

Th2 (CXCR5-CXCR3-CCR6-CCR4+), Th17/Th22 (CXCR5-CXCR3-CCR6+CCR4+), Th1/Th17 (CXCR5-CXCR3+CCR6+CCR4-), Tfh1 (CXCR5+CXCR3+CCR6-CCR4-) и Th17 (CXCR5-CXCR3-CCR6+CCR4-) клеток. Сравнение этих субпопуляций Th между пациентами и контрольной группой показало значительно более низкое значение Th1 ($p < 0,001$), у пациентов с ушибом головного мозга и значительно более высокое значение Th17 ($p < 0,001$; $p < 0,001$) у пациентов с ушибом и сотрясением головного мозга в сравнение с группой контроля. Кроме того, мы наблюдали значительное повышение количества Th17/Th22 ($p < 0,0001$) у пациентов с ушибом головного мозга и повышение количества Th1/Th17 ($p < 0,001$) у пациентов с сотрясением головного мозга в сравнение со здоровыми лицами.

Что касается Tfh1-клеток, их количественные изменения незначительны в сравнение со здоровыми лицами, однако установлены существенные изменения ($p < 0,001$) между группами больных с ЧМТ, при этом выявлены разнонаправленные изменения, так у пациентов с сотрясением головного мозга происходит увеличения количества Tfh1 ($3,8 \pm 0,25$) и снижение их количества у пациентов с ушибом головного мозга ($1,7 \pm 0,15$) в сравнение со здоровыми лицами ($3,5 \pm 0,2$).

Кроме того в субпопуляции Th2 клеток нет достоверных различий между пациентами с травмой мозга и контрольной группой.

Заключение.

Таким образом, сотрясение и ушиб головного мозга оказывают воздействие на клеточный иммунный ответ, вызывая снижение или повышение определенных субпопуляций клеток в CD45RA-негативной популяции CD3 + CD4 + лимфоцитов. Было выявлено, что при ушибе головного мозга происходит более сильная активация клеток, участвующих в воспалении наряду с клетками, участвующих в репаративных процессах. Возможно эти изменения могут быть предиктором

формирования клинической картины посттравматической энцефалопатии в отдаленном периоде, что требует усовершенствования лечебного и реабилитационного алгоритмов у данной категории больных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Damir Nizamutdinov, Lee A. Shapiro. Overview of Traumatic Brain Injury: An Immunological Context Overview of Traumatic Brain Injury: An Immunological Context. Brain Sci. 2017, 7, 11;
2. Melikyan Z.A., Mikadze Yu.V., Potapov A.A. Neurovisualization and Neuropsychological Studies in the Clinic of Traumatic and Brain Injuries of Mild to Medium Severity, Zh. Nevrol. and psychiatrist. – 2010. – Т. 110, No. 12. – P. 100-111.
3. Isaeva R.Kh., Antonyuk I.A., Gridyakina A.V., Evstafeva A.E. Immunological changes in traumatic brain injury // Intern. Log applied and basic research. – 2014. – № 8. – p. 41-47.
4. Xiong Y., Mahmood A., Chopp M. Current understanding of neuroinflammation after traumatic brain injury and cell-based therapeutic opportunities // Chin. J. Traumatol. – 2018. – Vol. 21 (3). – P. 137-151.
5. Yasir N. Jassam, Saef Izzy, Michael Whalen, Dorian B. McGavern, Joseph El Khoury Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift Neuron. 2017;95(6)1246
6. O'Neil ME, Carlson K, Storzbach D, Brenner L, Freeman M, Quiñones A, Motu'apuaka M, Ensley M, Kansagara D. Complications of Mild Traumatic Brain Injury in Veterans and Military Personnel: A Systematic Review. Washington (DC): Department of Veterans Affairs (US); 2013 Jan.
7. Celia A. McKee and John R. Lukens. T cells in the central nervous system: messengers of destruction or purveyors of protection? Immunology.- 2014.- 141, 340–344.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ: ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ

Образцов И. В., Корсунский И. А., Федоскова Т. Г.

Адрес для корреспонденции: Шмитовский пр-д, 29, Москва, 123317

E-mail: Эл. почта: igor_obraztsov@bk.ru

Введение. Колоректальный рак (КРР) является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований, занимающим третье место по смертности среди причин смерти, связанных с онко-

логическими заболеваниями [1]. Небольшая доля КРР характеризуется генетической предрасположенностью (семейный аденоматозный полипоз, синдром Линча и другие редкие синдромы), в то время как основная часть

случаев КРР – спорадические. К основным факторам патогенеза, вносящим вклад в развитие КРР, следует отнести хроническое воспаление. В частности, воспалительные заболевания кишечника (ВЗК – болезнь Крона и язвенный колит) ассоциированы с повышенным риском развития вторичного КРР, прогностически менее благоприятного по сравнению со спорадическими случаями. При этом даже при спорадическом КРР без какой-либо связи с ВЗК, составляющем до 95 % случаев колоректального рака, хроническое воспаление, выраженное в опухолевом очаге, обеспечивает поддержание и прогрессирование опухолевого процесса [2]. Оценка активности воспаления у пациентов с КРР позволит найти перспективные прогностические и перспективные биомаркеры для оценки течения основного заболевания. Одним из способов клинико-лабораторной оценки активности воспалительного процесса является функциональное тестирование нейтрофилов. Нейтрофилы являются наиболее активными клетками, способными реагировать на малейшие изменения гомеостаза, и в числе первых отвечающими на стимуляцию чужеродными антигенами и воздействие повреждающих факторов [3]. Целью настоящей работы стало определение особенностей и прогностической ценности окислительного метаболизма и поверхностных маркеров нейтрофилов при КРР.

