

УДК 617+616.94:616.155.34-037-092

## АПОПТОЗ ЦИРКУЛІРУЮЩИХ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ СЕПСИСЕ: ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ

А.Н. Нестеренко

Донецкий национальный медицинский университет им. М.Горького

**Реферат.** С целью изучения патогенетического значения апоптоза циркулирующих нейтрофилов при хирургическом сепсисе и возможности использования суправитального определения уровня апоптоза циркулирующих нейтрофилов как диагностического и прогностического критерия тяжести течения сепсиса проведено нерандомизированное ретроспективное когортное аналитическое обсервационное клиническое исследование 35 пациентов с хирургическим сепсисом. Посредством световой микроскопии окрашенных мазков из кондиционированной венозной крови определяли уровень апоптотических и некротически измененных нейтрофилов. Путем клиничко-патоморфологических исследований уточнена роль задержки апоптоза нейтрофилов в патогенезе хирургического сепсиса, полиорганной дисфункции/несостоятельности, в танатогенезе сепсиса. Установлено, что задержка апоптоза нейтрофилов при хирургическом сепсисе способствует повреждению эндотелия и развитию митохондриально-микроциркуляторного дистресса, что приводит к трансформации сепсиса в тяжелый сепсис – сепсис с органной дисфункцией. Разработан способ прогнозирования тяжести течения сепсиса путем суправитального определения в венозной крови соотношения некротически измененных нейтрофилов к апоптотическим (Патент UA 15271).

**Ключевые слова:** патогенез и танатогенез хирургического сепсиса, апоптоз циркулирующих нейтрофилов, полиорганная дисфункция/несостоятельность, прогнозирование тяжести течения сепсиса.

В начале XXI столетия сепсис по-прежнему остаётся одной из самых актуальных проблем современной медицины в силу неуклонной тенденции к росту заболеваемости и стабильно высокой летальности. Сепсис входит в десятку ведущих причин смерти в цивилизованном мире. В структуре всех разновидностей сепсиса доминирует хирургический сепсис (ХС) [18-22].

С 2004 года во всем мире широко обсуждается новая парадигма, уточняющая приоритеты в патогенезе и интенсивной терапии (ИТ) сепсиса, базирующаяся на теориях «микроциркуляторно-митохондриального дистресс-синдрома» и «DAMP – Danger-associated molecular patterns» [7, 20, 21]. Патологические механизмы развития сепсиса в значительной степени являются результатом ответа врожденного иммунитета пациента, под влиянием генетических факторов. Решающую роль в этом сложном каскаде со-

бытий играют нейтрофилы (Нф). Микробы и их токсины (pathogen-associated molecular patterns) распознаются нейтрофилами посредством толл-подобных рецепторов, подвергаются деструкции, поглощаются, перевариваются мигрирующими в очаг инфекции Нф и моноцитами. Происходит избыточная метаболическая активация Нф – «респираторный взрыв» с гиперпродукцией митохондриями Нф микробицидных «активных форм кислорода» (АФК) – синглетного кислорода  $^1\text{O}_2$ , гипохлорита  $\text{ClO}^-$ , перекиси водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$  – и азота, которые повреждают не только микробы, но и митохондрии эндотелиоцитов. Активация других Нф, моноцитов, эндотелиоцитов, провоцирует «цитокиновую бурю», активацию комплемента, вызывают митохондриальную дисфункцию, неуправляемый воспалительно-коагуляционный каскад с критическим нарушением микроциркуляции, повреждением тканей и развитием синдрома полиорганной дисфункции (СПОН). Гиперпродукция Нф лизосомальных ферментов вызывает деструкцию не только микробов, но и клеток тканей «хозяина», которые необратимо гибнут путем некроза. В условиях лавинообразно нарастающей интоксикации и митохондриального дистресса активируется апоптоз – заложенная природой в каждой клетке млекопитающих программа самоуничтожения – обратимый до определенного момента процесс, позволяющий биологически целесообразно контролировать количество и качество клеток различных тканей – нейтрофилов, лимфо-, эндотелио-, гепато-, энтеро-, миокардиоцитов и т.д., даже безъядерных эритроцитов [14]. Изучение процессов апоптоза при сепсисе позволит оптимизировать диагностическую и лечебную тактику [1-8, 10-14, 16, 17, 20-26].

**Цель работы** – изучить патогенетическое значение апоптоза циркулирующих нейтрофилов при хирургическом сепсисе и возможность использования суправитального определения уровня апоптоза циркулирующих нейтрофилов как диагностического и прогностического критерия тяжести течения ХС.

### Матеріал і методи

Проведено нерандомизированное ретроспективное когортное аналитическое обсервационное клиническое исследование 35 пациентов (возраст – 18-76 лет, женщины – 17, мужчины – 18), находившихся на лечении во хирургических отделениях № 2 и № 3 и реанимационном отделении Донецкого областного клинического территориального медицинского объединения с января 2003 по декабрь 2004 по поводу хирургического сепсиса (ХС) вследствие перитонита (12), гнойников брюшной полости (6), забрюшинной флегмоны (4), гнилостного парапроктита (3), флегмоны мягких тканей (4), диабетической флегмоны/гангрены нижних конечностей (4), инфекции мочевых путей (2) с развитием органических дисфункций у всех, а септического шока – у 17 из 35 пациентов. Диагностика сепсиса – по рекомендациям SCCM/ ESICM/ ACCP/ ATC/ SIS ISDC [15]. Прогнозирование исхода проводили по шкале APACHE II, динамику органной

дисфункции – по SOFA. После хирургической санации очага инфекции проводили антибактериальную, инфузионно-трансфузионную терапию; респираторную, инотропную, нутритивную, эфферентную, иммуностропную поддержку – комплекс ИТ до внедрения в практику принципов экстренной целенаправленной органопротективной терапии – модифицированного протокола MUST [2, 3, 22]. На этапах лечения проводили: мониторинг витальных функций; исследование клинических, биохимических, иммунологических показателей, микробиологический контроль гемокультур, отделяемого дренажей. Вычисляли интегральные гематологические индексы, определяли относительное количество лимфоцитов (Лфц) в венозной крови, в т.ч. Лфц, экспрессирующих CD95 – рецепторы индукции апоптоза, CD25 – рецепторы к интерлейкину-2 (IL-2); уровень в крови метаболитов оксида азота (mNO), цитокинов – TNF- $\alpha$  и хемокина IL-8; хемилюминесценции лейкоцитов (ХЛ) –

**Таблица 1.** Некоторые характеристики [Me $\pm$ m (QI - QIII)] обследованных пациентов, распределенных на группы/когорты (A, B, C) в зависимости от выраженности апоптоза нейтрофилов венозной крови в сравнении со здоровыми донорами (D).

