

# ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА И АКТИВНОСТИ NAD(P)-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫМ ГНОЙНЫМ ПЕРИТОНИТОМ В ПРОГНОЗЕ РАЗВИТИЯ СЕПСИСА

А.А. Савченко<sup>1,2</sup>, А.Г. Борисов<sup>1,3</sup>, Д.В. Черданцев<sup>3</sup>, О.В. Первова<sup>3</sup>,  
И.В. Кудрявцев<sup>4,5</sup>, И.И. Гвоздев<sup>1</sup>, А.В. Мошев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия

<sup>4</sup> ФГБНУ НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Целью исследования явилось изучение особенностей фенотипа и уровней активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов крови в прогнозе развития абдоминального сепсиса у больных распространенным гнойным перитонитом (РГП). Обследовано 50 больных РГП внебольничного и госпитального происхождения в дооперационном периоде. С 5 по 10 сут послеоперационного периода у 35 больных (70%) развился абдоминальный сепсис, у 15 больных (30%) осложнения отсутствовали. В качестве контроля обследовано 67 здоровых людей. Исследование фенотипа нейтрофильных гранулоцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови. По средней интенсивности флуоресценции оценивались уровни экспрессии поверхностных рецепторов. Исследование активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови проведено с помощью биOLUMИнесцентного анализа. Установлено, что воспалительная реакция у больных РГП характеризуется нейтрофилезом и изменением фенотипа нейтрофилов в крови. Маркерами последующего развития сепсиса при РГП являются менее выраженное (по сравнению с показателями больных без осложнений) увеличение количества нейтрофилов, снижение содержания HLA-DR<sup>+</sup>-клеток на фоне высокого уровня нейтрофилов, экспрессирующих высокоаффинный рецептор для IgG. У пациентов без последующего развития осложнений повышается количество нейтрофилов с экспрессией рецептора CD23. Метаболизм нейтрофилов у больных РГП характеризуется снижением интенсивности пластических процессов за счет низкой активности

---

**Адрес для переписки:**

Кудрявцев Игорь Владимирович  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12,  
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.  
Тел.: 8 (812) 234-29-29.  
E-mail: igorek1981@yandex.ru

**Contacts:**

Igor V. Kudryavtsev  
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Akademika Pavlova str., 12,  
Scientific Research Institute of Experimental Medicine.  
Phone: +7 (812) 234-29-29.  
E-mail: igorek1981@yandex.ru

**Библиографическое описание:**

Савченко А.А., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В. Особенности фенотипа и активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов у больных распространенным гнойным перитонитом в прогнозе развития сепсиса // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 369–376. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-369-376

**Citation:**

Savchenko A.A., Borisov A.G., Cherdancev D.V., Pervova O.V., Kudryavtsev I.V., Gvozdev I.I., Moshev A.V. Features of the phenotype and NAD(P)-dependent dehydrogenases activity in neutrophil by patients with widespread purulent peritonitis in prognosis for sepsis development // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 369–376. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-369-376

глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и дисбалансом активности ферментов митохондриального компартмента. Особенностью метаболизма нейтрофилов у больных РГП без последующего развития сепсиса является высокая активность анаэробной реакции лактатдегидрогеназы и снижение активности NADP-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы. У больных РГП с последующим развитием сепсиса обнаружен высокий уровень NAD-зависимого оттока субстратов с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена через глутаматдегидрогеназу, что может повлиять на активность аэробного дыхания нейтрофилов. Установленные различия фенотипа и активности ферментов в нейтрофилах крови у больных РГП в зависимости от последующего развития сепсиса определяют возможность создания метода прогноза развития осложнений и разработки иммуноактивной терапии в послеоперационном периоде РГП.

