

© Коллектив авторов, 2024

УДК 616-092

Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Рогожина Л.С., Ступин В.А., Ким А.Э., Титова Е.Г., Турищева О.О., Хамнагдаева Н.В.**Нейтрофильные экстраклеточные ловушки при воспалительных заболеваниях брюшной полости**

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1

Развитие инфекционных осложнений у больных с воспалительными заболеваниями определяется тем, насколько эффективную защитную реакцию нейтрофилы больного будут развивать при контакте с патогеном. Противомикробная устойчивость организма во многом определяется готовностью нейтрофилов формировать нейтрофильные сети, способные эффективно захватывать патогены.

Цель исследования. Определение параметров нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ) у больных с воспалительными заболеваниями брюшной полости.

Методика. Обследованы 28 прооперированных больных с различными формами абдоминального воспаления и 6 терапевтических больных с язвенным колитом, 6 пациентов обследованы при поступлении. Нейтрофилы выделяли, используя градиентное центрифугирование. Для подсчета НЭЛ использовали флуоресцентную микроскопию с красителем SYBR Green (Evrogen; Россия), специфично взаимодействующего с двухцепочечной ДНК. Функциональную активность НЭЛ определяли в тесте с захватом *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603).

Результаты. При исследовании больных в послеоперационном периоде обнаружили, что при остром аппендиците/абсцессе, остром холецистите и остром панкреатите/панкреонекрозе обнаруживаются близкие количества НЭЛ – $12,63 \pm 2,13\%$, $15,66 \pm 2,81\%$ и $12,64 \pm 2,73\%$. В этих же группах больных регистрируются достоверные различия в размерах НЭЛ, которые достигают $46,82 \pm 6,70$ мкм, $73,62 \pm 16,29$ мкм и $96,84 \pm 27,17$ мкм, соответственно. Увеличение размеров НЭЛ в этих группах больных объясняется присутствием, помимо сетевидных структур, дополнительно еще и нитевидных, волокнистых и вуалеобразных нейтрофильных внеклеточных структур. Группа больных с неспецифическим язвенным колитом, получающих консервативное лечение (группа сравнения), демонстрирует тенденцию к уменьшению размеров НЭЛ – до величины $31,96 \pm 14,75$ мкм. Исследование функциональной активности НЭЛ показывает, что её снижение предшествует развитию септического состояния (на примере выявленного клинического случая).

Заключение. Все, без исключения, исследованные нозологические формы воспаления в брюшной полости сопровождаются формированием НЭЛ в виде нейтрофильных сетей. Помимо нейтрофильных сетей воспаление индуцирует у части больных формирование НЭЛ в виде одиночных нитей, волокон и вуалей. Количественные параметры НЭЛ коррелируют с размерами и распространением очага воспаления на соседние анатомические области. На примере описанного клинического случая обнаружено резкое ослабление функциональной активности НЭЛ, которое предшествовало развитию септического осложнения. Прослеживается связь между исходно ослабленной функциональной активностью НЭЛ и развитием септического осложнения у пациента в послеоперационном периоде.

Ключевые слова: морфологическое строение нейтрофильных экстраклеточных ловушек; НЭЛ; воспаление; функциональная активность НЭЛ

Для цитирования: Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Рогожина Л.С., Ступин В.А., Ким А.Э., Титова Е.Г., Турищева О.О., Хамнагдаева Н.В. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки при воспалительных заболеваниях брюшной полости. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2024; 68(1): 15-25.

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.15-25

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Ступин В.А.; сбор, обработка материала и постановка экспериментов – Ким А.Э., Титова Е.Г., Турищева О.О., Рогожина Л.С.; подготовка иллюстративного материала, написание текста – Казимирский А.Н.; статистическая обработка материала – Панина М.И.; редактирование – Салмаси Ж.М., Панина М.И., Хамнагдаева Н.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Казимирский Александр Николаевич, e-mail: alnica10@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.01.2024

Принята к печати 25.01.2024

Опубликована 28.03.2024

Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I., Rogozhina L.S., Stupin V.A., Kim A.E., Titova E.G., Turishcheva O.O., Khamnagdaeva N.V.

Neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases of the abdominal cavity

Pirogov Russian National Research Medical University,
1 Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russian Federation

The development of infectious complications in patients with inflammatory diseases is determined by how effective protective reaction the patient's neutrophils will develop upon contact with the pathogen. The body's anti-infective resistance is largely determined by the willingness of neutrophils to form neutrophilic networks capable of effectively capturing pathogens.

Aim. Determination of parameters of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with inflammatory diseases of the abdominal cavity.

Methods. 28 operated patients with various forms of abdominal inflammation and 6 therapeutic patients with ulcerative colitis were examined, 6 patients were examined upon admission. Neutrophils were isolated using gradient centrifugation. To calculate the NETs, fluorescence microscopy with the dye SYBR Green (Evrogen; Russia), which specifically interacts with double-stranded DNA, was used. The functional activity of NETs was determined in the *Klebsiella pneumoniae* capture test (ATCC 700603).

Results. In the study of patients in the postoperative period, it was found that in acute appendicitis/abscess, acute cholecystitis and acute pancreatitis/pancreonecrosis, similar amounts of NETs are found – $12,63 \pm 2,13\%$, $15,66 \pm 2,81\%$ and $12,64 \pm 2,73\%$. In the same groups of patients, significant differences in the size of the NETs are recorded, which reach $46,82 \pm 6,70$ microns, $73,62 \pm 16,29$ microns and $96,84 \pm 27,17$ microns, respectively. The increase in the size of the NETs in these groups of patients is explained by the presence, in addition to network-like structures, additionally filamentous, fibrous and cloud-like neutrophil extracellular structures. A group of patients with nonspecific ulcerative colitis receiving conservative treatment (comparison group) shows a tendency to decrease the size of the NEL to a value of $31,96 \pm 14,75$ microns. A study of the functional activity of NETs shows that its decrease precedes the development of a septic condition (using the example of an identified clinical case).

