

На правах рукописи



Беленюк Василий Дмитриевич

**ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ
ПЕРИТОНИТОМ**

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск - 2022

*Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении
«Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского
отделения Российской академии наук» «Научно-исследовательский институт
медицинских проблем Севера»*

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор

Савченко Андрей Анатольевич

Официальные оппоненты:

Хайдуков Сергей Валерьевич – доктор биологических наук, заведующий лабораторией ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева», старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова».

Сесь Татьяна Павловна – доктор биологических наук, профессор кафедры иммунологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН)

Защита состоится « » _____ 2022 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте

www.niikim.ru/ru/наука/объявления-диссовета

Автореферат разослан _____ 2022 г.



Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Облеухова Ирина Александровна

Общая характеристика работы

Актуальность исследования. Одной из наиболее тяжелых инфекционно-воспалительных патологий является распространённый гнойный перитонит (РГП), иммунопатогенез которого до конца не ясен. Летальность при РГП сохраняется на уровне 10-30 %, а в случае генерализации инфекции и развития полиорганной недостаточности достигает 80-90% [Carobianco A., 2017]. Основные алгоритмы лечения РГП в послеоперационном периоде основаны на применении антибиотикотерапии. Как известно, антибиотики оказывают не только прямое воздействие на патогенную микрофлору, но и в значительной степени нарушают работу иммунной системы. При этом нельзя забывать, что образующиеся в момент оперативного вмешательства, повреждения тканей выступают дополнительным источником продуктов клеточного распада, что усиливает активность воспалительного процесса в организме.

За последние годы были выдвинуты и прошли практическую проверку постулаты, утверждающие главенствующую роль системы иммунитета в поддержании внутреннего гомеостаза, контроле процессов метаболизма, защите от внутренних и внешних патогенов [Хаитов Р.М., 2020; Abul Abbas, 2017]. Было показано, что при РГП значительную роль в формировании характера течения заболевания играют процессы, развивающиеся в системе иммунитета [Varela M.L., Mogildea M., 2018]. Как следствие, важным шагом стало углубление понимания основных механизмов функционирования клеток иммунной системы на фоне таких тяжелых состояний как сепсис и перитонит и, соответственно, разработка на их основе новых персонифицированных методов иммуноопосредованной терапии, что в перспективе позволит снизить летальность от РГП.

На фоне перитонита формируется ярко выраженная активация врожденного иммунитета, представленного основными популяциями фагоцитов. В исследовании Wang W. (2018) показано, что само развитие РГП определяет наличие нарушений в регуляторных и эффекторных механизмах местного и системного иммунитета [Wang W., 2018]. При этом часто отмечается угнетение адаптивного звена иммунной системы, обусловленное совокупностью многих факторов [Mikhalchik E.V., Borodina I.V., 2020]. Есть сведения, что состояние иммунной системы больных РГП характеризуется снижением количества и активности Т-клеточного звена, а также увеличением числа клеток врожденного иммунитета, дисиммуноглобулинемией в сторону снижения уровня IgA и увеличения содержания IgM и IgG, а также угнетением поглотительной функции нейтрофилов [Brook A.C., 2019; Mustaffa-Kamal F., 2019]. В работе Kim J.W. (2017) показана гиперкортизолемиа, блокирующая активность стресс-лимитирующих рецепторов иммунных клеток [Kim J.W., 2017].

Kim J.W. (2017), на основе нарушения баланса стресс-реализующих и стресс-лимитирующих механизмов клеток иммунной системы при перитоните, предположил механизм формирования иммунодефицит-подобного состояния. В своих работах он определил, что иммунодепрессии, как правило, возникают при эндотоксикозе 1-2 стадии, а иммунодефицит-подобные состояния – при 2-3 стадиях [Kim J.W., 2017].

Таким образом, становится очевидно, что исследования по данной теме, при должном подходе, могут предложить новые маркеры раннего прогнозирования исхода и течения таких тяжелых заболеваний как РГП. Однако, неоднозначность представлений о взаиморегуляции врожденного и адаптивного иммунитета на фоне антибиотикотерапии при лечении РГП требуют дальнейшего изучения.

Цель исследования: установить закономерности изменения фенотипа клеток иммунной системы у больных распространенным гнойным перитонитом и определить наиболее значимые предикторы исхода заболевания.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие **задачи**:

1. Оценить особенности фенотипа и уровней экспрессии активационных и адгезионных молекул на поверхности нейтрофилов, моноцитов, NK- и NKT-клеток крови у больных РГП в зависимости от исхода заболевания.
2. Оценить особенности фенотипа и уровней экспрессии активационных и адгезионных молекул на поверхности Т- и В-клеток крови у больных РГП в зависимости от исхода заболевания.
3. На основе выявленных изменений в фенотипе клеток врожденного и приобретённого иммунитета, выделить критерии, имеющие прогностическое значение для оценки исхода течения РГП.

Научная новизна. Впервые были установлены закономерности изменения соотношения классических и неклассических моноцитов в периферической крови у пациентов РГП в дооперационном периоде и после операции на фоне стандартной терапии, что характеризует повышение роли неклассической фракции клеток. Продemonстрировано, что у пациентов с неблагоприятным исходом РГП в дооперационном периоде снижается содержание зрелых NK- и NKT-клеток в периферической крови, как относительно контрольных диапазонов, так и относительно показателей пациентов с благоприятным исходом РГП. Впервые показано, что в дооперационном периоде при благоприятном исходе РГП выявлено повышение количества активированных Т-регуляторных клеток по сравнению с контрольным диапазоном и показателями больных с неблагоприятным исходом заболевания. Продemonстрировано, что в дооперационном периоде и в течение двух недель после операции при благоприятном исходе РГП повышается количество CD62L⁺Т-лимфоцитов по сравнению с контрольным диапазоном и показателями больных с

неблагоприятным исходом заболевания. При этом у пациентов с неблагоприятным исходом РГП повышение числа активированных Т-регуляторных клеток в крови выявляется только на третьей неделе наблюдения. Получены новые данные о том, что у пациентов с неблагоприятным исходом РГП на фоне терапии в послеоперационном периоде количество общих В-лимфоцитов, наивных В-клеток и В2-лимфоцитов, а также В-клеток, экспрессирующих CD23-рецептор, значительно выше аналогичных параметров, как контрольной группы, так и пациентов с благоприятным исходом РГП. Установлено, что в плазме крови пациентов с неблагоприятным исходом РГП одновременно повышаются концентрации провоспалительного IL-8, и противовоспалительного IL-10, что приводит к усугублению воспалительного процесса и торможению Т-клеточного иммунного ответа.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость работы заключается в расширении знаний об особенностях реакции клеток иммунной системы в зависимости от исхода РГП. Полученные результаты раскрывают взаимосвязь между нейтрофильными гранулоцитами и субпопуляциями моноцитов, а также процессами подавления адаптивного иммунитета и связанными с этим нарушениями. Определен вклад Th-клеток в течение воспалительного процесса при РГП. Практическая значимость работы заключается в том, что по результатам исследования фенотипического состава регуляторных Т-клеток и В-лимфоцитов был предложен способ прогнозирования исхода течения распространенного гнойного перитонита (Цитометрический способ прогнозирования исхода распространенного гнойного перитонита // Патент на изобретение RU 2691742 C1, 18.06.2019. Заявка № 2018119060 от 23.05.2018).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Фенотип и функциональная активность клеток иммунной системы у больных РГП значительно различаются, характеризуясь повышением уровня фагоцитарной активности нейтрофилов, количества зрелых НК- и НКТ-клеток, активированных Т-регуляторных клеток и снижением содержания активированных В-клеток (CD19⁺CD23⁺), наивных В-лимфоцитов, В1- и В2-клеток в послеоперационном периоде при благоприятном исходе заболевания и отсутствием подобных изменений при неблагоприятном исходе РГП.