**Ключевые слова:** перитонит, сепсис, нейтрофилы, функциональная активность, фенотип, метаболизм, дегидрогеназы.

## FEATURES OF THE PHENOTYPE AND NAD(P)-DEPENDENT DEHYDROGENASES ACTIVITY IN NEUTROPHIL BY PATIENTS WITH WIDESPREAD PURULENT PERITONITIS IN PROGNOSIS FOR SEPSIS DEVELOPMENT

Savchenko A.A.<sup>a,b</sup>, Borisov A.G.<sup>a,c</sup>, Cherdancev D.V.<sup>c</sup>, Pervova O.V.<sup>c</sup>, Kudryavtsev I.V.<sup>d,e</sup>, Gvozdev I.I.<sup>a</sup>, Moshev A.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>c</sup> Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>d</sup> Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>e</sup> Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the study was to examine the features of phenotype and the levels of NAD(P)-dependent dehydrogenases activity of blood neutrophils in the prognosis of abdominal sepsis development in patients with widespread purulent peritonitis (WPP). 50 patients with WPP of community and hospital origin in the pre-operative period were examined. From the 5th to the 10th day of the postoperative period 35 patients (70%) had developed abdominal sepsis, 15 patients (30%) had absence of complications. As controls 67 respect healthy people were examined. The research blood neutrophils phenotype was performed by flow cytometry using a direct immunofluorescence whole peripheral blood. The levels of surface receptor expression was assessed by the mean fluorescence intensity. The NAD(P)-dependent dehydrogenases activity in the blood neutrophils studied using bioluminescence method. It was established that the inflammatory reaction in patients with WPP is characterized by neutrophilia and changes in the phenotype of blood neutrophils. The markers of the subsequent development of sepsis in WPP are less pronounced (in comparison with the indices of uncomplicated patients), an increase in the number of neutrophils, a decrease in the HLA-DR<sup>+</sup>-cell count against the background of a high level of neutrophils expressing a high affinity receptor for IgG. The patients without subsequent complications had the number of neutrophils with CD23 receptor expression is increased. Metabolism of neutrophils in patients with WPP is characterized by a decrease in the intensity of plastic processes due to low activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and an imbalance in the activity of the enzymes of the mitochondrial compartment. A feature of the neutrophil metabolism in patients with WPP without subsequent development of sepsis is a high activity of anaerobic lactate dehydrogenase reaction and a decrease in the activity of NADP-dependent decarboxylating malate dehydrogenase. The patients with WPP with subsequent development of sepsis had a high level of NAD-dependent outflow of substrates from the tricarboxylic acid cycle on the amino acid exchange reaction via glutamate dehydrogenase which can affect the activity of aerobic respiration of blood neutrophils. The established differences in the phenotype and activity of enzymes in the blood neutrophils in patients with WPP depending on the subsequent development of sepsis determine the possibility of creating a method for predicting the development of complications and developing immunoactive therapy in the postoperative period of WPP.

**Key words:** peritonitis, sepsis, neutrophils, functional activity, phenotype, metabolism, dehydrogenases.

## Введение

Несмотря на достижения в медицине, летальность при распространенном гнойном перитоните (РГП), являющаяся главным критерием оценки эффективности применяемых способов лечения, удерживается на уровне 20–30%, а в случае генерализации инфекции и развития полиорганной недостаточности

и сепсиса достигает 75,8–100% [10, 14]. Само течение РГП, а также характер и особенности развития гнойных инфекционных осложнений определяются не только тяжестью основного патологического процесса, адекватностью оперативного вмешательства и медикаментозного лечения в послеоперационном периоде, но и зависят от происходящих изменений в системе иммунитета [8].

Нейтрофильные гранулоциты являются высокореактивными клетками врожденного иммунитета. Они быстро мобилизуются в очаг воспаления, их функциональная активность, которая во многом зависит от уровня экспрессии различных рецепторов, определяет эффективность противомикробной защиты организма [7]. Учитывая, что все регуляторные и антигенные молекулы реализуют свое воздействие на клетку через рецепторы, влияя на экспрессию генов, модулируя энергетические и пластические реакции, функциональные проявления нейтрофилов не могут не иметь метаболической основы.

