

ИЗУЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ У ПАЦИЕНТОВ С ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ НУТРИТИВНОЙ ПОДДЕРЖКОЙ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ ВМЕШАТЕЛЬСТВЕ НА ОРГАНАХ ЖКТ

© Дорджиев В.Э.^{2,3} Красносельский К.Ю.^{1,3} Александрович Ю.С.³,
Дементьева Е.А.³, Гурина О.П.³

¹ Санкт-Петербургский государственный Университет, Санкт-Петербург

² Клиническая больница № 122 им. Л.Г. Соколова ФМБА России, Санкт-Петербург.

³ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. Россия Медико-социальный институт, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Обследовано 12 пациентов в возрасте от 49 до 76 лет, которым в плановом порядке произведены оперативные вмешательства на органах брюшной полости. Пациенты были разделены на две группы. В первой (основной) группе (6 человек), кроме стандартного хирургического стола, для нутритивной поддержки использовался Импакт-орал (Nestle), Омега-3 жирные кислоты, L-карнитин, L-глутамин и аминокислоты ВСАА. Контрольная группа нутритивную поддержку не получала. Иммунофенотипирование лимфоцитов выполнялось методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови и «безотмывочной» технологии (проточный цитометр Epics XL, Beckman Coulter, США). Наблюдается стабильность в популяции Т-лимфоцитов в послеоперационном периоде в основной группе.

Ключевые слова: популяция лимфоцитов, проточная цитометрия, нутритивная поддержка, операция, иммунные смеси, омега-3 жирные кислоты, L-карнитин, L-глутамин и аминокислоты ВСАА.

STUDY OF LYMPHOCYTES POPULATION BY METHOD OF FLOW CYTOMETRY IN PATIENTS WITH PRE-OPERATIVE NUTRITIVE SUPPORT WITH SURGICAL INTERVENTION ON ORGANS OF THE GASTROINTESTINAL TRACT

© Dordzhiev V.E.^{2,3}, Krasnoselsky K.Y.^{1,3}, Aleksandrovich Yu.S.³,
Dementieva E.A.³, Gurina O.P.³

¹ St. Petersburg state University, St. Petersburg

² Clinical hospital № 122 them. L.G. Sokolov of FMBA of Russia, Saint Petersburg

³ St. Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia

Summary: the study included 12 patients aged 49 to 76 years, who routinely performed the surgical intervention on the organs of abdominal cavity. The patients were divided into two groups. In the first (main) group (6 persons), in addition to a standard surgical table for nutritional support used Impact-oral (Nestle), omega-3 fatty acids, L-carnitine, L-glutamine and BCAA. The control group has not received nutritional support. Immunophenotyping of lymphocytes was performed by flow cytometry using direct immunofluorescence assay of whole peripheral blood and “no clean” technology (flow cytometer Epics XL, Coulter Vismap, USA). There is stability in the population Of t-lymphocytes in the postoperative period in the main group.

Key words: lymphocyte population, flow cytometry, nutritional support, surgery, immune compounds, omega-3 fatty acids, L-carnitine, L-glutamine and BCAA.

ВВЕДЕНИЕ

Нутритивная поддержка пациентов в наше время перестала быть абсолютной прерогативой специалистов нутрициологов и стала обязательным компонентом ведения пациента в пред- и послеоперационном периоде. Хорошо известно, что ранняя адекватная нутритивная поддержка, представленная различными сочетаниями методик

парентерального и энтерального питания, является на настоящем этапе развития медицины наиболее эффективным методом коррекции расстройств белкового и энергетического обмена. Для того что бы оценить адекватность и эффективность питательной поддержки используют различные методики инструментальной и лабораторной диагностики.