Показатели, единицы измерения	D: Здоровые доноры (n = 12)	Сепсис+СПОН		Сепсис без СПОН	
		A: апоптоз↓D (n = 16)	B: апоптоз↓D (n = 9)	C: апоптоз↑↑D (n = 10)	
Апоптоз нейтрофилов*, %	12,3 $\pm$ 0,46 (11,6-12,9)	4,34 $\pm$ 0,44 (3,75-5,2)	10,3 $\pm$ 1,07 (8,6-13,3)	18,3 $\pm$ 1,402 (16,7-21,9)	
Некроз нейтрофилов*, %	50,3 $\pm$ 1,83 (38,2-51,1)	62,92 $\pm$ 3,194 (57,9-66,3)	56,4 $\pm$ 6,99 (36,3-65,5)	62,95 $\pm$ 5,42 (61,5-82,2)	
Некроз/апоптоз нейтрофилов*	3,99 $\pm$ 0,15 (3,09-4,29)	16,34 $\pm$ 1,75 (11,29-18,95)	4,20 $\pm$ 0,70 (3,78-5,77)	3,66 $\pm$ 0,29 (2,99-3,99)	
Возраст, лет	43,0 $\pm$ 3,55 (34,0-53,0)	62,0 $\pm$ 4,44 (39,0-72,0)	61,0 $\pm$ 7,35 (35,0-76,0)	63,0 $\pm$ 5,18 (41,5-66,0)	
Мужчин/женщин, %	41,67/58,33	56,2/43,8	44,44/55,56	50,0/50,0	
APACHE II*, баллы	–	22,0 $\pm$ 0,83 ▼ (20,0-26,0)	21,0 $\pm$ 1,07 ▼ (19,0-22,0)	20,5 $\pm$ 1,26 ▼ (18,0-22,0)	
SOFA**, баллы	–	9,0 $\pm$ 0,92 (7,0-9,0)	5,5 $\pm$ 0,503 (4,0-7,0)	5,0 $\pm$ 0,28 (4,0-5,0)	
Потребность в искусственной вентиляции легких, у человек		7	4	5	
Прогнозируемая летальность по APACHE II*		до 30 %	до 30 %	до 30 %	
Прогнозируемая летальность по SOFA**		до 69 %	более 30%	более 22%	
Умерло***, человек ( % в группе)		7 (43,75%)	1 (5,26%)		
Выжило***, человек		9	18		

\*В первые сутки после установления диагноза сепсис/тяжелый сепсис. \*\*Максимальный балл за 28-дневный период наблюдения. \*\*\* В течение 28 дней наблюдения. ▼Различия между группами статистически не достоверны.

Таблиця 2.

Корреляційна зв'язь (непараметричні критерії) деяких клініко-лабораторних показателів зі ступенем тяжкості стану по формалізованим шкалам APACHE II і SOFA в групі А пацієнтів з тяжелим сепсисом (+СПОН) і низьким рівнем апоптозу циркулюючих Нф.

Коефіцієнти кореляції	Коефіцієнт парної кореляції Кендалла		Коефіцієнт рангової кореляції Спірмена	
	APACHE II	SOFA	APACHE II	SOFA
Показатели / шкалы				
Соотношение некроз/ апоптоз нейтрофилов	<b>0,494*</b>	<b>0,624**</b>	<b>0,67*</b>	<b>0,796**</b>
Апоптоз нейтрофилов	-0,357	<b>-0,496*</b>	<b>-0,503</b>	<b>-0,633*</b>
Реактивный ответ нейтрофилов	<b>0,536**</b>	<b>0,497*</b>	<b>0,678**</b>	<b>0,658**</b>
Спонтанная миграция лейкоцитов	0,450	<b>0,554*</b>	0,565	<b>0,665*</b>
Нейтрофилы /Лимфоциты	<b>0,424*</b>	0,337	<b>0,603*</b>	0,458
Лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс	<b>-0,424*</b>	-0,337	<b>-0,603*</b>	-0,458
Индекс системной внутрисосудистой альтерации	0,328	<b>0,426*</b>	0,469	<b>0,560*</b>
Антиоксиданты сыворотки крови (по ХЛ сыворотки)	<b>-0,483*</b>	-0,464	<b>-0,634*</b>	<b>-0,594</b>
Антиоксиданты плазмы (по ХЛ плазмы)	<b>-0,517*</b>	<b>-0,554*</b>	<b>-0,648*</b>	<b>-0,684*</b>
Ядерный индекс сдвига нейтрофилов Г.А.Даштаянца	0,328	<b>0,426*</b>	0,469	<b>0,560*</b>
Гематологический показатель интоксикации С.В.Васильева	<b>0,540**</b>	<b>0,460*</b>	<b>0,655**</b>	<b>0,594*</b>

\*\* – корреляція значима на рівні 0,01 (2-стороння); \* – корреляція значима на рівні 0,05 (2-стороння)

маркера «респираторного взрива» лейкоцитів – концентрації АФК; рівень в крові продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) – дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіда (МДА), стан антиоксидантної системи (АОС) – по концентрації в крові  $\alpha$ -токоферолу, активності каталази (Кат), супероксиддисмутазу (СОД) з визначенням коефіцієнта ПОЛ/АОС.