Таким образом, целью исследования явилось изучение особенностей фенотипа и уровней активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов крови в прогнозе развития абдоминального сепсиса у больных РГП.

## Материалы и методы

Обследовано 50 больных РГП (22 мужчины и 28 женщин) внебольничного и госпитального происхождения в дооперационном периоде, проходивших лечение в отделении гнойной хирургии и отделении реанимации и интенсивной терапии КГБУЗ «КМКБСМП имени Н.С. Карповича» г. Красноярск. Средний возраст больных составил  $54,2 \pm 19,2$  года. Исходную степень тяжести больных определяли по шкале SAPSII. Тяжесть РГП исходно определяли по Мангеймскому индексу перитонита и индексу брюшной полости. Наличие и степень выраженности полиорганной недостаточности исходно и в динамике определяли по шкале SOFA [15]. При оценке тяжести синдрома системной воспалительной реакции мы придерживались критериев ACCP/SCCM [6]. Забор крови для проведения исследования осуществляли в 1-е сут госпитализации. С 5 по 10 сут послеоперационного периода у 35 больных (70%) развился абдоминальный сепсис, у 15 больных (30%) осложнения отсутствовали. В качестве контроля обследовано 67 здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипа нейтрофильных гранулоцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с применением моноклональных антител (Beckman Coulter, США), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7): CD11b, CD62L, CD16, CD23, CD64 и HLA-DR. По средней интенсивности флуоресценции (MFI — Mean Fluorescence Intensity) оценивались уровни экспрессии по-

верхностных рецепторов. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [9]. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, США). В каждой пробе анализировали не менее 50 000 нейтрофилов.

Нейтрофильные гранулоциты выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-урографина. Исследование активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови проведено с помощью биолюминесцентного анализа [2]. Метаболизм нейтрофилов оценивали по активности следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ), NADP-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы (NADP-МДГ), NAD- и NADH-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и NADH-ЛДГ), NAD- и NADH-зависимой реакции малатдегидрогеназы (МДГ и NADH-МДГ), NADP- и NADPH-зависимой глутаматдегидрогеназы (NADP-ГДГ и NADPH-ГДГ), NAD- и NADH-зависимой глутаматдегидрогеназы (NAD-ГДГ и NADH-ГДГ), NAD- и NADP-зависимых изоцитратдегидрогеназ (NAD-ИЦДГ и NADP-ИЦДГ соответственно) и глутатионредуктазы (ГР). Активность NAD(P)-зависимых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на  $10^4$  клеток, где  $1 \text{ E} = 1 \text{ мкмоль/мин}$  [3]. Исследование проводили на ферментативном препарате NAD(P):FMНоксидоредуктаз-люцифераза из *Photobacterium leiognathi* (получен в Институте биофизики СО РАН, г. Красноярск).

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей ( $Q_{0,25}$  и  $Q_{0,75}$ ). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

## Результаты и обсуждение

Независимо от развития абдоминального сепсиса у больных РГП относительно контрольных значений существенно повышается количество нейтрофилов, абсолютное содержание CD62L<sup>+</sup>-клеток, а также процентный и абсолютный уровень CD64<sup>+</sup>-нейтрофилов в крови (табл. 1). Однако уровень нейтрофилов у больных с последующим развитием сепсиса ниже, чем в группе пациентов без развития осложнений. Количество CD64<sup>+</sup>-клеток при последующем сепсисе выше, чем у пациентов без последующего развития осложнений. Только у больных РГП без осложнений повышен абсолютный уровень

CD23<sup>+</sup>- и HLA-DR<sup>+</sup>-нейтрофилов. У пациентов с последующим развитием сепсиса в крови понижено процентное содержание HLA-DR<sup>+</sup>-клеток, как относительно контрольных значений, так и уровня выявленного у больных без последующего развития осложнений.

