На правах рукописи

УСАНОВА ЕЛЕНА АЛЕКСЕЕВНА

Прогностическое значение изменения секреции активных форм

кислорода полиморфно-ядерными лейкоцитами крови

при остром деструктивном панкреатите.

14.03.03 – Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2014

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего

профессионального образования «Российский национальный исследовательский

медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,

профессор Балякин Юрий Викторович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,

профессор Демуров Евгений Аркадьевич

ГБОУ ВПО «РУДН» Минобрнауки России, кафедра общей патологии и патологической физиологии медицинского факультета

доктор медицинских наук,

профессор Войнов Владимир Антипович

ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, кафедра патофизиологии лечебного факультета

Ведущая организация:

ГБОУ ВПО «Воронежская Государственная Медицинская Академия им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «22» сентября 2014 г. в 15.00 часов на заседании

Диссертационного совета Д 208.072.05 при ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1 и на сайте http://rsmu.ru/.

Автореферат разослан «18» июля 2014 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета

кандидат медицинских наук, доцент Кузнецова Татьяна Евгеньевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В хирургической практике острый панкреатит в 20-40% случаев носит деструктивный, некротический характер (Багненко С.Ф. с соавт., 2005; Шелест П.В. с соавт., 2007; Beger H.G. с соавт., 2003; Dambrauskas Z. с соавт., 2006). В настоящее время экспериментальными исследованиями доказано, что активированные полиморфно-ядерные лейкоциты (ПМЛ) одними из первых иммунных клеток обнаруживаются в очаге панкреодеструкции (Dabrowski A. с со-авт., 1999; Poch B. с соавт., 1999; Sandoval D. с соавт.,1996). Считается, что они являются важными компонентами в защите и ограничении повреждения ткани поджелудочной железы. Однако ряд недавних исследований свидетельствует о не-гативной роли ПМЛ в патогенезе острого деструктивного панкреатита (ОДП). Ин-фильтрируя ткань поджелудочной железы и секретируя активные формы кислоро¬да (АФК) в ходе респираторного взрыва, нитроксиды и гидролитические фермен¬ты, ПМЛ способны вызывать локальное повреждение железы, способствуя про-грессированию процессов деструкции (Poch B. с соавт., 1999; Schoenberg M.H. с соавт., 1994). Существует точка зрения, что ПМЛ находясь в микроциркуляторном русле под действием «цитокинового шторма», вызванного панкреодеструкцией, приходят в состояние гиперстимуляции и, мигрировав в очаг деструкции, «перевы-полняют» там свои эффекторные функции, оказывая не защитное, а повреждаю¬щее действие. По мере развития ответной противовоспалительной реакции, ПМЛ вызывают развитие иммунодепрессии, тем самым способствуя усугублению ОДП и инфицированию очагов панкреатогенной деструкции (Нестерова И.В. с соавт., 2010). Установлено, что инфицирование очагов повреждения при эксперименталь-ном панкреатите реализуется за счет бактериальной транслокации флоры кишеч-ника и происходит уже в 1-е сутки после начала заболевания (Schwarz M., с соавт., 2000). Между тем, клиническое проявление гнойно-септических осложнений ОДП наблюдается только на 10 – 14-е сутки заболевания (Beger H.G с соавт., 1986; Beger H.G. с соавт.; 2007 Schwarz M. с соавт., 2000). Вопрос, в силу каких причин в од¬ном случае у больных ОДП протекает асептично и разрешается, а у других усугуб-ляется инфицированием и развитием гнойно-септических осложнений до настоя-щего времени остается нерешенным. Учитывая, что основное количество леталь-3

ных исходов при ОДП связано с развитием гнойно-септических осложнений, изу-чение процессов инфицирования и поиск ранних маркеров является одной из акту-альных задач современной медицины (Шелест П.В. с соавт., 2007).

Возможно, позитивное или негативное влияние ПМЛ на процессы деструкции в поджелудочной железе может быть связано с нарушениями процессов прайминга этих клеток. Существование такой способности у ПМЛ, как прайминг или пред-стимуляция, описано еще в 80-е годы прошлого века. Суть данного явления заклю-чается в том, что действие праймирующего стимула на клетку не приводит к ее не-посредственной активации, а вызывает развитие повышенной функциональной го-товности клетки, что влечет за собой усиление интенсивности ответа (например, повышенную секрецию АФК на последующее добавление этого же или другого стимула (Клебанов Г.И, 1999; Маянский А.Н., 2007; Тутелян А.В., 2004). Необхо-димо отметить, что при возникновении воспалительного процесса в макроорга-низме ПМЛ приходят в состояние предстимуляции еще в кровеносном русле под действием находящихся там праймирующих факторов. Далее, мигрируя в очаг вос-паления, там они реализуют все свои эффекторные функции, в том числе и секре-цию АФК. Таким образом, изучение праймирующей способности ПМЛ, прояв-ляющейся изменением секреции АФК in vitro имеет патофизиологическое значе¬ние in vivo. Между тем, процессы прайминга ПМЛ при ОДП остаются неизучен¬ными, что обусловило актуальность настоящей работы.

Исходя из выше изложенного, целью настоящей работы явилось исследова-ние механизмов изменения секреции активных форм кислорода полиморфно-ядерными лейкоцитами при остром деструктивном панкреатите.

Для достижения поставленной нами цели потребовалось выполнить следую-щие задачи:

1. Отработать условия определения секреции активных форм кислорода поли¬морфно-ядерными лейкоцитами крови в норме.

4

2. Выявить изменения секреции активных форм кислорода полиморфно-ядерными лейкоцитами при асептическом и инфицированном течении острого деструк-тивного панкреатита.