К настоящему времени методы оценки питательного статуса, схемы контроля, выбора и продолжительности питания пациента в периоперационном периоде находятся в состоянии непрерывного совершенствования. В России и мире предложены варианты, как протоколов диагностики, так и коррекции нутритивного статуса у пациентов разного возраста [1–8]. В частности, отмечается роль биоимпедасометрии (БИМ) и непрямой калориметрии (НК) среди современных методов диагностики питательного статуса [9–13]. Можно отметить интерес к пониманию необходимости предоперационной нутритивной подготовки пациента, и отметить важность использования при этом иммуномодулирующего питания [14–19]. Также подчеркнем, исследуются неблагоприятные последствия после хирургического вмешательства при недостаточной предоперационной нутритивной подготовке [13, 17, 20–25]. В протоколе скрининговой оценки нутритивного риска NRS2002 при высоком риске развития питательной недостаточности отмечается, что важнейшим из критериев является количество лимфоцитов [6]. Кроме того, отметим важность лимфоцитов в иммунном ответе, в распознавании и лизировании опухолевых клеток при первичном контакте [26]. В модуляции противоопухолевого иммунного надзора, особенно на раннем этапе развития неоплазии, важную роль играют Т-хелперы (CD3+CD4+лимфоциты), НК-клетки, NKT-популяция клеток. Низкий уровень в крови CD3+CD4+CD16+лимфоцитов считают одним из патофизиологических механизмов нарушения элиминации малигнизированных клеток из организма [27]. Внедрение методов проточной цитометрии позволило изучить особенности популяций лимфоцитов при различных заболеваниях у детей и взрослых [26, 28, 29, 30].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение популяции лимфоцитов с помощью проточной цитометрии у пациентов при хирургическом вмешательстве на органах ЖКТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 12 пациентов в возрасте от 49 до 76 лет, которым в плановом порядке произведены оперативные вмешательства на органах брюшной полости. В соответствии с анамнезом пациенты были отнесены к II–III группе риска по классификации ASA. Пациенты были разделены на две группы. В первой (основной) группе (6 человек), кроме стандарт-

ного хирургического стола, для нутритивной поддержки использовался Импакт-орал (Nestle) до операции и Импакт энтерал после, Омега-3 жирные кислоты, L-карнитин, L-глютамин и аминокислоты ВСАА. Пациенты получали эти препараты в течение не менее 5 дней до операции. Во второй (контрольной) группе (6 человек) не использовали нутритивную поддержку, а в послеоперационном периоде обе группы получали стандартный хирургический стол. По возрасту и массе тела пациенты обеих групп статистически значимо не отличались. Возраст пациентов основной группы колебался от 59 до 71 года, масса тела составила 75 (68,5–83) кг. Возраст пациентов контрольной группы был от 49 до 76 лет, масса тела — 74,5 (69,5–81) кг. Основную группу образовали пациенты, которым были проведены 2 левосторонние гемиколэктомии, 2 экстирпации желудка, 1 резекция прямой кишки и 1 ПДР, а в контрольной группе — 2 левосторонних гемиколэктомии, 2 резекции желудка и 2 резекции прямой кишки.

Иммунофенотипирование лимфоцитов выполнялось методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови и «безотмывочной» технологии (проточный цитометр Epics XL, Beckman Coulter, США). Для оценки распределения лимфоцитов по различным популяциям клетки окрашивались трехцветными комбинациями моноклональных антител, конъюгированных с флуоресцентными красителями FITC/PE/PC5: CD45/CD3/CD19, CD45/CD3/CD4, CD45/CD3/CD8, CD45/CD3/CD (16+56), CD45/CD3/HLA-DR, CD45/CD3/CD25 (Beckman Coulter, США). Популяции клеток выделялись при помощи гетерогенного гейтирования. Абсолютные значения лимфоцитов подсчитывались с использованием референсных частиц. Замеры проводились до операции (первый этап) и после операции через 24 часа (второй этап), на 3–5-й день (третий этап) и 7–10-й день (четвертый этап) после оперативного вмешательства. Статистически значимых различий в продолжительности операции не выявлено, в основной группе она составила 412 (350–660) минут, а в контрольной — 424 (386–575).