Средний уровень флуоресценции HLA-DR-рецептора на нейтрофилах крови у больных РГП без последующего развития осложнений ниже, чем у лиц контрольной группы и пациентов с последующим развитием сепсиса (см. табл. 1). Средний уровень флуоресценции CD64-маркера на нейтрофилах при РГП выше контрольных значений независимо от наличия/отсутствия последующих осложнений.

**Таблица 1. Фенотип нейтрофильных гранулоцитов у больных РГП в прогнозе развития сепсиса (Me, Q<sub>0,25</sub>–Q<sub>0,75</sub>)**

Table 1. The phenotype of neutrophilic granulocytes in patients with WPP in the forecast of sepsis development (Median values, Q<sub>0,25</sub>–Q<sub>0,75</sub>)

Показатели Parameters	Контроль Control n = 67		Без последующего развития сепсиса Without the subsequent development of sepsis n = 15		С последующим развитием сепсиса With the subsequent development of sepsis n = 35	
	Me	Q <sub>0,25</sub> –Q <sub>0,75</sub>	Me	Q <sub>0,25</sub> –Q <sub>0,75</sub>	Me	Q <sub>0,25</sub> –Q <sub>0,75</sub>
Нейтрофилы, 10 <sup>9</sup> /л Neutrophils, 10 <sup>9</sup> /л	3,15	2,55–3,86	9,59	5,32–10,91	6,91	3,89–9,12
			p <sub>1</sub> < 0,001		p <sub>1</sub> < 0,001 p <sub>2</sub> = 0,046	
CD62L <sup>+</sup> , %	5,5	2,6–7,5	5,4	3,8–8,2	6,3	4,2–7,7
CD62L <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /L	0,18	0,06–0,26	0,48	0,30–0,78	0,46	0,27–0,63
			p <sub>1</sub> = 0,003		p <sub>1</sub> < 0,001	
CD23 <sup>+</sup> , %	6,3	4,9–7,7	6,0	5,4–8,9	5,0	1,2–7,5
CD23 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /L	0,18	0,13–0,22	0,47	0,28–0,51	0,25	0,08–0,43
			p <sub>1</sub> = 0,005			
HLA-DR <sup>+</sup> , %	98,2	94,2–99,2	97,7	96,4–99,0	69,7	37,8–94,3
					p <sub>1</sub> < 0,001 p <sub>2</sub> = 0,012	
HLA-DR <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /L	2,69	2,01–3,40	7,24	4,95–9,39	3,62	1,47–6,19
			p <sub>1</sub> < 0,001		p <sub>2</sub> = 0,038	
CD64 <sup>+</sup> , %	15,8	5,5–42,1	54,5	20,7–72,5	84,9	30,7–99,9
			p <sub>1</sub> = 0,009		p <sub>1</sub> < 0,001 p <sub>2</sub> = 0,034	
CD64 <sup>+</sup> , 10 <sup>9</sup> /L	0,50	0,14–3,03	1,25	0,62–4,12	2,19	0,81–8,43
			p <sub>1</sub> = 0,012		p <sub>1</sub> < 0,001 p <sub>2</sub> = 0,040	
MFI HLA-DR <sup>+</sup> , o.e./relative units	1,66	1,52–1,85	1,32	1,21–1,39	1,62	1,33–1,95
			p <sub>1</sub> = 0,008		p <sub>2</sub> = 0,044	
MFI CD64 <sup>+</sup> , o.e./relative units	2,24	1,62–3,53	10,05	5,89–21,56	12,95	6,30–31,95
			p <sub>1</sub> < 0,001		p <sub>1</sub> < 0,001	

**Примечание:** p<sub>1</sub> — статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p<sub>2</sub> — статистически значимые различия с показателями больных РГП, у которых не будет сепсиса.

Note: p<sub>1</sub> — statistically significant differences with the parameters of the control group; p<sub>2</sub> — statistically significant differences with the rates of patients with WPP who will not have sepsis.