Conclusion. All, without exception, the studied nosological forms of inflammation in the abdominal cavity are accompanied by the formation of NETs in the form of neutrophilic networks. In addition to neutrophilic networks, inflammation induces the formation of NETs in the form of single strands, fibers and clouds form in some patients. The quantitative parameters of the NETs correlate with the size and spread of the inflammatory focus to neighboring anatomical areas. On the example of the described clinical case, a sharp decrease in the functional activity of NETs was found, which preceded the development of a septic complication. There is a connection between the initially weakened functional activity of NETs and the development of septic complications in the patient in the postoperative period.

Keywords: morphological structure of neutrophil extracellular traps; NETs; inflammation; functional activity of NETs

For citation: Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I., Rogozhina L.S., Stupin V.A., Kim A.E., Titova E.G., Turishcheva O.O., Khamnagdaeva N.V. Neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases of the abdominal cavity. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2024; 68(1): 15–25. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2024.01.15-25

Authors' contribution: the concept and design of the study – Poryadin G.V., Salmasi J.M., Stupin V.A.; collection, processing of material and staging of experiments – Kim A.E., Titova E.G., Turishcheva O.O., Rogozhina L.S.; preparation of illustrative material, writing the text – Kazimirskii A.N.; statistical processing of material – Panina M.I.; editing the text – Salmasi J.M., Panina M.I., Khamnagdaeva N.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

Information about the authors:

Kazimirskii A.N., <https://orcid.org/0000-0002-3079-4089>

Salmasi J.M., <https://orcid.org/0000-0001-8524-0019>

Poryadin G.V., <https://orcid.org/0000-0003-2010-3296>

Panina M.I., <https://orcid.org/0000-0002-7651-0037>

Rogozhina L.S., <https://orcid.org/0000-0002-3983-7890>

Stupin V.A., <https://orcid.org/0000-0002-9522-8061>

Kim A.E., <https://orcid.org/0000-0001-8119-772X>

Titova E.G., <https://orcid.org/0000-0002-1655-322X>

Turishcheva O.O., <https://orcid.org/0009-0009-6000-9131>

Khamnagdaeva N.V., <https://orcid.org/0000-0003-1167-9226>

Financing. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest.

Received 10.01.2024

Accepted 25.01.2024

Published 28.03.2024

Введение

В основе инициации запуска защитных систем организма лежит формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ, NETs). Эти внеклеточные структуры, образованные ядерной ДНК вместе с некоторыми белками хроматина и ферментами, формируются в ответ на присутствие в организме практически любых патогенов (вирусов, бактерий и других микроорганизмов). Морфологические характеристики формирующихся НЭЛ, их количество и размеры, а также их функциональная активность могут предопределять характер течения, тяжесть заболевания и риск развития инфекционных осложнений у больных.

Цель – определение параметров нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ) у прооперированных больных по поводу воспалительных процессов в брюшной полости, а также исследование функциональной активности НЭЛ отдельных больных, поступающих на госпитализацию в хирургический стационар.

Методика

Пациенты. В исследование включены больные, находящиеся на лечении в 51 ГКБ г. Москвы с различными нозологическими формами воспалительного процесса в брюшной полости. Были обследованы 28 больных после проведенного хирургического вмешательства (8 больных с острым аппендицитом, 8 больных с острым холециститом, 6 больных с диагнозом панкреатит/панкреонекроз, 6 больных с перитонитом) и 6 больных, находящихся на консервативном лечении с диагнозом язвенный колит. В исследование были также включены больные (6 человек), поступившие на госпитализацию, как на плановые операции, так и по экстренным показаниям.

Методы. Определение содержания нейтрофильных экстраклеточных ловушек

Получение клеточных фракций нейтрофилов

Для взятия проб крови использовали вакуутайнер с ЭДТА для предотвращения свертывания. Выделение нейтрофилов из венозной крови, обработанной ЭДТА, проводили традиционным методом с помощью градиентного центрифугирования. Для этого кровь разводили в 4 раза натрий-фосфатным буферным раствором 50 мМ, рН 7,4, и наслаивали на двойной градиент плотности фиколла-верографина. Плотность верхнего слоя градиента составляет 1,077 г/см³,

а нижнего – 1,190 г/см³. После центрифугирования (1600 об./мин, 30 мин) на границе между градиентами возникает скопление нейтрофилов с чистотой 98–100%. Нейтрофилы дважды отмывали от примесей фиколла натрий-фосфатным буферным раствором (50 мМ, рН 7,4). Осаждение клеток крови проводили при центрифугировании (1200 об./мин, 15 мин). Выделенные нейтрофилы в среде RPMI-1640 использовали в экспериментах по кратковременному культивированию. Жизнеспособность выделенных нейтрофилов составляла не менее 95% (тест с 0,1% раствором трипанового синего).

Иммунофлюоресцентное определение нейтрофильных экстраклеточных ловушек

Для обнаружения и подсчета нейтрофильных экстраклеточных ловушек использовали флюоресцентную микроскопию [1]. Выявление нейтрофильных экстраклеточных ловушек осуществляли с использованием флюоресцентного красителя SYBR Green (Evrogen; Россия), специфично взаимодействующего с двухцепочечной ДНК. Микроскопирование, подсчет и фоторегистрацию клеток и экстраклеточных структур проводили при увеличении 1000. Результаты выражали в процентах, в виде отношения количества экстраклеточных ловушек к общему числу клеток в поле зрения.

