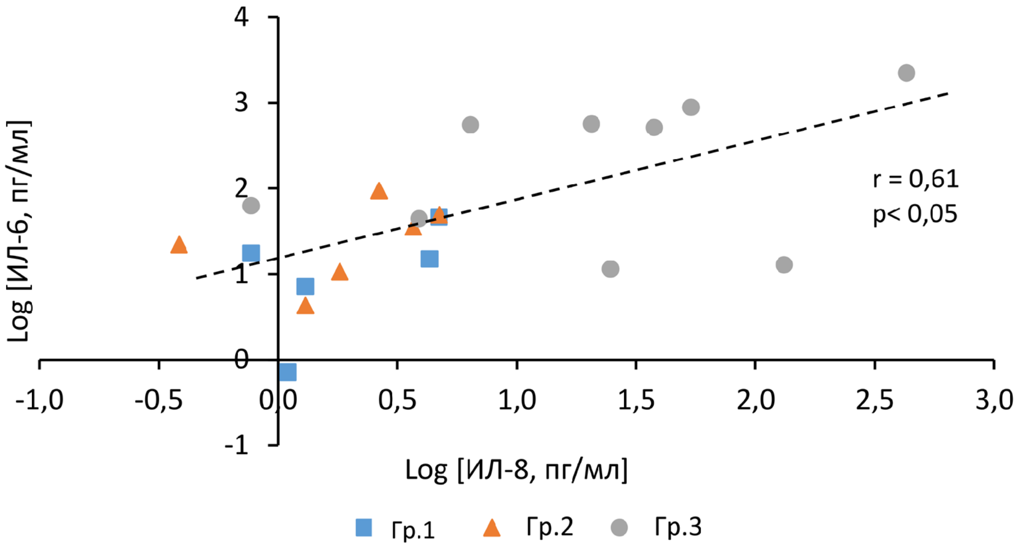

Рисунок 1. Сопоставление концентраций ИЛ-6 и ИЛ-8 в плазме пациентов групп 1-3 до операции (данные представлены в логарифмических координатах).

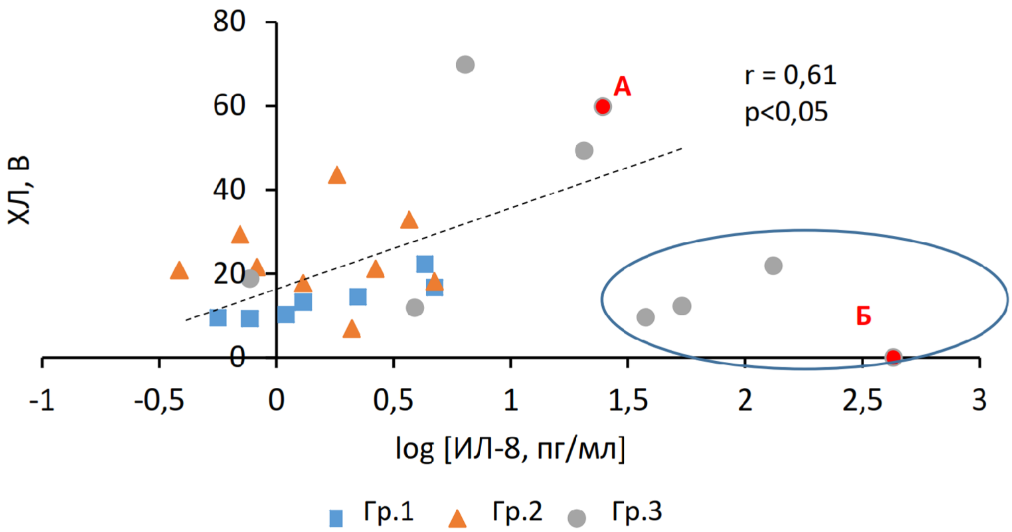

Рисунок 2. Сопоставление величины ХЛ крови с логарифмом концентрации ИЛ-8 в плазме до операции. Построение линии тренда и расчёт коэффициента корреляции проводили без учёта выделенных точек. Красными маркерами отмечены данные пациентов А и Б с летальным исходом. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии статьи на сайте журнала.