Премедикация на операционном столе состояла из атропина (0,007 мг/кг), фентанила (0,002 мг/кг). Сочетанная анестезия состояла из эндотрахеального наркоза и использования эпидурального катетера. Индукция анестезии: пропофол (2 мг/кг), эсмерон (0,6 мг/кг). Поддержание анестезии: N₂O:O₂ (1:1, FiO₂=50%), пропофол, фентанил. Периоперационные дозы гипнотиков, анальгетиков и миорелак-

Таблица 1

Результаты исследования

Группа		1	2	3	4	Норма
Абсолютные показатели лимфоцитов	1	1,62 (0,75–1,9)	1,0 (0,7–1,4)	1,4 (1,2–1,8)	1,3 (1–1,6)	1–4,8
	2	1,46 (1,1–1,88)	0,8 (0,6–1,5)	0,9 (0,8–1,0)	1,0 (0,9–1,7)	
В-lymph CD 19, кл/мкл	1	217(114–346)	233(224–315)	260(223–348)	203(198–257)	200–600
	2	115 (81–173)	120(89–221)	88,5(64,5–109)	75(70–103)	
Т-lymph CD3	1	1256(549–1416)	940(470–1161)	1130(903–1356)	932(738–1398)	800–3500
	2	1066(829–1560)	595(480–1213)	783(703–1190)	892(759–1422)	
Т-helper CD3+CD4	1	806(549–838)	422 (247–631)	718(659–810)	718(531–762)	400–2100
	2	538(381–1096)	319(219–419)	481(387–895)	693(471–945)	
Т CD3+CD8	1	469 (86–675)	285 (142–490)	387(166–588)	286(187–627)	200–1200
	2	386(311–806)	319 (210–412)	319(210–412)	256(201–454)	
NK CD3-(CD16+56)	1	163 (51–226)	125 (85–195)	145,5(105–216)	188(176–233)	70–1200
	2	178 (124–246)	107 (84–231)	93,5(76,5–101,5)	91 (81–223)	
NKT CD3+CD(16+56)	1	38 (6–83)	35 (13–92)	51,5(22–94)	41(40–49)	2–216
	2	108 (47–121)	68 (55–10)	43,5(38,5–68,5)	57(42–75)	

сантов в группах достоверно не различались. Введение препаратов для анестезии (миелоре-лаксантов, опиоидов, гипнотиков) проводилось по целевой концентрации. Расчет концентрации препаратов, вводимых внутривенно, производился при помощи фармакологических моделей на основе программы TIVAManager. Целевая концентрация ингаляционного анестетика измерялась по показаниям газоанализатора на выдохе. Соответствие гипнотического компонента контролировалось ЭЭГ. Для этого регистрировался ряд показателей: нативная ЭЭГ, спектральная мощность (электроэнцефалограф Мицар — ЭЭГ–201 Россия). Начальным и конечным моментами интраоперационного периода приняты, соответственно, момент разреза кожи и время после ушивания раны. Для сравнительного анализа полученных данных использовали непараметрический критерий Wilcoxon, реализованный в программе STATISTICA 6.0. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Графические построения осуществлялись в программе Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования представлены в таблице 1.

Абсолютное количество лимфоцитов в контрольной группе снижается в послеоперационном периоде. Лимфопения сохраняется в этой группе в отличие от основной, в которой наблюдается их рост на 3-м и 4-м этапе. Количество В-лимфоцитов значительно ниже в дооперационном периоде у контрольной груп-

пы. Кроме того, наблюдается супрессия В-клеточного звена, в отличие от основной группы на протяжении всего послеоперационного периода. Наблюдается снижение популяции Т-лимфоцитов в послеоперационном периоде в контрольной группе, которые не восстанавливаются до выписки пациента. Подобная супрессия происходит и с Т-хелперами. В NK и NKT клетках наблюдается стабильность значений в течение всего периоперационного периода в основной группе, в отличие от контрольной группы.