Захват тестового микроорганизма

Определение функциональной активности нейтрофильных внеклеточных структур проводили с помощью теста на захват микроорганизма *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). Для этого к нейтрофилам, иммобилизованным на стекле, покрытом полилизином, добавляли микробную культуру *Klebsiella pneumoniae* в среде RPMI-1640 в концентрации 10³/мкл. Нейтрофильные сети захватывали тестовый микроорганизм в соответствии с потенциальной функциональной активностью НЭЛ. После окрашивания (SYBR Green, 15 мин) и отмывания избытка красителя в ходе микроскопирования определяли количество клеток *Klebsiella pneumoniae*, связанное каждой экстраклеточной структурой.

Статистическая обработка. Полученные результаты обрабатывали в программе *Statistica 12.0 (StatSoft, Inc)*. Данные представлены в виде среднего значения (M) ± стандартная ошибка среднего (m). Сравнение количественных признаков проводили по ранговому U критерию Манна-Уитни и данным дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

Результаты

Результаты исследования морфологических параметров НЭЛ в группах больных с острыми воспалительными процессами в брюшной полости в соответствии с нозологической формой воспалительного процесса

Ни один из нами обследованных больных, госпитализированных для хирургического лечения с острым инфекционным воспалением в брюшной полости, не показал инфекционных осложнений в послеоперационном периоде. Все больные находились в удовлетворительном состоянии средней степени тяжести. Количество НЭЛ незначительно изменяется у нескольких групп больных с острыми воспалительными процессами в брюшной полости. Исследование нейтрофильных экстраклеточных ловушек показывает, что достоверные различия в размерах НЭЛ обнаружены при

сравнении больных с острым аппендицитом, острым холециститом и острым панкреатитом (табл. 1).

Относительное количество нейтрофильных экстраклеточных ловушек при различных нозологических формах острых воспалительных процессов в послеоперационном периоде оказывается сходным. Так, при остром аппендиците/абсцессе, остром холецистите и остром панкреатите/панкреонекрозе обнаруживаются близкие количества НЭЛ – 12,63±2,13%, 15,66±2,81% и 12,64±2,73%, соответственно. Острые локальные воспалительные процессы в брюшной полости сопровождаются формированием НЭЛ в диапазоне 12-15%. Однако, у больных с распространенным воспалением серозных оболочек брюшной полости (перитонит) в послеоперационном периоде наблюдалась тенденция к увеличению численности НЭЛ до уровня 18,40±4,02%. Результаты по определе-

Таблица 1/Table 1

Лабораторные показатели и параметры нейтрофильных экстраклеточных ловушек больных с воспалительными процессами в брюшной полости

Laboratory parameters and parameters of neutrophil extracellular traps in patients with inflammatory processes in the abdominal cavity

Нозологическая форма воспалительного процесса The nosological form of the inflammatory process	Возраст больных, лет Age of patients, years	День исследования Research Day	Количество лейкоцитов x10 ⁹ /л White blood cell count x10 ⁹ /l	С-реактивный белок, мг/л C-reactive protein,mg/l	НЭЛ, % NETs, %	Размеры НЭЛ, мкм Sizes NETs, microns
после оперативного вмешательства after surgery						
Острый аппендицит/абсцесс Acute appendicitis/abscess (n=8)	44,57±6,09	5,75±1,27	9,41±1,04	101,37±41,97	12,63±2,13	46,82±6,70*
Острый холецистит Acute cholecystitis (n=8)	51,75±5,97	5,80±1,68	10,35±2,15	44,33±22,76	15,66±2,81	73,62±16,29*
Острый панкреатит/ панкреонекроз Acute pancreatitis/ pancreonecrosis (n=6)	50,25±2,01	10,0±2,40	12,34±2,43	177,0±54,11	12,64±2,73	96,84±27,17*
Перитонит Peritonitis (n=6)	40,00±2,79	5,80±1,20	9,70±1,66	152,0±35,63	18,40±4,02	40,62±10,32
консервативное лечение conservative treatment						
Язвенный колит Ulcerative colitis (n=6)	50,33±13,19	5,33±1,45	6,83±0,73	43,00±2,76	11,30±2,92	31,96±14,75

Примечание. * – p<0,05 по данным дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса, с дополнительным попарным сравнением группы больных с диагнозом острый аппендицит с двумя другими группами больных (острый холецистит и острый панкреатит).

Note. * – p<0.05 according to the Kruskal-Wallis analysis of variance, with an additional pairwise comparison of a group of patients diagnosed with acute appendicitis with two other groups of patients (acute cholecystitis and acute pancreatitis).

нию количества НЭЛ показывают, что количество нейтрофильных экстраклеточных ловушек зависит от размеров очага воспаления и его распространения на соседние анатомические области.

Размеры НЭЛ (в мкм) в исследованных группах больных оказываются различными, по данным дисперсионного анализа Крускала–Уоллиса. При остром аппендиците, остром холецистите, остром панкреатите регистрируется достоверное увеличение размеров НЭЛ, которые достигают $46,82 \pm 6,70$ мкм, $73,62 \pm 16,29$ мкм и $96,84 \pm 27,17$ мкм, соответственно, при попарном сравнении результатов, полученных у больных с диагнозом острый аппендицит с двумя другими группами больных (острый холецистит, острый панкреатит).