Таблица 3. Величина ХЛ ответа и концентрация лейкоцитов (Лц) в крови пациентов разных групп до операции

Показатели	Группа 1 n=8	Группа 2 n=8	Группа 3 n=8		Норма n=12
			Подгруппа 3-1 n=5	Подгруппа 3-2 n=3	
ХЛ, В	11,8 (9,3÷22,3)	21,2[1] (6,9÷43,6)	9,6 (21,9÷12,3)	59,8*[1,2] (49,3÷69,9)	2,5** (1,6÷5,7)
Лц, 10^9/л	12,9 (9,9÷17)	14,7 (9,5÷18,6)	15,6 (14,3÷21,5)	17,4 (7,3÷19,2)	6,0** (5,5÷6,2)
ХЛ/Лц, В/млн	41,1 (23,5÷57,2)	61,3[1] (15,9÷183)	31,5 (24,7÷61,2)	160*[1,2] (124÷270)	16,7** (10,7÷38,0)

Примечание: Представлены медианы, в скобках указаны минимальное и максимальное значения. Достоверность различий рассчитана по критерию Манна-Уитни: * — $p<0{,}05$ по сравнению с группой 3-1, 1 — $p<0{,}05$ по сравнению с группой 1, 2 — $p<0{,}05$ по сравнению с группой 2, ** — $p<0{,}05$ по сравнению со всеми группами.

Для того, чтобы исключить прямое влияние концентрации лейкоцитов на величину ХЛ, мы привели также значения ХЛ, нормированные на концентрацию лейкоцитов (ХЛ/Лц, В/млн клеток). Из представленных в таблице 3 данных видно, что картина при этом не изменилась. По другим показателям (уровень цитокинов и МПО) достоверных различий между подгруппами не было.

Для оценки степени окисления белков в плазме мы измеряли концентрацию тиолов. В группах 1 и 3 концентрация тиолов по сравнению с нормой была снижена с абсолютным минимумом показателя в группе 3 (табл. 2).

Результаты анализа показателей в динамике (до операции, после операции, через сутки после операции) представлены на рисунке 3 (медианные, минимальные и максимальные значения представлены в Дополнительных материалах).

Отличия показателей от нормы в точке "после операции" были такими же, как и до операции (табл. 2). В точке "1 сутки" увеличенный относительно нормы уровень сохранялся у всех показателей в группе 3. Величина ХЛ во всех группах также отличалась от нормы. В группе 1 в точке "1 сутки" превышали норму концентрации ИЛ-8 и МПО ($p<0{,}05$ по критерию Манна-Уитни).

Сразу после операции в группе 2 возрастала концентрация ИЛ-6, а в группе 3 наблюдалась тенденция к снижению концентрации ИЛ-6, ИЛ-8, МПО, ХЛ и к росту ИЛ-10 (рис. 3). По сравнению с точкой "до операции" через сутки после операции в группе 1 и в группе 2 снижался уровень ХЛ ($p<0{,}05$ по критерию Уилкоксона для связанных выборок), оставаясь повышенным по сравнению с нормой (рис. 3), и увеличивалась концентрация ИЛ-8 ($p<0{,}05$). В группе 2 отмечалось уменьшение концентрации ИЛ-10 ($p<0{,}05$). В группе 3 снижалась концентрация ИЛ-6 и ИЛ-10 ($p<0{,}05$). Достоверного изменения концентрации тиолов не было ни в одной из групп (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

При формировании групп мы исходили из интраоперационной верификации диагноза. Степень распространённости воспалительного