ВЫВОДЫ

Разработанная предоперационная нутритивная подготовка поддерживает должный уровень популяции лимфоцитов на протяжении всего периода лечения. Диагностика состояния нутритивного статуса с помощью проточной цитометрии является действенным и точным методом как биоимпедансометрия и непрямая калориметрия. Метод оценки популяции лимфоцитов с помощью проточной цитометрии даст возможность тщательнее исследовать пациента и с большей вероятностью прийти к положительному результату лечения. Этот метод можно активно использовать при всевозможных заболеваниях и хирургии на органах ЖКТ, при онкопатологии, а также у пациентов находящихся в критическом состоянии. К главным плюсам данной методики можно отнести: Экономичность, безопасность, возможность многократного повторения исследования. А динамическое наблюдение, варианты корректировки и воздействия на конечный результат дают бес-

спорное преимущество для выбора тактики и лечения пациента. Сочетанное использование исследования популяции лимфоцитов с помощью проточной цитометрии для определения и коррекции нутритивного статуса имеет огромный потенциал для дальнейшего развития и внедрения в медицину.

ЛИТЕРАТУРА

- Хутубия М.Ш. Парентеральное и энтеральное питание. Национальное руководство / Хутубия М.Ш., Попова Т.С. Салтанов А.И. // ГЭОТАР-Медиа, 2015. 800 с.
- Луфт В.М. Протоколы нутриционной поддержки больных (пострадавших) в интенсивной медицине. / Луфт В.М., Лапицкий А.В. // СПб.: Стикс, 2017. 100 с.
- Костюченко Л.Н. 2013. Нутрициология в гастроэнтерологии. Специальное издательство медицинских книг, 2013. 448 с.
- ESPEN Guidelines for Nutrition Screening, (Европейское общество парентерального и энтерального питания) 2000.
- ASPEN. Guidelines for use of parenteral and enteral nutrition in adult and paediatric patients. (Американское общество парентерального и энтерального питания) 2002.
- Nutritional Risk Screening 2002.
- Алешина Е.И., Андриянов А.И., Богданова Н.М., Эдлеева А.Г., Кириченко Н.Н., Комиссарова М.Ю., Леонова И.А., Новикова В.П., Хомич М.М., Юрьев В.В. Методы исследования нутритивного статуса у детей и подростков. Санкт-Петербург, 2014. (2-е издание, исправленное и дополненное).
- Гурова М.М., Ткаченко Е.И. Лечебное питание детей в критических состояниях: современные подходы. Вопросы детской диетологии. 2004. Т. 2. № 5. С. 28–45.
- Kuchnia A. Evaluation of Bioelectrical Impedance Analysis in Critically Ill Patients: Results of a Multicenter Prospective Study. / Kuchnia A1, Earthman C, Teigen et al. // 2016 May 24.
- Cloetens L. Assessment of body composition in subjects with metabolic syndrome comparing single-frequency bioelectrical impedance analysis and bioelectrical spectroscopy. / Cloetens L1, Johansson-Persson A, Helgegren H, et al. // 2015 Mar;13(2):91–8.
- Verdich C. Changes in body composition during weight loss in obese subjects in the NUGENOB study: comparison of bioelectrical impedance vs. dual-energy X-ray absorptiometry. / Verdich C1, Barbe P, Petersen M, et al. // 2011 Jun;37(3):222–9.
- Faria S.L. Metabolic profile of clinically severe obese patients / Faria SL1, Faria OP, Menezes CS, et al. // 2012 Aug;22(8):1257–62.
- Drover J.W. Perioperative use of arginine-supplemented diets: a systematic review of the evidence. / Drover JW1, Dhaliwal R, Weitzel L, et al. // 2011 Mar;212(3):385–99, 399.e1.