3. Изучить влияние бактериальных комплексных антигенов на секрецию активных форм кислорода полиморфно-ядерными лейкоцитами в норме.

4. Оценить особенности секреции активных форм кислорода полиморфно-ядерными лейкоцитами крови под влиянием бактериальных комплексных анти-генов при асептическом и инфицированном течении острого деструктивного панкреатита.

5. Разработать прогностический алгоритм определения характера течения острого деструктивного панкреатита на первые сутки заболевания по изменению секре-ции активных форм кислорода полиморфно-ядерными лейкоцитами крови.

Научная новизна

Установлено влияние условий инкубации in vitro и подтверждена роль ком-понентов цельной крови в механизмах секреции АФК на ПМЛ крови в норме.

Впервые выявлено праймирующее влияние комплексных антигенов (АГ)

Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas

aeruginosa на секрецию АФК ПМЛ крови в норме.

Установлено, что у пациентов с инфицированным течением ОДП уже в 1-е – 3-е сутки заболевания наблюдается снижение суммарной секреции АФК и секре¬ции О2ˉ ПМЛ крови по сравнению с пациентами, имеющими в дальнейшем асеп-тическое течение заболевания.

Впервые выявлено снижение праймирующей способности ПМЛ к секреции АФК в ответ на воздействие инкубацией при 37˚С в течение 60 мин и комплекс¬ными АГ микроорганизмов, способными вызвать инфицирование у пациентов с гнойно-деструктивными формами острого панкреатита. Установлено, что одним из механизмов снижения секреции АФК ПМЛ крови является нарушение активности НАДФН-оксидазы.

Теоретическая значимость работы заключается в расширении представле-ний об участии ПМЛ в патогенезе ОДП, в частности их роли в развитии инфици-рования очагов панкреодеструкции на ранних сроках заболевания.

5

Практическая значимость работы. На основании полученных эксперимен-тальных данных установлена возможность использования метода Л-ХЛ крови в прогнозе течения ОДП уже в 1-е сутки заболевания. Снижение секреции АФК ПМЛ крови при воздействии комплексными АГ Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa может являться ранним специфическим маркером инфицирования при ОДП.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Для получения результатов по определению эффекта прайминга ПМЛ in vitro,

приближенных к условиям in vivo, необходимо производить исследования по

изучению секреции АФК ПМЛ на цельной крови.

2. Предварительная инкубация при 37˚С в течение 60 мин оказывает праймирую-щее влияние на секрецию АФК ПМЛ в норме. У пациентов с ОДП та же инку-бация вызывает снижение секреции АФК ПМЛ. При инфицированном течении ОДП одним из механизмов является нарушение активности НАДФН-оксидазы ПМЛ.

3. Комплексные АГ Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae и Pseudomonas aeruginosa оказывают праймирующее влияние на секрецию АФК ПМЛ в норме и при асептическом течении ОДП. Данное влияние определяется активацией НАДФН – оксидазы ПМЛ.

4. При инфицированном течении ОДП секреция АФК ПМЛ снижена. При воздей-ствии комплексными АГ Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae и Pseudomonas aeruginosa происходит снижение праймирующей способности к секреции АФК ПМЛ. Одним из механизмов наблюдаемого сни-жения является нарушение активации НАДФН-оксидазы ПМЛ.

5. На основании полученных данных предложен прогностический алгоритм опре-деления характера течения ОДП на 1-е сутки заболевания по изменению секре-ции АФК ПМЛ крови под влиянием бактериальных комплексных АГ.

Апробация работы состоялась на совместной научной конференции кафедр общей патологии МБФ, физиологии МБФ и экспериментальной и клинической хи-рургии МБФ ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ от 07 марта 2014 года. Материалы диссертационной работы доложены на II Всероссийской научно-6

практической конференции молодых ученых «Сибирские медико-биологические чтения» (Барнаул, 2012), на ХIХ Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2012) и на ХХ Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2013).

Внедрение результатов работы произведено в практику 12-го хирургиче-ского отделения ФГБУ «3 ЦВКГ им. А.А. Вишневского» и в учебный процесс ка-федры общей патологии МБФ ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ.

Публикации результатов исследования. По результатам исследования опубликовано 8 печатных работ из них 4 - в рецензируемых научных изданиях, ре-комендованных ВАК Министерства науки и образования РФ.

Личный вклад автора. Автор провел сбор исходных данных, анализ и обоб-щение полученных результатов. Вклад автора является определяющим и заключа-ется в непосредственном участии на всех этапах исследования: от постановки задач до обсуждения результатов в научных публикациях и докладах и их внедрении в практику.

Структура и объем диссертации. Материалы диссертации изложены на 150 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, собственных результатов и обсуждения, заключения, выво-дов, практических рекомендаций и списка литературы, состоящего из 88 отечест-венных и 70 иностранных источников, приложения. Работа иллюстрирована 38 таблицами, 31 рисунком.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ Материалы и методы исследования Характеристика групп пациентов. В исследование были включены 58 до¬норов (28,6±1,3 лет) и 28 пациентов с ОДП (50,7±3,3 лет). Забор крови осуществ¬лялся на основании информированного согласия у доноров однократно, а у боль¬ных на 1-е, 3- е, 7- е, 14- е сутки стационарного лечения. Пациентам проводилась консервативная терапия ОДП, согласующаяся с приказом №320 от 13.04.2011 Де-партамента Здравоохранения г. Москвы. Клиническое обследование пациентов с ОДП велось на кафедре экспериментальной и клинической хирургии МБФ ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ в ГКБ №55 г. Москвы (зав. кафедрой

7

проф. Шуркалин Б.К.). В зависимости от клинико-морфологической формы ОДП все обследованные пациенты были разделены на две группы: 1 группа - пациенты с асептическим течением ОДП (n=15) и 2 группа - пациенты с инфицированным те-чением ОДП (n=13).