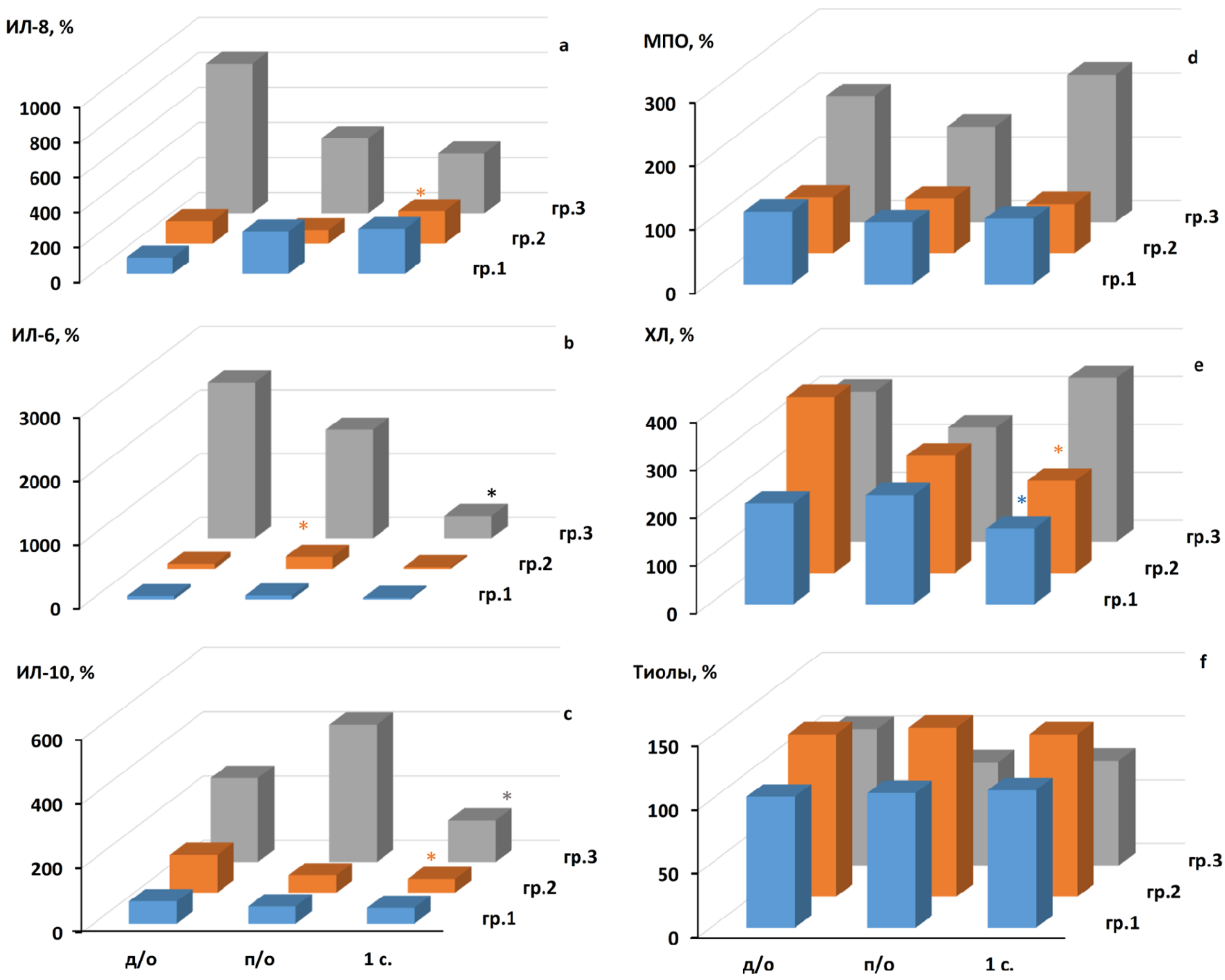

Рисунок 3. Концентрации ИЛ-8 (a), ИЛ-6 (b), ИЛ-10 (c), МПО (d), величина ХЛ (e) и содержание тиолов (f) до операции (д/о), сразу после операции (п/о) и через сутки после операции (1 с.) в группах 1-3. Представлены отношения медиан к верхней границе нормы, %. Достоверность изменений рассчитана по критерию Уилкоксона (для связанных выборок). * — $p<0{,}05$ относительно величины показателя до операции