- Reis A.M. COST-Effectiveness of perioperative immunonutrition in gastrointestinal oncologic surgery: a systematic review. / Reis AM1, Kabke GB2, Fruchtenicht AV2, et al. // 2016 Apr-Jun;29(2):121–5.
- Klek S. The impact of immunostimulating nutrition on infectious complications after upper gastrointestinal surgery: a prospective, randomized, clinical trial. / Klek S1., Kulig J., Sierzeга M. et al. // 2008 Aug;248(2):212–20.
- Klek S. Perioperative immunonutrition in surgical cancer patients: a summary of a decade of research. / Klek S1., Szybinski P., Szczepanek K. et al. // 2014 Apr;38(4):803–12.
- Giger U. Preoperative immunonutrition suppresses perioperative inflammatory response in patients with major abdominal surgery—a randomized controlled pilot study / Giger U1., Büchler M., Farhadi J. et al. // 2007 Oct;14(10):2798–806.
- Celik J.B. The role of immunonutrition in gynecologic oncologic surgery / Celik JB1, Gezginc K., Özçelik K. et al. // 2009;30(4):418–21.
- Ferreira L.G. 2013. Resting energy expenditure, body composition, and dietary intake: a longitudinal study before and after liver transplantation / Ferreira LG1., Santos L.F., Anastácio L.R. et al. // Sep;96(6):579–85.
- Agustsson T. 2012. Adipose tissue volume is decreased in recently diagnosed cancer patients with cachexia. // Agustsson T1., Wikrantz P., Rydén M. et al. // Sep;28(9):851–5.
- de Carvalho T.M. Evaluation of patients with head and neck cancer performing standard treatment in relation to body composition, resting metabolic rate, and inflammatory cytokines / de Carvalho TM1, Miguel Marin D., da Silva C.A. et al. // 2015 Jan;37(1):97–102.
- Ceolin Alves A.L. Energy Expenditure in Patients With Esophageal, Gastric, and Colorectal Cancer / Ceolin Alves AL1, Zuconi CP2, et al. // 2016 May;40(4):499–506.
- Griffiths R.D. Nutrition support for patients in the intensive care unit / Griffiths RD1, Bongers T. et al. // 2005 Oct;81(960):629–36.
- Giusti V. Energy and macronutrient intake after gastric bypass for morbid obesity: a 3-y observational study focused on protein consumption. / Giusti V1, Theytaz F2, Di Vetta V3, et al. // 2016 Jan;103(1):18–24.
- Camina Martín M.A. Specific bioelectrical impedance vector analysis (BIVA) is more accurate than classic BIVA to detect changes in body composition and in nutritional status in institutionalised elderly with dementia / Camina Martín MA1, de Mateo Silleras B2, Barrera Ortega S. et al. // 2014 Sep;57:264–71.
- Пичугина Л.В. Изменение фенотипа лимфоцитов при некоторых патологиях. Лабораторная медицина. 2008; 9: с. 39–44.
- Зяблов Е.В. Сравнительная оценка иммунного статуса при раке щитовидной железы и первично-множественном синхронном раке щитовидной и молочной желез. / Зяблов Е.В., Селезнева Т.Д. // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. 2013; 3 (2): 223.
- Гурина О.П., Дементьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н., Степанова А.А., Блинов Г.А. Иммунофенотип лимфоцитов при вирус-ассоциированном гломерулонефрите у детей. В сборнике: Современная педиатрия. Санкт-Петербург — белые ночи. 2018. Материалы форума. 2018. С. 38–39.
- Гурина О.П., Дементьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н. Иммунофенотип лимфоцитов при болезни Крона у детей. Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. 2016. № 3–4. С. М10b.
- Гурина О.П., Дементьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н., Тимохина В.И. Особенности иммунного реагирования при атопии у детей. Педиатр. 2014. Т. 5. № 4. С. 95–103.