При исследовании активности NAD- и NADP-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови обнаружено, что независимо от развития абдоминального сепсиса при РГП относительно контрольных значений снижается активность Г6ФДГ, ЛДГ и NADP-ГДГ (табл. 2). Также независимо от последующего развития сепсиса у больных РГП в нейтрофилах повышается активность NADP-ИЦДГ, NADH-ЛДГ и NADH-МДГ. Однако у пациентов с после-

дующим развитием сепсиса внутриклеточная активность NADH-ЛДГ ниже, чем у пациентов без последующего развития сепсиса. У больных РГП без последующего развития сепсиса в нейтрофила понижена активность NADP-МДГ как относительного диапазона, так и выявленного у пациентов с последующим развитием сепсиса. У больных РГП с последующим развитием сепсиса в нейтрофилах повышена активность NADPH-ГДГ как относительно

**Таблица 2. Активность NAD- и NADP-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови у больных РГП в прогнозе развития сепсиса (Me,  $Q_{0,25} - Q_{0,75}$ )**

Table 2. The activity of NAD- and NADP-dependent dehydrogenases in blood neutrophils with WPP in the forecast of sepsis development (Median values,  $Q_{0,25} - Q_{0,75}$ )

Показатели Parameters	Контроль Control n = 67		Без последующего развития сепсиса Without the subsequent development of sepsis n = 15		С последующим развитием сепсиса With the subsequent development of sepsis n = 35	
	Me	$Q_{0,25} - Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25} - Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25} - Q_{0,75}$
Г6ФДГ Glu6PDH	0,86	0,12–4,16	0,01	0,005–0,30	0,04	0,01–0,58
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	
ГЗФДГ Gly3PDH	0,54	0,07–1,68	0,38	0,08–1,03	0,61	0,30–1,35
ЛДГ LDH	11,45	1,44–43,03	0,01	0,005–1,12	0,01	0,001–0,17
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	
NADP-МДГ NADP-MDH	0,02	0,01–0,77	0,007	0,005–0,01	0,02	0,01–0,14
			$p_1 = 0,024$		$p_2 = 0,008$	
NADP-ГДГ NADP-GluDH	0,12	0,05–0,83	0,02	0,01–0,04	0,02	0,01–0,05
			$p_1 = 0,019$		$p_1 = 0,004$	
NADP-ИЦДГ NADP-ICDH	1,18	0,18–2,79	5,39	0,55–10,13	7,95	2,16–16,22
			$p_1 = 0,039$		$p_1 = 0,002$	
МДГ MDH	4,01	0,85–10,31	4,48	0,74–13,10	8,51	0,96–18,61
NAD-ГДГ NAD-GluDH	0,53	0,12–1,42	0,46	0,13–1,08	0,42	0,18–1,36
NAD-ИЦДГ NAD-ICDH	0,05	0,01–1,85	3,40	0,01–7,64	4,92	1,57–6,79
			$p_1 = 0,009$		$p_1 < 0,001$	
NADH-ЛДГ NADH-LDH	0,24	0,10–10,23	18,32	2,15–70,01	3,98	1,05–23,40
			$p_1 = 0,010$		$p_1 = 0,025$ $p_2 = 0,018$	
NADH-МДГ NADH-MDH	12,60	2,05–53,34	73,87	35,22–127,13	47,41	12,16–96,33
			$p_1 < 0,001$		$p_1 = 0,037$	
ГР GR	1,02	0,27–3,30	1,15	0,31–2,98	1,04	0,19–2,45
NADH-ГДГ NADH-GluDH	5,31	1,02–16,39	8,20	2,52–21,03	25,78	8,78–53,67
					$p_1 = 0,012$ $p_2 = 0,044$	
NADPH-ГДГ NADPH-GluDH	45,29	7,13–88,71	30,85	11,20–39,59	30,35	8,78–62,48

Примечание: то же, что и для табл. 1.