процесса возрастала в ряду: группа 1 (острый неосложнённый аппендицит) < группа 2 (острый аппендицит/холецистит, осложнённые местным перитонитом или абсцессом) < группа 3 (дивертикулит/острый аппендицит/перфорация/острая кишечная непроходимость, осложнённые распространённым перитонитом). У всех пациентов отмечен рост концентрации лейкоцитов по сравнению с нормой, однако достоверных различий между группами не было. Актуальным остаётся поиск показателей, характеризующих степень воспаления и вероятность ИАИ, в том числе, уровень цитокинов [1] и МПО [12] в плазме крови. В качестве потенциальных маркеров тяжести ИАИ рассматривают ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-10 [1]. ИЛ-6 — это плейотропный цитокин, реагирующий на инфекционные процессы и на неинфекционное обширное повреждение тканей [13]. ИЛ-8 обладает способностью стимулировать хемотаксис и бактерицидную активность нейтрофилов за счёт прайминга, ключевым событием которого служит сборка NADPH-оксидазы в мембране клеток [5]. ИЛ-10 — это один из главных противовоспалительных цитокинов, снижающих образование медиаторов воспаления. ИЛ-10 синтезируется лимфоцитами, тучными клетками, моноцитами/макрофагами [14] и нейтрофилами [15]. Стимуляция продукции ИЛ-10 той или иной клеточной популяцией может зависеть от локализации и стадии воспаления; эти же факторы определяют спектр потенциальных клеток-мишеней. Например, на модели сепсиса у мышей было показано супрессивное действие ИЛ-10, продуцируемого перитонеальными нейтрофилами, на перитонеальные моноциты [15]. Кроме того, при сепсисе лимфоциты, претерпевающие апоптоз, могут подавлять иммунные функции моноцитов, макрофагов, дендритных клеток с одновременным усилением синтеза этими клетками ИЛ-10 и трансформирующего ростового фактора бета. В результате развивается иммунная толерантность, влекущая за собой развитие вторичной и рекуррентной инфекции [14].

Наибольшие концентрации ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-10 в нашем исследовании были обнаружены в плазме крови пациентов группы 3; их диапазон находился в тех же пределах, что и в опубликованном исследовании, посвящённом ИАИ [1]. В группах 1 и 2 это увеличение было также достоверным, однако концентрации цитокинов превышали норму не более чем в 2 раза. Несмотря на отсутствие различий между группами 1 и 2 по концентрации в плазме каждого цитокина, отличия от нормы в группе 2 были выражены в большей степени, чем в группе 1 (по числу показателей, превышающих нормальный уровень, и по степени увеличения (табл. 2)).

Операция не приводила к немедленной нормализации концентрации цитокинов в плазме; выявленные до операции различия сохранялись и в точке “после операции”, снижение (за исключением ИЛ-8) происходило спустя сутки после операции (группы 1 и 2), а в группе 3 и в этой точке значения превышали норму. Полученный результат означает, что, несмотря на удаление источника инфекции, воспалительная реакция продолжает носить системный характер, что нужно учитывать при выборе дальнейшей хирургической стратегии лечения пациентов с распространённым перитонитом (релапаротомия “по требованию” или “по программе”). Дополнительные хирургические воздействия при программируемой релапаротомии могут играть роль “второго удара”, вызывая усиление продукции некоторых цитокинов, в первую очередь, ИЛ-8 [16].

Нейтрофилы играют ведущую роль в элиминировании инфекции на начальном этапе острого воспаления [17]. В результате их активации и дегрануляции во всех группах повышалась концентрация МПО в плазме. МПО — фермент азурофильных гранул нейтрофилов, участвующий в образовании мощного бактерицидного агента — хлорноватистой кислоты (HOCl). Повышенная концентрация МПО в плазме крови при сепсисе (от 60 нг/мл) коррелирует с риском смертности. Связь между ростом концентрации МПО в плазме и тяжестью состояния пациентов с сепсисом связывают с прямым повреждающим действием генерируемой ферментом HOCl на эндотелий сосудов, а также рассматривают увеличение показателя как значимый критерий степени воспаления [12]. По нашим данным, наибольших значений (до 282 нг/мл) концентрация МПО в плазме достигала у пациентов группы 3, хотя и в группах 1 и 2 она превышала нормальные значения, достигая 72 нг/мл и 96 нг/мл соответственно.

