



## НАРУШЕНИЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ И ИММУННОГО СТАТУСА И ИХ КОРРЕКЦИЯ У ДЕТЕЙ С АППЕНДИКУЛЯРНЫМ ПЕРИТОНИТОМ

**В.П. Гаврилюк**  
**А.И. Конопля**  
**С.А. Долгарева**

*Курский  
государственный  
медицинский  
университет*

*e-mail: wvas@mail.ru*

В статье изложены данные о нарушениях иммунного статуса и структурно-функциональных свойств эритроцитов у детей с аппендикулярным перитонитом. В работе определена недостаточная эффективность использования традиционной комплексной терапии у детей с аппендикулярным перитонитом и обоснована необходимость применения дополнительно иммуномодулирующих препаратов. Определена иммунокорректирующая, мембранопротективная и 7антиоксидантная эффективность использования лонгидазы в комплексной терапии детей с аппендикулярным перитонитом.

Ключевые слова: лонгидаза, аппендикулярный перитонит, иммунные нарушения, эритроциты, состояние перекисного окисления липидов.

Несмотря на постоянное совершенствование методов диагностики и лечения острого аппендицита у детей, доля послеоперационных осложнений при наиболее тяжелых формах заболевания сохраняется на высоком уровне и составляет 5–30% [5, 6]. Причем развитие осложнений при аппендикулярном перитоните остается мало прогнозируемым, а значит, и недостаточно управляемым процессом. Существующие на современном этапе различия в хирургической тактике в отношении методов санации и дренирования брюшной полости, самой методики операции (открытая или лапароскопическая) не оказывают значительного влияния на число послеоперационных внутрибрюшных осложнений [13, 15]. В сложившейся ситуации дальнейшее улучшение результатов лечения может быть достигнуто путем эффективного воздействия на патологические механизмы развития перитонита [16, 21].

Исход острого воспалительного заболевания органов брюшной полости зависит от соотношения агрессивных и защитных факторов организма, что требует пристального целенаправленного изучения иммунного статуса и профильной коррекции его нарушений. Сегодня можно с убедительностью утверждать о том, что эритроциты вовлекаются в патологический процесс не только при гематологических заболеваниях, но и претерпевают серьезные изменения структуры и функции при болезнях разного генеза. При этом, большинство авторов исходят из позиции, что красные кровяные клетки, помимо осуществления присущей им специфической газотранспортной функции, принимают участие в обеспечении стабильности и регуляции кислотно-основного состояния и водно-солевого обмена, определяют микрореологические свойства крови и функции иммунокомпетентных клеток и т.д., участвуя тем самым в процессах, связанных с поддержанием гомеостаза на уровне целого организма [1].

**Цель работы** – установление иммунокорректирующей, антиоксидантной и мембранопротективной активности лонгидазы у детей в условиях аппендикулярного перитонита.

**Материалы и методы.** Под постоянным наблюдением находилось 27 детей в возрасте старше 12 лет (средний возраст 13,7±0,9 лет) с верифицированным диагнозом разлитой гнойный аппендикулярный перитонит. Диагноз выставлялся на основании характерной клинической картины, лабораторно-инструментальных и интраоперационных данных. Группа контроля состояла из 12 соматически здоровых детей того же возраста.

Больным в первые сутки после верификации диагноза и предоперационной подготовки в условиях реанимационно-анестезиологического отделения производи-

лось открытое оперативное вмешательство – из доступа по Волковичу-Дьяконову производилась аппендэктомия, аспирация выпота, промывание и дренирование брюшной полости. В послеоперационном периоде производилось обезболивание, инфузионная и антибактериальная (цефалоспорины III поколения + аминогликозиды III поколения + метронидазол) терапия, которая корригировалась согласно результатам посева и определения чувствительности флоры в перитонеальной жидкости. Кроме этого 11 пациентов дополнительно в послеоперационном периоде получали лонгидазу (3 000 МЕ внутримышечно на 3, 6, 9, 12 и 15 сутки).

Выбор препарата основан на том, что он состоит из двух компонентов – протеолитического фермента (лидазы) и иммуномодулятора (полиоксидония). Первый компонент обеспечивает препарату гликолитические, регенерационные свойства, включение второго – полиоксидония – не только позволяет корригировать иммунные нарушения, но и стабилизирует структуру фермента [11, 12, 14].

