

## ИССЛЕДОВАНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ДИНАМИКЕ ЛЕЧЕНИЯ ПАНКРЕОНЕКРОЗА

Гвоздев И.И.,

Научный руководитель д-р мед. наук Савченко А.А.  
*НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН*

Несмотря на интенсивную разработку вопросов диагностики и лечения панкреонекроза, летальность заболевания остаётся высокой, достигая 30-50% и более. Значительное число больных с панкреонекрозом, высокая летальность и количество осложнений диктуют необходимость выработки единой тактики лечения. Постоянно увеличивается количество тяжелых форм панкреонекроза в сочетании с обширными гнойно-некротическими поражениями поджелудочной железы и брюшинной клетчатки. Именно тяжелые гнойно-некротические осложнения деструктивного панкреатита обуславливают львиную долю летальных исходов. Нейтрофильные гранулоциты — уникальная мультипотентная популяция клеток иммунной системы относящаяся к врожденному иммунитету. Зрелые сегментоядерные нейтрофилы в норме являются основным видом лейкоцитов, циркулирующих в крови человека, составляя от 47% до 72% общего количества лейкоцитов крови. Приобретенные дисфункции нейтрофильных гранулоцитов имеют критическое значение в патогенезе различных осложнений, влияют на течение и исход, в первую очередь, генерализованных гнойно-септических процессов. Нейтрофильные гранулоциты обладают высокой реактивностью, они способны быстро функционально перестраиваться в ответ на воздействие агентов различной природы. Кроме того, после активации нейтрофильные гранулоциты сами становятся мощными эффекторами каскадных реакций, определяя развитие воспаления и проявление цитотоксической активности данной клеточной популяции. Активация нейтрофилов сопровождается реакцией «респираторного взрыва» с участием НАДФН-оксидазы и образованием активных форм кислорода. Интенсивность синтеза активных форм кислорода в нейтрофилах можно оценить методом люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции. С этих позиций представляется перспективной оценка хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов при панкреонекрозе.

**Целью исследования** явилась оценка функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в динамике лечения панкреонекроза. Исходя из цели были сформулированы следующие задачи: 1)определить хемилюминесцентную активность нейтрофильных гранулоцитов контрольной группы и больных панкреонекрозом в динамике лечения,2)оценить различия уровней хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов контрольной и опытной групп,3)оценить изменения уровня активности нейтрофильныхгранулоцитов в динамике лечения.

**Материалы и методы.** Обследовано 19 больных панкреонекрозом в возрасте от 44 до 66 лет в динамике лечения: в периоды 1-2 дня, 4–7 дней, 10–14 и 20–24 дней после поступления в стационар. Группу контроля составили 19 здоровых людей аналогичного возраста. Из венозной крови обследуемых выделяли нейтрофильные гранулоциты. Для этого 5 мл крови с гепарином инкубировали в течение 30 мин при 37оС. Полученный лейкоцитарный супернатант дважды отмывали в растворе Хенкса без фенолового красного по 10 мин при 400 g. Супернатант слили, оставшиеся нейтрофильные гранулоциты развели в 1 мл Хенкса и получили взвесь. Подсчитали

количество нейтрофильных гранулоцитов в камере Горяева. Реакционная смесь для хемилюминесцентной реакции состояла из 20 мкл донорской сыворотки АВ(IV)Rh(-), 50 мкл люминола или люцигенина (“Sigma”, США) в концентрации 10-5 М, 40 мкл опсонизированного зимозана (в случае определения индуцированной хемилюминесценции), 200 мкл взвеси нейтрофилов (2 млн/мл) и 240 мкл раствора Хенкса (“ПанЭко”, Россия) для определения спонтанной хемилюминесценции или 200 мкл раствора Хенкса – для индуцированной. Исследование люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции проводили в течение 90 минут на хемилюминесцентном анализаторе CL3606М (СКТБ “Наука”, Красноярск). Результаты хемилюминесцентного анализа характеризовали по следующим параметрам: время выхода на максимум интенсивности хемилюминесценции, значение максимума интенсивности хемилюминесценции, площадь под кривой хемилюминесценции. Достоверность различий между показателями контрольной и опытной групп оценивали по непараметрическому критерию Mann-Whitney. Достоверность различий между показателями в динамике лечения оценивали по критерию Wilcoxon.

**Результаты и обсуждение.** При сравнительной оценке параметров люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов у больных панкреонекрозом наблюдается снижение времени выхода на максимум зимозан-индуцированной хемилюминесценции к периоду в 20-24 день ( $p < 0,05$ ). При исследовании люминол-зависимой хемилюминесценции обнаружено увеличение максимального значения интенсивности и площади под кривой спонтанной хемилюминесценции в период 1-2 дня ( $p < 0,05$ ). В периоды 4-7 дней, 10-14 дней и 20-24 дней также наблюдается увеличение максимума интенсивности и площади под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции ( $p < 0,05$ ).

При исследовании люцигенин-зависимой хемилюминесценции увеличения максимума интенсивности хемилюминесценции и площади под кривой хемилюминесценции не наблюдается. Известно, что люцигенин окисляется и люминесцирует только под влиянием супероксид-радикала, который определяется как первичная активная форма кислорода и синтезируется в системе НАДФН-оксидазы. Следовательно, исследование люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов позволяет охарактеризовать состояние активности НАДФН-оксидазы в нейтрофильных гранулоцитах. Люминол способен вступать в хемилюминесцентную реакцию как с первичными, так и с вторичными активными формами кислорода, в образовании которых принимают участие такие ферменты, как супероксиддисмутаза, каталаза, миелопероксидаза и др. Таким образом, в нейтрофилах больных панкреонекрозом наблюдается усиление продукции вторичных активных форм кислорода как при спонтанной, так и при зимозан-индуцированной хемилюминесцентной реакции. В хемилюминесцентном процессе, активатором которого является люцигенин, характеризующий образование супероксидного анион-радикала наблюдается увеличение скорости образования первичных активных форм кислорода при дополнительной антигенной стимуляции клеток (зимозан-индуцированная хемилюминесценция) на 3 неделе лечения. Ускорения образования вторичных активных форм кислорода не происходит. В динамике лечения статистически достоверных изменений установлено не было, следовательно, снижения хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов до контрольного уровня также не происходит.