Визначення комітітованих до апоптозу (Апо) і некротически змінених Нф проводили шляхом світлової мікроскопії в тонких мазках венозної крові, окрашених по Романовському-Гімзе після попереднього кондиціонування венозної крові за методикою, розробленою А.В.Сєдих [1, 4, 6]. На збільшенні  $\times 1000$  просматривали тисячу кліток і враховували (в %) змінені Нф, які диференціювали за характерними морфологічними ознаками: апоптотичні – за зменшенню розмірів, за конденсованою цитоплазмою, за ущільненою безструктурною хроматиною, часто розділеною на декілько округлих телець (рис. 1); некротическі – за розриву цитоплазматическої і внутрікліточескої мембран, за руйнуванню органелл,

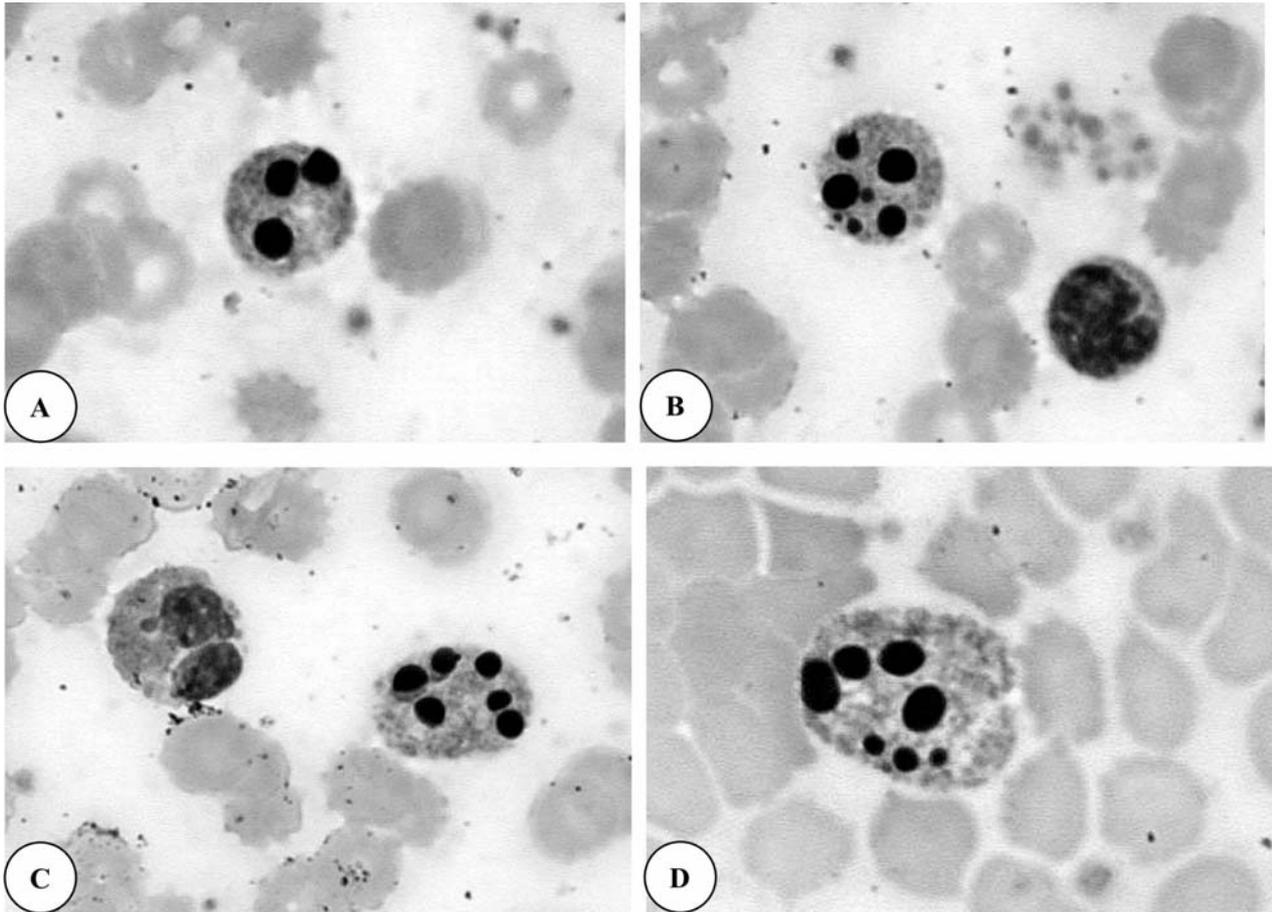
за виходу зміщеної цитоплазми в міжкліточеске пространство [1, 4, 6]. Дослідження проводили в перші сутки після встановлення діагнозу сепсис, але не раніше 24 ч після хірургіческогo усунення осередку. Визначали відношення некротически змінених циркулюючих Нф до апоптотических.

Виконано патоморфологіческіе дослідження внутрішніх органів 8 померлих пацієнтів.

Статистическа обробка проводилась за допомогою програмних пакетів MedStat (v.4.), Microsoft Excel, SPSS for Windows (v.13.). Застосовували тест Шапіро-Уїлка; t-критерій Ст'юдента; W- і T-критерії Вількоксона; критерій  $\chi^2$ ; множенственні порівняння з використанням критерієв Шефе, Даннета, Данна і ранговогo однофакторногo аналізу Крускала-Уолліса; корреляційний аналіз з використанням непараметрическіх коефіцієнтів: парної (Кендалла) і рангової (Спірмена) корреляції. Група здорових – доноры-добровольці. В порівнюємих групах оцінювали шанси і ризики летального ісходу.

#### Результати і обговорення

Ретроспективно 35 пацієнтів були внаслідок розділені на 3 групи/когорти в зависимо-



**Рис. 1.** Апоптоз циркулюючих нейтрофильных гранулоцитов: клетки несколько уменьшены в размерах, цитоплазма их уплотнена, хроматин конденсирован; фрагментоз, маргинация ядра (А-D). Мазки венозной крови. Световая микроскопия,  $\times 400$ . Окраска по Романовскому-Гимзе.

сти от выраженности апоптоза нейтрофилов венозной крови (табл. 1, рис. 2). Так, у 16 пациентов (гр. А) этот показатель был в 2,8 раза ( $p < 0,01$ ) снижен, у 9 (гр. В) – в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ) снижен – и у 10 (гр. С) – в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) повышен в сравнении со здоровыми (гр. D). При вычислении соотношения некротически измененных Нф к апоптотическим выявлено, что в группе А этот показатель превышал: норму (D) в 4,1 раза ( $p < 0,01$ ), группу В – в 3,9 раза ( $p < 0,05$ ) и группу С – в 4,1 раза ( $p < 0,01$ ). Недостоверными ( $p > 0,05$ ) оказались различия по этому показателю в группах D, В и С (рис. 2 В.). При анализе течения ХС выяснено, что в группах В и С органная дисфункция не трансформировалась в развернутый СПОН, что позволило объединить пациентов этих групп в одну группу/когорту В+С (табл. 1).