Достоверное увеличение размеров НЭЛ в этих группах больных (больные с острым холециститом, и острым панкреатитом) по сравнению с группой больных с диагнозом острый аппендицит объясняется присутствием, помимо сетевидных структур, дополнительно еще и нитевидных, волокнистых и вуалеобразных нейтрофильных внеклеточных образований. У больных же с перитонитом размеры НЭЛ испытывают тенденцию к снижению и регистрируются в диапазоне $40,62 \pm 10,32$ мкм. Группа больных с неспецифическим язвенным колитом, получающих консервативное лечение, избранная в пределах настоящего исследования как группа сравнения, демонстрирует тенденцию к еще большему уменьшению размеров НЭЛ — до величины $31,96 \pm 14,75$ мкм.

Оценка морфологического строения НЭЛ у больных с острыми воспалительными процессами в брюшной полости

Нейтрофильные экстраклеточные ловушки при воспалительных заболеваниях человека представлены в виде 4-х форм: сетевидной (это главная, функционально активная форма), нитевидной, волокнистой и вуалеобразной. Преобладающими морфологическими формами НЭЛ являются сетевидные структуры и нитевидные. НЭЛ в форме сети волокон ДНК образуется при контактных взаимодействиях нейтрофила и патогена, кроме того, структура сети формируется при контакте нейтрофила с апоптозирующими клетками организма, гибнущими в результате инфицирования [2]. НЭЛ в форме одиночных нитей формируется при контактных взаимодействиях нейтрофила с фибробластами и может служить маркером асептического воспаления [1]. Волокнистые и вуалеобразные структуры НЭЛ являются производными от сетей и нитей, которые образуются в организме, вероятно, под действием IgG, который не находит соответствующих клеток-мишеней [3].

Морфологические особенности нейтрофильных экстраклеточных структур у обследованных нами больных демонстрируют определенную связь с диагностированными у них нозологическими формами воспалительных процессов в брюшной полости.

1. При остром аппендиците регистрируются исключительно НЭЛ в морфологической форме сетей.

2. В случаях осложненного (абсцессом) аппендицита помимо сетевидных структур наблюдаются также

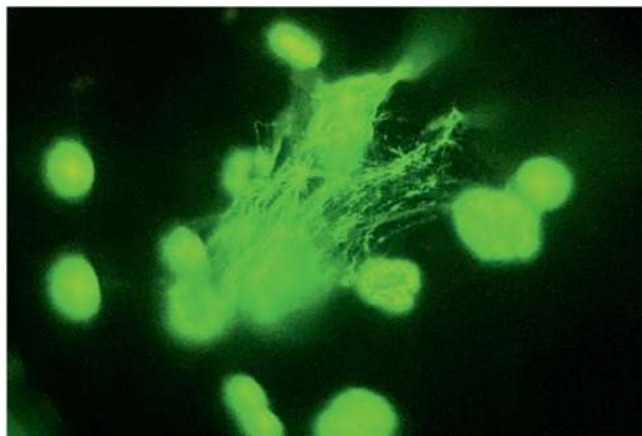


Рис. 1. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в морфологической форме нейтрофильных сетей. Неосложненный аппендицит после хирургического вмешательства.

Время инкубации 1 ч. Окрашивание CYBR Green. $\times 1000$.

Fig. 1. Neutrophil extracellular traps in the morphological form of neutrophilic networks. Uncomplicated appendicitis after surgery.

Incubation time is 1 hour. Coloring CYBR Green. $\times 1000$.

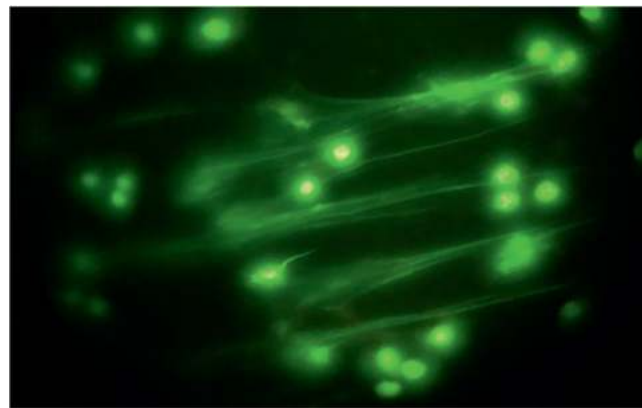


Рис. 2. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в морфологической форме одиночных нитей и волокон. Острый холецистит (после оперативного вмешательства). Время инкубации 1 ч. Окрашивание CYBR Green. $\times 1000$.

Fig. 2. Neutrophil extracellular traps in the morphological form of single strands and fibers. Acute cholecystitis (after surgery). Incubation time is 1 hour. Coloring CYBR Green. $\times 1000$.

дополнительно минимальные количества нитевидных, волокнистых и вуалеобразных форм (рис. 1).

3. У больных с острым холециститом после оперативного вмешательства в подавляющем большинстве случаев наблюдаются сети, но в половине случаев наблюдаются сети совместно с одиночными нитями и волокнами (рис. 2, 3).



Рис. 3. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в морфологической форме нейтрофильных волокон. Острый холецистит (после оперативного вмешательства). Время инкубации 1 ч. Окрашивание CYBR Green. × 1000.

Fig. 3. Neutrophil extracellular traps in the morphological form of neutrophil fibers. Acute cholecystitis (after surgery). Incubation time is 1 hour. Coloring CYBR Green. × 1000.