Повышение ХЛ крови за счёт образования нейтрофилами АФК и HOCl при стимуляции *in vitro* отражает их прайминг, в результате которого происходит сборка NADPH-оксидазы, деполимеризация филаментов актина, усиление фосфорилирования внутриклеточных сигнальных молекул [2]. Роль праймирующих факторов могут играть ИЛ-8 [5] и бактериальные липополисахариды [18]. ИЛ-6 не оказывает непосредственного влияния на образование АФК и HOCl нейтрофилами, но усиливает хемотаксис клеток под действием ИЛ-8 [19]. Ранее было показано увеличение образования АФК циркулирующими нейтрофилами при тяжелых вторичных перитонитах [4] как часть механизма неспецифической иммунной защиты.

Уровень ХЛ ответов крови во всех группах был выше, чем у здоровых добровольцев, и при этом оказался единственным показателем, который достоверно различался между группами 1 и 2 (табл. 2 и 3). Между логарифмом концентрации ИЛ-8 и величиной ХЛ (рис. 2) была обнаружена прямая пропорциональная зависимость, за исключением нескольких образцов из группы 3, для которых ХЛ оказалась существенно ниже аппроксимирующей прямой (выделенная овалом область на рис. 2). Следовательно, ещё до начала лечения (до операции) может возникать ситуация частичного или полного истощения активности циркулирующих нейтрофилов. Такое состояние нейтрофилов развивается в результате избыточной их стимуляции *in vivo* и характеризуется снижением продукции ими АФК (вследствие нарушения работы внутриклеточных сигнальных путей) и уменьшением содержимого гранул [2]. В этом случае нейтрофил не способен противостоять инфекции [17]. Показано, что при летальном сепсисе высокие концентрации цитокинов, хемокинов, оксида азота нарушают миграцию нейтрофилов в очаг воспаления, вызывая тем самым их “паралич” [20].

Прайминг нейтрофилов, усиливающий их АФК-продуцирующую активность, одновременно создаёт риск окислительного повреждения собственных молекул и тканей (окислительного стресса). Одной из мишеней АФК и других окислителей в плазме являются тиоловые группы белков. 80% тиолов в плазме крови — это SH-группа цистеина в молекуле альбумина. В нашем исследовании у двух пациентов в группе 3 уровень тиолов был в 3 раза ниже нормы; ранее трёхкратное снижение этого показателя при ИАИ было обнаружено у пациентов с сепсисом [6]. У пациента А из группы 3 было зарегистрировано падение показателя до нулевого уровня (рис. 3). При такой степени окисления страдают функции альбумина и остальных белков плазмы и создаётся угроза поражения тканей и органов [21]. Ранее при исследовании активации образцов цельной крови однослойными углеродными нанотрубками, выступавшими в качестве провоспалительного стимула для нейтрофилов, нами была обнаружена обратная пропорциональная зависимость между концентрацией тиолов и МПО в плазме [22].

Летальный исход в течение суток после операции наблюдали у двух пациентов из группы 3. В одном случае был зарегистрирован низкий уровень тиолов в сочетании с отсутствием ХЛ крови (пациент Б), что можно считать признаком дисфункции нейтрофилов; в другом случае — нулевой уровень тиолов при высоких значениях ХЛ крови (пациент А), что свидетельствует о критическом уровне окислительного стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Подводя итоги, можно оценить полученные результаты с точки зрения стратегии ранней диагностики ИАИ:

1. оценка ХЛ крови позволяет быстро выявить у пациентов дисфункцию (истощение) нейтрофилов или их высокую активность;

2. снижение концентрации тиолов в плазме в 3 и более раз относительно нормы является неблагоприятным прогностическим маркером развития ИАИ, особенно в сочетании с высокими показателями ХЛ крови;

3. при разработке панели для выявления и оценки степени ИАИ перспективными показателями являются концентрации ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-8 и МПО в плазме. Наиболее информативным является их комплексный анализ.