Материалы и методы. Исследовали кровь 47 пациентов с КРР и 26 здоровых доноров. У пациентов с КРР выполняли ХЛ анализ и иммунофенотипирование нейтрофилов после операции с целью определения возможностей метода для раннего прогнозирования инфекционно-септических послеоперационных осложнений. Всем пациентам выполнялись полостные операции: колэктомии, гемиколэктомии, резекции прямой и сигмовидной кишок, гемигепатэктомии, резекции петель тонкой кишки; релапаротомии. Больным выполняли иммунологические тесты перед вмешательством (день 0), затем – после операции (дни +1, +2 и +3). Клинико-лабораторную оценку статуса больного проводили после +5 дня. Обследуемые пациенты причислялись к группе осложнённого течения после операционного периода при выполнении любых 2 критериев из трёх перечисленных, начиная с +5 дня после операции: 1) баллы SOFA (sepsis-related organ failure assessment score) > 5 или единовременное нарастание SOFA на 2+ балла; 2) температура тела > 38°C или лейкоцитоз > 15 тыс / мкл или СРБ > 100 мг / л ; 3) бактериологически подтверждённый очаг инфекции. Таким образом, из 47 обследованных пациентов наличием гнойно-септических послеоперационных осложнений характеризовались 12 человек.

Окислительный метаболизм нейтрофилов оценивали методом хемилюминесцентного (ХЛ) анализа

цельной крови; иммунофенотипирование нейтрофилов проводили методом проточной цитометрии. Фенотипирование включало определение уровня экспрессии Fc-рецепторов иммуноглобулинов (FcγRIII, CD16 и FcγRI, CD64) на основании оценки средней интенсивности флуоресценции в соответствующих каналах детекции. Для окрашивания использовали моноклональные антитела CD16-PE, CD64-FITC (BD). ХЛ анализ включал регистрацию ответа нейтрофилов, праймированных 50 нг/мл форбол-миристан-ацетатом (ФМА, Сигма), на внесение 10 мкМ N-формил-метионил-лейцил-фенилаланина (ФМЛФ, Sigma); в качестве ХЛ-зонда использован 45 мкМ люминол (Sigma). Для тонкого анализа кинетики наработки АФК фагоцитами в среде LabView (National Instruments, США) было разработано программное обеспечение позволяющее выполнять деконволюцию ХЛ-грамм объективным не зависящим от оператора способом. Процедура деконволюции позволяет отдельно анализировать параметры кинетических компонент результирующего ХЛ-ответа. ХЛ-граммы моделировали с помощью линейной комбинации степенных экспоненциальных функций, характеризующих вне- и внутриклеточную ХЛ. Оценивали интенсивности и светосуммы вне- и внутриклеточного ХЛ-ответа нейтрофилов.

Результаты. При сравнении показателей ХЛ получены достоверные различия между группами пациентов с КРР перед хирургическим лечением и здоровых доноров. Соотношение светосумм вне- и внутриклеточной ХЛ $f(t)_{\text{вне-}} / f(t)_{\text{внутри-}}$ в контрольной группе составило 0,448 – 0,561 ед., в группе больных КРР – 0,694 – 1,07 ед ($p < 0.001$). Площадь под ROC-кривой для соотношения светосумм составила 0,763 ($p < 0.0001$), чувствительность лежит в диапазоне 0,67,3 – 0,91,8; специфичность – 57,7 – 91,4 ($p < 0,05$). Соотношение интенсивностей вне- и внутриклеточной ХЛ $\text{Max } f(t)_{\text{вне-}} / \text{Max } f(t)_{\text{внутри-}}$ в контрольной группе составило 1,31 – 1,88 ед., в группе больных КРР – 2,04 – 2,73 ед ($p < 0.001$). Площадь под ROC-кривой для соотношения интенсивностей составила 0,826 ($p < 0.00001$), чувствительность лежит в диапазоне 62,2 – 88,5 %; специфичность – 61,9 – 93,7 % ($p < 0,05$).

Построена динамика экспрессии CD64 на мембранах нейтрофилов после хирургических вмешательств. Внутри группы пациентов с неосложнённым течением послеоперационного периода определяется незначительный подъём показателя с 0,440 – 0,799 ед. флуор. до 0,575 – 1,0 ед. флуор., в дальнейшем показатель остаётся на прежнем уровне. У пациентов с осложнённым послеоперационным периодом уровень экспрессии CD64 был повышен как перед операцией (1,01 – 1,25 ед. флуор., $p < 0,05$), так и на ранних сроках после неё (0,802 – 1,63 ед. флуор., $p < 0,001$). На основании проведённого

ROC-анализа определено значение уровня экспрессии CD64 перед операцией и на 1-3 послеоперационные сутки, позволяющее отнести пациента в группу риска по развитию инфекционно-септических осложнений. К факторам риска следует отнести уровень экспрессии CD64 перед операцией выше 0,85 ед. флуор. (чувствительность 85,7 %, специфичность 77,8 %, $p = 0,052$) и выше 1,05 ед. флуор. в раннем послеоперационном периоде (чувствительность 70,4 %, специфичность 79,0 %, $p < 0,001$). Пациенты, отнесённые в группу риска по экспрессии CD64 характеризовались более длительными сроками пребывания в стационаре. Так, при повышении экспрессии CD64 выше порогового значения перед операцией медиана продолжительности госпитализации составляла 18 койко-дней, при нормальном уровне экспрессии – 9 койко-дней ($p < 0,001$). Повышение экспрессии CD64 в раннем послеоперационном периоде менее специфично, однако также ассоциировано с более длительным пребыванием больного в стационаре: медиана длительности госпитализации в группах с повышенным и нормальным CD64 составляет, соответственно, 13 и 10 койко-дней ($p < 0,05$).

Согласно полученным данным, помимо увеличения экспрессии CD64, к факторам риска развития послеоперационных инфекционных осложнений следует отнести потерю экспрессии CD16. Среди больных с неосложнённым течением послеоперационного периода экспрессия маркера падает после вмешательства с 14,4 – 22,2 ед. флуор. до 9,77 – 18,5 ед. флуор., в дальнейшем показатель остаётся на прежнем уровне так же, как и в случае с CD64. У пациентов с осложнённым послеоперационным периодом уровень экспрессии CD16 в послеоперационном периоде составлял 5,1 – 10,0 ед. флуор., что достоверно ниже по сравнению с группой неосложнившихся больных ($p = 0,001$). Проведённый ROC-анализ определил пороговое значение уровня экспрессии CD16 в 1-3 послеоперационные сутки, позволяющее отнести пациента в группу риска по развитию гнойно-септических осложнений, составляющее 12,8 ед. флуор. Падение экспрессии маркера ниже указанного уровня ассоциировано с развитием инфекционных послеоперационных осложнений (чувствительность 87,5 %, специфичность 65,6 %, $p = 0,002$). Потеря экспрессии CD16 ассоциирована с более длительной госпитализацией пациентов: в группе с нормальным значением показателя медиана срока госпитализации составила 11 койко-дней; в группе с пониженным значением – 18 койко-дней ($p < 0,01$).

Развитие инфекционных осложнений у обследованных пациентов ассоциировано с изменением окислительного метаболизма фагоцитов. Оценивали интенсивность внеклеточной выработки активных форм кислорода (АФК) как отношение максимума интенсивности соответствующего пика ХЛ (*Max*) к его полуширине (*full width at half maximum, FWHM*). При сопоставлении значений показателя в обследуемых группах было выявлено снижение интенсивности внеклеточной ХЛ в группе с осложнённым послеоперационным периодом на 2 – 3 сутки после вмешательства ($p < 0,01$): $2,25 - 3,06 \cdot 10^{-3}$ по сравнению с $2,97 - 5,09 \cdot 10^{-3}$ ед. Методом ROC-анализа вычислено пороговое значение интенсивности внеклеточной ХЛ, позволяющее отнести пациентов в группу риска развития гнойно-септических осложнений, составляющее $3,0 \cdot 10^{-3}$ ед. Снижение интенсивности показателя ниже указанного уровня ассоциировано с развитием инфекционных послеоперационных осложнений (чувствительность 69,6 %, специфичность 68,5 %, $p < 0,001$). Снижение интенсивности внеклеточной ХЛ на 2 – 3 послеоперационные сутки ассоциировано с более длительной госпитализацией пациентов: в группе с нормальным значением показателя медиана срока госпитализации составила 10 койко-дней; в группе с пониженным значением – 19 койко-дней ($p < 0,001$).

Заключение. В процессе исследования разработан и апробирован подход к оценке окислительного метаболизма и активации нейтрофилов периферической крови, основанный на методологии хемилюминесцентного анализа и проточной цитометрии. Показано, что развитие КРР ассоциировано с усилением внеклеточного ХЛ ответа. Построена динамика функциональных показателей нейтрофилов у пациентов с КРР в послеоперационном периоде и предложены клинически значимые индикаторы (CD16, CD64, интенсивность внеклеточной ХЛ), позволяющие прогнозировать инфекционно-септические осложнения у данных пациентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019 Jan;69(1):7-34.
2. Chen J, Pitmon E, Wang K. Microbiome, inflammation and colorectal cancer. *Semin Immunol.* 2017 Aug;32:43-53.
3. Nicolás-Ávila JÁ, Adrover JM, Hidalgo A. Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer. *Immunity.* 2017 Jan 17;46(1):15-28.