Выделение полиморфно-ядерных лейкоцитов крови осуществляли по ме-тоду Воуm А. (Бейум А., 1980) из гепаринизированной крови (50 Ед/мл). Подсчет ПМЛ производился по общепринятой методике в камере Горяева под световым микроскопом. Для определения жизнеспособности клеток использовали метод суправитальной окраски мазков трипановым синим.

Определение суммарной секреции АФК ПМЛ производили с помощью метода стимулированной сульфатом бария люминол-зависимой хемилюминесцен-ции (Л-ХЛ) ПМЛ крови и суспензии выделенных ПМЛ. Измерение Л-ХЛ прово-дили на биохемилюминесцентном анализаторе БЛМ 3606М - 01, сигнал от которо-го поступал на персональный компьютер и анализировался с помощью программы BLM- Obrab (СКТБ «Наука» КНЦ СО РАН, Россия). Для этого к образцам крови или суспензии выделенных ПМЛ, содержащим 1×106 клеток в пробе (конечный объем пробы составлял 0,7 мл и доводился раствором Хенкса (рН=7,45), добавля¬ли активатор свечения – люминол (его используют для регистрации интенсивности ХЛ, отражающую суммарную выработку практически всех АФК (Владимиров Ю.А. и соавт., 1987) в количестве 0,15 мл (рабочая концентрация раствора 2×10-3 М, Sigma, США). Регистрировали спонтанный уровень Л-ХЛ, затем добавляли стимулятор свечения – сульфат бария, в количестве 0,15 мл (рабочая концентрация раствора 2 мг/мл) и измеряли уровень стимулированной Л-ХЛ. Регистрация ХЛ проводилась в режиме постоянного перемешивания и температуре 37ºС. С помо-щью компьютерной программы BLM- Obrab определяли следующие параметры ХЛ: интенсивность спонтанной ХЛ - Iспонт; интенсивность максимальной ХЛ -Iмах; время достижения максимальной вспышки ХЛ - Тмах; интенсивность стиму-лированной ХЛ: Iстим = Iмах – Iспонт; площадь под кривой Л-ХЛ - Sхл, отра-жающей светосумму ХЛ и прямо пропорциональной общей фагоцитарной актив-ности ПМЛ крови (рисунок 1).

8

Рис.1. Регистрируемые параметры кривой люминол-зависимой хемилюми-несценции.

Определение секреции супероксид анион радикала (О2ˉ ) ПМЛ производи-ли с помощью метода стимулированной сульфатом бария люцигенин-зависимой хемилюминесценции (Лц-ХЛ) ПМЛ крови и суспензии выделенных ПМЛ. Мето-дика определения аналогична методу Л-ХЛ, отличающаяся использованием специ-фического активатора свечения - люцигенина. Он избирательно связывается с О2ˉ, который образуется в ходе респираторного взрыва ПМЛ при активации НАДФН-оксидазы (Матвеева Н.С. и соавт., 2007). Площадь под кривой Лц-ХЛ, отражаю¬щая светосумму ХЛ, прямо пропорциональна активности НАДФН-оксидазы ПМЛ при действии стимула.

Определение влияния условий инкубации in vitro на ПМЛ. Отбирали объ¬емы образцов крови или суспензий выделенных ПМЛ, содержащие 1×106 ПМЛ, доводили до 0,7 мл средой Хенкса, предварительно инкубировали в течение 60 мин при 37ºС в режиме постоянного перемешивания. Время инкубации при 37˚С было выбрано согласно ряду ранее проведенных исследований по подбору оптимальных условий инкубации с различными специфическими факторами (Невмятуллин А.Л., 1988; Редькин А.П., 1989). После инкубации производили одновременное измере-ние интенсивности Л-ХЛ, Лц-ХЛ и определение параметров ХЛ по ранее описан-9

ной методике. Контрольными пробами служили пробы, из экспериментов по опре-делению суммарной секреции АФК и секреции О2ˉ ПМЛ крови или суспензии вы-деленных ПМЛ. Для оценки праймирующего влияния вычисляли два показателя: индекс стимуляции (ИС), равный отношению Iстим опытной пробы к Iстим кон-трольной пробы, и показатель соотношения Sхл опытной и контрольной проб, ко-торый обозначали как индекс соотношения площадей (ИП). О наличии эффекта прайминга у ПМЛ крови говорили, если показатели, характеризующие его, досто-верно положительно коррелировали между собой и превышали значение 1,0. Оцен-ку влияния компонентов крови на секрецию АФК ПМЛ производили сравнением ИС, ИП между ПМЛ цельной крови и выделенными ПМЛ.

Определение праймирующего влияния комплексных АГ Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumonia и Pseudomonas aeruginosa на ПМЛ.

Комплексные АГ получали из штаммов бактерий клинических изолятов методом приготовления бактериальных комплексов на целлофановом диске (Федосеева В.Н. и соавт., 2001). Полученные маточные суспензии представляли собой ком¬плексные АГ, стандартизированные по количеству микробных клеток на 1 мл сус¬пензии (рабочая концентрация 1×109 микр.кл/мл). Для выявления эффекта прай-минга отбирали объемы образцов крови или суспензий выделенных ПМЛ, содер¬жащие 1×106 ПМЛ, доводили до 0,69 мл средой Хенкса, предварительно инкубиро¬вали с 0,01 мл комплексного АГ в различных конечных концентрациях (5×104 -1000×104 микр. кл/мл) в течение 60 мин при 37ºС в режиме постоянного перемеши¬вания. Контрольные пробы содержали 0,01 мл физ. раствора и также инкубирова¬лись. После инкубации производили одновременное измерение интенсивности Л-ХЛ, Лц-ХЛ и определение параметров ХЛ по ранее описанной методике.