Лабораторные методы исследования крови проводились по общепринятым методикам при поступлении больных в стационар и на 18-ые сутки. При оценке гемограмм за основу брались физиологические нормы, соответствующие международной системе единиц (СИ) в клинических исследованиях [10].

В работе фенотип лимфоцитов определялся методом иммунофлюоресцентного анализа с помощью моноклональных антител (ООО «Сорбент», г. Москва) к структурам CD3, CD4, CD8, CD22 [8]. Содержание иммуноглобулинов классов M, G и A определяли в плазме крови методом радиальной иммунодиффузии по Манчини, используя диагностический набор ООО НПЦ «Медицинская иммунология» (г. Москва).

Количественная оценка уровней ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-10, проводилась с помощью тест-систем (ООО «Цитокин», г. Санкт-Петербург) методом твердофазного иммуноферментного анализа. Активность и интенсивность фагоцитоза нейтрофилов периферической крови оценивали по фагоцитарному индексу (ФИ) и фагоцитарному числу (ФЧ). Активность кислородзависимых систем нейтрофилов оценивали по реакции восстановления нитросинего тетразолия спонтанного (НСТ-сп.) и стимулированного зимозаном (НСТ-ст.) [3, 9, 17]. Выраженность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию в крови малонового диальдегида (МДА) и ацилгидроперекисей (АГП) [2, 4]. Кроме этого, определяли активность каталазы [1].

Эритроциты получали из 5 мл гепаринизированной крови по методу E. Beutler [18]. Определяли сорбционную способность эритроцитов (ССЭ) и сорбционную емкость их гликокаликса (СЕГ) [1]. О функциональном состоянии эритроцитов судили также по накоплению в них малонового диальдегида [1]. Мембраны эритроцитов получали методом G.T. Dodge [19]. Электрофорез проводили в присутствии додецилсульфата натрия в вертикальных пластинах полиакриламидного геля по методу U.K. Laemmli [22]. Белки окрашивали Кумаси голубым R-250 по модифицированной методике G. Fairbanks [20].

Статистическую обработку результатов исследования проводили, используя непараметрические методы: критерии Вилкоксона-Манна и Уитни, Крускала-Уоллиса, Фридмана и непараметрический вариант критерия Ньюмена-Кейлса [7].

**Результаты.** При поступлении у больных АП установлено снижение содержания в крови CD3, CD4 и CD8-лимфоцитов, повышение CD22-клеток, концентрации в плазме крови IgM и IgG, снижение активности и интенсивности фагоцитоза нейтрофилов периферической крови (снижение ФИ и ФЧ) при повышении их кислородзависимой активности (рис. 1).

При изучении цитокинового статуса у больных АП выявлено повышение концентрации в плазме крови всех изученных провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8), продуктов ПОЛ (МДА и АГП), при неизменной концентрации противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4 и ИЛ-10) и активности каталазы (рис. 1).

К моменту выписки из стационара после традиционного комплексного лечения нормализуется уровень в крови CD8 и CD22-лимфоцитов, концентрация в плазме крови IgM, ФИ, частично ФЧ и кислородзависимая активность нейтрофилов периферической крови. В плазме крови снижается до уровня нормы концентрация ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$ ,

снижается, но не до нормальных цифр, концентрация ФНО $\alpha$ , ИЛ-8, МДА и АГП, возрастает концентрация ИЛ-4 (рис. 1).

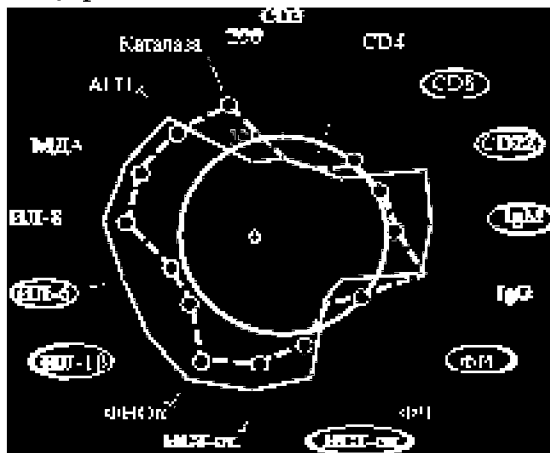


Рис. 1. Иммуный статус и состояние перекисного окисления липидов у детей с аппендикулярным перитонитом до лечения и через 18 дней с момента поступления в стационар.

