

О.М.Сулаєва

Донецький національний
медичний університет
ім. М. Горького

Ключові слова: нейтрофіли, пептичні виразки, кровотечі.

Надійшла: 16.05.2011
Прийнята: 12.06.2011

УДК 616.379–008.64: 616.33/.34–002.34

ДИСФУНКЦІЯ НЕЙТРОФІЛІВ У ХВОРИХ З ПЕПТИЧНИМИ ВИРАЗКАМИ, УСКЛАДНЕНИМИ КРОВОТЕЧЕЮ

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи «Міжклітинні та міжтканинні кооперації в реалізації репаративної регенерації органів: залежність від реактивності організму» (№ державної реєстрації 0109U008714).

Резюме. Для аналізу дисфункції лейкоцитів у патогенезі виразкових кровотеч проводили оцінку кисень залежних процесів, фагоцитарної активності та цитохімічних показників нейтрофілів 100 хворих з кровотечами з виразок шлунка та дванадцятипалої кишки при ефективному гемостазі (1 група, n=77) та розвитку рецидиву кровотечі (2 група, n=23). Визначено, що розвиток виразкової кровотечі у пацієнтів 1-ї групи асоційований з підвищенням спонтанної продукції активних радикалів кисню, обмеженням індукованої активності НАДФН оксидази, зниженням активності кислої фосфатази, мієлопероксидази та зниження фагоцитарного числа при зростанні фагоцитарного індексу. Фактором ризику розвитку повторних кровотеч у пацієнтів 2-ї групи було різке зростання спонтанної НСТ на фоні нівелювання функціонального резерву кисень залежного метаболізму нейтрофілів при значному інгібуванні фагоцитарної активності та зниження активності лізосомальних ферментів.

Морфологія. – 2011. – Т. V, № 2. – С. 80-83.
© О.М.Сулаєва, 2011.

Sulayeva O.N. Dysfunction of neutrophils in patients with peptic ulcers, complicated with bleeding.

Summary. To analyze a role of leukocytes dysfunction in the pathogenesis of ulcer bleeding the oxygen dependent metabolism, phagocytic activity and cytochemical indices of neutrophils were estimated in 100 patients with gastric and duodenal ulcers bleeding with effective hemostasis (group 1, n = 77) and rebleeding (group 2, n = 23). It was shown that peptic ulcer bleeding in patients of group 1 was associated with moderate increase of spontaneous production of active oxygen radicals, restriction of induced NADPH oxidase activity, decrease of acid phosphatase and myeloperoxidase activity but enhancement of phagocytic index. Sharp increase of spontaneous NBT-reaction with lost of oxidize functional reserve in neutrophils with significant inhibition of ability to phagocytosis and decreased of lysosomal enzymes activity were risk factors for rebleeding in patients of group 2.

Key words: neutrophils, peptic ulcer, bleeding.

Вступ

Згідно з сучасною концепцією патогенезу патології гастродуоденальної зони (ГДЗ), асоційованої з *Helicobacter pylori*, провідним фактором розвитку пептичних виразок та їх ускладнень є запальний процес (Аруин Л.И., 1998). Його розвиток багато в чому пов'язаний з дією пептичних факторів та ефектами *Helicobacter pylori*, що через каскад внутрішньоклітинних сигнальних подій індукує продукцію клітинами покривного епітелію хемокінів (зокрема IL-8), та з особливостями системи імунного захисту індивідууму (Кондратенко П.Г., 2006; Konturek S.J., 2005). Найважливішою ланкою системи антимікробного захисту та ефекторами гострої запальної відповіді організму на ушкодження є нейтрофіли (Нф) (Долгушин И.И., 2001). Відомо, що загострення виразкової хвороби супроводжується підсиленням їх рекрутування до зони ураження. Численні роботи імунологів та молекулярних біологів присвячені вивченню особливостей

структурних змін та механізмів реалізації антимікробної функції нейтрофілів. Проте як змінюється функціональна активність Нф за умов тривалого дизрегенераторного і запального процесу, який розвивається в ГДЗ на фоні системної і локальної дисрегуляції та зміни імунологічної реактивності, що мають місце за умов виразкової хвороби, відомо мало. Ще менш фактів щодо зміни функціональної відповіді нейтрофілів на деструкцію тканин ГДЗ та їх роль у розвитку виразкових кровотеч.

