

Ю.С. ВИННИК <sup>1</sup>, Р.А. ПАХОМОВА <sup>1</sup>,  
Л.В. КОЧЕТОВА <sup>1</sup>, В.В. КОЗЛОВ <sup>2</sup>



## **ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ И ЦИТОАРХИТЕКТОНИКА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХОЙ**

Красноярский государственный медицинский университет имени  
профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого <sup>1</sup>, г. Красноярск,  
Первый Московский государственный медицинский университет  
имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) <sup>2</sup>, г. Москва,  
Российская Федерация

**Цель.** Изучить функциональную активность и цитоархитектонику нейтрофильных гранулоцитов методом атомно-силовой микроскопии у пациентов с механической желтухой доброкачественного генеза разной степени тяжести.

**Материал и методы.** Объектом исследования были 92 пациента в возрасте от 47 до 69 лет, находившиеся на стационарном лечении в хирургических отделениях лечебных учреждений г. Красноярска с диагнозом механической желтухи доброкачественного генеза. Контрольную группу составили 60 доноров, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой. В зависимости от степени тяжести механической желтухи исследовали люминол-зависимую хемилюминесценцию нейтрофилов и выполняли атомно-силовую микроскопию нейтрофильных гранулоцитов с определением формы, состояния мембраны, геометрических размеров и сил адгезии нейтрофилов крови.

**Результаты.** У пациентов с механической желтухой интенсивность спонтанной хемилюминесценции зависит от степени тяжести механической желтухи. Кинетика хемилюминесцентного ответа нейтрофилов периферической крови свидетельствует о повышении компенсаторных функциональных возможностей этой клеточной популяции при легкой степени тяжести механической желтухи с их истощением параллельно нарастанию степени тяжести механической желтухи.

При атомно-силовой микроскопии выявлены нарушения структурной организации нейтрофильного гранулоцита. С увеличением степени тяжести механической желтухи нейтрофил приобретал выпуклую форму, увеличивалось количество сегментов ядра, мембрана клетки становилась неровной, объем нейтрофила достигал  $62,20 \pm 5,94$  мкм<sup>3</sup>. Величина сил адгезии нейтрофилов падала на 25% у пациентов со степенью тяжести механической желтухи класса В и на 31% при степени тяжести механической желтухи класса С.

**Заключение.** На основании анализа хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов и их цитоархитектоники пришли к заключению, что функциональные возможности нейтрофильных гранулоцитов при механической желтухе истощаются параллельно нарастанию степени тяжести механической желтухи. Дисфункции нейтрофилов при механической желтухе вызваны изменением их цитоархитектоники и снижением сил адгезии.

*Ключевые слова:* механическая желтуха, хемилюминесцентный ответ, атомно-силовая микроскопия, цитоскелет, нейтрофил

**Objective.** To study the functional activity and cytoarchitectonics of neutrophilic granulocytes by the atomic force microscopy technique in the patients with mechanical jaundice of benign genesis of varying severity.

**Methods.** The subject of the study were 92 patients aged from 47 to 69 years undergoing the in-patient treatment in the surgical departments of medical institutions in Krasnoyarsk with the diagnosis of mechanical jaundice of benign genesis. The control group consisted of 60 donors, comparable in sex and age with the main group. Depending on the severity of mechanical jaundice, luminol-dependent chemiluminescence of neutrophils was investigated and atomic-force microscopy of neutrophilic granulocytes was performed to determine the shape, membrane state, geometric dimensions and adhesion forces of the blood neutrophils.

**Results.** In patients with mechanical jaundice, the intensity of spontaneous chemiluminescence depends on the severity of mechanical jaundice. The kinetics of the chemiluminescent response of the peripheral blood neutrophils indicates an increase in the compensatory functional capacity of this cell population in case of mild degree of mechanical jaundice severity with their depletion in parallel with the increase in the severity of mechanical jaundice.

Atomic force microscopy revealed violations of the structural organization of the neutrophil granulocyte. With increasing severity of mechanical jaundice, neutrophil became convex in shape, the number of segments of the nucleus increased, the cell membrane became irregular, the neutrophil volume reached  $62.20 \pm 5.94$  m<sup>3</sup>. The magnitude of the adhesion forces of neutrophils decreased by 25% in patients with class B severity of mechanical jaundice and by 31% with class C severity of mechanical jaundice.

**Conclusions.** Based on the analysis of the chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes and their cytoarchitectonics, we concluded that the functional capabilities of neutrophilic granulocytes in mechanical jaundice are depleted in parallel with the increase in the severity of mechanical jaundice. Dysfunctions of neutrophils in mechanical jaundice are caused by the change in its cytoarchitectonics and by the decrease in adhesion forces.

*Keywords:* mechanical jaundice, chemiluminescent response, atomic force microscopy, cytoskeleton, neutrophil

**Novosti Khirurgii. 2018 Jan-Feb; Vol 26 (1): 42-50**

**Chemiluminescent Activity and Cytoarchitectonics of Neutrophilic Granulocytes in Patients with Mechanical Jaundice**

**Y.S. Vinnik, R.A. Pakhomova, L.V. Kochetova, V.V. Kozlov**

#### **Научная новизна статьи**

На основании анализа хемилуминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов и результатов изучения их цитоскелета методом атомно-силовой микроскопии доказано, что функциональные возможности нейтрофильных гранулоцитов истощаются параллельно нарастанию степени тяжести механической желтухи. Увеличение объема нейтрофильного гранулоцита и значительное снижение сил адгезии вызывает нарушения второй фазы фагоцитоза, что свидетельствует о вторичном иммунодефиците, проявления которого зависят от степени тяжести механической желтухи.

#### **What this paper adds**

Based on the analysis of the chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes and the results of studying their cytoskeleton by atomic force microscopy technique, it has been proved that the functional capabilities of neutrophilic granulocytes are depleted in parallel with the increase in the severity of mechanical jaundice. An increase in the volume of neutrophilic granulocyte and a significant decrease in adhesion forces cause disturbances in the second phase of phagocytosis, indicating a secondary immunodeficiency, the manifestations of which depend on the severity of mechanical jaundice.

#### **Введение**

Механическая желтуха (МЖ) является одним из наиболее тяжелых осложнений при заболеваниях органов гепатопанкреатодуоденальной зоны. Применение современных малоинвазивных методов в хирургии желчных путей, интенсивной терапии и адекватного анестезиологического пособия позволило улучшить результаты лечения пациентов с МЖ. Однако уровень летальности до настоящего времени остается высоким и, по данным разных авторов, колеблется от 4,7 до 24,5% [1, 2].

Холангиовенозный и холангиолимфатический рефлюкс с массивным выбросом в системный кровоток и лимфоток бактерий, эндотоксинов, компонентов желчи, продуктов клеточной деградации происходит при повышении давления в холедохе до 300-450 мм вод.ст., что, в свою очередь, вызывает развитие системной эндотоксемии. Интоксикация, развивающаяся при МЖ нарушает функционирование иммунной системы [3, 4].

Помимо индивидуальных особенностей организма пациента и риска развития заболевания, в формировании иммунологических расстройств большое значение имеют и экологические, и техногенные факторы. Кроме того, хирургическое вмешательство, вид обезболивания и иммунотоксическое действие лекарственных препаратов значительно снижают фагоцитоз и вызывают вторичный иммунодефицит [2, 4].

В условиях МЖ происходит нарушение функционирования как фагоцитарной кле-

точной, так и гуморальной составляющей иммунной системы организма. По данным одних авторов, это проявляется в угнетении активности лейкоцитов и подавлении секреторной функции нейтрофилов [3, 5, 6]; результаты исследования других авторов свидетельствуют об активации лейкоцитов периферической крови и избыточной продукции свободнорадикальных метаболитов кислорода у пациентов с МЖ [4, 7]. Уменьшение фагоцитарной активности лейкоцитов, угнетение внутриклеточного переваривания микроорганизмов и снижение бактерицидной активности крови в раннем послеоперационном периоде после декомпрессии желчных путей даже несколько усиливаются.

По всей видимости, при МЖ формируется дисбаланс в системе иммунореактивности, который проявляется изменением количества клеток иммунной системы, их функциональной недостаточностью, дисбалансом в клеточном и гуморальном звеньях иммунного ответа. Неоднородность пациентов по тяжести состояния, генезу механической желтухи, малочисленность обследуемых пациентов в группах, исследование отдельных звеньев иммунной системы обуславливают противоречивость научных данных о состоянии иммунной системы и фагоцитарной активности лейкоцитарного ряда у пациентов с МЖ.

Исследования состояния иммунного статуса у пациентов с МЖ доброкачественного генеза разной степени тяжести практически отсутствуют, что требует дальнейшего изучения и клинической оценки параметров иммунореактивности.

**Цель.** Изучить функциональную активность и цитоархитектонику нейтрофильных гранулоцитов методом атомно-силовой микроскопии у пациентов с механической желтухой доброкачественного генеза разной степени тяжести.

### Материал и методы

Объектом исследования были 92 пациента в возрасте от 47 до 69 лет, находившихся на лечении в лечебных учреждениях г. Красноярска с диагнозом механической желтухи доброкачественного генеза.

Диагноз ставили на основании клинко-лабораторного исследования, УЗИ органов брюшной полости, рентгенологических и эндоскопических методов исследования. При необходимости выполнялась компьютерная томография органов брюшной полости. На все виды исследований были получены разрешения этического комитета ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого». Исследования проводились с соблюдением рекомендаций, этических норм и принципов, установленных в Декларации (Хельсинки, 1964 г.), регламентирующей научные исследования на человеке.

Степень тяжести МЖ определяли по классификации Э.И. Гальперина (2012 г.) [1]. В первую группу вошел 31 пациент с тяжестью МЖ класса А, средний возраст которых составил  $61,2 \pm 8,1$  года ( $M \pm \sigma$ ), во вторую группу – 32 пациента с тяжестью МЖ класса В, средний возраст которых был  $60,9 \pm 7,4$  года ( $M \pm \sigma$ ), в третью группу – 29 пациентов со средним возрастом  $62,3 \pm 7,6$  года ( $M \pm \sigma$ ) и степенью тяжести МЖ класса С. Группы сопоставимы по половой принадлежности пациентов. Контрольную группу составили 60 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой.

Кроме клинического анализа крови для оценки степени интоксикации и состояния резистентности организма определяли люминол-зависимую хемилуми-несценцию (ХЛ) нейтрофилов периферической крови по методу De Sole al. [8]. Опсонизированный зимозан использовали в качестве индуктора дыхательного взрыва. При исследовании спонтанной и индуцированной ХЛ анализировали максимальное значение интенсивности ХЛ ( $I_{max}$ ), время выхода на максимум интенсивности ( $T_{max}$ ) и площадь кривой ХЛ ( $S$ ). Усиление ХЛ, индуцированной зимазином, оценивали на основании индекса активации (ИА), который рассчитывали как соотношение площади под кривой, индуцированной ХЛ, к площади кривой, спонтанной ХЛ.

На атомно-силовом микроскопе Integra Aura (NT-MDT, Россия) (АСМ) изучены структурно-функциональные свойства нейтрофильных гранулоцитов. Сканирование поверхности образцов проводили в полуконтактном, а при измерении сил адгезии – в контактном режиме на воздухе. Использовали кремниевые зонды серии NSG01 (NT-MDT, Россия) жесткостью 7,2 нН/нм, резонансной частотой 190 кГц, при этом длина кантилевера составляла 125 мкм, ширина – 20 мкм, толщина – 3 мкм. В работе использовали программное обеспечение АСМ NOVA для получения изображений и программу Image Analysis для анализа изображений. Для анализа сканов использовали метод мазка крови, на котором выбирались отдельные нейтрофилы, чтобы исключить механическое воздействие соседних клеток и искажение морфологии. Число клеток для анализа варьировалось в пределах 20-30 нейтрофилов для каждого образца, при этом каждая исследуемая клетка была просканирована дважды: первый раз клетка целиком, второй раз – мембрана клетки для анализа ее состояния.

### Статистика

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft, USA). Характер распределения изучаемых признаков определялся при помощи критерия Шапиро-Уилка. В зависимости от характера распределения переменных описательная статистика представлена средними арифметическими и стандартными отклонениями (при нормальном распределении) и медианой и квартилями (при распределениях, отличающихся от нормального). Статистическую значимость различий между показателями нормально распределенных независимых выборок при условии множественных сравнений оценивали при помощи дисперсионного анализа с последующими парными сравнениями групп по критерию Шеффе, в случаях отсутствия нормального распределения использовали критерий Краскела-Уоллиса и парные сравнения по критерию Манна-Уитни. При этом для решения проблемы статистической значимости различий при множественных сравнениях использовали поправку Бонферрони. В результате статистически значимым уровнем различий при сравнении 3 групп считали  $p < 0,017$ , при сравнении 4 групп –  $p < 0,008$ .

### Результаты

Данные общего анализа крови (таблица 1)

Таблица 1

Клинический анализ крови пациентов при разной степени тяжести МЖ								
	Hb (M±σ)	СОЭ (M±σ)	WBC – (N4-8,5× 10 <sup>9</sup> /L) (M±σ)	NEUT (N46- 70,5%) (M±σ)	LYMPH (22-44%) (M±σ)	MONO (4-10%) (M±σ)	EO (1-6%) (M±σ)	BASO (0-1,9%) (M±σ)
Класс А (1)	111,67±15,59	40,4±10,09	5,43±0,3	51,7±9,5	35,48±5,2	8,11±1,2	2±0,26	0,22±0,13
Класс В (2)	126,4±16,4	36±13,13	13,23±0,1	65,5±7,8	20,96±6,4	6,7±1,1	1,8±0,46	0,33±0,15
Класс С (3)	123,86±14,37	41,14±10,77	6,38±0,2	36,89±8,6	50,78±4,2	7,1±1,3	6,21±0,41	0,25±0,16
p	p <sub>1-2</sub> <0,001 p <sub>1-3</sub> <0,001 p <sub>2-3</sub> =0,419	p <sub>1-2</sub> =0,142 p <sub>1-3</sub> =0,784 p <sub>2-3</sub> =0,122	p <sub>1-2</sub> <0,001 p <sub>1-3</sub> <0,001 p <sub>2-3</sub> <0,001	p <sub>1-2</sub> <0,001 p <sub>1-3</sub> <0,001 p <sub>2-3</sub> <0,001	p <sub>1-2</sub> <0,001 p <sub>1-3</sub> <0,001 p <sub>2-3</sub> <0,001	p <sub>1-2</sub> <0,001 p <sub>1-3</sub> =0,003 p <sub>2-3</sub> =0,198	p <sub>1-2</sub> =0,055 p <sub>1-3</sub> <0,001 p <sub>2-3</sub> <0,001	p <sub>1-2</sub> =0,003 p <sub>1-3</sub> =0,427 p <sub>2-3</sub> =0,052

Примечание: Hb – гемоглобин, СОЭ – скорость оседания эритроцитов, WBC – лейкоциты, NEUT – нейтрофилы, LYMPH – лимфоциты, MONO – моноциты, EO – эозинофилы, BASO – базофилы; p<sub>1-2</sub>, p<sub>2-3</sub>, p<sub>1-3</sub> – различия между группами 1, 2, 3, соответствующие классам тяжести механической желтухи А, В, С.

показали, что у пациентов со степенью тяжести МЖ класса В определялся умеренный лейкоцитоз, нейтрофилов было больше, а лимфоцитов и моноцитов меньше по сравнению с пациентами с МЖ класса А (p < 0,05). У пациентов с МЖ со степенью тяжести класса С количество нейтрофилов было меньше, а лимфоцитов больше, чем у больных МЖ класса А и В. Различия в количестве эозинофилов и базофилов у пациентов с МЖ класса А и класса В статистически незначимы, а у пациентов со степенью тяжести МЖ класса С количество эозинофилов статистически значимо больше, количество базофилов по сравнению с контрольной группой и пациентами с легкой и средней степенью тяжести МЖ оставалось на прежнем уровне на фоне статистически значимо меньшего количества нейтрофилов по

сравнению с первой и второй группами.

Показатели хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с разной степенью тяжести МЖ представлены в таблице 2.

При исследовании хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов крови у пациентов со степенью тяжести МЖ класса А, по сравнению с контрольной группой обнаружено статистически значимое повышение максимума интенсивности (p ≤ 0,001) и площади спонтанной ХЛ (p ≤ 0,001). Кроме того, у пациентов этой группы имелась тенденция к замедлению времени выхода на максимум (p ≤ 0,001) спонтанной хемилюминесценции. При исследовании зимозан-индуцированной ХЛ у пациентов с легкой степенью тяжести МЖ установлено, что время выхода на максимум

Таблица 2

#### Показатели функционально-метаболической активности нейтрофилов у пациентов с механической желтухой разной степени тяжести

Показатели	Класс А	Класс В	Класс С	Норма
	1	2	3	4
	Me (C <sub>25</sub> ; C <sub>75</sub> )	Me (C <sub>25</sub> ; C <sub>75</sub> )	Me (C <sub>25</sub> ; C <sub>75</sub> )	Me (C <sub>25</sub> ; C <sub>75</sub> )
T <sub>maxc</sub>	1583 (1476;1933)	1569 (1096;2448)	1694 (1062;2273)	975 (211;1510)
I <sub>maxc</sub>	46029 (26884;65174)	13922 (6118;19925)	15302 (7711;29712)	7720 (3000;19000)
Squr <sub>I(c)</sub> (*10 <sup>6</sup> )	1,54 (0,77;9,77)	p <sub>1-2</sub> <0,001; p <sub>1-3</sub> <0,001; p <sub>1-4</sub> <0,001; p <sub>2-4</sub> <0,001 2,16 (1,14;3,79)	2,81 (1,67;5,59)	0,22 (0,15;0,54)
T <sub>maxi</sub>	2312 (1918;3761)	1448 (1123;1949)	1684 (1032;2579)	1102,5 (872;1800)
I <sub>maxi</sub>	11038 (8698;46947)	22257 (6703;31124)	30090 (21449;47302)	17270 (8000;42840)
Squr <sub>i</sub> (*10 <sup>6</sup> )	2,26 (1,78;12,98)	p <sub>1-4</sub> <0,001 4,5 (1,36;7,55)	5,33 (4,04;8,43)	0,4 (0,15;0,95)
Индекс активации S <sub>1</sub> /S <sub>2</sub>	1,39 (1,35;1,43)	p <sub>1-3</sub> =0,002 1,88 (1,41;2,27)	p <sub>1-4</sub> <0,001; p <sub>2-4</sub> <0,001; p <sub>3-4</sub> <0,001; p <sub>1-3</sub> =0,001 1,48 (1,25;2,99)	1,3 (0,9;2,0)

Примечание: p<sub>1-2</sub>, p<sub>2-3</sub>, p<sub>1-3</sub> – статистически значимые различия между группами 1, 2, 3, соответствующие классам тяжести механической желтухи А, В, С; p<sub>1-4</sub>, p<sub>2-4</sub>, p<sub>3-4</sub> – статистически значимые различия групп наблюдения с контрольной группой.

зимозан-индуцированной ХЛ снижается в 2 раза и в 5,7 раза увеличивается площадь под кривой зимозан-индуцированной ХЛ ( $p \leq 0,001$ ).

У пациентов с тяжестью МЖ класса В ХЛ – ответ и уровень интенсивности не отличались статистически значимо от нормативных параметров (таблица 2). В то время как площадь спонтанной ХЛ-кривой превышала нормальные показатели в 11,3 раза ( $p \leq 0,001$ ).

При оценке показателей спонтанной ХЛ нейтрофильных гранулоцитов крови у пациентов с тяжестью МЖ класса С регистрировалось статистически значимое увеличение площади под кривой ХЛ ( $p \leq 0,001$ ) по сравнению с величинами нормы. Кроме того, обнаружено снижение максимума интенсивности относительно показателей, зарегистрированных у пациентов с классом тяжести МЖ А ( $p \leq 0,001$ ). Анализ показателей зимозан-индуцированной ХЛ выявил самую высокую величину площади под кривой ХЛ, превышающую норму в 13,3 раза ( $p \leq 0,001$ ) и в 2,4 раза величины в группе пациентов с тяжестью МЖ класса А ( $p \leq 0,001$ ).

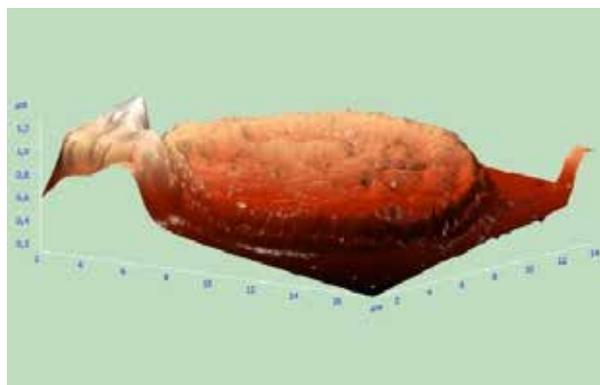
Следует отметить, что компенсаторные метаболические возможности нейтрофилов периферической крови у пациентов с МЖ в нагрузочных тестах сохраняются, о чем свидетельствуют

показатели индекса активации. Таким образом, при исследовании хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови установлено, что интенсивность спонтанной хемилюминесценции у пациентов с механической желтухой отличается от нормы и зависит от степени тяжести механической желтухи. Выявлено, что у пациентов с тяжестью МЖ класса А самая высокая интенсивность спонтанной ХЛ, при этом интенсивность зимозан-индуцированной ХЛ нейтрофильных гранулоцитов значимо выше в группе пациентов с тяжестью МЖ класса С. Не зависимо от степени тяжести МЖ в периферической крови выявлена тенденция к снижению времени выхода на максимум как спонтанной, так и зимозан-индуцированной ХЛ и отмечено значимое увеличение площади под кривой.

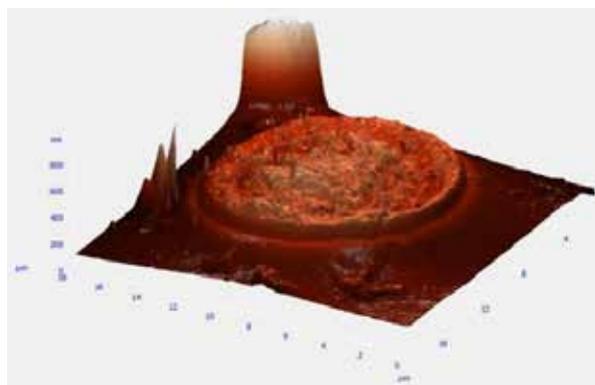
С целью исследования цитоархитектоники нейтрофильных гранулоцитов использовали метод атомно-силовой микроскопии.

При сканировании нейтрофилов на АСМ получены изображения отдельно лежащих нейтрофилов (рис. 1). У лиц контрольной группы обнаружены нейтрофилы с правильной округлой формой и четко определяющимся сегментированным ядром. С увеличением степени

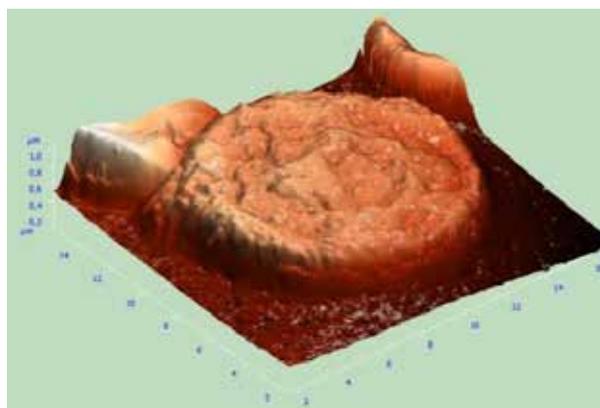
**Рис. 1 . Сканы 3D нейтрофилов пациентов с МЖ разной степени тяжести, полученные при атомно-силовой микроскопии.**



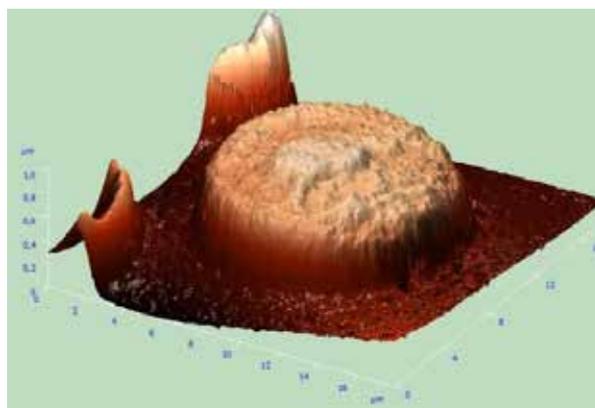
**Норма**



**Класс А**



**Класс В**



**Класс С**

Средние значения основных измеряемых величин нейтрофилов пациентов с МЖ разной степени тяжести

Классы	S, мкм <sup>2</sup> (M±σ)	V, мкм <sup>3</sup> (M±σ)	F±F, нН по пробе (M±σ)
Норма	129,21±9,23	51,00±5,00	1,04±0,03
Класс А	126,51±4,15	50,38±2,90	0,81±0,01
Класс В	118,88±7,42	45,32±3,28	0,77±0,01
Класс С	127,18±4,72	62,20±5,94	0,76±0,01

Примечание: S – площадь нейтрофилов, V – объем нейтрофилов, F<sub>cp</sub>±ΔF – сила адгезии.

тяжести МЖ нейтрофил приобретает выпуклую форму, количество сегментов ядра уменьшается, они становятся размытыми, мембрана клетки – неровной. На мембране появляется большое количество пор со средними ориентированными значениями диаметров и глубин, равными 500 и 300 нм.

Величина площади сегментоядерных нейтрофилов у пациентов с МЖ не зависит от степени ее тяжести (таблица 3), однако объем их статистически значимо уменьшается при МЖ класса В и увеличивается у больных МЖ класса С, причем как по сравнению с контрольной группой, так и по сравнению с больными со степенью тяжести МЖ класса А и класса С.

С целью получения более полной информации о функциональных особенностях нейтрофилов пациентов с МЖ изучили их адгезионные свойства. У каждого пациента из пробы было выделено по 10 нейтрофилов, на каждом нейтрофиле было проведено 15 измерений сил адгезии: по пять измерений на трех различных линиях. Величина силы адгезии у пациентов с МЖ класса А была меньше на 25% по сравнению с контрольной группой и продолжала уменьшаться по мере нарастания уровня билирубина (таблица 3).

При изучении графика на рис. 2 можно увидеть экспоненциальное падение значений сил адгезии зондов к нейтрофилам при увеличении концентрации билирубина. Резкое падение сил адгезии происходит на участке, соответствующем классу А, у пациентов с уровнем билирубина 53,4±3,4 мкмоль/л. Это падение составляет приблизительно 25%. На участке, соответствующем переходу класса В (уровень билирубина 194,2±12,6 мкмоль/л) в класс С (уровень билирубина 304,8±21,7 мкмоль/л), значение адгезии упало приблизительно на 1%. Падение сил адгезии на участке, соответствующем переходу класса А в класс С, составило около 31%. Вышеизложенное может говорить о том, что концентрация содержания билирубина в крови снижает силы адгезии зондов к поверхностям нейтрофилов и, как следствие, влияет на адгезионные свойства нейтрофилов в целом, причем это влияние наиболее выраже-

но на ранних стадиях повышения содержания билирубина в крови.

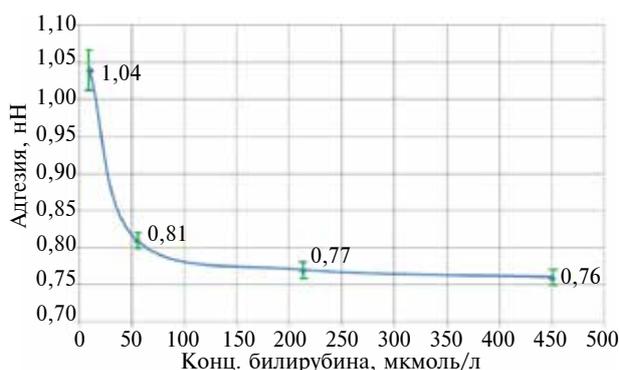
### Обсуждение

Число пациентов с МЖ доброкачественной этиологии не только не уменьшается, но и имеет тенденцию к росту. Развивающаяся эндогенная интоксикация и прогрессирующая печеночная недостаточность на фоне иммунодефицита являются основными причинами смерти больных МЖ. Изучение роли иммунокомпетентности организма приобретает важный практический смысл, поскольку вторичная иммунная недостаточность оказывает существенное влияние на течение основного заболевания, устойчивость к инфекционным осложнениям и эффективность проводимой терапии [3, 5].

Поэтому на современном уровне развития медицины возникла необходимость осмысления патогенеза иммунных расстройств при холестазах и проведения комплексного исследования иммунной системы. Поскольку нейтрофилы принимают участие во всех типах иммунных реакций, исследование функционально-метаболической активности нейтрофилов и строения их цитоскелета приобретает важное научно-практическое значение [8, 9].

Данные, полученные в представленном исследовании, свидетельствуют о выраженных изменениях кинетики ХЛ-ответа нейтрофилов периферической крови, отражающих изменения компенсаторных функциональных возможно-

Рис. 2. График зависимости сил адгезии зондов к поверхностям нейтрофилов от тяжести МЖ.



стей данной клеточной популяции. Вероятно, это связано с длительно сохраняющимися воспалительными процессами различного уровня интенсивности, в которых нейтрофильные гранулоциты принимают самое активное участие [4, 9]. Нейтрофильная инфильтрация является неотъемлемым компонентом воспалительного процесса. При этом в крови повышается популяция активированных клеток и «юных» нейтрофилов. Сравнительный анализ показал, что у пациентов с тяжестью МЖ класса С интенсивность ХЛ-ответа нейтрофильных гранулоцитов крови ниже, чем у пациентов с тяжестью МЖ класса А. В то же время площадь индуцированной ХЛ в этой группе пациентов статистически значимо выше показателей в группе пациентов с МЖ класса А.