2. Коэффициент Т-клеточной регуляции, определяемый из количественных отношений В1-лимфоцитов и Т-регуляторных клеток, является информативным в прогнозе исхода распространенного гнойного перитонита.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, глав собственных исследований и обсуждения полученных результатов,

заклучения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 44 таблицами и 19 рисунками. Список литературы включает 162 библиографических изданий (23 отечественный и 139 иностранный).

Степень достоверности, апробация результатов и личный вклад автора.

Высокая достоверность полученных результатов определяется продуманным дизайном исследования, подтверждается использованием различных подходов с автоматизированной оценкой результатов, а также современными методами статистической обработки результатов.

Основные положения диссертационного исследования представлены и обсуждены на Научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы охраны здоровья населения регионов Сибири» ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» (Красноярск, 2016); Актуальные вопросы вакцинопрофилактики, краевая научно-практическая конференция (Красноярск 2017); Сложные системы в экстремальных условиях, XVIII Всероссийский симпозиум с международным участием (Красноярск 2017); Актуальные вопросы охраны здоровья населения регионов Сибири, 15-я региональная научно-практическая конференция молодых ученых (Красноярск 2017); Наука, промышленность, экология VII Молодежная школа-конференция (Шира 2017); 21 межрегиональная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы медицины» (Абакан, 2018); XIX Всероссийский симпозиум с международным участием «Сложные системы в экстремальных условиях» (Красноярск 2018); XXI Конференция молодых учёных ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск 2018); V Всероссийская научно-практическая школа-конференция с международным участием «Иммунология в клинической практике» (Красноярск 2018); Всероссийская научно-практическая школа-конференция с международным участием «Иммунология в клинической практике» (Красноярск 2019); XVII научно-практическая конференция молодых ученых «Актуальные вопросы охраны здоровья населения регионов Сибири» (Красноярск 2019); XVIII Межрегиональная научно-практическая конференция молодых ученых, посвященная 80-летию члена-корреспондента РАН Валерия Тимофеевича Манчука (Красноярск 2021); XX Международный симпозиум «Сложные системы в экстремальных условиях», Международная сателлитная конференция «Экологический мониторинг: методы и подходы» (Красноярск 2021); Всероссийский конгресс с международным участием «Иммунология в клинической практике» (Красноярск 2021); Научно-практическая конференция с международным участием «Современные аспекты реабилитации иммунной системы» (Красноярск 2021); Научно-практическая конференция «Инфекции и иммунитет. Диагностика, лечение, реабилитация и профилактика у детей и взрослых» (Красноярск 2022).

Работа проводилась на базе лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ ФИЦ КНЦ СО РАН, НИИ МПС (руководитель лаборатории д.м.н., профессор А.А. Савченко). Все исследования выполнялись при непосредственном участии автора в рамках темы государственного задания «Изучение распространенности и механизмов развития иммунометаболических нарушений у населения Сибири» (№ госрегистрации 0356-2017-0045, НИОКТР № госрегистрации 01201351110).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, из них 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ, индексируемых в базах Web of Science, Scopus и РИНЦ, получен 1 патент.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объект исследования

Обследовано 35 пациентов с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП, средний возраст 49,6 лет. В качестве контроля обследовано 38 относительно здоровых людей, средний возраст 45,3 года. Образцы крови забирались утром натощак, в дооперационном периоде, а также на 7-е, 14-е и 21-е сутки после операции. На основании исхода заболевания обследуемые были разделены на группы: 1 группа – больные с благоприятным исходом РГП (n=21); 2 группа – больные с неблагоприятным исходом РГП (n=14); 3 группа – контроль (n=38).

Проточная цитометрия

Имунофенотипирование образцов осуществляли по стандартной методике с применением готовых моноклональных антител (Beckman Coulter, США) и лизирующего реагента VerasLyse (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, USA). В каждой пробе анализировали не менее 50000 клеток

Оценка фагоцитарной активности моноцитов и нейтрофилов

Оценку фагоцитарной активности проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой четырехцветной иммунофлуоресценции цельной периферической крови. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [Зурочка А.В., 2018]. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (BeckmanCoulter, USA).

Иммуноферментный анализ

Концентрацию цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, INF- α , TNF- α и иммуноглобулинов класса IgA, IgM, IgG и IgE в сыворотке определяли иммуноферментным методом, с применением тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» г. Новосибирск. Результаты учитывали фотометрически на приборе StatFax 303+ (США)

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ результатов производили методами описательной и непараметрической статистики с помощью пакетов прикладных программ Statistica 10 и GraphPad Prism 8. Выборку описывали с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C_{25} и C_{75}). Достоверность различий между группами оценивали по критериям Mann-Whitney, Wilcoxon и Friedman. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент корреляции. Достоверность различий коэффициентов корреляции оценивали с помощью критерия Spearman. Статистически достоверными считали значения $p < 0,05$. Для оценки чувствительности и специфичности модели прогноза исхода РГП использовали ROC-анализ.

Результаты и обсуждение

Воспалительная реакция у больных РГП характеризуется увеличением содержания нейтрофилов в крови уже в дооперационном периоде и наличием тенденции к снижению (но при сохранении на повышенном уровне) количества гранулоцитов к концу наблюдаемого периода (рис. 1). Содержание $CD64^+$ и $HLA-DR^+$ нейтрофилов в крови больных РГП в до- и послеоперационном периоде изменяется одинаково: в дооперационном периоде значительное превышение контрольных значений, к концу наблюдаемого периода лечения – тенденция к нормализации.

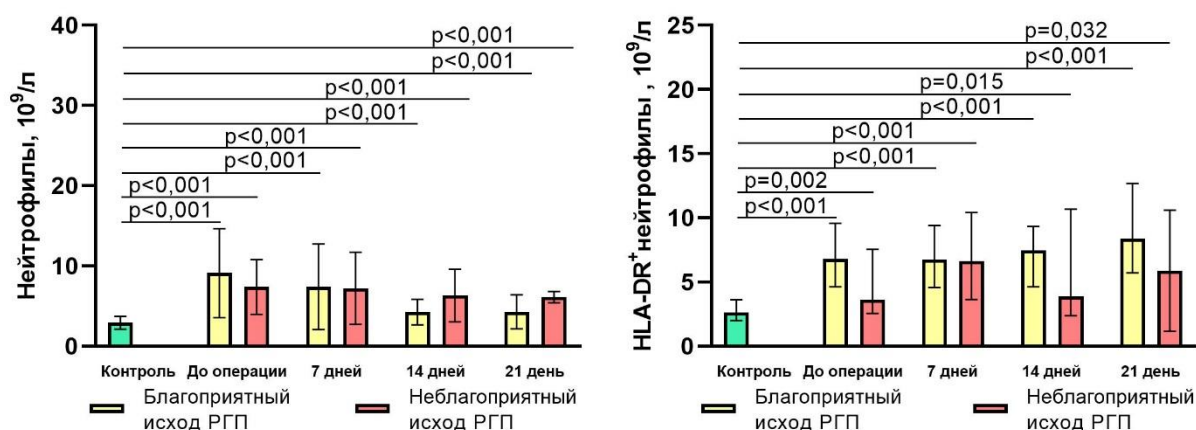


Рисунок 1 – Содержание нейтрофилов и $HLA-DR^+$ нейтрофилов у больных РГП в динамике послеоперационного периода.

Экспрессия $CD64$ -антигена также повышена в дооперационном периоде и на 21-е сутки наблюдения снижается до контрольных значений. $CD64$ ($Fc\gamma RI$) является высокоаффинным рецептором к Fc -фрагментам иммуноглобулинов G и биомаркером бактериальных инфекций [Jong E., 2016; Qian W., 2016]. Оценка фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов показала, что в до- и послеоперационном

периоде у больных независимо от исхода РГП по сравнению с контролем в 2 раза повышается фагоцитарный индекс (ФИ) (рис. 2).