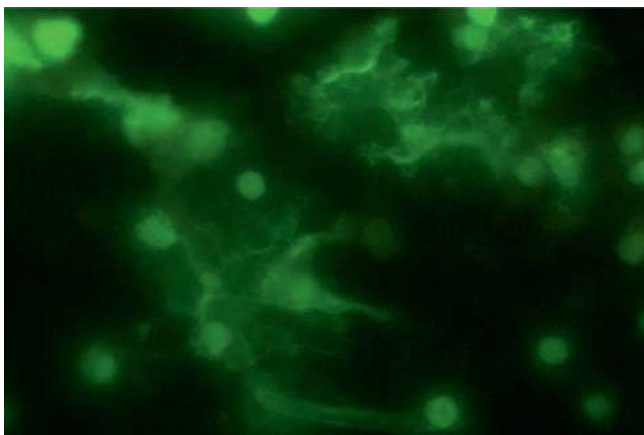


Рис. 4. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в вуалеобразной форме. Перитонит.

Время инкубации 1 ч. Окрашивание CYBR Green. × 1000.

Fig. 4. Neutrophil extracellular traps in a cloud form. Peritonitis. Incubation time is 1 hour.

Coloring CYBR Green. × 1000.

4. При остром панкреатите/панкреонекрозе во всех случаях регистрировали нейтрофильные сети совместно с одиночными нитями, волокнами и вуалиями.

5. У больных с перитонитом ведущая структура НЭЛ это вуали. Сетевидные формы тоже присутствуют в небольшом количестве (около 10% от общего количества нейтрофильных экстраклеточных структур), встречаются также волокна (рис. 4).

6. При язвенном колите присутствуют нейтрофильные сети небольшого размера. Обнаруживается значительное количество вуалеобразных форм.

Результаты этого раздела исследования показывают, что, несмотря на отсутствие достоверных различий в количественных характеристиках НЭЛ у больных с различными нозологическими формами воспалительного процесса в брюшной полости, различия, тем не менее, выявляются на уровне морфологического строения НЭЛ.

Основные морфологические формы нейтрофильных экстраклеточных ловушек у больных с воспалительными заболеваниями в брюшной полости

Результаты этого экспериментального раздела (табл. 2) показывают, что оценка морфологического строения НЭЛ у больных с острыми воспалительными процессами в брюшной полости может быть полезной при дифференциальной диагностике заболевания. Эта оценка не носит абсолютного характера, но может найти применение для определения тяжести текущего воспалительного процесса и выявления осложнений.

Мы предполагаем, что применение нашего метода визуализации детальной структуры НЭЛ позволит выявить скрытые осложнения, что повысит эффективность проводимого лечения.

Результаты индивидуальных измерений параметров НЭЛ и их функциональной активности у отдельных больных при поступлении на госпитализацию

Прогнозирование риска инфекционных осложнений у хирургических больных в послеоперационном периоде представляет собой актуальную и полностью не решенную проблему.

Для практикующих врачей-хирургов в качестве критериев прогнозирования развития таких осложнений у хирургических больных после оперативного вмешательства предложено много различных методик. Существующие методы оценки и прогноза опираются на текущее клиническое состояние больных, параметры адаптивного иммунитета (активность Т-лимфоцитов, содержание иммуноглобулинов и белков комплемента), уровни некоторых ферментов липидно-

го обмена. Хирургические процедуры, как известно, приводят к увеличению количества потенциально патогенных бактерий в организме пациентов [4] и часто вызывают формирование иммунодефицита в послеоперационном периоде.

Непрерывно идут поиски наиболее эффективных маркеров для прогнозирования инфекционных осложнений в послеоперационном периоде. К их числу в последнее время относят показатель отношения нейтрофилов/лимфоциты (NLR), которое может указывать на развитие послеоперационных инфекционных осложнений [5]. В некоторых сообщениях предлагают в качестве такого маркера использовать отношение лимфоциты/моноциты (LMR). Получены данные о том, что соотношение лимфоцитов к моноцитам (LMR) также является независимым показателем отдаленных результатов после хирургических операций [6]. Сообщают, что послеоперационное определение прокальцитонина может быть маркером для прогнозирования послеоперационных инфекционных осложнений после хирургических вмешательств [7]. Тем не менее, в клинической практике уровень С-реактивного белка остается наиболее востребованным показателем ответа острой фазы у хирургических больных и традиционно применяется в клинике как для оценки тяжести состояния больных, так и в качестве маркера риска осложнений в послеоперационном периоде [8, 9]. Общая

особенность перечисленных методов прогнозирования риска развития инфекционных осложнений состоит в том, что все они используют параметры оценки системного ответа острой фазы в организме больного. Однако, указанные методы прогнозирования риска инфекционных осложнений не позволяют уточнить, какой будет защитная реакция клеточного звена врожденного иммунитета (нейтрофилов) при поступлении патогена в организм больного.

Общепризнанным является факт, что инфекционные осложнения являются наиболее частыми среди всех осложнений в послеоперационном периоде, однако отсутствие четко обоснованной иммунологической концепции не позволяет заранее прогнозировать, а затем и интерпретировать возникающие при мониторинге осложнения, что затрудняет предложения стратегий вмешательства [10].

Вместе с тем, нам представляется, что наиболее эффективный подход к решению этой проблемы может состоять в том, чтобы подвергать оценке процесс, лежащий в основе инициации и запуска противоинфекционного ответа организма.