Note: see Tabl. 1.

контрольного уровня, так и значений, выявленных у пациентов без последующего развития сепсиса.

Воспалительная реакция у больных РГП характеризуется увеличением содержания нейтрофилов в периферической крови. В то же время у больных с последующим развитием сепсиса количество нейтрофилов в крови ниже, чем у пациентов без осложнений. Можно предположить, что более слабый выход фагоцитирующих клеток является одной из причин развития осложнений РГП. Пропорционально повышению уровня нейтрофилов в крови у больных РГП повышается абсолютное количество клеток, экспрессирующих CD62L-маркер. Данная молекула относится к семейству L-селектинов, обеспечивает слабые межклеточные взаимодействия и принимает участие в экстравазации нейтрофилов [11]. Только у больных РГП без последующих осложнений в крови повышается абсолютное содержание CD23<sup>+</sup>- и HLA-DR<sup>+</sup>-нейтрофилов. Гликопротеин CD23 является низкоаффинным рецептором IgE, его экспрессия на нейтрофилах характеризует функциональную активацию клеток [12]. HLA-DR-рецептор (продукт главного комплекса гистосовместимости II класса) принимает участие в антигенпрезентации. Снижение уровня экспрессии HLA-DR-маркера на нейтрофилах больных РГП с отсутствием последующих осложнений, по-видимому, определяется миграцией активированных клеток в зону воспалительных процессов. В крови у больных РГП повышается количество CD64<sup>+</sup>-нейтрофилов и уровень экспрессии данного маркера, причем в группе пациентов с последующим развитием сепсиса содержание CD64<sup>+</sup> более выражено, чем у больных с отсутствием осложнений. CD64 (высокоаффинный рецептор IgG) является маркером бактериальных инфекций. Более выраженное увеличение количества клеток, экспрессирующих CD64, у пациентов с последующим развитием сепсиса может являться показателем начинающейся бактериемии при РГП.

Исследуемые NAD- и NADP-зависимые дегидрогеназы нейтрофилов занимают ключевые позиции на разных метаболических путях клетки, характеризуя основные обменные процессы. Так, Г6ФДГ является ключевым и инициализирующим ферментом пентозофосфатного цикла, от активности которого зависит широкий спектр синтетических процессов [2, 3]. Соответственно, снижение активности фермента в нейтрофилах больных РГП определяет значительную недостаточность реакций пластического обмена. NADP-МДГ также является NADP-зависимым ферментом, локализуемым в цитоплазматическом компартменте нейтрофилов. У больных РГП с последующим

развитием сепсиса активность фермента значительно снижена, тогда как у пациентов, у которых в процессе лечения развивается данной осложнение, активность NADP-МДГ соответствует контрольному уровню. Активность NADP-ГДГ, принимающего участие в процессах внутриклеточного обмена азота, при РГП снижается, активность NADP-ИЦДГ — повышается.

Так как пентозофосфатный цикл является конкурентом гликолизу за субстрат, можно предположить, что при снижении активности Г6ФДГ интенсивность субстратного потока по гликолизу возрастет. Действительно, у больных РГП в нейтрофилах активность анаэробной реакции ЛДГ (NADH-ЛДГ) повышается относительно контрольных значений, причем у пациентов без последующего развития сепсиса ее активность значительно выше, чем у пациентов с последующим развитием сепсиса. Подобные изменения интенсивности анаэробного гликолиза, безусловно, повлияют на энергетическое состояние клеток. Следовательно, у больных РГП, послеоперационный период которых пройдет без осложнений, наработка АТФ в гликолизе более выражена, чем у пациентов с последующим развитием сепсиса. Причем известно, что изменение функциональной активности нейтрофилов происходит при повышении интенсивности субстратного потока по гликолизу [2, 5].