Мета: визначення функціональної активності Нф за умов розвитку кровотечі у хворих з виразками ГДЗ.

Матеріали та методи

Нейтрофіли виділяли з периферійної крові 100 хворих з кровотечами з виразок шлунка та дванадцятипалої кишки шляхом градієнтного центрифугування. Для оцінки життєздатності отримані нейтрофіли забарвлювали трипановим синім і підраховували в препараті відсоток забар-

рвлених клітин. Під час цитохімічного дослідження НФ визначали активність кислій (КФ) і мієлопероксидази (МПО) (Барінова М.Э., 2007). Внутрішньоклітинний кисень залежний метаболізм інтерпретували за показниками НСТ-теста в нестимульованих та інкубованих з пірогеналом НФ. За цим у пробірці з 0,1 мл суспензії нейтрофілів додавали 0,05 мл 0,2% розчину НСТ в 0,1 мл фосфатного буферу. Суміш інкубували 30 хв при температурі 37°C. Пробірки центрифугували, з осаду готували мазки, фіксували метанолом, забарвлювали 0,1% розчином сафроніну впродовж 5 хвилин. За цим розраховували інтенсивність НСТ-реакції (Dahlgren С., 2007). Крім того, розраховували функціональний резерв нейтрофілів (ФРН) як співвідношення між інтенсивністю індукованої та спонтанної НСТ-реакції. Фагоцитарну функцію НФ оцінювали, використовуючи вбиту культуру *Staphylococcus aureus* (штам № 209). Після інкубації гранулоцити висушували, фіксували метанолом і забарвлювали за методом Романовського-Гімзи. Розраховували активність фагоцитозу – відсоток фагоцитів з 100 клітин, фагоцитарний індекс (ФІ) – число активно фагоцитуючих НФ з 100 клітин і фагоцитарне число (ФЧ) – середня кількість мікробних тіл, захоплених одним фагоцитуючим НФ (Барінова М.Э., 2007). Контрольну групу склали 10 волонтерів відповідного віку без клінічних ознак патології гастроуденальної зони та гострих запальних процесів. Отримані результати обробляли статистично у програмі MedStat (Лях Ю.Е., 2006).

Результати та їх обговорення

Дослідження функціональної активності Нф у хворих з виразковими кровотечами визначило значні відміни від контролю. На момент госпіталізації хворих із виразковими кровотечами НФ периферійної крові знаходилися в активованому стані. Про це свідчило зростання показника спонтанної НСТ реакції. У здорових людей інтенсивність спонтанної НСТ реакції складала $0,565 \pm 0,014$. На відміну від цього в групі спостереження зареєстровано широкі варіації даного показника від 0,5 до 1,6. Характерно, що підйом спонтанної НСТ реакції відбувався не у всіх НФ, частина цих лейкоцитів знаходилася у стані лізису, що підтверджувалося при забарвленні трипановим синім. Відсоток нежиттєздатних клітин коливався від 12 до 47%. У визначенні причин таких широких варіацій було проведено співставлення даного параметра функціональної відповіді нейтрофілів з клініко-лабораторними показниками у обстежених хворих. Такий аналіз не визначив вагомого впливу на інтенсивність спонтанної локалізації та розміру виразкових дефектів. Цікавими виявилися дані щодо зміни спонтанної НСТ у пацієнтів з різним терміном госпіталізації після появи клінічних симптомів кровотечі. Так, у хворих, що потрапили у перші 6 го-

дин від клінічної маніфестації, спонтанна НСТ-реакція в більшості випадків недостовірно перевищувала контроль, проте після 12-24 годин відмінність даного показника від контролю набувала максимальної виразності ($p < 0,01$), однак зменшувалася у хворих з тривалістю кровотечі більше 2 діб. Така динаміка корелювала із зростанням кількості паличкоядерних НФ у периферійній крові ($r = 0,62$, $p < 0,01$).