Следует подчеркнуть, что мы не обнаружили однозначной зависимости между цитокиновым профилем в плазме, концентрацией МПО и активностью нейтрофилов. Это означает, что для прогноза и/или ранней диагностики инфекционных осложнений при ИАИ наиболее эффективно сочетание анализа разных звеньев воспалительного ответа (цитокинов, степени активации нейтрофилов, окисления белков плазмы (например, по содержанию тиолов)). Выявленные маркеры воспаления при перитоните могут служить основой для создания микрочипов и тестовых систем на основе микрофлюидных технологий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта №17-75-30064.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было проведено в соответствии с международными этическими рекомендациями. Взятие образцов и обработку данных проводили на основании информированного согласия пациентов и здоровых добровольцев. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Российского национального исследовательского университета им. Н.И. Пирогова (Протокол №180 от 17.12.2018).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tolonen M., Kuuliala K., Kuuliala A., Leppäniemi A., Kulänpää M.-L., Sallinen V., Puolakkainen P., Mentula P.* (2019) J. Surg. Res., **244**, 436-443.
2. *Hong C.W.* (2017) Immune Netw., **17**(5), 298-306.
3. *Holzer K., Konietzny P., Wilhelm K., Henrich D.* (2002) Eur. Surg. Res., **34**, 275-284.
4. *Holzer K., Richter A., Hendrich D., Wilhelm K., Encke A.* (2001) Shock, **15**(2), 90-94.
5. *Guichard C, Pedruzzi E., Dewas C., Fay M., Pouzet C., Bens M., Vandewalle E.O.D., Gougerot-Pocidalo M.A., Elbim C.* (2005) J. Biol. Chem., **280**(44), 37021-37032.
6. *Quinlan G.J., Margarson M.P., Mumby S., Evans T.W., Gutteridge M.C.* (1998) Clin. Sci., **95**, 459-465.
7. *Kaysen G.A., Dubin J.A., Müller H.-G., Rosales L., Levin N.W., Mitch W.E.* (2004) Kidney International, **65**(4), 1408-1415.
8. *Vlasova I.I., Mikhalchik E.V., Gusev A.A., Balabushevich N.G, Gusev S.A., Kazarinov K.D.* (2018) Bioelectromagnetics, **39**(2), 144-155.
9. *Соколов А.В., Костевич В.А., Горбунов Н.П., Григорьева Д.В., Горудко И.В., Васильев В.Б., Панасенко О.М.* (2018) Медицинская иммунология, **20**(5), 699-710. [*Sokolov A.V., Kostevich V.A., Gorbunov N.P., Grigorieva D.V., Gorudko I.V., Vasilyev V.B., Panasenko O.M.* (2018) Medical Immunology (Russia), **20**(5), 699-710.]
10. *Sokolov A.V., Kostevich V.A., Zakharova E.T., Samygina V.R., Panasenko O.M., Vasilyev V.B.* (2015) Free Radical Research, **46**(6), 800-811.
11. *Hu M.L.* (1994) Methods Enzymol., **233**, 380-385.
12. *Schrijver I.T., Kemperman H., Roest M., Kesecioglu J., de Lange D.W.* (2017) Intensive Care Medicine Experimental, **5**, 43. DOI: 10.1186/s40635-017-0157-y
13. *Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T.* (2014) Cold Spring Harb. Perspect. Biol., **6**, a016295, DOI: 10.1101/cshperspect.a016295
14. *Coopersmith C.M., Amiot II D.M., Stromberg P.E., Dunne W.M., Davis C.G., Osborne D.F., Husain K.D., Turnbull I.R., Karl I.E., Hotchkiss R.S., Buchman T.G.* (2003) Shock, **19**(5), 408-414.
15. *Ocuin L.M., Bamboat Z.M., Balachandran V.P., Cavnar M.J., Obaid H., Plitas G., de Matteo R.P.*(2011) J. Leuk. Biol., **89**, 423-432.
16. *Zügel N., Siebeck M., Geißler B., Lichtwark-Aschoff M., Gippner-Steppert C., Witte J., Jochum M.* (2002) Arch. Surg., **137**, 590-599.
17. *Craciun F.L., Schuller E.R., Remick D.G.* (2010) J. Immunol., **185**, 6930-6938.
18. *Vogt K.L., Summers C., Chilvers E.R., Condliffe A.M.* (2018) Eur. J. Clin. Invest., **48**(Suppl. 2), e12967. DOI: 10.1111/eci.12967
19. *Wright H.L., Cross A.L., Edwards S.W., Moots R.J.* (2014) Rheumatology, **53**, 1321-1331.
20. *Alves-Filho J.C., Spiller F., Cunha F.Q.* (2010) Shock, **34**(Supplement 1), 15-21.
21. *Taverna M.* (2013) Annals Intensive Care, **3**, 4. DOI: 10.1186/2110-5820-3-4
22. *Vlasova I.I., Mikhalchik E.V., Barinov N.A., Kostevich V.A., Smolina N.V., Klinov D.V., Sokolov A.V.* (2016) Nanomedicine: Nanotechnology, Biology Medicine, **12**, 1615-1625.