Задача запуска противоинфекционного ответа организма на вторгающуюся инфекцию возложена на систему врожденного иммунитета. Клетки врожденного иммунитета (нейтрофилы, моноциты/макрофаги), снабженные рецепторами врожденного иммунитета

Таблица 2/Table 2

Преобладающие морфологические формы НЭЛ у больных при различных нозологических формах воспалительного процесса в брюшной полости

The predominant morphological forms of NETs in patients with various nosological forms of the inflammatory process in the abdominal cavity

Нозологическая форма воспалительного процесса The nosological form of the inflammatory process	Сети Networks	Одиночные нити Single Threads	Волокна Fibers	Вуали Clouds
Острый аппендицит, неосложненный Acute appendicitis, uncomplicated	++++	-	-	-
Острый аппендицит, осложненный абсцессом Acute appendicitis complicated by an abscess	+++	+	+	+
Острый холецистит Acute cholecystitis	++	+	+	-
Острый панкреатит/панкреонекроз Acute pancreatitis/pancreonecrosis	+	+	+	+
Перитонит Peritonitis	+	-	+	++
Язвенный колит Ulcerative colitis	+	-	-	+++

Примечание. +++++ – значительное количество нейтрофильных экстраклеточных структур;

+ – минимальное (менее 10% от общего количества) нейтрофильных экстраклеточных структур.

Note. +++++ – a significant number of neutrophil extracellular structures; + – minimum (less than 10% of the total) neutrophil extracellular structures.

(TLR), распознают патогены, формируют нейтрофильные экстраклеточные ловушки, захватывают, удерживают и повреждают патоген за счет действия активных форм кислорода и некоторых других факторов.

В пределах настоящего исследования помимо морфологических параметров НЭЛ определяли также и функциональную активность НЭЛ у отдельных больных. Функциональная активность НЭЛ это их

способность захватывать и связывать патогены. В качестве тестового микроорганизма, который добавляли к нейтрофилам, выделенным у больных, использовали клетки *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). После распознавания и захвата патогена нейтрофильные сети развивают ретракцию волокон сети и приобретают вуалеобразную форму, в центре которой локализованы клетки патогена.

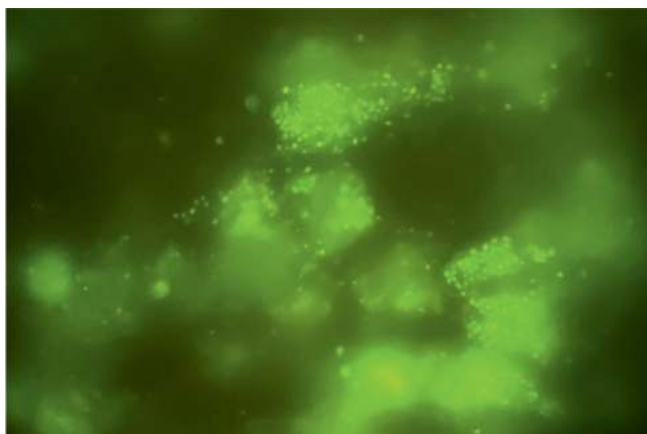


Рис. 5. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в вуалеобразной форме. Неоперированная грыжа (больной № 1). Высокая связывающая способность нейтрофильных экстраклеточных структур к захвату патогена *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). Время инкубации 1 ч. Окрашивание CYBR Green. × 1000.

Fig. 5. Neutrophil extracellular traps in a clouds form. An unoperated hernia (patient No. 1). High binding ability of neutrophil extracellular structures to capture the pathogen *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). Incubation time is 1 hour. Coloring CYBR Green. × 1000.

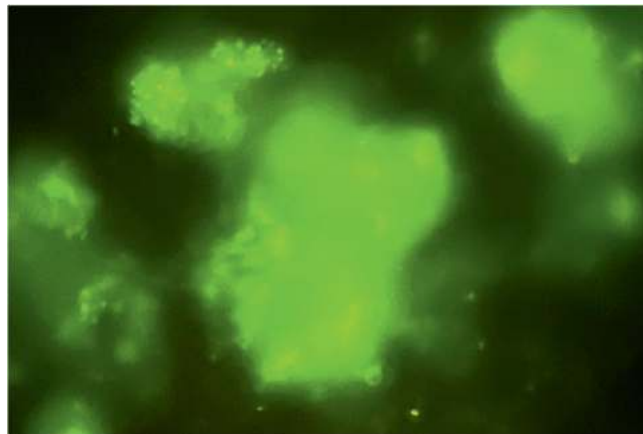


Рис. 6. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в вуалеобразной форме. Перитонит (больной № 6). Ослабление патоген-связывающей способности нейтрофильных экстраклеточных структур к захвату *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). Время инкубации 1 ч. Окрашивание CYBR Green. × 1000.

Fig. 6. Neutrophil extracellular traps in a clouds form. Peritonitis (patient No. 6). Weakening of the pathogen-binding ability of neutrophil extracellular structures to capture *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). Incubation time is 1 hour. Coloring CYBR Green. × 1000.

Таблица 3/ Table 3

Клиническо-лабораторные показатели больных, поступивших за один день

Clinical and laboratory indicators of patients admitted in one day

№	Возраст, лет Age, years	Диагноз Diagnosis	Общее состояние Patient's condition	Количество лейкоцитов ×10 ⁹ /л Leukocyte count ×10 ⁹ /l	С-реактивный белок, мг/л C-reactive protein, mg/l
1.	42	Пупочная грыжа Umbilical hernia	Удовлетворительное Satisfying	-	-
2.	42	Паховая грыжа Inguinal hernia	Средней тяжести Moderate severity	-	-
3.	62	Панкреатит, панкреонекроз Pancreatitis, pancreatic roses	Тяжелое Serious condition	6,2	155
4.	28	Перитонит Peritonitis	Средней тяжести Moderate severity	16,3	115
5.	33	Перитонит Peritonitis	Средней тяжести Moderate severity	14,0	71
6.	49	Перитонит Peritonitis	Средней тяжести Moderate severity	14,5	71

Функциональная активность нейтрофилов, полученных от больных, тем выше, чем больше клеток *Klebsiella pneumoniae* захватывают и удерживают нейтрофильные внеклеточные структуры. В таблице 3 приводятся клинико-лабораторные показатели отдельных больных, поступивших на госпитализацию за один день.