Статистическая обработка результатов. Анализ результатов проводили с использованием общепринятых статистических методов, обрабатывая их с помо-щью статистических компьютерных программ «STATISTICA for Windows» версия 7.0 (Stat Soft, USA) и приложения Microsoft Office Excel 2010. Все параметры и по-казатели вычислялись в виде среднего арифметического (М), ошибки среднего (m). Для сравнения средних использовался параметрический t критерий (критерий Стьюдента). Достоверно значимыми считали результаты с р<0,05. Для ИС и ИП

10

определяли коэффициент корреляции Пирсона (r) и также оценивали его достовер-ность (p). В случае распределения, отличающегося от нормального, применялся критерий Манна-Уитни.

Основные результаты исследования Изучение влияния условий инкубации in vitro на секрецию АФК ПМЛ крови

в норме и при ОДП

Известно, что при возникновении острого воспалительного процесса in vivo ПМЛ приходят в состояние прайминга еще в кровотоке, под действием неспецифи-ческих и специфических факторов, а мигрируя в очаг воспаления, они реализуют там все свои эффекторные функции, в том числе и секрецию АФК. Было предпо-ложено, что инкубация в течение 60 мин при 37˚С in vitro оказывает праймирую-щее влияние на секрецию АФК ПМЛ и является неспецифическим фактором, по-скольку не требует наличия специфических рецепторов на поверхности клетки для запуска дыхательного взрыва. Кроме того, наличие в цельной крови опсонинов и других ее компонентов также может способствовать данному влиянию инкубации на секрецию АФК ПМЛ.

Было получено, что инкубация в течение 60 мин при 37˚С вызывает увеличе-ние секреции АФК ПМЛ. ИС и ИП >1,0 (р<0,05) как для выделенных ПМЛ, так и для ПМЛ крови (таблица 1). Праймирующее влияние данной инкубации in vitro на секрецию АФК ПМЛ происходит как в случае регистрации интенсивности Л-ХЛ, так и при регистрации интенсивности Лц-ХЛ, и оно различно. Это свидетельствует о различном влиянии условий инкубации in vitro на ферментные системы кислоро-дозависимого метаболизма ПМЛ, а также роли компонентов цельной крови в дан-ном праймирующем влиянии. Из таблицы 1 видно, что в цельной крови индексы, характеризующие праймирующее влияние условий инкубации in vitro на секрецию АФК, изменяются в большей мере, чем соответствующие индексы у выделенных ПМЛ. В связи с этим, можно сделать вывод о положительном влиянии других ком-понентов крови (опсонинов и др.) на праймирование секреции АФК ПМЛ.

11

Таблица 1.

Сравнение индексов стимуляции и соотношения площадей под кривыми Л-ХЛ и

Лц-ХЛ суспензии выделенных ПМЛ и ПМЛ крови доноров

в условиях инкубации in vitro, (M ± m)

Вид ХЛ Выделенные ПМЛ ПМЛ крови

ИС г ИП ИС г ИП

Л-ХЛ (секре¬ция всех АФК) 1,07±0,04\* 0,85; p<0,05 1,11±0,08\* 2,67±0,06 0,97; p<0,05 2,80±0,08

Лц-ХЛ

(секре¬ция О2ˉ) 1,28±0,06\* 0,98; p<0,05 1,34±0,06\* 1,41±0,07 0,91; p<0,05 1,49±0,06

Примечание.\* - p<0,05 при сравнении с ПМЛ крови.

В то же время, процессы выделения клеток могут оказывать негативное влия-ние на способность ПМЛ секретировать АФК. Данные факты свидетельствуют о том, что для получения результатов максимально приближенных и неискажаю-щих картину in vivo необходимо проводить исследование секреции АФК ПМЛ на цельной крови. При сравнении ИС и ИП между собой для выделенных ПМЛ и для ПМЛ крови путем корреляционного анализа нами было выявлено, что данные ин-дексы имеют сильную положительную корреляцию, что может позволить оцени-вать праймирующее влияние по одному из индексов для группы доноров.

На следующем этапе работы исследовали влияние условий инкубации in vitro на секрецию АФК ПМЛ в цельной крови у пациентов с ОДП (таблица 2). При сравнении индексов, характеризующих праймирующее влияние инкубации в тече-ние 60 мин при 37˚С на секрецию АФК ПМЛ доноров и больных ОДП было выяв-лено снижение данного влияния у всех пациентов. При сравнении ИС и ИП между собой для каждой из групп больных путем корреляционного анализа нами также было выявлено, что данные индексы имеют сильную положительную корреляцию. На следующих этапах исследования это позволило также как, и в группе доноров, в группах больных с ОДП оценивать праймирующее влияние только по ИП.

12

Таблица 2. Сравнение индексов стимуляции и соотношения площадей под кривыми Л-ХЛ и

Лц-ХЛ ПМЛ крови больных ОДП в условиях инкубации in vitro, (M ± m)

Вид ХЛ Асептический ОДП (1 группа) Инфицированный ОДП (2 группа)

ИС г ИП ИС г ИП

Л-ХЛ 2,16±0,03\* 0,86; р<0,05 2,41±0,04\* 1,35±0,05\*# 0,83; р<0,05 1,48±0,05\*#

Лц-ХЛ 2,23±0,05\* 0,92; р<0,05 2,25±0,06\* 1,28±0,03\*# 0,88; р<0,05 1,32±0,05\*#

Примечание: \* - p<0,05 при сравнении с группой доноров, # - p<0,05 при сравнении с 1 группой.