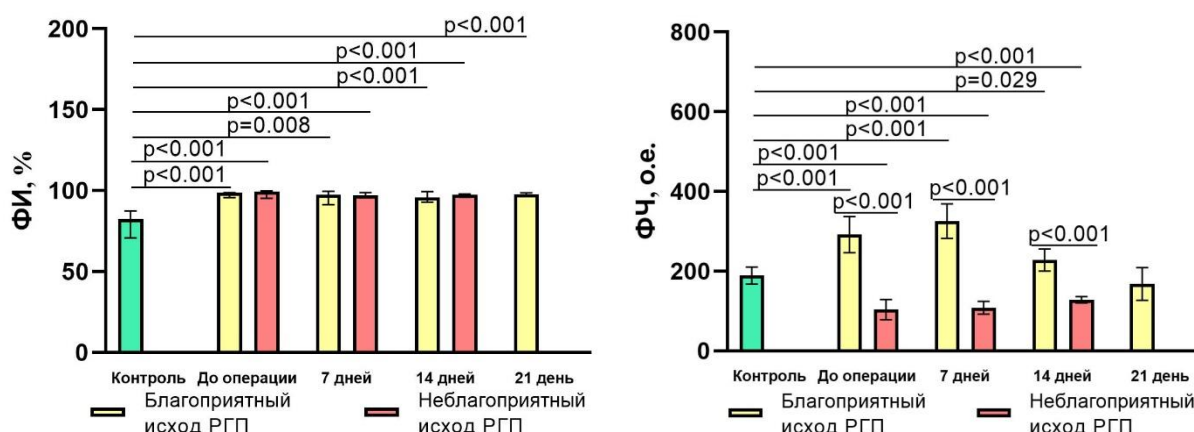


Рисунок 2 – фагоцитарный индекс (ФИ) и фагоцитарное число (ФЧ) нейтрофилов у больных РГП в динамике послеоперационного периода.

В дооперационном периоде у больных с благоприятным течением РГП в 1,5 раза относительно контрольного уровня и в 3 относительно группы с неблагоприятным течением повышается фагоцитарное число (ФЧ) нейтрофилов. В послеоперационном периоде в группе с благоприятным течением РГП наблюдается постепенное снижение ФЧ, вплоть до значений контрольной группы на 21-е сутки наблюдения. В группе с неблагоприятным течением РГП в дооперационном периоде в 2 раза относительно контрольного уровня снижается ФЧ нейтрофилов. На 7-е и 14-е сутки наблюдается сохранение сниженных показателей ФЧ нейтрофилов, как относительно контрольных значений, так и в сравнении с группой благоприятного исхода РГП.

Иммуновоспалительная реакция при благоприятном течении РГП характеризуется снижением содержания моноцитов в периферической крови, однако после 7-х суток наступает постепенная нормализация данного показателя, что говорит о массовой миграции клеток в очаг воспаления на ранних сроках развития заболевания. В тоже время, относительное и абсолютное содержание HLA-DR⁺моноцитов и CD64⁺моноцитов резко снижается в начале лечения и не восстанавливается полностью даже к концу наблюдения. При РГП понижается количество классических моноцитов вне зависимости от течения заболевания (рис. 3). На этом фоне наблюдается смещение равновесия в пользу неклассических моноцитов, выраженное увеличением относительного и абсолютного числа данных клеток, синтезирующих провоспалительные цитокины (TNF- α , IL-1 β и IL-6). Повышение содержания неклассических моноцитов отмечено при различных инфекционно-воспалительных заболеваниях [Мао Y., 2017]. Можно предположить, что нарушение этого процесса у

пациентов с неблагоприятным исходом приводит к задержке иммунного ответа и усугубляет течение заболевания.

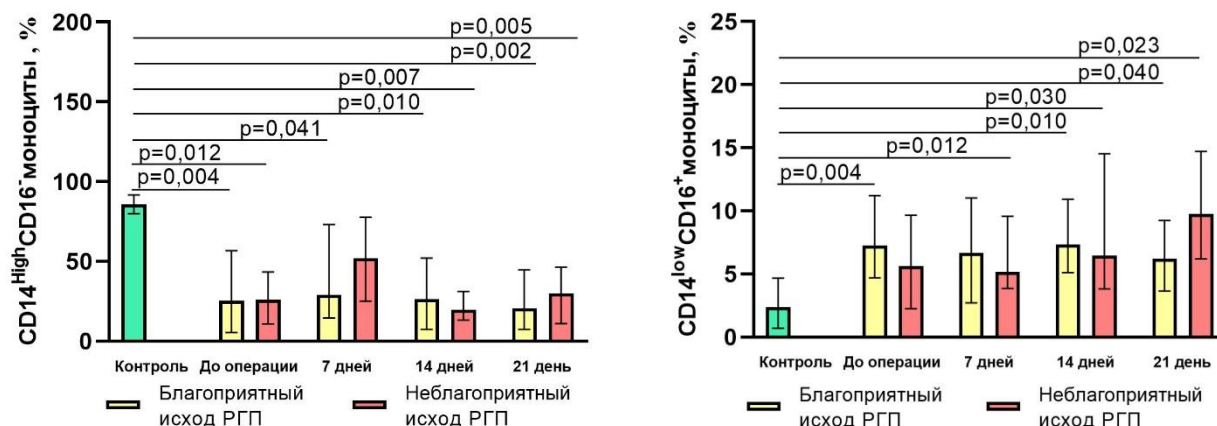


Рисунок 3 – Содержание классических и неклассических моноцитов в периферической крови пациентов с РГП в динамике лечения.

Также особенностью моноцитов крови у больных РГП является снижение содержания клеток, экспрессирующих HLA-DR и CD64, являющихся критически значимыми для осуществления эффективной антиген-презентации.

При оценке фагоцитарной активности моноцитов было установлено, что в до- и послеоперационном периоде у больных с благоприятным исходом РГП повышается ФИ (рис. 4). В тоже время, у пациентов с неблагоприятным течением заболевания только в дооперационном периоде наблюдается сохранение уровня ФИ на уровне контрольной группы, в послеоперационном периоде ФИ достоверно снижается относительно группы с благоприятным течением РГП и контрольных значений. При этом ФЧ моноцитов достоверно снижено в обеих группах независимо от течения РГП.

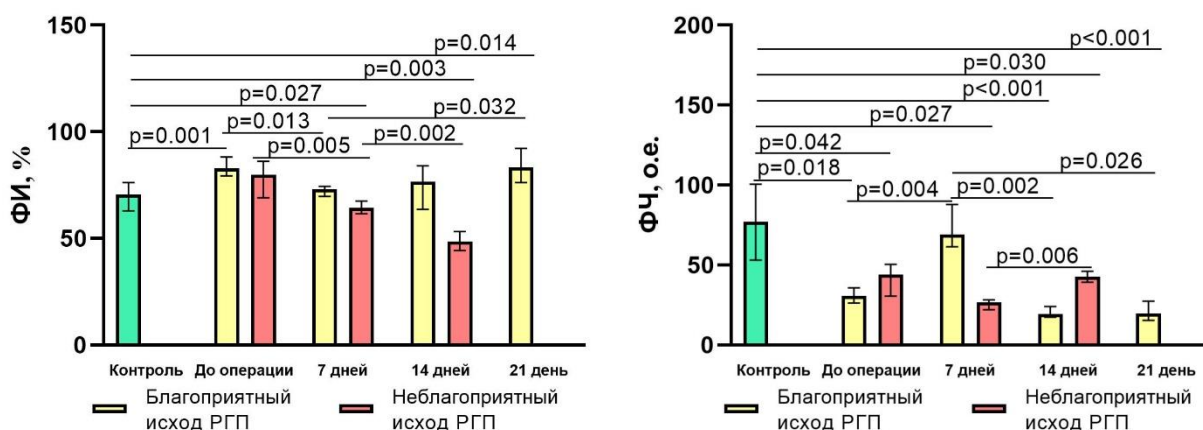


Рисунок 4 – фагоцитарный индекс (ФИ) и фагоцитарное число (ФЧ) моноцитов у больных РГП в динамике послеоперационного периода.

У больных РГП независимо от исхода заболевания относительное количество общих NK- и NKT-клеток в крови снижено уже в дооперационном периоде, что проявляется на фоне понижения абсолютного уровня лимфоцитов в крови (рис. 5).