Примечания.

1. Радиус окружности – показатели у здоровых доноров (1 группа);
2. ————— – показатели у больных АП до лечения (2 группа);
3. - - - - - – показатели у больных АП на 18-ые сутки традиционного лечения (3 группа);
4. ○ –  $p < 0,05$  между показателями 2 и 3 группами;
5. ○ –  $p > 0,05$  между показателями 3 группы по отношению с 1 группой.

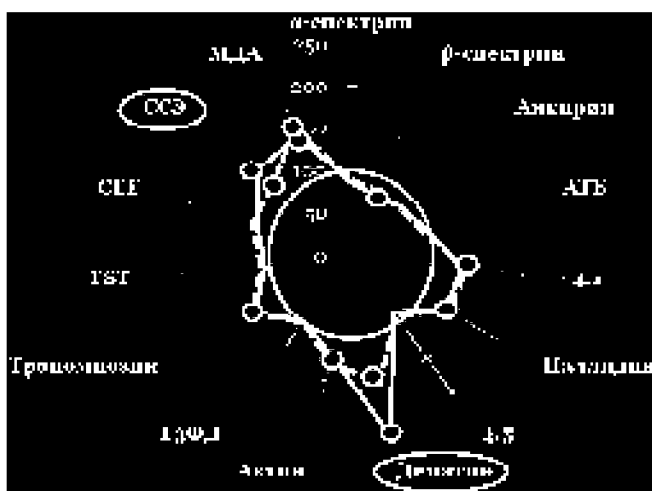


Рис. 2. Структурно-функциональные свойства эритроцитов у детей с аппендикулярным перитонитом до лечения и через 18 дней с момента поступления в стационар

Примечания.

1. Радиус окружности – показатели у здоровых доноров (1 группа);
2. ————— – показатели у больных АП до лечения (2 группа);
3. - - - - - – показатели у больных АП на 18-ые сутки традиционного лечения (3 группа);
4. ○ –  $p < 0,05$  между показателями 2 и 1 группами;
5. ○ –  $p > 0,05$  между показателями 3 группы по отношению с 1 группой.

Кроме этого, у пациентов с АП при поступлении в эритроцитарной мембране снижается количество  $\beta$ -спектрина и подфракции анкирина и повышается содержание белка полосы 4.1, 4.2, дематина и тропомиозина, повышается общая сорбционная способность эритроцитов и внутриклеточная концентрация малонового диальдегида (рис. 2). К моменту выписки из стационара у детей с АП снижается представительность в

эритроцитарной мембране дематина, но не до уровня здоровых доноров, и уменьшается ССЭ (рис. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о выраженных нарушениях иммунного статуса, состояние ПОЛ и структурно-функциональных свойств эритроцитов, имеющих место у детей с АП, только частично купируемые проводимым комплексом консервативных и хирургических мероприятий.

Использование лонгидазы у детей с АП позволило дополнительно к традиционной терапии нормализовать количество CD3-лимфоцитов, концентрацию ИЛ-8, АГП и значения НСТ-теста стимулированного, кроме этого частично нормализовать концентрацию ФНО $\alpha$ , МДА, повысить активность каталазы и фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови (рис. 3).

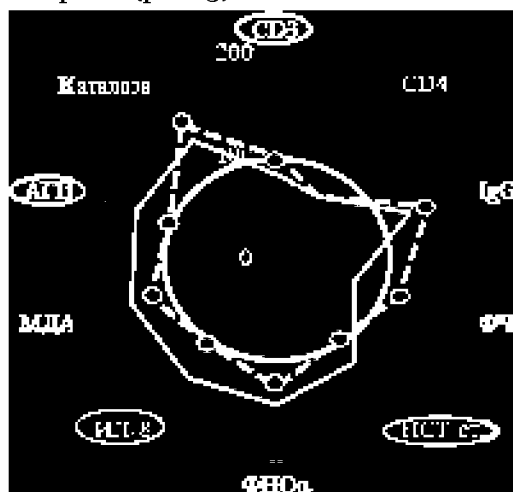


Рис. 3. Иммунный статус и состояние перекисного окисления липидов у детей с аппендикулярным после традиционного лечения отдельно и дополненного лонгидазой

Примечания.