Для 1 группы пациентов характерны более высокие значения ИС и ИП, ха-рактеризующие праймирующее влияние условий инкубации in vitro на секрецию АФК ПМЛ по сравнению со 2 группой. Суммарная секреция АФК ПМЛ под влия-нием условий инкубации in vitro снижена на 13,9-19,1% (p<0,05). В то же время, секреция О2ˉ ПМЛ крови, наоборот, увеличена на 51,0-58,1% (p<0,05) по сравне-нию с донорами. Во 2 группе суммарная секреция АФК ПМЛ под влиянием инку-бации in vitro снижена на 47,1-49,4% (p<0,05), в том числе и секреция О2ˉ на 9,2-11,4% (p<0,05). Поскольку уровень секреции АФК в данных группах различен, возникло предположение, что причиной этого является присутствие в крови паци-ентов с инфицированным течением ОДП специфических факторов, подавляющих секрецию АФК ПМЛ. Такими специфическими факторами могут быть бактерии, фрагменты их клеточной стенки и их АГ, участвующие в бактериальной трансло-кации из толстого кишечника при инфицировании очагов панкреодеструкции. По данным литературы наиболее часто высеваемыми возбудителями при инфицирова-нии ОДП являются Escherichia coli, Klebsiella spp, Staphylococcus aureus и Pseudo-monas aeruginosa (Михайлусов С.В. и соавт, 2009; McNaught C.E. с соавт., 2002). В связи с этим на следующем этапе работы были использованы комплексные АГ данных микроорганизмов, состоящие из инактивированных цельных бактерий, их разрушенных компонентов и выделенных ими продуктов жизнедеятельности.

13

Изучение праймирующего влияния бактериальных комплексных АГ на секрецию АФК ПМЛ крови в норме и при ОДП

При изучении воздействия бактериальных комплексных АГ было установле¬но, что исследуемые комплексные АГ праймируют секрецию АФК ПМЛ у доно¬ров. Для комплексных АГ Escheriсhia coli, Staphylococcus aureus и Pseudomonas aeruginosa праймирующий эффект имел характер обратно пропорциональный до¬зе, причем самая большая концентрация 1000×104 микр.кл/мл вызывала макси¬мальное подавление секреции АФК (ИП<1,0 с p<0,05). В случае воздействия ком¬плексным АГ Klebsiella pneumoniae эффект прайминга не имел аналогичной зави¬симости от концентрации, так как весь диапазон концентраций вызывал увеличе¬ние секреции АФК ПМЛ доноров (таблица 3).

Таблица 3. Влияние бактериальных комплексных АГ на секрецию АФК ПМЛ крови доноров,

(M ± m)

Вид ХЛ САГ,

микр.кл/

мл,

х104 ИП

E.coli ИП

St. aureus ИП

KL pneumoniae ИП

Ps. aeruginosa

Л-ХЛ 5 1,85 ± 0,15\* 2,13 ± 0,17\* 2,80 ± 0,21\* 1,51 ± 0,05\*

50 1,69 ± 0,16\* 1,21 ± 0,09\* 3,04 ± 0,30\* 1,16 ± 0,07\*

250 1,31 ± 0,14\* 0,72 ± 0,05\* 2,11 ± 0,26\* 0,82 ± 0,08\*

1000 0,89 ± 0,10\* 0,31 ± 0,04\* 1,02 ± 0,17 0,40 ± 0,05\*

Лц-ХЛ 5 1,33 ± 0,08\* 3,12 ± 0,14\* 2,41 ± 0,36\* 1,19 ± 0,06\*

50 1,25 ± 0,06\* 1,27 ± 0,08\* 2,72 ± 0,39\* 0,98 ± 0,07

250 1,16 ± 0,07\* 1,30 ± 0,09\* 2,17 ± 0,31\* 0,72 ± 0,05\*

1000 0,57 ± 0,05\* 0,75 ± 0,06\* 1,14 ± 0,13 0,33 ± 0,02\*

Примечание. \* - р<0,05 по отношению к контролю.

При праймирующем воздействии комплексным АГ Escheriсhia coli увеличе-ние суммарной секреции АФК и секреции О2ˉ ПМЛ у доноров наблюдалось в диа-пазоне концентраций 5×104-250×104 микр.кл/мл. Воздействие концентрации 5×104 микр.кл/мл оказывало максимальный предстимулирующий эффект на секрецию АФК ПМЛ доноров, в т. ч. и на секрецию О2ˉ.

Комплексный АГ Staphylococcus aureus стимулировал суммарную секрецию АФК ПМЛ доноров в диапазоне концентраций 5×104-50×104 микр.кл/мл. Воздейст-

14

вие концентрацией 5×104 микр.кл/мл вызывало максимальный предстимулирую-

щий эффект на секрецию АФК ПМЛ доноров. Влияние комплексного АГ Staphylo-

coccus aureus на секрецию О2ˉ ПМЛ доноров было выражено в большей степени

(увеличение ИП при регистрации Лц-ХЛ выражено в большей степени по сравне¬

нию с ИП при регистрации Л-ХЛ), предстимулирующие концентрации находились

в диапазоне 5×104-250×104 микр.кл/мл. Воздействие концентрации 250×104

микр.кл/мл оказывало предстимулирующее влияние только на секрецию О2ˉ.

При праймирующем воздействии комплексным АГ Klebsiella pneumoniae максимальный предстимулирующий эффект на секрецию АФК ПМЛ доноров вы-зывало воздействие концентрацией 50×104 микр.кл/мл.

Предстимулирующее влияние комплексного АГ Pseudomonas aeruginosa на суммарную секрецию АФК ПМЛ доноров находилось в диапазоне концентраций 5×104-50×104 микр.кл/мл, а секрецию О2ˉ предстимулировало воздействие только одной концентрации - 5×104микр.кл/мл.