Нами было выявлено, что, несмотря на различное по степени тяжести состояние обследованных больных при поступлении в стационар, количественные параметры их НЭЛ (численность и размеры) не показали значительных отличий. Так, количество НЭЛ у всех больных соответствует диапазону 10-14%, а их размеры изменяются от 40 до 64 мкм.

Функциональная активность НЭЛ у обследованных больных оказалась различной. Так, неоперированные больные с пупочной и паховой грыжей (№ 1 и 2) показали высокую связывающую способность патогена нейтрофильными сетями на уровне 43-44 клеток тестового микроорганизма *Klebsiella pneumoniae* на одну нейтрофильную сеть. Больной с панкреатитом/панкреонекрозом (№ 3), а также двое больных с перитонитом (№ 4 и 5) также показали довольно высокую способность нейтрофильных внеклеточных сетей к захвату и связыванию клеток тестового микроорганизма, лежащую в диапазоне 20-25 клеток на одну сеть (рис. 5). Дальнейшие клинические наблюдения за состоянием этих больных (№ 1-5) не зарегистрировали развития инфекционных осложнений у них в послеоперационном периоде.

Однако, у больного № 6, который при поступлении имел умеренное значение С-реактивного белка, нами было выявлено резкое ослабление функциональной активности нейтрофилов (рис. 6). В среднем, его нейтрофильные внеклеточные структуры связывали только 8 клеток патогена. Это показатель был в 5 раз ниже, чем у других поступивших в этот день больных с неоперированной грыжей, в 3 раза ниже, чем у тяжелого больного с диагнозом панкреатит/панкреонекроз (№ 3) и также по сравнению с другими больными с диагнозом перитонит (№ 4 и 5). Дальнейшие наблюдения за динамикой состояния больных в ходе стационарного лечения показали, что состояние этого больного (№ 6) через 2 дня послеоперационного периода резко ухудшилось, и развилось осложнение в виде острого септического процесса, сопровождающегося высокой лихорадкой. Этот пациент в дальнейшем продолжал лечение в отделении интенсивной терапии. Тщательное клинико-лабораторное и инструментальное обследование этого пациента в отделении не выявило причину столь тяжелого инфекционного

осложнения. Мы полагаем, что причина осложнения в виде септического процесса у данного пациента может быть связана с предшествующим резким снижением функциональной активности НЭЛ.

Заключение

Приоритетная концепция настоящего исследования предполагает признание того, что в основе инициации запуска защитных систем организма лежит формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек (NETs, НЭЛ) при поступлении патогенов в организм человека. Эти структуры способны захватывать и удерживать патогены, подвергая их при этом повреждению и инактивации. Впоследствии развивается фагоцитоз, сопряженный с внутриклеточным гидролизом патогенов и фрагментов нейтрофильных сетей. В результате этих начальных иницирующих процессов происходит презентация антигенов, которая позволяет включить в ответную защитную реакцию систему адаптивного иммунитета. Результаты проведенного исследования впервые демонстрируют разнообразие морфологических структур нейтрофильных экстраклеточных ловушек у больных с воспалительными заболеваниями брюшной полости.

Главной, функционально активной структурой НЭЛ является сетевидная морфологическая форма, которая способна эффективно захватывать и удерживать патогены. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в форме нейтрофильных сетей обнаружены нами при всех исследованных нозологических формах инфекционного воспаления в брюшной полости. Дополнительно обнаруживаются некоторые другие морфологические нейтрофильные структуры – нитевидные, волокнистые и вуалеобразные. Обнаружение сочетания главной сетевидной нейтрофильной структуры с дополнительными нейтрофильными структурами может быть положено в основу дифференциальной диагностики воспалительных заболеваний брюшной полости.

Количественные параметры НЭЛ (их численность) при изученных заболеваниях оказывается сходным, а различия проявляются в виде тенденции. Наиболее заметные различия обнаружены при сравнении острого локального воспаления (аппендицит) и распространенного (перитонит), что позволяет сделать заключение о том, что количество нейтрофильных экстраклеточных ловушек определяется размерами и распространенностью очага воспаления на соседние анатомические области. Данные других исследователей, проводивших подобные исследования, выявляют зависимость численности НЭЛ от тяжести заболевания.

Впервые проведена оценка размеров НЭЛ у больных с различными нозологическими формами абдоминального воспаления и выявлены различия при локальном, отграниченном и распространенном воспалительных процессах в брюшной полости.

При локальном воспалении размеры НЭЛ последовательно достоверно увеличиваются в ряду «острый аппендицит, острый холецистит, острый панкреатит» за счет присоединения дополнительных нитевидных и волокнистых нейтрофильных структур.

При распространенном неотграниченном воспалении в брюшной полости (перитонит) размеры нейтрофильных сетей испытывают тенденцию к снижению.

Наиболее существенные результаты получены при исследовании функциональной активности нейтрофильных сетей у отдельных больных, поступающих на госпитализацию. Результаты показывают, что выявление ослабления функциональной активности нейтрофильных сетей может быть использовано в качестве критерия для прогнозирования возможных инфекционных осложнений в послеоперационном периоде.

Выводы

1. Все, без исключения, исследованные нозологические формы воспаления в брюшной полости сопровождаются формированием НЭЛ в виде нейтрофильных сетей.

2. Помимо нейтрофильных сетей воспаление индуцирует у части больных формирование НЭЛ в виде одиночных нитей, волокон и вуалей.