1. Радиус окружности – показатели у здоровых доноров (1 группа);
2. ————— – показатели у больных АП до после традиционного лечения (2 группа);
3. - - - - - – показатели у больных АП на 18-ые сутки традиционного лечения + лонгидаза (3 группа);
4. ○ –  $p < 0,05$  между показателями 2 и 3 группами;
5. ○ –  $p > 0,05$  между показателями 3 группы по отношению с 1 группе.

Кроме этого использование лонгидазы позволило у детей с АП нормализовать общую ССЭ, представительность  $\beta$ -спектрина, тропомиозина и дематина и снизить, но не до уровня нормы концентрацию внутриэритроцитарную МДА.

Представленные выше данные позволяют сделать заключение, что интраабдоминальная инфекция, имеющая место при аппендикулярном перитоните, у детей тесно связана с дестабилизацией иммунной системы, характеризующейся дефицитом клеточного иммунитета, снижением фагоцитарной активности нейтрофилов, активация гуморального иммунитета (повышение концентрации CD22-лимфоцитов, IgM и IgG) и повышении кислородзависимой активности нейтрофилов в сочетании с провоспалительными цитокинами и нарушением структурно-функциональных свойств красных клеток крови.

**Обсуждение.** Структурно-функциональные свойства эритроцитов входят в цепь приспособительных механизмов, поддерживающих постоянство внутренней среды, как в норме, так и в условиях патологии. Развивающийся «окислительный взрыв» приводит к повышению процессов перекисного окисления липидов, как внутри клетки, так и в ее мембране, что характеризуется повышением внутриклеточного количества МДА. Это приводит к «вымыванию» холестерина из фосфолипидного слоя эритроцитарной мембраны, уменьшению ее липидной части, некоторой потере периферических низкомолекулярных мембранных белков и относительному повышению количества гликопротеидов, что, по-видимому и повышает ССЭ.



Безусловно происходящие изменения структурно-функциональных свойств эритроцитарной мембраны приводит к изменению их антигенной структуры, что влияет на механизмы регулирования иммунологических функций. В настоящее время множество работ посвящено установлению выраженности и роли иммунных нарушений при разлитом перитоните, клинически апробированы достаточно эффективные иммунокорректирующие фармакологические схемы в коррекции нарушений иммунного гомеостаза у больных с перитонитом, включающие иммуномодулирующие препараты в комплексе с антиоксидантами, антигипоксантами, стабилизаторами клеточных мембран и другими.

Полученные данные об изменениях иммунного статуса и состоянии ПОЛ у детей с АП подтверждают важную роль эритроцитов в поддержании иммунного гомеостаза в условиях аппендикулярного перитонита и у детей, кроме этого в реализации иммуностимулирующих эффектов фармакологических схем иммунореабилитации у таких больных.

Включение в программу послеоперационного ведения детей старшей возрастной группы препаратов, сочетающих иммуномодулирующую и гиалуронидазную активность, обеспечивает адекватность ответа иммунной системы на операционную травму, о чем свидетельствуют нормализация ряда показателей иммунного статуса, структурно-функциональных свойств красных клеток крови и состояния ПОЛ.

Таким образом, коррекцию иммуно-метаболического статуса в послеоперационном периоде у детей, перенесших вмешательства по поводу аппендикулярного разлитого гнойного перитонита, можно рассматривать как обязательную составляющую комплексной терапии.