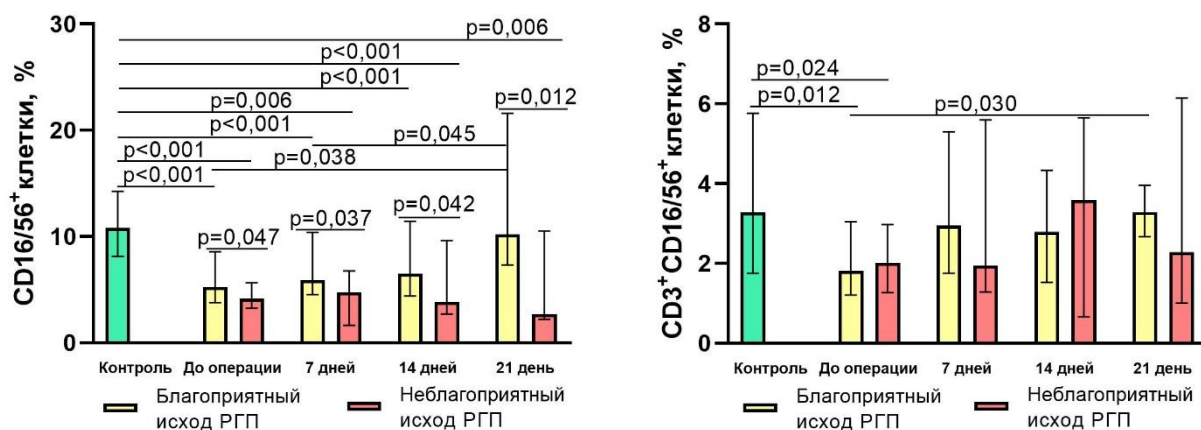


Рисунок 5 – Содержание NK- и NKT-клеток в периферической крови пациентов с РГП в динамике лечения.

Количество NK-клеток до уровня контрольного диапазона восстанавливается только у больных с благоприятным исходом РГП. Низкое содержание NK-клеток при перитоните может определяться миграцией клеток в зону воспаления. В частности, на примере экспериментального перитонита показано, что уже через 48 часов развития заболевания количество мигрирующих в брюшную полость NK-клеток достигает максимума [Parodi M., 2018]. При этом, если процент NKT-клеток восстанавливается уже на 7-е сутки после операции, то сниженный абсолютный уровень данной фракции лимфоцитов сохраняется и в послеоперационном периоде.

Обнаружено, что у больных РГП независимо от исхода заболевания количество CD28⁺NK-клеток, в течение всего периода наблюдения соответствует контрольным значениям. Однако при неблагоприятном исходе в дооперационном периоде и в течение 2-х недель послеоперационного лечения наблюдается повышение MFI CD28 на NK-клетках, как относительно контрольных значений, так и уровней, выявляемых у пациентов с благоприятным исходом РГП (рис. 6). Доказано, что CD57⁺NK-клетки, способны более активно синтезировать IFN γ , но обладают сниженным уровнем пролиферации, что позволяет определить эти клетки как зрелые, эффекторные [Damele L., 2018]. У больных с неблагоприятным исходом заболевания в послеоперационном периоде наблюдается последовательное снижение содержания CD57⁺NK-клеток относительно контрольных значений и уровней, выявленных при благоприятном исходе РГП. В то же время, MFI CD57 у данной категории в послеоперационном периоде выше, чем у здоровых людей и пациентов с благоприятным исходом заболевания.

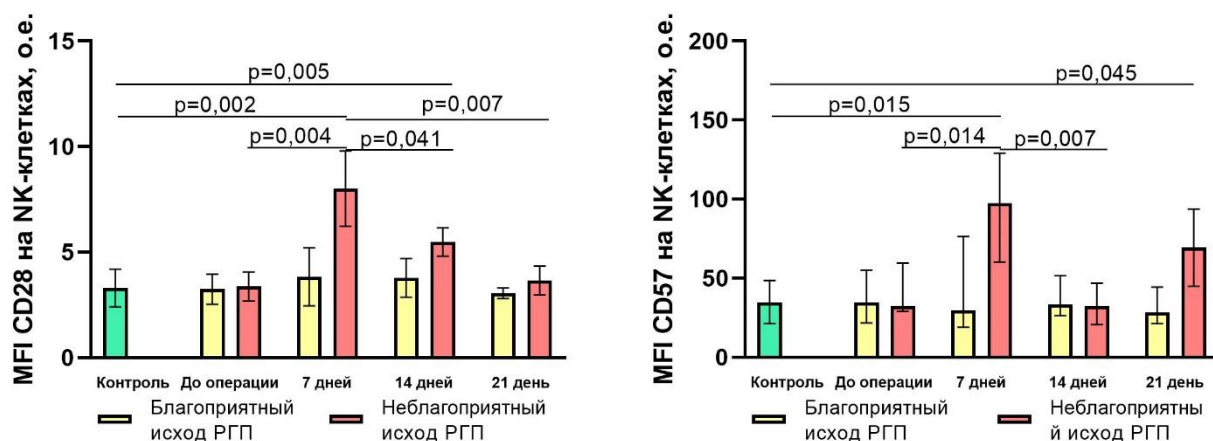


Рисунок 6 – MFI CD28 и CD57 на NK-клетках в периферической крови пациентов с РГП в динамике лечения.

При исследовании параметров, характеризующих адаптивный иммунный ответ в динамике лечения РГП, у обследованных пациентов с РГП независимо от исхода заболевания в дооперационном периоде выявляется снижение абсолютного количества общих лимфоцитов в крови, уровень которых восстанавливается до контрольных значений только на третьей недели лечения (рис. 7). У больных РГП в дооперационном периоде отмечается повышение относительного числа Т-лимфоцитов. В тоже время в послеоперационном периоде высокое число данных клеток сохраняется только у пациентов с благоприятным исходом заболевания.

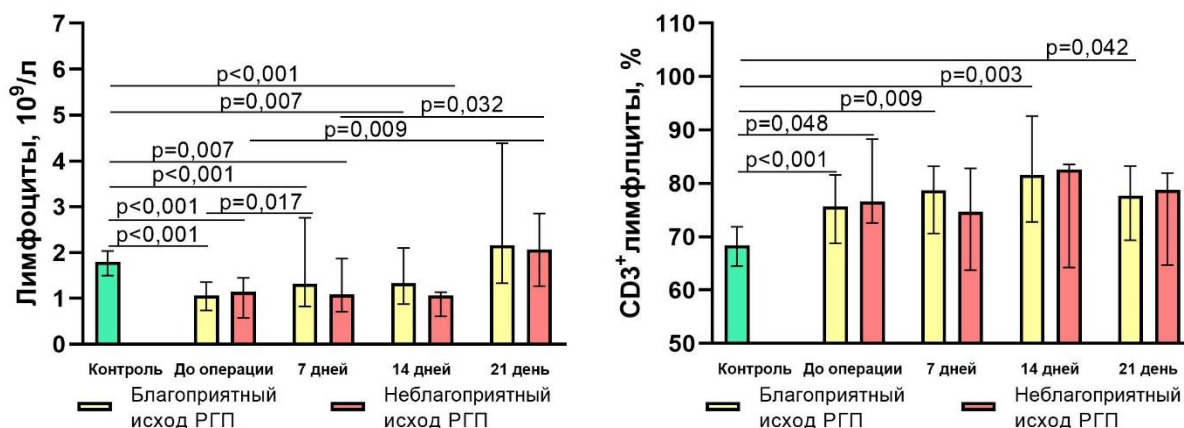


Рисунок 7 – Содержание лимфоцитов и Т-клеток в периферической крови пациентов с РГП в динамике лечения.

При анализе фенотипического состава CD4^+ Т-лимфоцитов в зависимости от исхода РГП установлено, что при благоприятном исходе заболевания у обследованных пациентов в дооперационном периоде наблюдается повышение относительного количества CD4^+ Т-лимфоцитов, но при снижении их абсолютного содержания (рис. 8).