Нейтрофилы являются клетками, осуществляющими свою функцию преимущественно в анаэробных условиях. Однако их метаболизм также зависит от состояния обменных процессов в митохондриях [3]. Обнаружено, что активность NAD-ИЦДГ в нейтрофилах крови у больных РГП повышена независимо от наличия/отсутствия последующих осложнений. Фермент является лимитирующим интенсивность субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот, который в значительной степени определяет активность аэробного дыхания [13]. Однако активность МДГ (другой фермент лимонного цикла) в нейтрофилах больных не изменена. Кроме того, у обследованных пациентов обнаружено повышение активности NADH-зависимой реакции МДГ, которая является ключевой в системе малат-аспартатного шунта митохондрий [3]. Подобный дисбаланс может значительно снизить энергетические возможности клеток и, безусловно, повлиять на их функциональную активность.

Цикл трикарбоновых кислот является анаплеротическим, соединяющим все основные метаболические процессы в клетке. В связи с этим можно предположить, что снижение интенсивности субстратного потока в промежутке между NAD-ИЦДГ и МДГ связана с выведением

ем субстратов лимонного цикла. Данная особенность зафиксирована в нейтрофилах у больных РГП с последующим развитием сепсиса. Обнаружено, что в клетках у лиц данной группы значительно повышается активность NADH-ГДГ, что отражает отток субстратов с лимонного цикла на реакции аминокислотного обмена.

## Заключение

Воспалительная реакция у больных РГП характеризуется нейтрофилезом и изменением фенотипа нейтрофилов в крови. Установлено, что маркерами последующего развития сепсиса при РГП являются менее выраженное (по сравнению с показателями больных без осложнений) увеличение количества нейтрофилов, снижение содержания HLA-DR<sup>+</sup> клеток на фоне высокого уровня нейтрофилов, экспрессирующих высокоаффинный рецептор для IgG. У пациентов без последующего развития осложнений повышается количество нейтрофилов с экспрессией рецептора CD23. Метаболизм нейтрофилов у больных РГП характеризуется снижением интенсивности пластических процессов

за счет низкой активности Г6ФДГ и дисбалансом активности ферментов митохондриального компартмента. Особенностью метаболизма нейтрофилов у больных РГП без последующего развития сепсиса является высокая активность анаэробной реакции ЛДГ и снижение активности NADP-МДГ. У больных РГП с последующим развитием сепсиса обнаружен высокий уровень NAD-зависимого оттока субстратов с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена через глутаматдегидрогеназу, что может повлиять на активность аэробного дыхания нейтрофилов. Установленные различия в состоянии фенотипа и активности ферментов в нейтрофилах у больных РГП в зависимости от последующего развития сепсиса определяют возможность создания метода прогноза развития осложнений и разработки иммуноактивной терапии в послеоперационном периоде РГП.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности».*