### Литература

1. Банкова, В.В. Способ оценки патологических изменений плазматической мембраны у детей при различных заболеваниях / В.В. Банкова, Н.Ф. Прищепова, О.И. Авратинский // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1987. – № 3. – С. 78-81.
2. Бенисевич, В.И. Образование перекисей непредельных жирных кислот в оболочке эритроцитов при болезни Маркиафава-Микели / В.И. Бенисевич, Л.И. Идельсон // Вопр. мед. химии. – 1973. – Т. 19, Вып. 6. – С. 596–599.
3. Виксман, М.Е. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия. / М.Е. Виксман, А.Н. Маянский. – Казань, 1979. – 15 с.
4. Гаврилов, В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В.Б. Гаврилов, М.И. Мишкорудная // Лаб. дело. – 1983. – №3. – С. 33–36.
5. Дронов, А.Ф. Лапароскопические методы лечения аппендикулярного перитонита у детей / А.Ф. Дронов [и др.] // Материалы VII Российского конгресса «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии». – 2008. – С. 355.
6. Карасева, О.В. Лечение аппендикулярного перитонита у детей / О.В. Карасева [и др.] // Детская хирургия. – 2007. – № 3. – С. 23-27.
7. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1980. – 243 с.
8. Лесков, В.П. Клиническая иммунология для врачей / В.П. Лесков [и др.]. – М., 1997. – 120 с.
9. Медведев, А.Н. Способ исследования поглотительной фазы фагоцитоза / А.Н. Медведев, В.В. Чаленко // Лаб. дело. – 1991. – № 2. – С. 19–20.
10. Меньшиков, В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. В.В. Меньшиков. – М.: Медицина, 1987. – 365 с.
11. Назаренко, Т.А. Применение препарата лонгидаза в комплексной терапии патологических изменений эндометрия / Т.А. Назаренко, Л.В. Дубницкая // Акушерство и гинекология. – 2007. – № 5. – С. 95–98.
12. Петрович, Е.А. Безопасность и эффективность препарата лонгидаза 3000 МЕ при лечении больных, страдающих спаечным процессом в малом тазе / Е.А. Петрович, А.А. Колесов, И.Б. Манухин // Иммунология. – 2006. – № 2. – С. 124–126.
13. Пулатов, А.Т. О классификации острого аппендицита и аппендикулярного перитонита у детей / А.Т. Пулатов // Детская хирургия. – 2007. – № 1. – С. 36-40.

14. Пушкарь, Д.Ю. Лонгидаз в терапии хронического простатита / Д.Ю. Пушкарь, А.В. Зайцев, А.С. Сегал // Иммунология. – 2006. – № 2. – С. 119–121.
15. Цитохимическая оценка течения раннего послеоперационного периода при аппендикулярном перитоните у детей. Вопросы современной педиатрии/под ред.И.В. Писарева – 2007. – Т. 6, №3. – С. 28-31.
16. Шамсиев, А.М. Репродуктивное здоровье женщин, перенесших аппендикулярный перитонит и первичный перитонит в детском возрасте / А.М. Шамсиев, Б.Л. Давранов, Ж.А. Шамсиев // Детская хирургия. 2008. – № 3. – С. 35-39.
17. Щербаков В.И. Применение НСТ-теста для оценки чувствительности нейтрофилов к стимуляторам / В.И. Щербаков. // Лаб. дело. – 1989. – № 1. – С. 30–33.
18. Beutler E. How do red cell enzymes age a new perspective // Brit. J. Haemat. – 1985. – V. 61. – P. 377-384.
19. Dodge, G.T. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes / G.T. Dodge, C. Mitchell, D.J. Hanahan. // Arch. Biochem. Biophys. – 1963. – V. 100. – P. 119-130.
20. Fairbanks G. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane / G Fairbanks, T. Steck // Biochemistry. – 1971. – V. 10. – P. 2606-2616.
21. Haecker F.M. Peritonitis in childhood: clinical relevance of cytokines in the peritoneal exudate / F.M. Haecker.[et al.] // Eur. J. Pediatr. Surg. – 2006. – Vol. 16(2). – P. 94-99.
22. Laemli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemli // Nature. – 1970. – V. 227. – P. 680.

## **DISTURBANCES OF STRUCTURALLY FUNCTIONAL PROPERTIES OF ERYTHROCYTES AND THE IMMUNE STATUS AND THEIR CORRECTION AT CHILDREN WITH APPENDICULAR PERITONITIS**

**V.P. Gavrioliuk**  
**A.I. Konoplya**  
**S.A. Dolgareva**

*Kursk*  
*State Medical*  
*University*

*e-mail: wvas@mail.ru*

In article data about disturbances of the immune status and structurally functional properties of erythrocytes at children with appendicular peritonitis are presented. In work small efficiency of traditional treatment at patients with appendicular peritonitis is established and necessity of use additional immunomodulating preparations is proved. It is defined immunomodulatory, membranoprotective and antioxidatic efficiency of longidaza in complex therapy of children with appendicular peritonitis.

Key words: longidaza, appendicular peritonitis, immune disturbance, red blood cells, condition of lipid peroxidation.