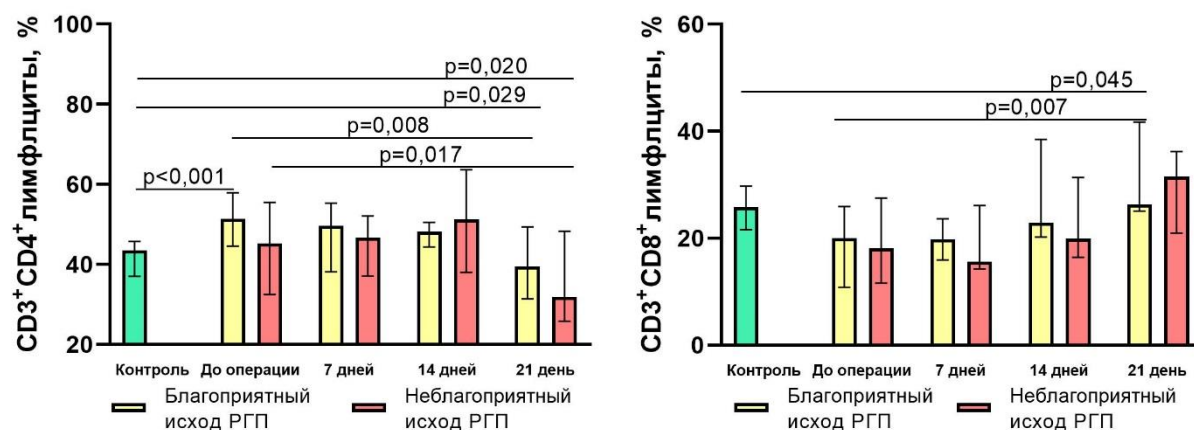


Рисунок 8 – Содержание Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток в периферической крови пациентов с РГП в динамике лечения.

У больных с благоприятным исходом РГП относительное содержание цитотоксических Т-клеток в крови в дооперационном периоде и течение двух недель послеоперационного лечения соответствует контрольному диапазону и повышается только на 21-е сутки лечения. При неблагоприятном исходе на всем протяжении обследования у пациентов выявляется соответствие процентного уровня CD8⁺Т-клеток контрольному диапазону. Установлено, что при благоприятном исходе заболевания у больных в крови, начиная с 14-х суток лечения, повышается количество цитотоксических CD11b⁺Т-лимфоцитов, тогда как при неблагоприятном исходе подобное повышение уровня клеток наблюдается только на 21-е сутки послеоперационного лечения. Согласно работе Shiohawa A et al. (2017), экспрессия CD11b увеличивает миграционный и эффекторный потенциал цитотоксических Т-клеток [Shiohawa A. et al., 2017].

На модели перитонита в работе Lee GR et al. (2018), доказано, что регуляторные Т-клетки способны мигрировать из крови в зону воспаления и осуществлять ингибирование воспалительных процессов [Lee G.R. et al., 2018]. У больных с благоприятным исходом РГП наблюдается повышенное количество регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) в крови (в том числе, экспрессирующих CD62L-рецептор) в дооперационном периоде и первые две недели послеоперационного лечения, только на 21-е сутки наблюдения количество клеток снижалось до контрольных значений (рис. 9). При неблагоприятном исходе заболевания содержание Treg и CD62L⁺Treg в дооперационном периоде и до 14-ти суток, включительно, соответствовала контрольному уровню, тогда как на 21-е сутки понижалось ниже контрольного диапазона. Можно предположить, что понижение содержания в крови Treg, неэкспрессирующих и экспрессирующих CD62L-рецептор, у больных РГП в конце наблюдаемого периода связано с проводимой терапией.

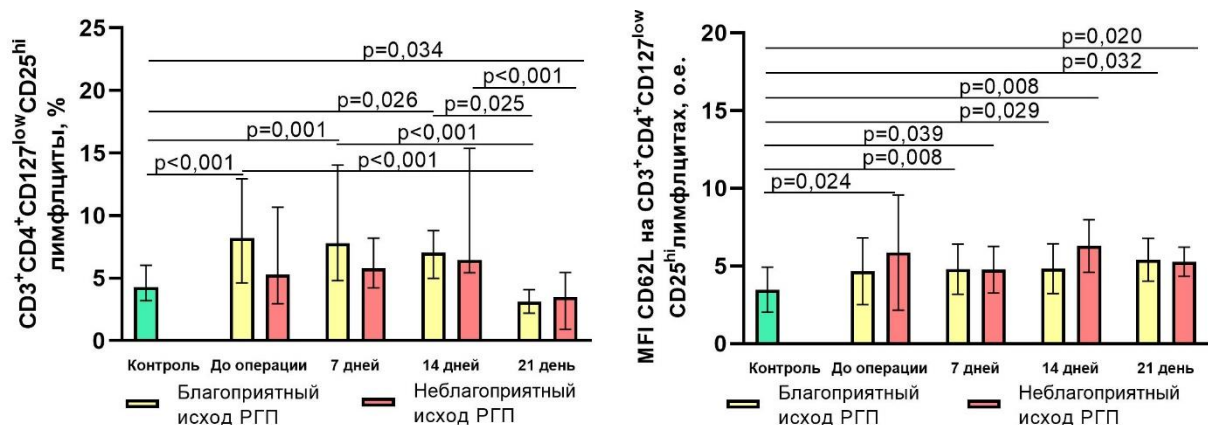


Рисунок 9 – Содержание регуляторных Т-лимфоцитов и уровень MFI CD62L на регуляторных Т-лимфоцитах в периферической крови пациентов с РГП в динамике лечения.

При исследовании концентрации основных цитокинов в периферической крови у больных с благоприятным исходом РГП наблюдалось повышение содержания IL-4 относительно контрольных значений (рис. 10). У больных с благоприятным исходом РГП в дооперационном периоде наблюдалось повышение концентрации IL-8 в периферической крови относительно контрольных значений. У больных с РГП в обеих группах в дооперационном периоде наблюдалось повышение концентрации IL-10 в периферической крови относительно контрольных значений. В группе с неблагоприятным исходом РГП наблюдалось повышение концентрации IL-10 в сравнении с группой благоприятного исхода.

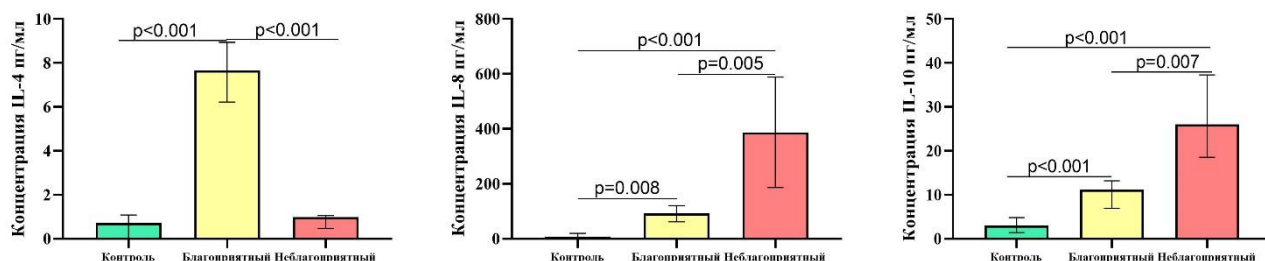


Рисунок 10 – Концентрация IL-4, IL-8 и IL-10 в периферической крови в дооперационный период течения РГП.

В зависимости от исхода заболевания у больных РГП в до- и послеоперационном периоде различается содержание В-лимфоцитов в периферической крови (рис. 11). У пациентов с неблагоприятным исходом заболевания на 7-е сутки после операции количество CD23⁺В-клеток повышено, как относительно контрольного диапазона, так и значений, выявленных при благоприятном исходе РГП. В дальнейшем у больных с неблагоприятным исходом РГП уровень активированных В-лимфоцитов остается повышенным относительно обнаруженного при благоприятном исходе заболевания.

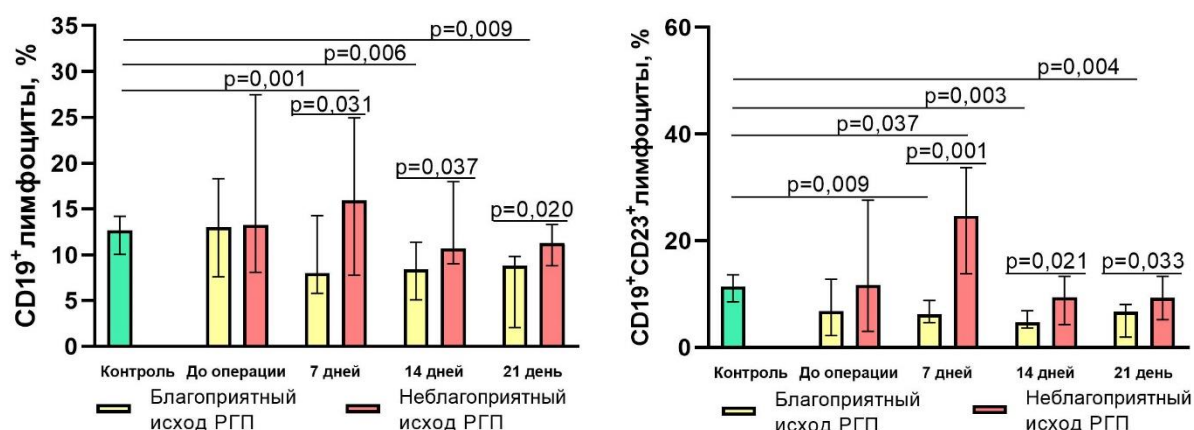


Рисунок 11 – Содержание В- и CD23⁺В-лимфоцитов в периферической крови у РГП в динамике лечения.

Значительные различия в зависимости от исхода заболевания наблюдаются в субпопуляционном составе В-лимфоцитов (рис. 12). У пациентов с благоприятным исходом РГП число В1-клеток снижено в ходе всего периода наблюдения, в тоже время у пациентов с неблагоприятным исходом заболевания отмечается повышение числа данных клеток в первые 2-е недели наблюдения. В работе Yong L. et al. (2019) показано, что увеличение содержания В1-клеток в печени сопровождалось снижением уровней экспрессии хемокинов и провоспалительных цитокинов, что приводило к ингибированию воспалительной реакции [Yong L. et al., 2019].

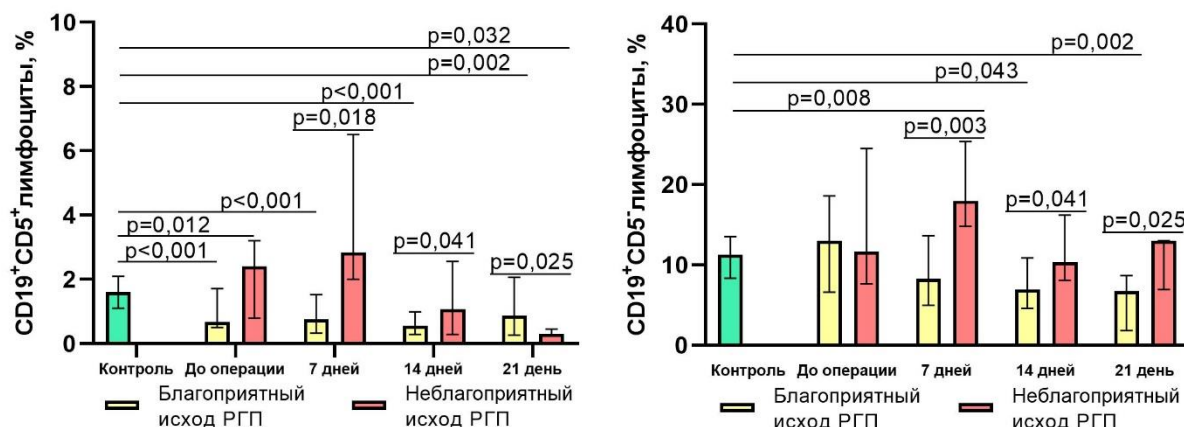


Рисунок 12 – Содержание В1- и В2-лимфоцитов в периферической крови у РГП в динамике лечения.

Динамика количества В2-лимфоцитов у больных с благоприятным исходом РГП в до- и послеоперационном периоде полностью повторяет изменение количества общих В-клеток. Данное совпадение определяется тем, что В2-клетки составляют основную фракцию В-лимфоцитов крови [Chen L., 2016]. В частности, у пациентов с благоприятным исходом РГП доля В2-клеток в составе общих В-лимфоцитов находится

в диапазоне от 96,3% (в дооперационном периоде) до 80,4% (на 21-е сутки послеоперационного лечения).

При исследовании концентрации общих иммуноглобулинов наблюдается снижение концентрации IgA у пациентов обеих групп (рис. 13).

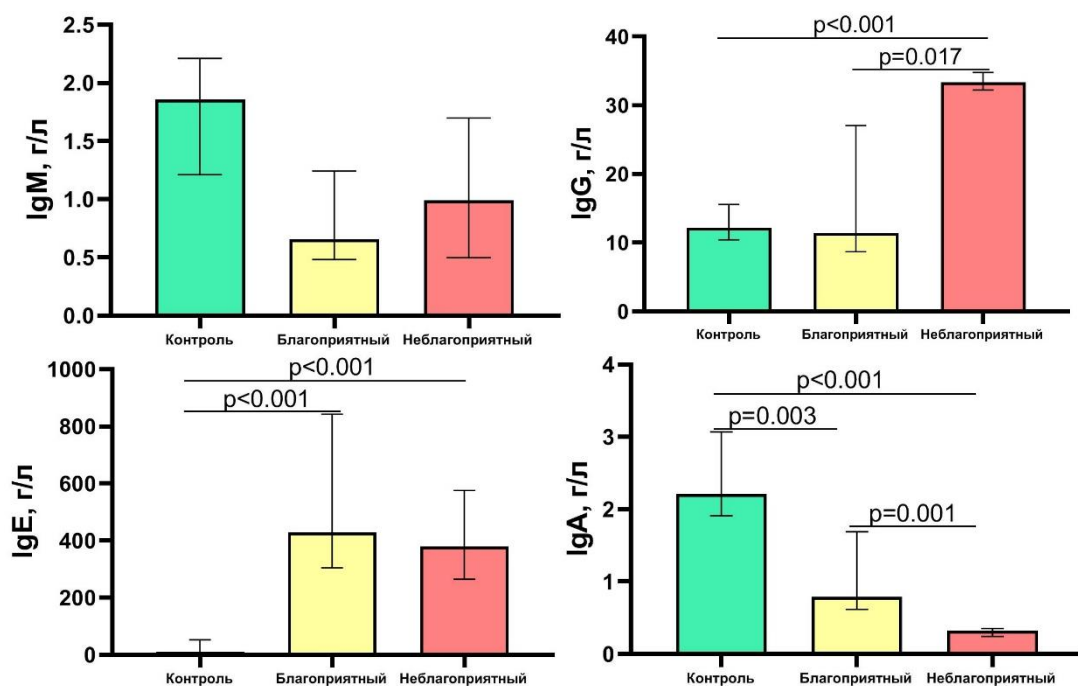


Рисунок 13 – Содержание Ig A, G, E в плазме крови у РГП в динамике лечения.

У пациентов с неблагоприятным исходом РГП отмечено повышение концентрации IgG относительно контрольной группы и пациентов с благоприятным исходом РГП. В обеих группах наблюдается повышение концентрации IgE относительно контрольных значений. Полученные данные указывают на снижение эффективности барьерного иммунитета и усиление аутоиммунных процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволяют заключить, что фагоциты крови, представленные нейтрофильными гранулоцитами, а также различными субпопуляциями моноцитов, в динамике лечения РГП способны не только формировать эффективные механизмы, направленные на разрешение воспалительного процесса, но и оказывать избыточное провоспалительное воздействие, вызывая утяжеление характера течения заболевания и, в ряде случаев, неблагоприятный исход РГП. При этом наблюдалось нарушение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с неблагоприятным течением РГП, связанное, в том числе, с изменениями гуморального иммунного ответа, приводящие к снижению способности клеток реализовывать процессы фагоцитоза. У больных РГП в периферической крови понижается уровень моноцитов, экспрессирующих HLA-DR, а также изменяется соотношение основных популяций моноцитов, что характеризует повышение роли неклассической фракции в

патогенезе РГП. Выявлены особенности фенотипа NK- и NKT-клеток в крови при неблагоприятном исходе заболевания, отражающие нарушения в механизмах созревания и миграции данных клеток, что выражается снижением содержания зрелых NK- и NKT-клеток, а также понижением числа $CD11b^+$ и $CD57^+$ NK- и NKT-клеток, при повышении уровня экспрессии на этих клетках рецепторов CD28 и CD57.

Важной особенностью фенотипа Т-лимфоцитов стало повышение числа $CD62L^+$ Т-хелперов и активированных Т-регуляторных клеток у пациентов с благоприятным исходом РГП в течение 2-х недель послеоперационного периода. При благоприятном исходе РГП в середине лечения наблюдается повышение количества активированных цитотоксических Т-лимфоцитов, которое при неблагоприятном исходе наблюдается только к концу наблюдения. По-видимому, снижение числа Т-хелперов и активация цитотоксических Т-клеток к 14-м суткам наблюдения являются факторами, характеризующими снижение интенсивности воспалительных процессов при РГП и, тем самым, повышающими вероятность благоприятного исхода заболевания. При этом Т-лимфоциты больных РГП значительно интенсивнее по сравнению с клетками здоровых людей экспрессируют рецепторы CD28 и CD62L.

У больных с благоприятным исходом РГП в течение послеоперационного периода наблюдается снижение количества большинства субпопуляций В-лимфоцитов, тогда как у пациентов с неблагоприятным исходом заболевания в дооперационном периоде повышено число наивных В-лимфоцитов и В1-клеток. В послеоперационном периоде уровни содержания различных фракций В-клеток у данных пациентов практически не меняются. Предполагается, что установленные особенности в содержании В-лимфоцитов в крови в зависимости от исхода заболевания определяются тем, что у больных с неблагоприятным исходом РГП снижен уровень миграции клеток в процессе развития иммунного ответа.

В дооперационном периоде у пациентов с благоприятным течением РГП выявляется значительное повышение концентрации IL-4 в сыворотке крови, чего не наблюдалось в группе с неблагоприятным течением РГП. Можно предположить, что у пациентов с неблагоприятным течением РГП переход в сторону Th2-типа иммунной реакции значительно менее выражен, что может способствовать развитию неблагоприятного исхода заболевания. Независимо от течения заболевания отмечалось значительное повышение концентрации IL-8 и IL-10 в сыворотке крови. Однако у пациентов с неблагоприятным течением РГП повышение носило более выраженный характер. Таким образом, одновременный рост концентрации данных цитокинов в плазме крови пациентов с РГП может указывать на развитие дисрегуляции синтеза цитокинов и выраженной гиперпродукции отдельных компонентов гуморальной регуляции, что способствует развитию эффекта «цитокинового шторма».

На основании исследования клеточного и гуморального звеньев иммунной системы при развитии РГП с различным исходом разработан способ прогнозирования исхода распространенно гнойного перитонита на основании оценки количества В-лимфоцитов и Т-регуляторных клеток. При сопоставлении значений, полученных в ходе исследования и данных последующего наблюдения за клиническим состоянием больных РГП, был рассчитан коэффициент Т-клеточной регуляции (КТКР), представляющий собой соотношение процентного содержания В1-лимфоцитов к процентному содержанию активированных Т-регуляторных клеток, то есть $КТКР = \frac{\text{В1-лимфоциты}}{\text{активированные Т-регуляторные клетки}}$. Было доказано, что значение КТКР равное или выше 4,23 свидетельствует о снижении Т-регуляторной активности иммуновоспалительного процесса и повышении количества В1-лимфоцитов. Таким образом, при значении КТКР ниже 4,23 прогнозируют благоприятный исход РГП, при значении КТКР равном и выше 4,23 прогнозируют неблагоприятный исход заболевания.

ВЫВОДЫ

1. Фагоцитарный индекс нейтрофилов повышен у всех больных РГП, тогда как фагоцитарное число, повышенное у пациентов с благоприятным исходом заболевания, у больных при неблагоприятном исходе снижено до операции и в течение всего периода послеоперационного лечения, что свидетельствует об активном вовлечении нейтрофилов в иммунопатогенез РГП, но при снижении поглотительной способности клеток у пациентов при неблагоприятном исходе заболевания.
2. В крови у больных РГП понижается фагоцитарная активность моноцитов на фоне снижения количества $CD14^{++}CD16^{-}$ и $HLA-DR^{+}$ -моноцитов. Содержание $CD14^{+}CD16^{+}$ -моноцитов у больных с благоприятным исходом заболевания повышено в течение всего послеоперационного лечения, тогда как при неблагоприятном исходе уровень данной субпопуляции моноцитов повышается только на 3-й недели лечения, что характеризует значимость влияния неклассических моноцитов на характер иммуновоспалительного процесса и, соответственно, исход РГП.
3. Количество зрелых $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{+}$ - и $CD3^{+}CD16^{+}CD56^{+}$ -клеток, пониженное у больных с благоприятным исходом РГП, восстанавливалось до нормы после операции за счет увеличения числа $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{dim-}$ и $CD3^{-}CD16^{-}CD56^{hi}$ -клеток, а также $CD3^{+}CD16^{-}CD56^{+}$ и $CD3^{+}CD8^{+}CD16^{+}CD56^{+}$ -клеток, соответственно, что свидетельствует о влиянии послеоперационного лечения на субпопуляции NK- и NKT-клеток и отсутствии этого влияния на сниженное содержание зрелых NK- и NKT-клеток у больных с неблагоприятным исходом заболевания.
4. У пациентов с благоприятным течением РГП повышено количество $CD3^{+}CD4^{+}CD62L^{+}$ и $CD3^{+}CD4^{+}CD127^{Low}CD25^{High}CD62L^{+}$ -клеток, а также концентрация IL-4 в крови относительно контрольных значений и показателей пациентов с

неблагоприятным исходом заболевания, что характеризует превалирование Th2-типа иммунного ответа и повышение роли регуляторных Т-клеток в патогенезе РГП.

5. При неблагоприятном исходе РГП в крови у больных повышается количество CD19⁺CD27⁻, CD19⁺CD5⁺ и CD19⁺CD5⁻-лимфоцитов, а также В-клеток, экспрессирующих CD23, по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы и пациентов с благоприятным исходом заболевания, что указывает на значимость роли В-лимфоцитов в реализации иммуновоспалительной реакции при РГП и снижении уровня миграции В-клеток в ткань при неблагоприятном исходе заболевания.

6. Разработан способ прогнозирования исхода РГП на основании расчёта коэффициента Т-клеточной регуляции (КТКР), представляющего собой соотношение процентного содержания В1-лимфоцитов к процентному содержанию активированных Т-регуляторных клеток, определяющий благоприятный исход при повышении Т-регуляторной активности и снижении количества В1-клеток у больных. Повышение КТКР (выше 4,23) свидетельствует о неблагоприятном прогнозе за счет низкой Т-регуляторной активности и повышенного уровня В1-лимфоцитов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Оригинальные статьи

1. Борисов А.Г., Савченко А.А., Черданцев Д.В., Здзитовецкий Д.Э., Первова О.В., Кудрявцев И.В., **Беленюк В.Д.**, Шапкина В.А. Типы иммунного реагирования при распространенном гнойном перитоните // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова.-2016.- № 9.-С. 28-34.
2. Черданцев Д.В., Первова О.В., Шапкина В.А., Дятлов В.Ю., Трофимович Ю.Г., Борисов А.Г., **Беленюк В.Д.**, Гвоздев И.И., Амельченко А.А., Анохина А.Р. Современный подход к лечению пациентов с распространенным гнойным перитонитом // Сибирское медицинское обозрение. – 2016. – №6(102). – С.24-35.
3. Савченко А.А., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., **Беленюк В.Д.** Регуляторное влияние моноцитов крови на популяционный состав гранулоцитарных лейкоцитов и состояние их респираторного взрыва при распространенном гнойном перитоните // Инфекция и иммунитет.-2018.-Т. 8, № 2.-С. 201-210.
4. Савченко А.А., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., **Беленюк В.Д.** Особенности фенотипа Т-лимфоцитов в динамике послеоперационного периода у больных перитонитом в зависимости от исхода заболевания // Инфекция и иммунитет. - 2019. - Т.9. - №1. - С.115-127. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-115-127>

5. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., **Беленюк В.Д.** Фенотип НК-клеток в динамике послеоперационного периода у больных перитонитом в зависимости от исхода заболевания // Инфекция и иммунитет.-2019-Т. 9, № 3-4.-С. 539-548. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-3-4-539-548>
6. **Беленюк В.Д.**, Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В. Зависимость фенотипа Т-лимфоцитов крови от исхода распространенного гнойного перитонита // Российский иммунологический журнал.-2019.-Т. 13 (22), № 4.-С. 1385-1392. DOI: 10.31857/S102872210007041-0
7. **Беленюк В.Д.**, Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В. Особенности фенотипа В-лимфоцитов крови в зависимости от исхода распространенного гнойного перитонита // Инфекция и иммунитет. – 2021. – Т. 11. – № 3. – С. 454-462. DOI 10.15789/2220-7619-SVC-1397.

Статьи в сборниках конференций

1. **Беленюк В.Д.**, Мошев А.И., Гвоздев И.И., Савченко А.А., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Шапкина В.А. Исследование фенотипического состава лимфоцитов больных распространенным гнойным перитонитом различной степени тяжести // Актуальные вопросы охраны здоровья населения регионов Сибири: материалы 14-й Региональной научно-практической конференции молодых ученых, г. Красноярск, 9-10 июня 2016.- Красноярск, 2016. – С. 5-7.
2. **Беленюк В.Д.**, Мошев А.В., Кашникова Е.С., Савченко А.А., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Шапкина В.А. Исследование фенотипического состава лимфоцитов у больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от степени тяжести // Мат. II Всероссийскую школы-конференции молодых ученых «Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии», 2-4 июля 2015 г., г. Пермь.-Российский иммунологический журнал.-2015.-Т. 9(18), № 2(1).-С. 193-195.
3. **Беленюк В.Д.**, Мошев А.В. Фенотип Т-лимфоцитов при распространенном гнойном перитоните в зависимости от исхода // Мат. XVII научно-практической конференции молодых ученых «АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ РЕГИОНОВ СИБИРИ», 6-7 июня 2019 г., Красноярск.-SIBERIAN JOURNAL OF LIFE SCIENCES AND AGRICULTURE.-2019.-Т.11, №5, С. 26-31.
4. **Беленюк В.Д.**, Гвоздев И.И., Мошев А.В. Исследование фенотипических параметров Т-лимфоцитов периферической крови больных распространенным гнойным перитонитом // Мат. XIX Всероссийского симпозиума с международным участием «СЛОЖНЫЕ СИСТЕМЫ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ», 20-23 августа 2018 г., Красноярск.- сборник трудов конференции, 2018, С. 36-38.

5. **Беленюк В.Д.,** Гвоздев И.И., Мошев А.В. Исследование фенотипа В-лимфоцитов периферической крови как одного из критериев прогноза исхода распространённого гнойного перитонита // Мат. XXI межрегиональной научно-практической конференции, «АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНЫ» 27 апреля 2018 г., Абакан.-Вестник хакасского государственного университета им. Н.Ф. Катанова.-2018.- №24, С. 115-119.

6. **Беленюк В.Д.,** Гвоздев И.И., Мошев А.И., Шапкина В.А., Толмачева Т.В. Фенотипический состав Т- и В-лимфоцитов в периферической крови больных распространенным гнойным перитонитом различной степени тяжести // Мат. краевой научно-практической конференции «АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ». 27 апреля 2017 г., Красноярск.- сборник трудов конференции, 2017. С. 5-9.

Тезисы материалов конференций

1. **Беленюк В.Д.,** Мошев А.В., Савченко А.А., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Шапкина В.А. Фенотипический состав Т- и В-лимфоцитов больных распространенным гнойным перитонитом // Сложные системы в экстремальных условиях : тез. докл. XVIII Всерос. симпозиума с междунар. участием, Красноярск, 8-14 августа 2016.– Красноярск: Сиб. федер. ун-т, 2016.– С. 15.

2. Борисов А.Г., Савченко А.А., Черданцев Д.В., Здзитовецкий Д.Э., Первова О.В., **Беленюк В.Д.,** Кудрявцев И.В. Типы иммунного реагирования у больных с распространенным гнойным перитонитом // Вопросы сохранения и развития здоровья населения Севера и Сибири. Материалы Итоговой научно-практической конференции, посвященной 40-летию НИИ медицинских проблем Севера. Вып.14.–Красноярск, 2016. –С. 54.

3. **Беленюк В.Д.,** Гвоздев И.И., Мошев А.В. Исследование фенотипического состава лимфоцитов периферической крови больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от исхода // Тезисы докладов VII Молодежной школы-конференции «НАУКА, ПРОМЫШЛЕННОСТЬ, ЭКОЛОГИЯ», 24 июля-07 августа 2017 г., пос. Жемчужный, Республика Хакасия.-2017. С. 10.

4. **Беленюк В.Д.,** Мошев А.В., Савченко А.А., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Шапкина В.А. Фенотипический состав Т- и В-лимфоцитов больных распространенным гнойным перитонитом // Тезисы докладов XVIII Всероссийского симпозиума с международным участием «СЛОЖНЫЕ СИСТЕМЫ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ». 08-14 августа 2016 г. Красноярск.-2016. С.15.

5. **Беленюк В.Д.,** Савченко А.А., Борисов А.Г. Особенности фенотипического состава клеток врожденной и адаптивной иммунной системы у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода // Экологический мониторинг: методы и подходы: Материалы Международной

сателлитной конференции «Экологический мониторинг: методы и подходы» и XX Международного симпозиума «Сложные системы в экстремальных условиях», Красноярск, 20–24 сентября 2021 года. – Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2021. – С. 25-28.

Патенты

Савченко А.А., Каспаров Э.В., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д. Цитометрический способ прогнозирования исхода распространенного гнойного перитонита //Патент № 2691742 РФ. МПК7 G01N 33/48 (2006.01). Патентообладатель: ФГБУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН»».-Заявлено 23.05.2018.- Заявка № 2018119060.-Опубл. 18.06.2019 Бюл. № 17.- 8 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПК - антигенпрезентирующая клетка

АТФ - аденозинтрифосфат

ЖКТ - желудочно кишечный тракт

МИП - Мангеймский индекс перитонита

ПОН - поли органная недостаточность

РГП - Распространенный гнойный перитонит

ССВР - Синдром системной воспалительной реакции

СЭИ - Синдром эндогенной интоксикации

TCR- антигенраспознающий рецептор Т-лимфоцитов

BCR - антигенраспознающий рецептор В-лимфоцитов

В1 - барьерные В-лимфоциты

В2 - основная популяция В-лимфоцитов

CDR - участок, определяющий комплементарность

CD - кластер дифференцировки

HLA - лейкоцитарный антиген человека (МНС)

IFN - интерферон

IL - интерлейкин

LFA - функциональный антиген лимфоцитов

МНС - главный комплекс гистосовместимости

МНС-I - молекула главного комплекса гистосовместимости I класса

МНС-II - молекула главного комплекса гистосовместимости II класса

TNF - фактор некроза опухоли