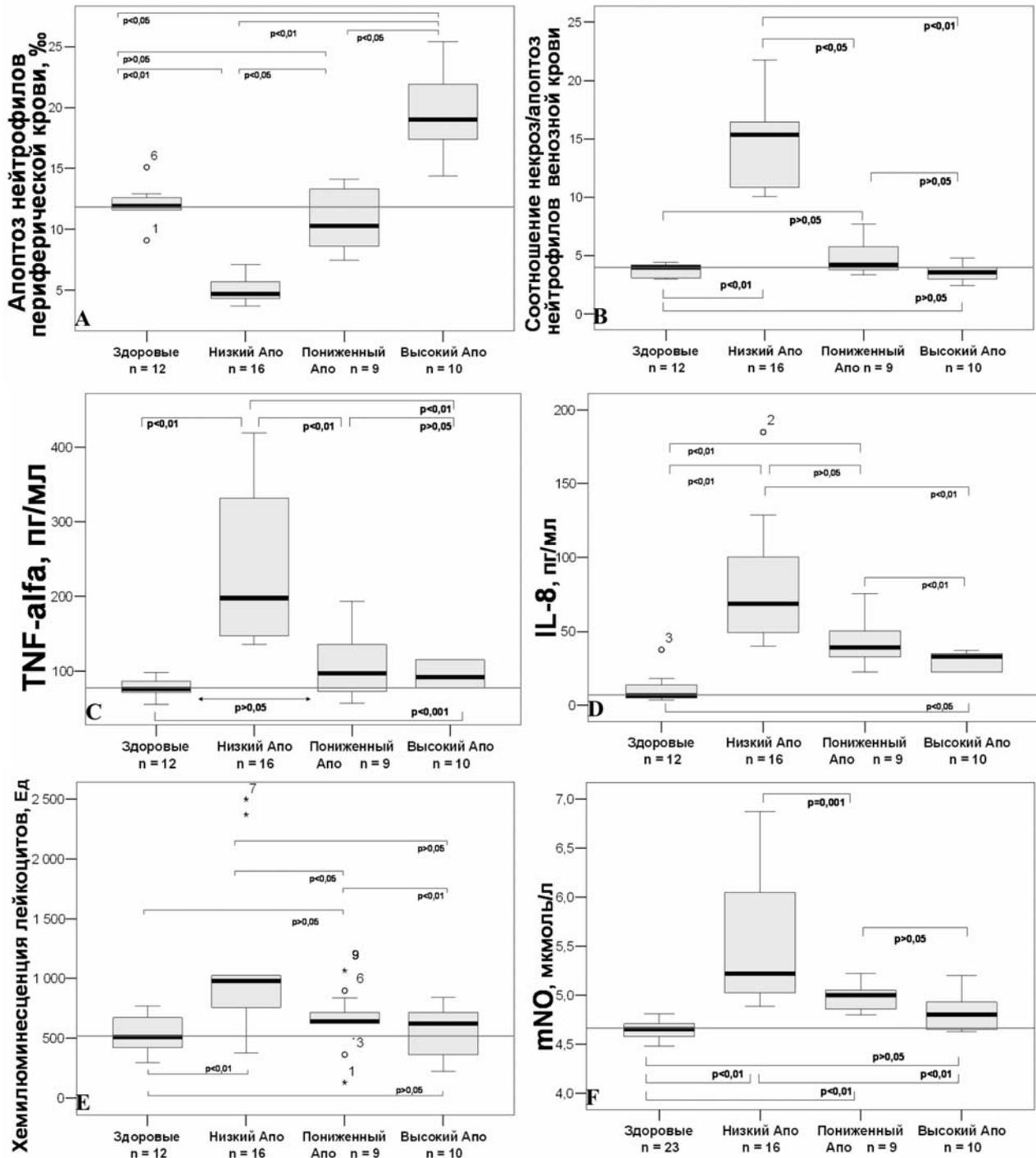
Корреляционный анализ выявил достоверно высокую и среднюю степень связи между степенью тяжести состояния пациентов с такими показателями как отношение некро-

тически измененных к апоптотическим Нф, АпоНф, способность лейкоцитов к спонтанной миграции в очаг инфекции, антиоксидантная активность сыворотки и плазмы, а также с интегральными гематологическими индексами: индексом системной внутрисосудистой альтерации (ИСВА), индексом Нф/Лфц, ядерным индексом сдвига Нф, реактивным ответом Нф и гематологическим показателем интоксикации (табл. 2).