Поступила в редакцию: 05. 06. 2020.
После доработки: 21. 08. 2020.
Принята к печати: 24. 08. 2020.

BIOMARKERS OF SYSTEM INFLAMMATION IN LOCAL AND DIFFUSE PERITONITIS

E.V. Mikhalchik[1], I.V. Borodina[1], I.V. Vlasova[2], T.V. Vakhrusheva[1], N.P. Gorbunov[1], O.M. Panasenko[1], S.M. Titkova[3], M.V. Anurov[3], G.B. Ivakhov[3], I.V. Ermakov[3], A.V. Teplyshev[4], D.V. Klinov[1]*

[1]Federal Research Clinical Center of Physical Chemical Medicine, FMBA of Russia,
1a Malaya Pirogovaskaya str., Moscow, 119435 Russia; *e-mail: lemik2007@yandex.ru
[2]Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Institute for Regenerative Medicine,
8-2, Trubetskaya str., Moscow, 119998 Russia
[3]Pirogov Russian National Research Medical University,
1 Ostrovityanova str., Moscow, 117997 Russia
[4]Pirogov City Clinical Hospital №1,
8/10 Leninsky ave., Moscow, 119049 Russia

In cases of any acute surgical abdominal disease the progression of purulent inflammation can lead to local or diffuse peritonitis. The indicators of the degree and specificity of the inflammatory response in blood such as cytokine concentration, neutrophil activity, plasma antioxidant capacity (thiols concentration) could be considered as potential predictors of complications. The luminol-dependent chemiluminescence (CL) response of blood activated by the phorbol ester (PMA), and the concentration of cytokines IL-6, IL-8, IL-10, myeloperoxidase (MPO) and thiols in plasma were measured in patients with uncomplicated condition (group 1, n=8), local peritonitis (group 2, n=9) or diffuse peritonitis (group 3, n=9) at admission to surgery (before surgical operation, b/o), immediately after surgical operation (a/o) and a day after surgery (1 day) as well as in healthy volunteers (norm, n=12). In all time-points the cytokines and MPO concentrations measured by ELISA, in group 3 were higher than in healthy volunteers and in patients in groups 1 and 2. Blood CL demonstrated a more than 5-fold increase above the normal values in all patients, and was also higher in group 2 as compared to group 1 (b/o and a/o). Patients in group 3 had shown both maximum and minimum of CL values, which could be a consequence of neutrophil priming or exhaustion (“immune paralysis”), respectively. The same patients' plasma exhibited low thiol concentration (≤30% vs normal values). In patients with fatal outcomes (group 3, n=2) within a day after surgery, either a decrease of the CL to zero values concurrently with elevated IL-8 and IL-6 concentrations and low thiol levels was observed, or CL exceeded normal values more than 20 times with concurrent complete exhaustion of the plasma thiol pool. No clear dependency between the plasma parameters and neutrophil activity was found. Hence a parameter set for prognosis and/or early diagnosis of infectious complications in acute abdominal pathology should include different biomarkers of the inflammatory response: cytokine profile (IL-6, IL-8, IL-10), MPO and neutrophil activity, antioxidant plasma capacity (e.g., total thiols concentration).

Key words: peritonitis; biomarkers of inflammation; interleukins; myeloperoxidase; chemiluminescence; thiols

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 17-75-30064.

Received: 05.06.2020; revised: 21.08.2020; accepted: 24.08.2020.