На основании определенной силы праймирующего влияния на суммарную секрецию АФК ПМЛ доноров комплексные АГ можно расположить в следующей последовательности: Klebsiella pneumoniae>Staphylococcus aureus >Escheriсhia coli >Pseudomonas aeruginosa. Тот же ряд по праймирующему влиянию на секрецию О2ˉ выглядит так: Staphylococcus aureus > Klebsiella pneumoniae >Escheriсhia coli >Pseudomonas aeruginosa.

Исходя из полученных закономерностей влияния бактериальных комплекс¬ных АГ на секрецию АФК ПМЛ у доноров, необходимо определить, в какой мере данные закономерности сохранятся при ОДП. Поэтому следующим этапом изуче¬ния влияния специфических факторов на секрецию АФК ПМЛ стало исследование данного воздействия при ОДП (таблица 4). При воздействии исследуемых бактери-альных комплексных АГ на ПМЛ крови пациентов 1 группы было выявлено, что весь диапазон концентраций (5×104-1000×104 микр.кл/мл) вызывает увеличение суммарной секреции АФК и секреции О2ˉ (p<0,05). Не наблюдалось обратно про-порциональной дозовой зависимости ИП как в группе доноров. В случае прайми-рующего воздействия данными комплексными АГ предстимулирующее влияние на секрецию О2ˉ ПМЛ было выражено в большей степени (увеличение ИП при реги-15

страции Лц-ХЛ выражено в большей степени по сравнению с ИП при регистрации

Л-ХЛ). Это может свидетельствовать о значительной предстимуляции НАДФН-

оксидазы ПМЛ крови пациентов с асептическим течением ОДП в ответ на воздей¬

ствие данными комплексными АГ. Необходимо отметить, что по силе прайми-

рующего влияния на суммарную секрецию АФК ПМЛ крови пациентов 1 группы

комплексные АГ можно расположить в следующей последовательности:

Escheriсhia coli>Klebsiella pneumoniae>Staphylococcus aureus>Pseudomonas

aeruginosa. Тот же ряд по влиянию на секрецию О2ˉ выглядит так: Klebsiella pneumoniae >Escheriсhia coli >Pseudomonas aeruginosa> Staphylococcus aureus. Данные ряды последовательностей отличаются от таковых в группе доноров.

Для 2 группы пациентов с ОДП наблюдалось снижение праймирующей спо-собности ПМЛ к суммарной секреции АФК и секреции О2ˉ на всем диапазоне кон-центраций комплексных АГ Escheriсhia coli, Staphylococcus aureus и Klebsiella pneumoniae по сравнению с 1 группой и группой доноров (p<0,05). Причем по силе влияния на секрецию АФК ПМЛ данные комплексные АГ располагались в анало-гичной последовательности как в группе доноров. При воздействии комплексным АГ Pseudomonas aeruginosa не фиксировалось праймирующего влияния на сум-марную секрецию АФК и секрецию О2ˉ ПМЛ крови (ИП<1,0 при p<0,05 на всем диапазоне концентраций).

Таким образом, можно заключить, что наблюдаемое снижение секреции АФК ПМЛ крови при инфицированном течении ОДП, в т. ч. и снижение секреции О2ˉ объясняется дефектами в работе НАДФН-оксидазы и других кислородзависимых ферментных систем ПМЛ (МПО и СОД). Одним из таких дефектов, может являть¬ся нарушение сборки НАДФН-оксидазного комплекса в процессе прайминга ПМЛ бактериальными АГ и как следствие этого снижение секреции О2ˉ (Маянский А.Н., 2007).

16

Таблица 4. Влияние бактериальных комплексных АГ на секрецию АФК ПМЛ крови пациентов с ОДП, (М ± т)

САГ, микр.кл

/мл, xlO4 Асептический ОДП Инфицированный ОДП

(1 группа) (2 группа)

ИП

E.coli ИП

St. aureus ИП

KL pneumoniae ИП

Ps.aeruginosa ИП

E.coli ИП

St. aureus ИП

KL pneumoniae ИП

Ps. aeruginosa

5 2,45±0,07\* 1,43±0,11\* 2,26±0,10\* 1,11±0,12\* 1,10±0,06\*# 1,24±0,02\*# 2,11±0,02\* 0,67±0,05\*

50 2,08±0,07\* 1,35±0,07 2,26±0,14\* 1,29±0,12 1,45±0,06# 0,92±0,07\*# 1,97±0,16\* 0,92±0,08\*#

250 1,83±0,14\* 1,25±0,16\* 1,53±0,15\* 1,57±0,12\* 0,88±0,08\*# 0,44 ±0,04\*# 1,19±0,07\*# 0,70±0,02#

1000 2,13±0,04\* 1,09±0,05\* 1,83±0,17\* 1,87±0,17\* 0,68±0,04\*# 0,10±0,002\*# 0,58±0,02\*# 0,47±0,008\*#

5 3,52±0,10\* 2,05±0,25\* 4,28±0,12\* 1,59±0,20\* 0,70±0,04\*# 1,39±0,11\*# 0,98±0,04\*# 0,92±0,002\*#

50 2,88±0,12\* 1,55±0,16 4,03±0,26\* 1,46±0,10\* 1,15±0,10# 0,91±0,15\*# 1,55±0,07\*# 0,97±0,04#

250 2,37±0,19\* 1,75±0,12\* 3,52±0,23\* 2,68±0,20\* 0,92±0,10\*# 0,87±0,12\*# 1,38±0,10\*# 0,99±0,07\*#

1000 2,84±0,16\* 1,46±0,03\* 2,75±0,30\* 2,72±0,16\* 0,46±0,06\*# 0,59±0,03\*# 0,78±0,02\*# 0,69±0,06\*#

Примечание. \* - p<0,05 при сравнении с группой доноров; # - p<0,05 при сравнении с 1 группой.