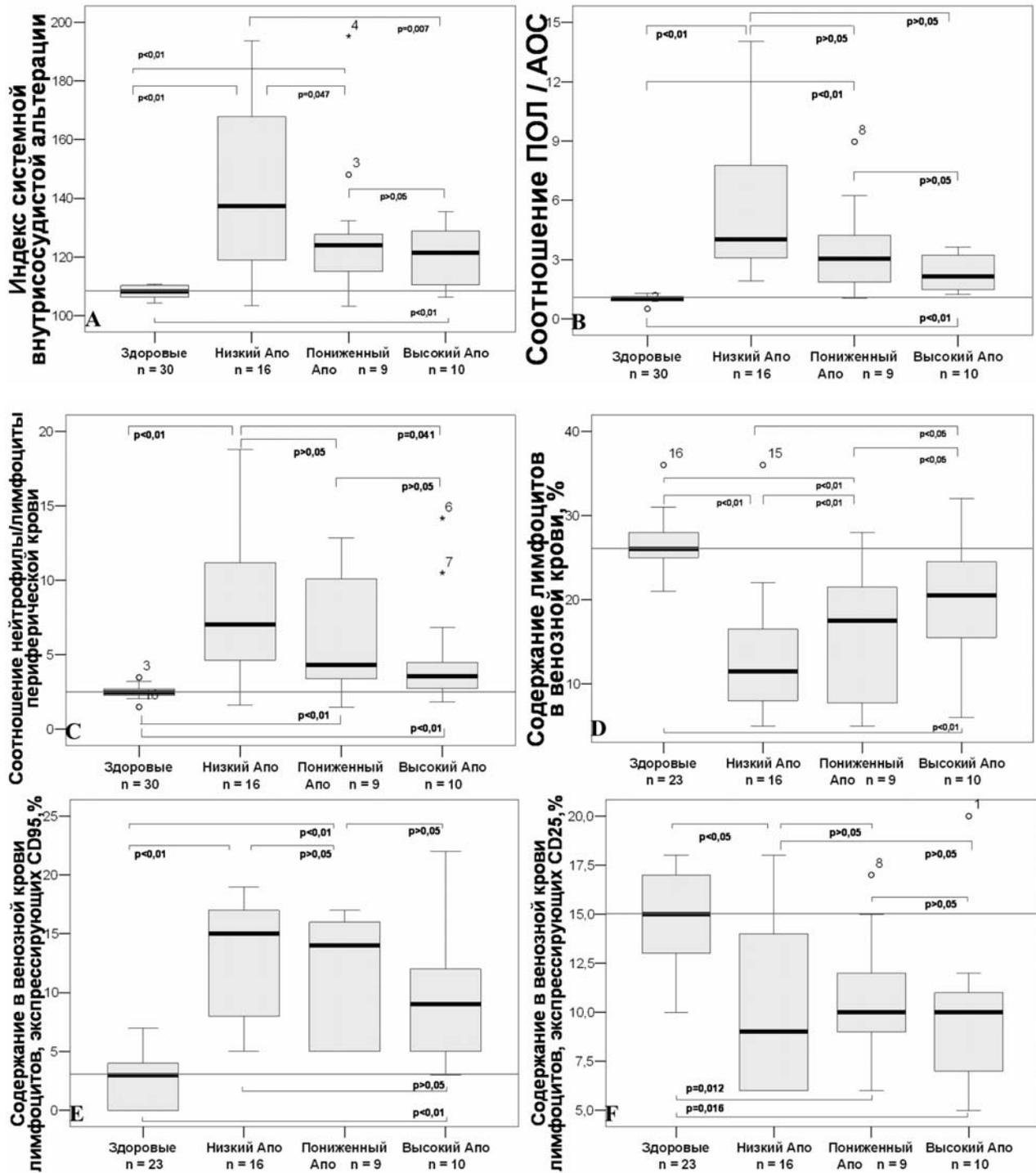
Уже в первые сутки после постановки диагноза ХС в гр. А отмечено повышение уровней в венозной крови mNO, TNF- $\alpha$ , IL-8; ХЛ как в сравнении со здоровыми ( $p < 0,01$ ), так и с группами В и С (рис. 2 С-F.), что свидетельствовало о более высоком уровне провоспалительных цитокинов, АФК и азота у пациентов с низким Апо Нф. ИСВА в гр. А был достоверно выше как в сравнении со здоровыми, так и с группами В и С (рис. 3 А.), что указывало на более выраженную степень эндотелиальной дисфункции у пациентов с низким Апо Нф. Суррогатный маркер митохондриальной

дисфункции ПОЛ/АОС был также выше у пациентов с низким Апо Нф (рис. 3 В.). Достоверно более выраженными были относительные лимфопения и нейтрофилез у пациентов с низким Апо Нф (рис. 3 С-Д.). Повышение в

сравнении со здоровыми концентрации циркулирующих Лфц-CD95 и понижение концентрации циркулирующих Лфц-CD25 отмечено во всех группах (А, В, С), но более выраженное у пациентов с низким Апо Нф (рис.



**Рис. 2.** Уровни [Me  $\pm$  m (QI - QIII)] в венозной крови: апоптоза циркулирующих нейтрофилов (А); соотношения некротически/ апоптотически измененных нейтрофилов (В); цитокина TNF- $\alpha$  (С), хемокина IL-8 (D); хемилюминесценции лейкоцитов (Е), метаболитов оксида азота – mNO (F) в первые сутки от момента постановки диагноза сепсис/ тяжелый сепсис у хирургических пациентов, ретроспективно разделенных на 3 группы/когорты в зависимости от выраженности апоптоза циркулирующих нейтрофилов: низкий – пониженный – высокий (в сравнении со здоровыми донорами).



**Рис. 3.** Уровни [Me ± m (QI - QIII)]: индекса системной внутрисосудистой альтерации (А); соотношения ПОЛ/АОС (В); соотношения нейтрофилов и лимфоцитов венозной крови (С), лимфоцитов венозной крови (D), в том числе экспрессирующих молекулы CD95 (Е), CD25 (F) в первые 24 часа от момента постановки диагноза сепсис/тяжелый сепсис у хирургических пациентов, ретроспективно разделенных на 3 группы/когорты в зависимости от выраженности апоптоза нейтрофилов периферической крови: низкий – пониженный – высокий (в сравнении со здоровыми донорами).

3 Е-Ф.), что свидетельствовало об иммунном дистрессе при ХС – повышении уровня апоптоза Лфц и снижении чувствительности Лфц к воздействиям цитокина IL-2, регулирующего ответ иммунной системы на антиген. По дан-

ном Oberholzer С. с соавт. (2001) апоптоз Лфц при сепсисе могут индуцировать как отсутствие в циркуляции IL-2, так и гиперпродукция TNF-α.

Проведен клинико-морфологический ана-

лиз танатогенеза 8 пациентов. В сосудах микроциркуляции у 6 умерших наблюдались набухание, десквамация и очаговая пролиферация эндотелиоцитов. У 5 – нарушения гемомикроциркуляции в виде стазов, сладжей эритроцитов, фибриновых тромбов, лейкостазов. Наиболее часто эти изменения определялись в сосудах мозга, легких, реже – миокарда, печени, почек (рис. 4 А-Ф.).

Легкие, как единственный орган, получающий 100% сердечного выброса (венозной крови, отекающей из очагов инфекции), были первой мишенью в «каскаде» ПОН при ХС. Морфологическим эквивалентом клинически сепсис-индуцированного острого легочного повреждения были гистологические изменения в легких – полнокровие, отек, очаги эмфиземы и дис-ателектазов. В ряде случаев – мелкоочаговые кровоизлияния, сегментарная инфильтрация, пневмонические фокусы, утолщение и инфильтрация межальвеолярных перегородок нейтрофилами и макрофагами (рис. 4 С.).

Ведущим клиническим признаком у всех пациентов с ХС был инфекционно-воспалительный эндотоксикоз (ЭТ). Массивность токсической микробной нагрузки при абдоминальном ХС проявлялась развитием дисфункции печени и почек. Морфологическим эквивалентом эндотоксикоза, манифестирующего ПОН, были гистологические изменения органов детоксикации (рис. 4 Е-Ф.).

Одним из самых ранних критериев диагностики ХС были нервно-психические нарушения. Морфологическим эквивалентом проявлений токсико-гипоксической, дисциркуля-

торной энцефалопатии при ХС были гистологические изменения головного мозга – периваскулярный и перицеллюлярный отек, венозное полнокровие, периваскулярные скопления лейкоцитов, выраженные дистрофические изменения нейронов; лейкостазы, набухание и десквамация эндотелия в сосудах микроциркуляторного русла мозга (рис. 4 А-В.). Отек головного мозга считали одним из наиболее танатогенетически значимых осложнений ХС.

Танатогенетическое значение при ХС имели нарушения трофики миокарда, что гистологически проявлялось у всех умерших полнокровием, выраженными дистрофическими изменениями миокардиоцитов (преимущественно вакуольная дистрофия) в миокарде, в половине случаев – с фрагментацией кардиомиоцитов, пролиферацией и десквамацией эндотелия капилляров в миокарде (рис. 4 D.).

Непосредственной причиной смерти одного пациента из группы В+С было массивное кровотечение из острых эрозий и стрессорных язв желудочно-кишечного тракта.

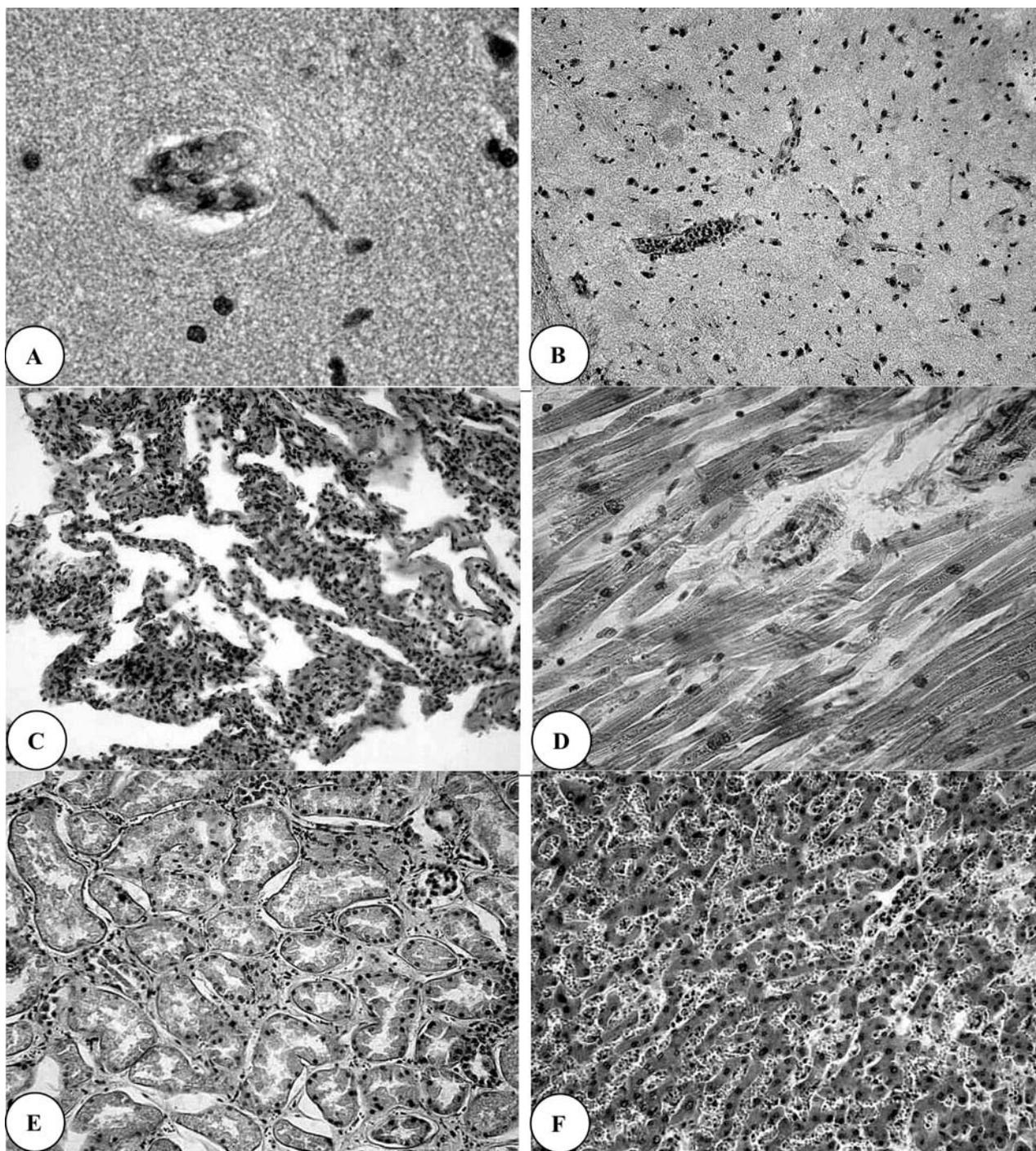
Таким образом, при изначально сопоставимой тяжести состояния и одинаковом уровне прогнозируемой летальности во всех исследуемых группах, но при стартовом достоверно более низком уровне апоптоза циркулирующих Нф (табл. 1) пациенты группы А продемонстрировали достоверно более высокие шансы и риски летального исхода в связи с развитием и прогрессированием органной дисфункции и СПОН, чем пациенты группы В+С (табл. 3). Можно предположить, что в патогенезе СПОН при ХС существен-

Таблица 3.

Шансы и риски развития летального исхода у исследованных пациентов в зависимости от степени тяжести состояния и выраженности апоптоза нейтрофилов венозной крови

Анализируемые характеристики в сравниваемых группах пациентов	А: апоптоз↓↓D (n = 16)	В: апоптоз↓D (n = 9)	С: апоптоз↑↑D (n = 10)
	Сепсис+СПОН		
Сепсис без СПОН (n=19)			
Умерло*, человек. Летальность (%)	7 (43,75%)	1 (5,26%)	
Выжило*, человек	9 (56,25%)	18 (94,74%)	
Отношение шансов (ОШ) летального исхода в группе А по сравнению с группой В+С, доверительный интервал (ДИ) – 95%.	Шансы умереть в группах А и В+С статистически значимо различаются, $p = 0,022$ ; ОШ = 14,0; (ДИ: 1,49-131,89; $p=0,05$ ); $\chi^2 = 5,28 >$ критического ( $\chi^2_{крит.} = 3,84$ ).		
Отношение рисков (ОР) умереть в группе А к группе В+С. **	Риски умереть в группах А и В+С статистически значимо различаются, $p=0,023$ . ОР = 8,31; (ДИ: 1,14≤ОР≤60,60; $p=0,05$ .)		
Снижение абсолютного риска (САР) летального исхода в группе ВС в сравнении с группой А.**	Риски умереть в группах А и В+С статистически значимо различаются, $p = 0,023$ . САР = 38,5%; (ДИ: 10,2%≤САР≤62,0%, $p=0,05$ )		

\* – в течение 28 дней лечения/ наблюдения; \*\* – двусторонняя критическая область.



**Рис. 4.** Патоморфологические изменения внутренних органов у умерших пациентов с тяжелым хирургическим сепсисом: А – набухание и десквамация эндотелия в сосудах головного мозга; В – лейкостаз в сосудах микроциркуляторного русла головного мозга; С – утолщение и инфильтрация межальвеолярных перегородок нейтрофилами и макрофагами; D – пролиферация и десквамация эндотелия капилляров в миокарде; E – дистрофия эпителия канальцев почки; F – лейкостаз в синусоидах печени. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение: А  $\times 1000$ ; D  $\times 400$ ; В, С, E, F  $\times 200$ .

ную роль сыграла пролонгация жизни циркулирующих полиморфноядерных нейтрофилов вследствие стартовом достоверно более низкого уровня апоптоза циркулирующих Нф в группе А (рис. 2 А.). Не устранимые путем

апоптоза активированные Нф покидая сосудистое русло и устремляясь в ткани органов (рис. 4 В-С, E-F.) продолжали гиперпродукцию мощных протеаз, NO, АФК (рис. 2 С-F.), которые не только повреждали микроорга-

низми, но и вызывали универсальное повреждение эндотелиоцитов (рис. 4 А, D.), микроциркуляторно-митохондриальный дистресс, что приводило к развитию так называемой ранней, цитокин-обусловленной органной дисфункции-недостаточности с трансформацией в танатогенетически значимую полиорганную несостоятельность.

#### Выводы

1. Полиморфноядерные нейтрофилы как клетки первой линии неспецифической иммунной защиты организма от микробной агрессии играют ключевую роль в патогенезе сепсиса и полиорганной недостаточности.

2. Задержка апоптоза нейтрофилов при хирургическом сепсисе способствует повреждению эндотелия и развитию митохондриально-микроциркуляторного дистресса, что приводит к трансформации сепсиса в тяжелый сепсис – сепсис с органной дисфункцией.

3. Для прогнозирования тяжести течения хирургического сепсиса может быть использовано суправитальное определение уровня апоптотических и некротически измененных циркулирующих нейтрофилов с вычислением отношения некротически измененных нейтрофилов к апоптотическим, причем за значения нормы принимают значения отношения от 3,1 до 4,3 и при значениях этого отношения более 4,50, но менее 10, прогнозируют осложненное течение хирургического сепсиса без развития полиорганной недостаточности, а при значениях этого отношения 10 и более прогнозируют осложненное течение хирургического сепсиса с развитием полиорганной недостаточности [4], что требует проведения экстренной целенаправленной органопротективной терапии – модифицированного протокола MUST.

#### АПОПТОЗ ЦИРКУЛЮЮЩИХ НЕЙТРОФИЛІВ ПРИ ХІРУРГІЧНОМУ СЕПСИСІ: ПАТОГЕНЕТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ І ПРОГНОСТИЧНІ МОЖЛИВОСТІ

О.М. Нестеренко

**Реферат.** З метою вивчення патогенетичного значення апоптозу циркулюючих нейтрофілів при хірургічному сепсисі і можливості використання суправітального визначення рівня апоптозу циркулюючих нейтрофілів як діагностичного і прогностичного критерію тяжкості перебігу сепсису проведено нерандомізоване ретроспективне когортне аналітичне обсерваційне клінічне дослідження 35 пацієнтів з хірургічним сепсисом. За допомогою світлової мікроскопії забарвлених мазків з кондиціонованої венозної крові визначали рівень апоптотичних і некротично змінених нейтрофілів. Шляхом клініко-патоморфологічних досліджень уточнена роль затримки апоптозу нейтрофілів в патогенезі хірургічного сепсису, поліорганної дисфункції/ неспроможності, в танатогенезі сепсису.

Встановлено, що затримка апоптозу нейтрофілів при хірургічному сепсисі сприяє ушкодженню ендотелію й розвитку митохондриально-микроциркуляторного дистрессу, що призводить до трансформації сепсису в тяжкий сепсис – сепсис з органною дисфункцією. Розроблений спосіб прогнозування тяжкості перебігу сепсису шляхом суправітального визначення у венозній крові співвідношення некротично змінених нейтрофілів до апоптотичних (Патент UA 15271).

**Ключові слова:** патогенез і танатогенез хірургічного сепсису, апоптоз циркулюючих нейтрофілів, поліорганна дисфункція/ неспроможність, прогнозування тяжкості перебігу сепсису.

#### APOPTOSIS OF CIRCULATING NEUTROPHILS IN SURGICAL SEPSIS: PATHOGENETIC SIGNIFICANCE AND PROGNOSTIC POSSIBILITIES

A.N. Nesterenko

**Abstract.** With the purpose of researching of significance of apoptosis of circulating neutrophils in pathogenesis of surgical sepsis and possibility of the use of supravital determination of level of apoptosis of circulating neutrophils as the diagnostic and prognostic criterion of severity of sepsis course a nonrandomized retrospective cohort analytical observational clinical study in 35 patients with a surgical sepsis was conducted. Neutrophil apoptosis and necrosis in conditioned venous blood was assessed by light microscopy analysis of stained blood smear. The role of delay of apoptosis of neutrophils in pathogenesis of surgical sepsis, of multiorgan dysfunction/incompetence, of thanatogenesis of sepsis was specified by clinical and pathomorphological investigations. It was established that the delay of neutrophil apoptosis in surgical sepsis contributes to damage endothelium and development of mitochondrial-microcirculatory distress that leads to the transformation of sepsis in severe sepsis - sepsis with organ dysfunction. The method of predicting of severity of sepsis course by supravital determination of level of apoptotic and necrotic changed neutrophils in venous blood with the subsequent calculation of necrotic/ apoptotic changed neutrophils ratio was developed (Patent UA 15271).

**Keywords:** pathogenesis and thanatogenesis of surgical sepsis, apoptosis of circulating neutrophils, multiorgan dysfunction/ failure, prediction of severity of sepsis course.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Нестеренко А.Н. Апоптоз нейтрофилов как прогностический критерий течения хирургического сепсиса // Біль, знеболювання і інтенсивна терапія. – 2007. – № 3 (д). – С. 109-110.
2. Нестеренко А.Н. Ксилат в инфузионной терапии клинических синдромов тяжелого хирургического сепсиса // Укр. хіміотер. журнал. – 2008. – № 1-2 (22). – С. 254-258.
3. Нестеренко А.Н. Выбор антибактериальной терапии хирургического сепсиса с учетом региональных особенностей роста резистентности его основных возбудителей // Український журнал хірургії. – 2009. – № 2. – С. 101-109.
4. Пат. UA 15271, Україна, МПК6 G 01 N 33/48. Спосіб прогнозування перебігу хірургічного сепсису / Нестеренко О.М.; заявник і патентовласник Донецький держ. мед. університет ім. М.Горького. – № у 2006 00063; заявл. 03.01.06; опубл. 15.05.2006. Бюл. № 6.
5. Стариков Ю.В. Роль молекул оксида азота в программированной гибели нейтрофилов при окислительном стрессе: автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. мед. наук: спец. 03.00.04 «Биохимия» и 14.00.16

- «Патологическая физиология» / Ю.В.Стариков. – Новосибирск, 2008. – 22 с.
6. Черний В.И., Нестеренко А.Н. Нарушения иммунитета при критических состояниях: особенности диагностики // Внутренняя медицина. – № 3, 2007. – С. 25-39.
  7. Castellheim A., Brekke O. – L., Espevik. T., et al. Innate Immune Responses to Danger Signals in Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis // Scandinavian Journal of Immunology. – 2009. – vol. 69. – P. 479-491.
  8. Chakravarti A, Allaey I, Poubelle PE. Neutrophils and immunity: is it innate or acquired ? // Med Sci (Paris). – 2007. – vol. 23. – № 10. – P. 862-867.
  9. Dellinger R.P., Levy M.M., Carlet J.M. et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008 // Intensive Care Med. – 2008. – Vol. 34, № 1. – P. 17-60.
  10. Fialkow L, Filho LF, Bozzetti MC., et al. Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome // Crit Care. – 2006. – № 6. – R155 (doi:10.1186/cc5090). Available online <http://ccforum.com/content/10/6/R155>.
  11. Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, et al. Accelerated Lymphocyte Death in Sepsis Occurs by both the Death Receptor and Mitochondrial Pathways // J Immunol. – 2005. – vol. 174. – P. 5110-5118.
  12. Huet O, Obata R, Aubron C, et al. Plasma-induced endothelial oxidative stress is related to the severity of septic shock // Crit Care Med. – 2007. – vol. 35. – P. 821-826.
  13. Kantari C, Pederzoli – Ribeil M, Witko – Sarsat V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity // Contrib Microbiol. – 2008. – vol. 15. – P. 118-146.
  14. Kempe DS, Akel A, Lang PA, et al. Suicidal erythrocyte death in sepsis // J Mol Med. – 2007. – vol. 85. – № 3. – P. 269-277.
  15. Levy M.M., Marshall J.C., Fink M.P. et al. 2001 SCCM/ESICM/ ACCP/ ATC/ SIS International Sepsis Definitions Conference // Crit. Care Med. – 2003. – vol. 31. – № 4. – P. 1250-1256.
  16. Maianski N.A., Maianski A.N., Kuijpers T.W., Roos D. Apoptosis of Neutrophils // Acta Haematol. – 2004. – vol. 111. – P. 56-66.
  17. Maianski NA, Geissler J, Srinivasula SM, et al. Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis // Cell Death and Differentiation. – 2004. – vol. 11. – P. 143-153.
  18. Martins PS, Kallas EG, Neto MC, et al. Upregulation Of Reactive Oxygen Species Generation And Phagocytosis, And Increased Apoptosis In Human Neutrophils During Severe Sepsis And Septic Shock // SHOCK. – 2003. – vol. 20. – № 3. – P. 208-212.
  19. Moerer O., Quintel M. Definition, Epidemiologie und konomische Aspekte der Sepsis bei Erwachsenen (Sepsis in adult patients – definitions, epidemiology and economic aspects) // Der Internist. – 2009. – DOI 10.1007/s00108 – 008 – 2285 – 7.
  20. Picard K.M., O'Donoghue S.C., Young-Kershaw D.A., Russell K.J. Development and Implementation of a Multidisciplinary Sepsis Protocol // Critical Care Nurse. – 2006. – Vol 26. – № 3. – P. 43-54.
  21. Remick D.G. Pathophysiology of Sepsis // Am J Pathology. – 2007. – vol. 170. – № 5. – P. 435-1444.
  22. Shapiro NI, Howell M, Talmor D, et al. Implementation and Outcomes of the Multiple Urgent Sepsis Therapies (MUST) Protocol // Crit Care Med. – 2006. – vol. 34. – № 4. – P. 1025-1032.
  23. Shimaoka M., Park E.J. Advances in understanding sepsis // Eur J Anaesthesiol Suppl. – 2008. – vol. 42. – P. 146-153.
  24. Unsinger J, McDonough JS, Shultz LD, et al. Sepsis-induced human lymphocyte apoptosis and cytokine production in “humanized” mice // J Leukoc Biol. – 2009. – vol. 86. – Uncorrected Version. Published on April 15, 2009 as DOI:10.1189/jlb.1008615. [www.jleukbio.org](http://www.jleukbio.org)
  25. Wesche-Soldato DE, Lomas – Neira JL, Perl M, et al. The role and regulation of apoptosis in sepsis // Journal of Endotoxin Research. – 2005. – Vol. 11, № 6. – P. 375-382.
  26. Wesche D.E., Lomas – Neira J.L., Perl, M. et al. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock // Journal of Leukocyte Biology. – 2005. – vol. 78. – P. 325-337.