3. Количественные параметры НЭЛ коррелируют с размерами и распространением очага воспаления на соседние анатомические области.

4. На примере описанного клинического случая обнаружено резкое ослабление функциональной активности НЭЛ, которое предшествовало развитию септического осложнения. Прослеживается связь между исходно ослабленной функциональной активностью нейтрофильных экстраклеточных ловушек и развитием септического осложнения у пациента в послеоперационном периоде.

Соответствие принципам этики. Исследование проб крови проводили на кафедре патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России. Все процедуры выполнялись в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации ВМА (в редакции 2004 г.) и письменного информированного согласия пациентов. Исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» (Протокол № 203 от 21.12.2021 г.)

Литература (п.п. 4–10 см. References)

1. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И. Новые возможности диагностики и исследования патогенеза различных видов воспаления. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(2): 34–42. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.02.34-42>
2. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В. Антивирусная система врожденного иммунитета: патогенез и лечение COVID-19. *Вестник РГМУ.* 2020; (5): 5–14. <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2020.054>
3. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И., Ларина В.Н., Ступин В.А. и др. IgG стимулирует образование внеклеточных ловушек нейтрофильных клеток и изменяет их структуру. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2023; 174 (6): 806-9. <https://doi.org/10.1007/s10517-023-05794-2>

References

1. Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I. New opportunities for diagnosis and investigation of the pathogenesis of various types of inflammation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2022; 66(2): 34–42. (in Russian) <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.02.34-42>
2. Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V. Antiviral system of innate immunity: COVID-19 pathogenesis and treatment. *Vestnik RGMU.* 2020; (5): 5–13. (in Russian) <https://doi.org/10.24075/brsmu.2020.054>
3. Kazimirskii A.N., Salmasi Zh.M., Poryadin G.V., Panina M.I., Larina V.N., Stupin V.A., et al. IgG Stimulates the Formation of Neutrophil Extracellular Traps and Modifies Their Structure. *Bull Exp Biol Med.* 2023; 174(6): 806-9. <https://doi.org/10.1007/s10517-023-05794-2>
4. Lederer A.K., Pisarski P., Kousoulas L., Fichtner-Feigl S., Hess C., Huber R. Postoperative changes of the microbiome: are surgical complications related to the gut flora? A systematic review. *BMC Surg.* 2017; 17(1): 125. <https://doi.org/10.1186/s12893-017-0325-8>
5. Mohri Y., Tanaka K., Toiyama Y., Ohi M., Yasuda H., Inoue Y., et al. Impact of Preoperative Neutrophil to Lymphocyte Ratio and Postoperative Infectious Complications on Survival After Curative Gastrectomy for Gastric Cancer: A Single Institutional Cohort Study. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(11): e3125. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003125>
6. Kamonvarapitak T., Matsuda A., Matsumoto S., Jamjitrong S., Sakurazawa N., Kawano Y., et al. Preoperative lymphocyte-to-monocyte ratio predicts postoperative infectious complications after laparoscopic colorectal cancer surgery. *Int J Clin Oncol.* 2020; 25(4): 633-40. <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01583-y>
7. Vasavada B., Patel H. Postoperative serum procalcitonin versus C-reactive protein as a marker of postoperative infectious complications in pancreatic surgery: a meta-analysis. *ANZ J Surg.* 2021; 91(5): E260-E270. <https://doi.org/10.1111/ans.16639>
8. Medina-Fernández F.J., Garcilazo-Arismendi D.J., García-Martín R., Rodríguez-Ortiz L., Gómez-Barbadillo J., Gallardo-Valverde J.M., et al. Validation in colorectal procedures of a useful novel approach for the use of C-reactive protein in postoperative infectious complications. *Colorectal Dis.* 2016; 18(3): O111-O118. <https://doi.org/10.1111/codi.13284>

9. Řezáč T., Stašek M., Zbořil P., Špička P. The role of CRP in the diagnosis of postoperative complications in rectal surgery. *Pol Przegl Chir.* 2021; 93(5):1-7. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0014.6591>. PMID: 34552029
10. Sousa Á.F.L., Bim L.L., Hermann P.R.S., Fronteira I., Andrade D. Late postoperative complications in surgical patients: an integrative review. *Rev Bras Enferm.* 2020; 73(5): e20190290. <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2019-0290>

Сведения об авторах:

Казимирский Александр Николаевич, доктор биол. наук, доцент, вед. науч. сотр. отдела молекулярных технологий, проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: alnica10@mail.ru;

Салмаси Жан Мустафаевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: profjms@yandex.ru;

Порядин Геннадий Васильевич, член-корр. РАН, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: poryadin_GV@rsmu.ru;

Панина Марина Ивановна, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: pan-mar@list.ru;

Рогожина Людмила Сергеевна, ассистент каф. госпитальной хирургии № 1, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: lusy-090909@yandex.ru;

Ступин Виктор Александрович, доктор мед. наук, проф. каф. госпитальной хирургии № 1 лечебного факультета, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: stvictor@bk.ru;

Ким Анна Эрнестовна, ассистент каф. патофизиологии и клинической патофизиологии, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: infoany@mail.ru;

Титова Екатерина Геннадиевна, ст. преподаватель, каф. патофизиологии и клинической патофизиологии, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: Ека-gen@mail.ru;

Турищева Ольга Олеговна, канд. мед. наук., ст. преподаватель каф. патофизиологии и клинической патофизиологии, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: turishevaolia@mail.ru;

Хамназдаева Надежда Вениаминовна, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии и клинической патофизиологии ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, e-mail: lyssa_ash@mail.ru