Прогностическое значение исследования секреции АФК ПМЛ крови при ОДП

Для оценки возможности прогностического значения исследования секреции АФК посредством метода ХЛ было произведено определение суммарной секреции АФК ПМЛ, секреции О2ˉ и праймирующей способности ПМЛ секретировать АФК под влиянием бактериальных комплексных АГ в динамике развития ОДП (1-е, 3-е, 7-е и 14-е сутки стационарного лечения) у больных с асептической и инфициро-ванной формой течения ОДП.

Динамическое исследование суммарной секреции АФК, секреции О2ˉ

ПМЛ крови больных ОДП

На рисунке 2А показано, что максимальные величины суммарной секреции АФК ПМЛ крови в обеих группах пациентов с ОДП приходится на 3-е сутки ста-ционарного лечения, а ее снижение происходит к 14-м суткам. Однако во всем пе-риоде наблюдения во 2 группе пациентов уровень суммарной секреции АФК ниже, чем в 1 группе.

А. Б.

Асептический ОДП

1 сутки 3 сутки 7 сутки 14 сутки

Инфицированный ОДП

Доноры

Рис.2. Динамика изменения суммарной секреции АФК ПМЛ крови, оцениваемой по величине площади под кривой Л-ХЛ, у больных с ОДП (А) и секреции О2ˉ ПМЛ крови, оце-ниваемой по величине площади под кривой Лц-ХЛ, у больных с ОДП (Б). Примечание: \*-р<0,05; # -p<0,001 по сравнению с группой доноров.

Из рисунка 2Б следует, что максимум уровня секреции О2ˉ ПМЛ у данных групп пациентов приходится на разные периоды исследования – в 1 группе он на-чинается уже с 1-х суток и продолжается до 3-х суток, а к 14-м суткам происходит

18

нормализация уровня секреции О2ˉ, во 2 группе максимум наблюдается лишь к 7-м суткам, а на 14-е сутки секреция О2ˉ ПМЛ снижена по сравнению с донорами и 1 группой.

Следовательно, у пациентов с инфицированным течением ОДП уже в ранние сроки заболевания (1-е–3-е сутки), а также в период манифестации гнойно-септических осложнений (14-е сутки) наблюдаются нарушения кислородозависи-мого метаболизма ПМЛ, проявляющиеся в снижении суммарной секреции АФК и секреции О2ˉ ПМЛ крови.

Динамическое исследование праймирующего влияния комплексных бактериальных АГ на секрецию АФК ПМЛ крови больных ОДП

Как представлено на рисунке 3А, Б, В, Г в 1 группе пациентов наблюдается значительное увеличение суммарной секреции АФК ПМЛ крови в ответ на прай-мирующее влияние высоких концентраций бактериальных комплексных АГ, осо-бенно в 1-е и 7-е сутки. Во 2 группе на протяжении всего срока наблюдения фик-сируется снижение суммарной секреции АФК ПМЛ (ИП<1,0; p<0,05).

Данные результаты показывают, что ПМЛ крови пациентов с асептическим течением ОДП находятся в повышенной функциональной готовности по отноше-нию к бактериальному агенту, способному вызвать инфицирование воспалительно-го процесса на протяжении всего срока исследования. В группе пациентов с инфи-цированным течением, наоборот, ПМЛ уже находятся в состоянии иммунодепрес-сии по отношению к возможным возбудителям инфицирования. Вероятно, это служит одной из причин развития гнойно-септических осложнений ОДП у пациен-тов данной группы. Кроме того, данные результаты косвенно подтверждают тот факт, что инфицирование очагов панкреодеструкции может происходить уже в первые сутки заболевания (Schwarz M., с соавт., 2000).

Таким образом, полученные результаты позволяют использовать определение праймирующей способности ПМЛ к суммарной секреции АФК под влиянием ис-следованных бактериальных комплексных АГ как прогностический маркер течения данного заболевания еще до развития клинических проявлений инфицированного ОДП. Те пациенты, у которых уже на первые сутки заболевания ИП >1,0 с вероят-ностью p<0,001 в дальнейшем дадут картину асептического ОДП. Пациенты с

19

ИП<1,0 с вероятностью p<0,05 составляют группу риска по развитию гнойно-деструктивных форм ОДП и нуждаются в более пристальном внимании врачей.

А. Escheriсhia coli

Б. Staphylococcus aureus

В. Klebsiella pneumoniae

Г. Pseudomonas aeruginosa

Инфицированный ОДП

Асептический ОДП

Рис.3. Динамика изменения прайминг - эффекта ПМЛ крови, оцениваемого по индексу со-отношения площадей Л-ХЛ у больных с ОДП при воздействии исследуемых комплексных АГ в концентрации 1000×104 микр. кл/мл. Примечание: \*-р<0,05; # -p<0,001 по сравнению с группой доноров.

ВЫВОДЫ

1. Отработаны условия определения секреции активных форм кислорода поли-морфно-ядерными лейкоцитами в норме. Показано праймирующее влияние инку-бации в течение 60 мин при 37˚С на секрецию активных форм кислорода поли-морфно-ядерными лейкоцитами доноров. Выявлено, что выделение полиморфно-ядерных лейкоцитов из цельной крови изменяет данное влияние инкубации на сек-рецию активных форм кислорода в норме (суммарная секреция активных форм ки-

20

слорода выделенными полиморфно-ядерными лейкоцитами доноров снижена на 169,0% по сравнению с таковой в цельной крови, а секреция О2ˉ снижена на 15,0%).

2. При инфицированном течении острого деструктивного панкреатита наблюдает¬ся снижение секреции активных форм кислорода, в т.ч. О2ˉ по сравнению с паци-ентами, имеющими асептическое течение острого деструктивного панкреатита (суммарная секреция активных форм кислорода снижена на 50,7%, а секреция О2ˉ снижена на 48,9%).

3. При остром деструктивном панкреатите в условиях инкубации in vitro секреция активных форм кислорода полиморфно-ядерными лейкоцитами крови снижена по сравнению с донорами. При инфицированном течении острого деструктивного панкреатита снижение секреции активных форм кислорода связано с нарушением работы всех кислородозависимых систем полиморфно-ядерных лейкоцитов, в т.ч. со снижением активности НАДФН-оксидазы.

4. Исследуемые бактериальные комплексные антигены обладают праймирующим влиянием на секрецию активных форм кислорода полиморфно-ядерными лейко-цитами в норме и при асептическом течении острого деструктивного панкреатита. Одним из механизмов такого влияния является активация НАДФН-оксидазы поли-морфно-ядерных лейкоцитов.

5. При инфицированном течении острого деструктивного панкреатита выявлено снижение секреции активных форм кислорода при воздействии бактериальными комплексными антигенами на полиморфно-ядерные лейкоциты крови (ИП<1,0). Одним из механизмов выявленного нарушения является снижение активности НАДФН-оксидазы.

6. По изменению секреции активных форм кислорода полиморфно-ядерными лей-коцитами при воздействии комплексных антигенов бактерий в первые сутки забо-левания можно судить о течении патологического процесса. У пациентов с ИП >1,0 вероятность развития гнойных процессов в поджелудочной железе составляет ме-нее 0,1%. У пациентов с ИП<1,0 следует ожидать гнойно-септических осложнений острого деструктивного панкреатита (p<0,05).

21

Практические рекомендации

1. Полученные результаты по изучению праймирующего влияния комплексных АГ Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa на секрецию АФК ПМЛ доноров могут использоваться как рефе-рентные значения в экспериментальных работах по изучению аналогичной праймирующей способности ПМЛ крови при других острых воспалительных заболеваниях.

2. С целью предупреждения развития гнойно-септических осложнений предложен прогностический алгоритм определения характера течения острого деструктив-ного панкреатита в 1-е сутки заболевания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Усанова, Е.А. Прайминг полиморфноядерных лейкоцитов крови доноров, инду-цированный бактериальными суспензиями / Е.А. Усанова, С.В. Чаусова, Ю.В. Балякин и др. // XIХ Российский национальный конгресс «Человек и Лекарст-во»: мат. конгр.- М., 2012. - С.588.

2. Усанова, Е.А. Прайминг полиморфноядерных лейкоцитов крови доноров ком-плексами бактериальных антигенов Klebsiella pneumoniae / Е.А. Усанова, С.В. Чаусова, О.Ю. Филатов // II Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых «Сибирские медико-биологические чтения»: мат. конф.- Бар-наул, 2012. - С. 80-81.

3. Усанова, Е.А. Влияние комплексных бактериальных препаратов на оксидантные функции полиморфно-ядерных лейкоцитов крови доноров / Е.А. Усанова, С.В. Чаусова, О.Ю. Филатов и др. //Вестник Российского государственного меди-цинского университета. – 2012.- №5.- С.71-75.

4. Усанова, Е.А. Возможность использования метода хемилюминесценции в оцен-ке функционального состояния полиморфно-ядерных лейкоцитов крови у боль-ных с различным течением острого деструктивного панкреатита / Е.А. Усанова, С.В. Чаусова, О.Ю. Филатов и др. //Medline.ru [Российский биомедицинский

22

электронный журнал]. - 2012. - Т.13. - № статьи 77. - С.923-934. URL: http://medline.ru/public/art/tom13/art77.html.

5. Усанова, Е.А. Праймирование полиморфно-ядерных лейкоцитов крови доноров комплексным антигенным препаратом Escherichia coli / Е.А.Усанова // Вестник Российского государственного медицинского университета. - VIII Междуна-родная Пироговская конференция студентов и молодых ученых: мат.конф – Москва, 2013. – спец. вып. №1.- С.145.

6. Усанова, Е.А. Общая фагоцитарная активность и НАДФН-оксидазная актив¬ность полиморфно-ядерных лейкоцитов крови как прогностический критерий инфицирования острого панкреатита / Е.А. Усанова, С.В. Чаусова, О.Ю. Фила¬тов и др. //XХ Российский национальный конгресс «Человек и Лекарство»: мат.конгр. –М., 2013. - С. 249-250.

7. Усанова, Е.А. Особенности кислородозависимого метаболизма и эффект прай-минга полиморфно-ядерных лейкоцитов крови при воздействии комплексными препаратами антигенов Pseudomonas aerugenosa и Escherichia coli / Е.А.Усанова, С.В. Чаусова, О.Ю.Филатов, Ю.В. Балякин //Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2013.- Т.12, №2. -С.461- 467.

8. Усанова, Е.А. Оценка функциональной активности полиморфно-ядерных лей-коцитов крови у больных панкреонекрозом. / Е.А.Усанова, С.В.Чаусова, М.А. Агапов, Е.А. Дмитриева //Системный анализ и управление в биомедицин-ских системах. – 2013. - Т.12, №3. - С.777-782.

Список сокращений

АГ– антиген

АФК – активные формы кислорода ИС – индекс стимуляции

ИП – индекс соотношения площадей под кривыми хемилюминесценции Л-ХЛ – люминол-зависимая хемилюминесценция Лц-ХЛ – люцигенин-зависимая хемилюминесценция ОДП – острый деструктивный панкреатит ПМЛ – полиморфно-ядерный лейкоцит

23