На основании анализа хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов крови можно заключить, что функциональные возможности клеток у больных МЖ истощаются параллельно нарастанию степени тяжести МЖ. Снижение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов при патологии, осложненной гнойной инфекцией, отмечают Л.М. Куртасова с соавт. [8], А.А. Савченко с соавт. [9].

По всей видимости, снижение функциональных возможностей нейтрофилов происходит на фоне изменения его структурной организации, которую исследовали методом атомно-силовой микроскопии. С увеличением степени тяжести МЖ нейтрофил приобретает выпуклую форму, мембрана клетки становится неровной. Причем изменение формы нейтрофила происходит на фоне увеличения его объема.

Представляется интересным выявленный в данном исследовании факт падения значений сил адгезии. Причем резкое снижение сил адгезии происходит при легкой степени тяжести МЖ. При классе А это падение составляет 25%, а при классе С – около 31%. Вполне правомочно предположить, что снижение силы адгезии зондов к поверхности нейтрофилов отражает снижение способности нейтрофилов вступать в межклеточные контакты, при этом нарушаются процессы хемотаксиса, адгезии и фагоцитоза.

### **Заключение**

У пациентов с тяжелой степенью тяжести МЖ уменьшается количество нейтрофилов и увеличивается количество эозинофилов. Интенсивность спонтанной хемилюминесценции у больных механической желтухой зависит от степени тяжести МЖ. У пациентов с тяжестью МЖ класса А выявлены высокая интенсив-

ность спонтанной ХЛ, увеличение объема нейтрофильного гранулоцита и значительное снижение сил адгезии, что, по-видимому, уже на начальных стадиях МЖ вызывает нарушения второй фазы фагоцитоза. Интенсивность ХЛ-ответа, отражающая функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов, у пациентов со степенью тяжести МЖ класса С значительно ниже, чем у здоровых людей и пациентов с МЖ класса А. У больных этой группы силы адгезии снижаются на 31%, на клеточной мембране появляются разрывы до 500 нм на фоне увеличения объема нейтрофила.

Таким образом, на основании анализа хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов и результатов изучения их цитоскелета методом АСМ можно заключить, что функциональные возможности нейтрофильных гранулоцитов истощаются параллельно нарастанию степени тяжести МЖ. Истощение происходит на фоне изменения цитоархитектоники нейтрофила и снижения адгезивных свойств.

### **Финансирование**

Работа выполнялась в соответствии с планом научных исследований Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого.

### **Конфликт интересов**

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

### **Одобрение комитета по этике**

Исследование одобрено этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого.

### **Благодарность**

Благодарим коллектив кафедры нанотехнологий и материаловедения Санкт-Петербургского национального исследовательского университета информационных технологий, механики и оптики, заведующий кафедрой Голубок А.О., за техническое обеспечение и выполнение атомно-силовой микроскопии нейтрофилов.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Гальперин ЭИ. Классификация тяжести механической желтухи. *Анналы Хирург Гепатологии*. 2012;17(2):26-33.
2. Welniak LA, Sun R, Murphy WJ. The role of growth hormone in T-cell development and reconstitution.

*J Leukoc Biol.* 2002 Mar;71(3):381-87.

3. Даценко БМ, Борисенко ВБ. Механическая желтуха, острый холангит, билиарный сепсис: их патогенетическая взаимосвязь и принципы дифференциальной диагностики. *Новости Хирургии.* 2013;21(5):31-39. doi: <http://dx.doi.org/10.18484/2305-0047.2013.5.31>.
4. Смирнова ОВ, Титова НМ, Манчук ВТ, Елманова НГ, Кочетова ЛВ, Пахомова РА. Особенности клеточного звена иммунитета у больных механической желтухой доброкачественного генеза в зависимости от уровня билирубина. *Фундам Исследования.* 2015;(2-10):2174-79.
5. Liu G, Yang H, Chen X, Wang X, Chu Y. Modulation of neutrophil development and homeostasis. *Curr Mol Med.* 2013 Sep;13(8):1270-83.
6. Strydom N, Rankin SM. Regulation of circulating neutrophil numbers under homeostasis and in disease. *J Innate Immun.* 2013;5(4):304-14. doi: 10.1159/000350282.
7. Ступин ВА, Лаптев ВВ, Цкаев АЮ, Гивировская НЕ. Показатели иммунной системы при механической желтухе доброкачественного генеза. *Анналы Хирург Гепатологии.* 2008;13(2):69-75.
8. Куртасова ЛМ, Семенов ЭВ, Зуков РА, Шкапова ЕА. Изменение параметров люминол- и люцигенин зависимей хемилюминесценции нейтрофилов крови у больных раком мочевого пузыря в динамике заболевания. *Мед Иммунология.* 2015;17(2):173-78.
9. Савченко АА, Дресвянкина ЛВ, Гринштейн ЮИ, Аристов АИ. Особенности хемилюминесцентной активности нейтрофилов крови и мокроты у больных внебольничной пневмонией в динамике лечения. *Сиб Мед Обзорение.* 2014;(5):52-56.

#### REFERENCES

1. Gal'perin EI. Klassifikatsiia tiazhesti mekhan-

#### Адрес для корреспонденции

660022, Российская Федерация,  
г. Красноярск, ул. П. Железняк, д. 1,  
Красноярский государственный медицинский  
университет имени профессора  
В.Ф. Войно-Ясенецкого,  
Кафедра общей хирургии,  
тел. моб: +79029423912,  
e-mail: PRA555@mail.ru,  
Пахомова Регина Александровна

#### Сведения об авторах

Винник Юрий Семенович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей хирургии им. проф. М.И. Гульмана, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Красноярск, Российская Федерация.  
<http://orcid.org/0000-0002-8135-0445>  
Пахомова Регина Александровна, к.м.н., ассистент кафедры общей хирургии им. проф. М.И. Гульмана, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Красноярск, Российская Федерация.

icheskoj zheltukhi. *Annaly Khirurg Gepatologii.* 2012;17(2):26-33. (in Russ.)

2. Welniak LA, Sun R, Murphy WJ. The role of growth hormone in T-cell development and reconstitution. *J Leukoc Biol.* 2002 Mar;71(3):381-87.
3. Datsenko BM, Borisenko VB. Mechanical jaundice, acute cholangitis, biliary sepsis: pathogenic relationship and principles of differential diagnostics. *Novosti Khirurgii.* 2013;21(5):31-39. doi: <http://dx.doi.org/10.18484/2305-0047.2013.5.31>. (in Russ.)
4. Smirnova OV, Titova NM, Manchuk VT, Elmanova NG, Kochetova LV, Pakhomova RA. Cellular immunity features in patients with benign origin obstructive jaundice depending on bilirubin. *Fundam Issledovaniia.* 2015;(2-10):2174-79. (in Russ.)
5. Liu G, Yang H, Chen X, Wang X, Chu Y. Modulation of neutrophil development and homeostasis. *Curr Mol Med.* 2013 Sep;13(8):1270-83.
6. Strydom N, Rankin SM. Regulation of circulating neutrophil numbers under homeostasis and in disease. *J Innate Immun.* 2013;5(4):304-14. doi: 10.1159/000350282.
7. Stupin VA, Laptev VV, Tskaev AYU, Givirovskaya NE. Immune System in Benign Obstructive Jaundice Patients. *Annaly Khirurg Gepatologii.* 2008;13(2):69-75. (in Russ.)
8. Kurtasova LM, Semenov EV, Zukov RA, Shkapova EA. Changes in parameters of luminol-dependent and lucigenin-dependent chemiluminescence of peripheral blood neutrophils in patients with bladder cancer in the disease dynamics. *Med Immunologia.* 2015;17(2):173-78. (in Russ.)
9. Savchenko AA, Dresvjankina LV, Grinshtejn YuI, Aristov AI. Features of chemiluminescent activity of blood neutrophils and sputum of patients with community-acquired pneumonia during the treatment. *Sib Med Obozrenie.* 2014;(5):52-56. (in Russ.)

#### Address for correspondence

660022, The Russian Federation,  
Krasnoyarsk, P.Zheleznyak Str., 1,  
Krasnoyarsk State Medical University  
named after Professor  
V. F. Voino-Yasenetsky,  
General Surgery Department,  
Tel. mobile +79029423912,  
e-mail: PRA555@mail.ru,  
Pakhomova Regina A.

#### Information about the authors

Vinnik Yurij S., MD, Professor, Head of the General Surgery Department named after Professor M.I. Gulman, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V. F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.  
<http://orcid.org/0000-0002-8135-0445>  
Pakhomova Regina A., PhD, Assistant of the General Surgery Department named after Professor M.I. Gulman, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V. F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.  
<http://orcid.org/0000-0002-3681-4685>  
Kochetova Lyudmila V., PhD, Associate Professor of the General Surgery Department named after Professor M.I.

<http://orcid.org/0000-0002-3681-4685>

Кочетова Людмила Викторовна, к.м.н., доцент кафедры общей хирургии им. проф. М.И. Гульмана, Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Красноярск, Российская Федерация.  
<http://orcid.org/0000-0001-5784-7067>

Козлов Василий Викторович, к.м.н., доцент кафедры общественного здоровья и здравоохранения, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), г. Москва, Российская Федерация.  
<http://orcid.org/0000-0002-2389-3820>

Gulman, Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V. F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

<http://orcid.org/0000-0001-5784-7067>

Kozlov Vasilij V., PhD, Associate Professor of the Department of Public Health and Health Care, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation.

<http://orcid.org/0000-0002-2389-3820>

#### **Информация о статье**

*Поступила 6 апреля 2017 г.*

*Принята в печать 11 сентября 2017 г.*

*Доступна на сайте 5 февраля 2018 г.*

#### **Article history**

*Arrived 6 April 2017*

*Accepted for publication 11 September 2017*

*Available online 5 February 2018*