## Список литературы/References

1. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 1. С. 19–26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 1, pp. 19–26. doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26 (In Russ.)]
2. Савченко А.А. Определение активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах биолюминесцентным методом // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 159, № 5. С. 656–660. [Savchenko A.A. Evaluation of NAD(P)-dependent dehydrogenase activities in neutrophilic granulocytes by the bioluminescent method. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 159, no. 5, pp. 656–660. doi: 10.1007/s10517-015-3049-8 (In Russ.)]
3. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните. Н.: Наука, 2013. 142 с. [Savchenko A.A., Zdzitovetskii D.E., Borisov A.G. Immunometabolicheskie narusheniya pri rasprostranennom gnoynom peritonite [Immunometabolic disorders in common purulent peritonitis]. *Novosibirsk: Nauka*, 1996. 142 p.]
4. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов и уровни концентрации цитокинов у больных распространенным гнойным перитонитом // Цитокины и воспаление. 2013. Т. 12, № 1–2. С. 115–119. [Savchenko A.A., Zdzitovetskii D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Neutrophil chemiluminescent activity and cytokine concentration levels in patients with extensive purulent peritonitis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2013, vol. 12, no. 1–2. (In Russ.)]
5. Behnen M., Möller S., Brozek A., Klingner M., Laskay T. Extracellular acidification inhibits the ROS-dependent formation of neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8, 12 p. doi: 10.3389/fimmu.2017.00184
6. Bone R.S., Balk R.A.B., Cerra F.B. American college of Chest Physicians. Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.*, 1992, vol. 20, iss. 6, pp. 864–874.
7. Hyun Y.M., Hong C.W. Deep insight into neutrophil trafficking in various organs. *J. Leukoc. Biol.*, 2017, vol. 102, iss. 3, pp. 617–629. doi: 10.1189/jlb.1RU1216-521R
8. Lastrucci C., Baillif V., Behar A., Al Saati T., Dubourdeau M., Maridonneau-Parini I., Cougoule C. Molecular and cellular profiles of the resolution phase in a damage-associated molecular pattern (DAMP)-mediated peritonitis model and revelation of leukocyte persistence in peritoneal tissues. *FASEB J.*, 2015, vol. 29, no. 5, pp. 1914–1929. doi: 10.1096/fj.14-259341
9. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, vol. 12, pp. 191–200. doi: 10.1038/nri3158
10. Singal R., Dhar S., Zaman M., Singh B., Singh V., Sethi S. Comparative evaluation of intra-operative peritoneal lavage with super oxidized solution and normal saline in peritonitis cases; randomized controlled trial. *Maedica (Buchar)*, 2016, vol. 11, no. 4, pp. 277–285.
11. Spadaro M., Caldano M., Marnetto F., Lugaresi A., Bertolotto A. Natalizumab treatment reduces L-selectin (CD62L) in CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Neuroinflammation*, 2015, vol. 12: 146, 9 p. doi: 10.1186/s12974-015-0365-x

12. Sutton B.J., Davies A.M. Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: FcεRI and CD23/FcεRII. *Immunol. Rev.*, 2015, vol. 268, iss. 1, pp. 222–235. doi: 10.1111/immr.12340
13. Upadhyay V.A., Brunner A.M., Fathi A.T. Isocitrate dehydrogenase (IDH) inhibition as treatment of myeloid malignancies: progress and future directions. *Pharmacol. Ther.*, 2017, vol. 177, pp. 123–128. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.03.003
14. Van Biesen W., Brown E.A. Diagnostic and therapeutic approach to peritonitis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2017, vol. 32, iss. 8, pp. 1283–1284. doi: 10.1093/ndt/gfx226
15. Vincent J.L., Moreno R., Takala J., Willatts S., De Mendonça A., Bruining H., Reinhart C.K., Suter P.M., Thijs L.G. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.*, 1996, vol. 22, no. 7, pp. 707–710.

**Авторы:**

**Савченко А.А.**, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия; зав. кафедрой физиологии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;

**Борисов А.Г.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия; доцент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;

**Черданцев Д.В.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой и клиникой хирургических болезней им. проф. А.М. Дыхно с курсом эндоскопии и эндохирургии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;

**Первова О.В.**, д.м.н., профессор кафедры и клиники хирургических болезней им. проф. А.М. Дыхно с курсом эндоскопии и эндохирургии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;

**Кудрявцев И.В.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории общей иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Гвоздев И.И.**, младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр СО РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

**Мошев А.В.**, младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр СО РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия.

**Authors:**

**Savchenko A.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Laboratory of Molecular Cell Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation; Head of the Department of Physiology, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Borisov A.G.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Cell Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation; Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Cherdantsev D.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department and Clinic Surgical Diseases named after prof. A.M. Dychno with the course of endoscopy and endosurgery, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Pervova O.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor of the Department and Clinic Surgical Diseases named after prof. A.M. Dychno with the course of endoscopy and endosurgery, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Kudryavtsev I.V.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Gvozdev I.I.**, Junior Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the RAS, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

**Moshev A.V.**, Junior Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the RAS, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation.