

ПОРУШЕННЯ ЛОКАЛЬНОГО І СИСТЕМНОГО ІМУНІТЕТУ У ХВОРИХ З ГОСТРИМ ФЛЕГМОНОЗНИМ АПЕНДИЦИТОМ НА СТАДІЇ ЗАГОСТРЕННЯ

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця (м. Київ)

ludaalex@ukr.net

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота виконана в рамках програми кафедри хірургії стоматологічного факультету Національного медичного університету імені О.О. Богомольця "Оптимізація вибору пластичного матеріалу при лікуванні гриж живота", № державної реєстрації – 0104U000450, 2006 рік.

Вступ. Перитонеальні макрофаги (ПМ) відіграють важливу роль в контролі над виникненням інфекції та розвитком гострого запального процесу в черевній порожнині [1]. В останні роки досягнуто великого прогресу в розкритті джерел виникнення ПМ та їх участі в особливостях розвитку вродженого і адаптивного імунітету в умовах запалення. Переважна більшість цих досліджень отримана в умовах дослідних моделей інфекційних захворювань з використанням експериментальних тварин, тоді як вивчення властивостей ПМ у людини в нормі і в умовах запалення в черевній порожнині практично не проводилось [2]. Гостре запалення черевної порожнини внаслідок ускладнення післяопераційного періоду у хворих з діагнозом гострий флегмонозний апендицит характеризується різнобічними проявами порушення локального і системного імунітету [2,3]. Це може бути пов'язано як з властивостями різних популяцій і субпопуляцій імунокомпетентних (ІК) клітин, які залучені в місце виникнення запалення, так і з властивостями збудника інфекції [3]. Автори роботи вивчали рецептори вродженого імунітету, такі як SR-A/CD36 на фагоцитах, в умовах розвитку гострого запалення черевної порожнини у нокаутованих мишей при експериментальному перитоніті [3]. Експериментальний перитоніт було отримано шляхом внутрішньочеревного введення суспензії *St. aureus* в кількості 20 μ l, вміст мікробних тіл був 10^9 . Було виявлено збільшення синтезу прозапального цитокіна IL-1 β і зменшення кількості мікробних колоній в черевній порожнині [3]. При цьому кількість перитонеальних макрофагів зменшувалась. Коли цей збудник (золотистий стафілокок) вводили інтраназально, навпаки збільшувалась кількість мікробних колоній в бронхоальвеолярній рідині, кількість альвеолярних макрофагів і нейтрофілів. Кількість прозапальних цитокінів не мала достовірних відмінностей (IL-1 β , IL-6, IL-10) у порівнянні з даними отриманими в групі контролю. Одержані результати свідчать про те, що локальна імунна відповідь в черевній порожнині має протективний характер, тоді як в легенях відсутня захисна дія вродженого імунітету [3]. З метою вивчення особливостей і порушень системного і локального імунітету хворих з ускладненим гострим флегмонозним апендицитом з післяопераційним перитонітом автор даної роботи вирішила зупинитися на вивченні кількісних і якісних характеристик ІК клітин в динаміці системної і локальної імунної відповіді у хворих з несприятливою формою в перебігу післяопераційно-

го перитоніту. Незважаючи на велику кількість досліджень присвячених вивченню цього захворювання у людей, залишається ще багато запитань стосовно окремих етапів процесу фагоцитозу, таких як презентація, поглинання, знешкодження інфекційних збудників у фагосомі, а також локальній продукції прозапальних і супресивних цитокінів та процесу апоптоза. Взаємодія ПМ з іншими ІК клітинами в черевній порожнині, а також вид інфекційного агента – це ті фактори, що безпосередньо впливають на кінцевий результат захворювання – чи одужає хворий на перитоніт, чи хвороба перейде у незворотню стадію – сепсис [4,5,6,7].

Мета роботи. Метою цієї роботи було вивчити порушення системного і локального імунітету хворих з гострим флегмонозним апендицитом з ускладненням – післяопераційним перитонітом, спрогнозувати найбільш ефективний специфічний метод лікування гострого захворювання.

Об'єкт і методи дослідження. У дослідження було включено 50 хворих з гострим флегмонозним апендицитом на стадії загострення з перитонітом. Ці хворі перебували на лікуванні на кафедрі хірургії стоматологічного факультету НМУ імені О.О. Богомольця на території Київської міської клінічної лікарні швидкої медичної допомоги. Групу контролю склали особи без хірургічної патології черевної порожнини та інших запальних захворювань (48 осіб). Аналіз загальних імуноглобулінів (ІГ) проводився на автоматичному аналізаторі Advia 1800 фірми Siemens, USA за методом імунотурбідиметрії. Популяційний і СП склад клітин CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD3+CD4+HLA-DR+, CD19+, NK – CD3-CD16/56+ визначали методом проточної цитометрії, користувались Мон АТ виробництва фірми Mon-Beckman Coulter, USA на проточному цитофлуориметрі FC 500 MPL (USA). Цей метод використовували для встановлення проценту фагоцитозу моноцитів ПК. Всі отримані результати були піддані статистичній обробці для непараметричних критеріїв з використанням програми «Minitab 16». При аналізі використовували тест Колмогорова-Смірнова і порівняння середніх двох незалежних вибірок за критерієм Стьюдента. Кількісні зміни представлені у вигляді середніх значень і середньоквадратичних відхилень.

Результати досліджень та їх обговорення. Автором роботи представлені результати, які демонструють, що у пацієнтів з гострим флегмонозним апендицитом в умовах загострення (перитоніт) спостерігаються зміни у складі ІК клітин периферичної крові (ПК) у порівнянні з аналогічними клітинами, які були отримані у групі контролю. Достовірно збільшувалась кількість активних В-лімфоцитів (CD19+) у хворих на гострий флегмонозний апендицит (ГФА) – $18,0 \pm 0,9\%$ у порівнянні з групою контролю ($12,6 \pm 0,23\%$, $p < 0,001$). Також достовірно зменшувалась

лася кількість активних Т-хелперів (CD3+CD4+HLA-DR+), у хворих (4,7±0,891), у групі контролю (10,8±0,37, $p < 0,001$). Процентний вміст NK клітин (CD3-CD16/56+) у хворих на ГФА теж був знижений порівнюючи з аналогічними даними в групі контролю, у хворих на ГФА з перитонітом процент NK клітин становив (10,9±0,9%), контроль (14,5±0,45% NK клітин, $p < 0,001$) (табл. 1, рис. 1-3). У хворих в період загострення процент фагоцитозу був достатньо високим, але це не впливало на функціональну активність фагоцитів, тому що процес запалення в черевній порожнині посилювався та розповсюджувався. Як моноцити крові, так і тканинні макрофаги не продемонстрували високої функціональної активності процесу фагоцитозу, що пов'язано з порушенням окремих ланок процесу фагоцитозу та локальним продукуванням прозапальних і супресивних цитокінів та процесу апоптоза, що сприяло виникненню ускладнення і розповсюдженню інфекції в черевній порожнині [3,7]. Вивчення локальної імунної відповіді при використанні імуногістохімічного аналізу ІК клітин стінки апендикса у хворих з діагнозом ГФА показало, що збільшувалась кількість В-лімфоцитів (CD20+), тканинних макрофагів апендиксу CD68, Т-лімфоцитів (CD3+), Т-хелперів (CD4+), цитотоксичних Т-лімфоцитів (CD8+), а також зростали індекс проліферації Кі67+ та % індекс проліферації Кі67. У **рисунках 1-3** наведені препарати клітин перитонеального ексудату отримані від хворих з різними формами ГФА, які були забарвлені гематоксилін-еозином [8].

Усі наведені дані демонструють наявність достовірних змін в кількості окремих популяцій субпопуляцій ІК клітин у хворих у порівнянні з особами контрольної групи без інфекційної патології системної імунітету. Порівнюючи дані вивчення системної і локальної імунної відповіді, можна підсумувати, що в цілому вони співпадають, але є і деякі відмінності. Їх можна пояснити наступним чином: різним походженням тканинних макрофагів апендиксу і моноцитів периферичної крові, властивостями збудника інфекції в черевній порожнині, продукцією прозапальних і супресивних цитокінів різної локалізації (в сироватці та черевній порожнині) [1,2,3,9]. На **рисунках 1-3** представлені препарати клітин перитонеального ексудату хворих з різними формами запалення черевної порожнини.

Рівні сироваткового Іg А і Іg G були достовірно вищими у хворих на перитоніт у порівнянні з контрольною групою, $p < 0,05$ (табл. 2). Ці дані співпадають з результатами вивчення вмісту загальних Іg А і Іg G у хворих з інфекційним ураженням черевної порожнини [10]. Автори роботи, які вивчали специфічний гуморальний імунітет як у групі контролю, так і у хворих з інфекційним ураженням черевної порожнини золотистим стафілококом, зазначили, що зміни носили індивідуальний характер як у пацієнтів з інфекцією, так і в контрольній групі [11]. Але найбільше зростання відбувалось у хворих з боку специфічного Іg G. В меншій мірі зростав рівень специфічного Іg А. Зміни рівня специфічного Іg М мали лише тенденцію до збільшення [11]. Ці відмінності у результатах пояснюються тим, що у даній роботі досліджувались рівні загальних сироваткових імуноглобулінів, тоді як у зазначеній вище роботі вивчали рівні специфічних до білків стафілококу Іg різних класів (А, G, М) [11].

Таблиця 1.

Вміст імунологічних клітин і фагоцитарна активність моноцитів периферичної крові хворих з гострим флегмонозним апендицитом (%), M±m

Показники	Контроль, n=48	Хворі, n=50	p
CD3+	72,5±0,11	75,0±5,4	0,270
CD3+CD4+	47,5±0,11	46,0±4,4	0,360
CD3+CD4+HLA-DR+	10,8±0,37	4,7±4,2	<0,001
CD3+CD8+	21,9±0,24	22,9±1,2	0,214
CD19+	12,6±0,23	18,0±0,9	<0,001
CD3-CD16/56+	14,5±0,45	10,9±1,0	<0,001
Фагоцитоз	90,8±0,01	89,0±3,8	0,170

Таблиця 2.

Рівень загальних імуноглобулінів класів А, М, G хворих на гострий флегмонозний апендицит, (г/л)

Показники	IgA	IgM	IgG
Контроль, n=48	1,4±0,30	1,1±0,19	9,4±0,16
Хворі, n=50	2,4±0,4	1,0±0,2	7,6±0,8
p	<0,05	0,730	<0,05

Висновки. Дані, по складу ІК клітин периферичної крові пацієнтів з ГФА, отримані при вивченні складу імунокомпетентних клітин при оцінці системного імунітету, відрізняються від тих, що були представлені при морфологічному дослідженні тканини стінки апендикса.

В умовах системної відповіді, кількість В-клітин (CD19+) збільшувалась, а кількість активних Т-хелперів (CD3+CD4+HLA-DR+) і NK клітин (CD3-CD16/56+) зменшувалась, тоді як при локальній імунній відповіді збільшувалась кількість В-лімфоцитів (CD20+) і перитонеальних макрофагів (CD68+) в умовах післяопераційного ускладнення ГФА при перитоніті. Крім того спостерігалась висока проліферативна активність Кі67. Подальше вивчення системної та локальної імунної відповіді буде сприяти успіхам в лікуванні хворих на перитоніт і значно знизить кількість померлих від гострого флегмонозного апендициту внаслідок перитоніту.

Перспективи подальших досліджень. Існує велика кількість досліджень патогенезу гострого запалення в черевній порожнині на стадії загострення при

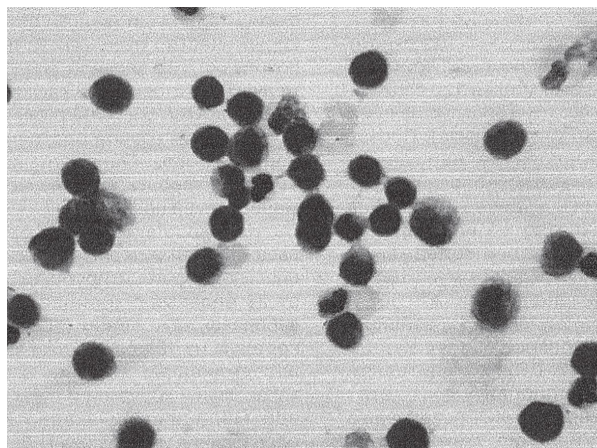


Рис. 1. Клітини перитонеального ексудату хворого (Ш.А.П) з серозно-фібринозним перитонітом, в якому превалює інфільтрація лімфоцитів. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення x900.

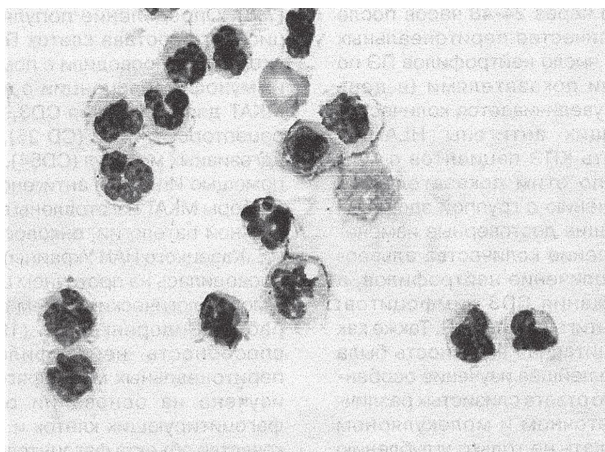


Рис. 2. Клітини перитонеального ексудату хворого (Ф.К.К) з гнійно-фібринозним перитонітом, у якому преважують нейтрофіли (до 89%), макрофаги і лімфоцити практично відсутні. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення $\times 900$.

перитоніті. Вони базуються на використанні експериментальних і клінічних даних вивчення системного і локального імунітету, і патогенетичного порушення цих механізмів при перитоніті. Роботу в цьому напрямку необхідно продовжувати, тому що виникає багато запитань, які потребують подальшого вивчення. Перспективним є дослідження мікрооточення ІК

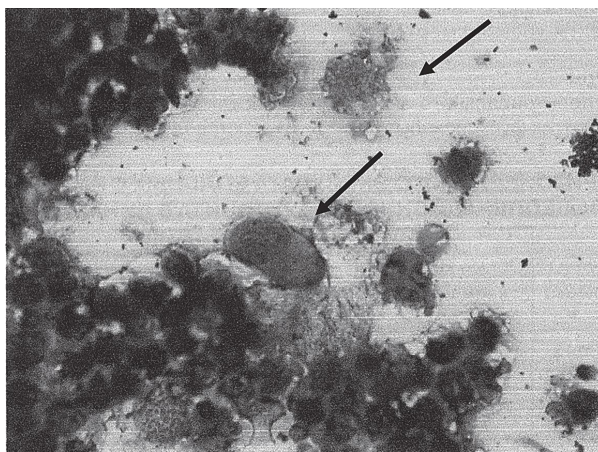


Рис. 3. Клітини перитонеального ексудату хворого (Ж.А.І) з гнійно-фібринозним перитонітом на термінальній стадії. На фото представлені гігантські клітини, а також багато зруйнованих клітин. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення $\times 900$.

клітин, в якому відбувається безпосередній контакт цих клітин і різних біорегуляторів, таких як прозапальні і супресивні цитокіни та патогени. Нові дані дозволяють знайти специфічний, ефективний метод профілактики і лікування ГФА при його ускладненні (перитоніті).

Література

1. Dosch M, Zindel J, Jebbawi F, Melin N, Sanchez-Taltavull D, Stroka D, et al. Connexin-43-dependent ATP release mediates macrophage activation during sepsis. *eLife*. 2019;8:e42670.
2. Ruiz-Alcaraz AJ, Carmona-Martínez V, Tristan-Manzano M, Machado-Linde F, Sanchez-Ferrer ML, Garcia-Penarrubia P, et al. Characterization of human peritoneal monocyte/macrophage subsets in homeostasis: Phenotype, GATA6, phagocytic/oxidative activities and cytokines expression. *Scientific Reports* 8. 2018;8:12794.
3. Blanchet C, Jouvion G, Fitting C, Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Protective or deleterious role of scavenger receptors SR-A and CD36 on host resistance to *Staphylococcus aureus* depends on the site of infection. *PLOS One*. 2014;9(1):e87927.
4. Cassado AA, D'Imperio Lima MR, Bortoluci KR. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Front Immunol*. 2015;5:225.
5. Babic ZM, Zunic FZ, Pantic JM, Radosavljevic GD, Jovanovic IP, Arsenijevic NN, et al. IL-33 receptor (ST2) deficiency downregulates myeloid precursors, inflammatory NK and dendritic cells in early phase of sepsis. *J Biomed Sci*. 2018;25:56-68.
6. Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med*. 2017;214(7):1913-23.
7. Obuz E, Arslan RS, Kucuk S. An unusual cause of phlegmonous appendicitis, actinomycosis: a case report. *Gastroenterology & Hepatology: Open Access*. 2019;10(2):104-6.
8. Kuyun L, Kurchenko I, Bisyuk Yu. Immunohistochemical analysis of appendix cell wall infiltrate in acute phlegmonous appendicitis. *Georg. Med. News*. 2017;9(270):15-9.
9. Laurin LP, Brissette MJ, Lepage S, Cailhier JF. Regulation of experimental peritonitis: a complex orchestration. *Nephron Exp. Nephrol*. 2012;120:e41-e46. DOI: 10.1159/000334169
10. Lebedev KA, Ponyakina ID. Konflikt organizma cheloveka s yego mikrofloroy. *Zhurnal Priroda*. 2007;7:20-8. [in Russian].
11. Dryla A, Prustomersky S, Gelbmann D, Hanner M, Bettinger E, Kocsis B. Comparison of Antibody Repertoires against *Staphylococcus aureus* in Healthy Individuals and in Acutely Infected Patients. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12(3):387-98.

ПОРУШЕННЯ ЛОКАЛЬНОГО І СИСТЕМНОГО ІМУНІТЕТУ У ХВОРИХ З ГОСТРИМ ФЛЕГМОНОЗНИМ АПЕНДИЦИТОМ НА СТАДІЇ ЗАГОСТРЕННЯ

Куюн Л. О.

Резюме. Метою цієї роботи було вивчити порушення системного і локального імунітету хворих з гострим флегмонозним апендицитом з ускладненням – післяопераційним перитонітом та спрогнозувати найбільш ефективний специфічний метод лікування гострого захворювання. У пацієнтів (50 хворих) з гострим флегмонозним апендицитом на стадії загострення (при перитоніті) відбуваються певні зміни у складі ІК клітин периферичної крові у порівнянні з аналогічними даними, одержаними у групі контролю (48 осіб). Достовірно збільшувалась кількість В-лімфоцитів (CD19+) у хворих на гострий флегмонозний апендицит (ГФА) ($18,0 \pm 0,9\%$) у порівнянні з групою контролю ($12,6 \pm 0,23\%$, $p < 0,001$). Також достовірно зменшувалась кількість CD3+CD4+HLA-DR+ у хворих ($4,7 \pm 0,891$), у групі контролю ($10,8 \pm 0,37$, $p < 0,001$). Процентний вміст NK клітин (CD3-CD16/56+) у хворих на ГФА теж був знижений порівнюючи з аналогічними даними в групі контролю: у хворих на ГФА з перитонітом процент NK клітин становив ($10,9 \pm 0,9\%$), контроль ($14,5 \pm 0,45\%$ NK клітин, $p < 0,001$). Вивчення локальної імунної відповіді при використанні імуногістохімічного аналізу ІК клітин стінки апендикса у хворих показало, що збільшувалась кількість В-лімфоцитів (CD20+) і перитоніальних макрофагів (CD68+) у порівнянні з вмістом популяції цих імунних клітин у осіб без гострого запалення черевної порожнини. Найбільш перспективним є індивідуальний підхід, тому що як системний, так і локальний імунітет мають свої відмінності,

урахування яких буде сприяти успіхам в лікуванні хворих на перитоніт і значно знизить кількість померлих від гострого флегмонозного апендициту внаслідок перитоніту.

Ключові слова: гострий флегмонозний апендицит, перитоніт, загострення, системний і локальний імунітет, перитоніальні макрофаги, моноцити, прозапальні цитокіни.

НАРУШЕНИЕ ЛОКАЛЬНОГО И СИСТЕМНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ ФЛЕГМОНОЗНЫМ АППЕНДИЦИТОМ НА СТАДИИ ОБОСТРЕНИЯ

Куюн Л. А.

Резюме. Целью данной работы было изучить нарушения системного и локального иммунитета больных с острым флегмонозным аппендицитом с осложнением – послеоперационным перитонитом и спрогнозировать наиболее эффективный специфический метод лечения острого заболевания. У пациентов (50 больных) с острым флегмонозным аппендицитом на стадии обострения (при перитоните) происходят определенные изменения в составе ИК клеток периферической крови по сравнению с аналогичными данными, полученными в группе контроля (48 лица). Достоверно увеличивалось количество В-лимфоцитов (CD19+) у больных острым флегмонозным аппендицитом (ГФА) ($8,0 \pm 0,9$), в группе контроля ($12,6 \pm 0,23 < 0,001$). Также достоверно уменьшалось количество (CD3+CD4+HLA-DR+) у больных ($4,7 \pm 0,891$), в группе контроля ($10,8 \pm 0,37$, $p < 0,001$). Процентное содержание NK клеток (CD3 – CD16/56) у больных с ГФА тоже был снижен по сравнению с аналогичными данными в группе контроля: у больных с ГФА с перитонитом процент NK клеток составил ($10,9 \pm 0,9\%$), контроль ($14,5 \pm 0,45\%$ NK клеток, $p < 0,001$). Изучение локального иммунного ответа при использовании иммуногистохимического анализа ИК клеток стенки аппендикса у больных с диагнозом ГФА показало, что увеличивалось количество В-лимфоцитов (CD20+) и перитонеальных макрофагов (CD68+) по сравнению с содержанием популяций этих иммунных клеток у лиц без острого воспаления брюшной полости. Наиболее перспективным является индивидуальный подход, потому что как системный, так и локальный иммунитет имеют свои отличия, учитывать которые необходимо, чтобы способствовать успехам в лечении больных перитонитом и значительно снизит количество умерших от острого флегмонозного аппендицита в результате перитонита.

Ключевые слова: острый флегмонозный аппендицит, перитонит, обострение, системный и локальный иммунитет, перитоніальні макрофаги, моноцити, провоспалительные цитокіни.

LOCAL AND SYSTEMIC IMMUNITY DEFICIENCY IN PATIENTS WITH ACUTE PHLEGMONOUS APPENDICITIS DURING EXACERBATION

Kuyun L. A.

Abstract. Objective. The purpose of this research was to study the systemic and local immune disorders in patients with acute phlegmonous appendicitis during exacerbation (post-surgery peritonitis) to discover the most efficient specific treatment method.

Object and methods. Materials used in the research were obtained from 50 acute phlegmonous appendicitis patients during the exacerbation stage (peritonitis). There were 48 healthy individuals in the control group (without peritoneal pathologies and infections in other systems). Analysis of the serum levels of immunoglobulins (Ig) A, M, and G was conducted using an immunoturbidimetric method. The population and subpopulations of the immune cells were identified using an immunofluorescence flow cytometry method. The same method was used to evaluate phagocytic activity of monocytes in the peripheral blood. The data obtained during the research was statistically processed.

Results and their discussion. Analysis of the material taken from 50 post-surgical peritonitis patients with acute phlegmonous appendicitis (APA) during exacerbation showed certain changes in immunocompetent cells of the peripheral blood. The results were compared against those obtained from a control group (48 healthy individuals in the control group without peritoneal pathologies and infections in other systems). There was a significant increase in B-lymphocytes (CD19+) in APA patients ($18,0 \pm 0,9\%$) compared to the control group samples ($12,6 \pm 0,23\%$, $p < 0,001$). Activated T-helper cells (CD3+CD4+HLA-DR+) in APA patients decreased significantly ($4,7 \pm 0,891$) in the peripheral blood, compared to the numbers in the control group ($10,8 \pm 0,37$, $p < 0,001$). Similarly, the content of NK cells (CD3-CD16/56+) in those same patients was also lower comparing to the control group (in APA peritonitis patients the percentage of NK cells was ($10,9 \pm 0,9\%$), the control group ($14,5 \pm 0,45\%$ NK клітин, $p < 0,001$). Studying the local immune response using immunohistochemical analysis of the IC cells of the appendix walls in APA patients showed increased numbers of B-lymphocytes (CD20+) and peritoneal macrophages (CD68+) when compared to the content of the same populations of immune cells in the control group.

Significance of the research. The systemic and local immune response have certain differences that need to be accounted for in order to achieve success in treating peritonitis patients. Individual approach in treatment will help to dramatically decrease the number of deaths due to peritonitis as a complication of acute phlegmonous appendicitis.

Key words: acute phlegmonous appendicitis, peritonitis, exacerbation, local and systemic immunity, proinflammatory cytokines.

Рецензент – проф. Скрипник І. М.
Стаття надійшла 10.06.2019 року