Максимальні розбіжності щодо інтенсивності НСТ реакції в нестимульованих НФ були визначені у хворих з різним перебігом та результатом виразкового процесу – із стабільним гемостазом і загоєнням виразок (1 група, 77 пацієнтів) та з розвитком повторних кровотеч (2 група, 23 пацієнти). За даними статистичного аналізу, між групами розбіжності сягали майже двократної різниці: в 1-й групі $Me \pm m$ становила $0,69 \pm 0,016$ (ВІ=0,67-0,71), тоді як в 2-й групі даний показник дорівнював $1,3 \pm 0,023$ (ВІ=1,2-1,5). Проте в 4 пацієнтів з рецидивами виразкових кровотеч було визначено значне зниження спонтанної НСТ (до $0,37 \pm 0,03$), що в 1 випадку супроводжувалося розвитком летального результату. Цікаво, що при аналізі анамнестичних та клініко-лабораторних даних було з'ясовано, що всі ці пацієнти страждали на супутню патологію шлунково-кишкового тракту, в 3 з них мав місце цироз печінки та синдром портальної гіпертензії. Така ситуація відбиває різну градацію підйому активності НАДФН оксидази в нейтрофілах периферійної крові пацієнтів з виразковими кровотечами, а відповідно і продукцію активних радикалів кисню, що провокує підсилення оксидативного ушкодження тканин.

Закономірно, що ситуація з індукованою пірогеналом НСТ-реакцією також мала відміни від контролю. Якщо у контролі інтенсивність індукованої НСТ-реакції зростала до $1,59 \pm 0,03$, то за умов виразкової кровотечі і НСТ-реакція не перевищувала $1,40 \pm 0,03$ як в 1-й, так і в 2-й групах. Не дивлячись на схожі параметри досліджуваного показника, така ситуація свідчить про різний ступінь обмеження резервної потужності НАДФН-оксидази, що відбивалося на значному зниженні функціонального резерву в обох групах. Така ситуація відбиває роль змін кисень-залежного метаболізму у детермінації перебігу запально-репаративного процесу ризик розвитку рецидиву кровотечі у пацієнтів з порушенням механізмів реалізації респіраторного вибуху. Частково ці факти можуть бути пов'язані з виходом у периферійну кров за умов кровотечі незрілих форм НФ, кількість яких в 1-й групі сягала 5 ± 1 (ВІ=4-6), а в 2-й групі – 7 ± 1 (ВІ=6-8) ($p < 0,05$).

Зареєстрована активація нейтрофілів у периферійній крові пацієнтів з крововтратою, по суті, є закономірною і відбиває гостру відповідь організму на ушкодження, що асоційована з під-

йомом продукції прозапальних цитокінів – ІЛ-1 β , ІЛ-6, ФНПа, С-реактивного білку, активацією системи комплементу тощо. Проте окрім констатації факту зростання спонтанної активності кисень-залежних процесів в нейтрофілах при обмеженні їх функціонального резерву важливо визначити їх роль у детермінації процесів, що розвиваються в організмі хворих з виразковими кровотечами. Проведення кореляційного аналізу не встановило залежності показників кисень-залежного метаболізму від локалізації та розміру виразок, тривалістю виразкової хвороби та наявності супутньої патології. Було визначено наявність статистично значущого зв'язку між ступенем крововтрати та показником інтенсивності спонтанної НСТ реакції ($r=0,427$; $p<0,05$). Значущість змін НАДФ-Н оксидазної активності нейтрофілів підтверджувалося наявністю кореляційного зв'язку з розвитком ускладнень – рецидиву кровотечі, геморагічного шоку, летального результату ($r=-0,695$; $p<0,05$), та даними дисперсійного аналізу ($F=7,34$; $p<0,01$).

Окрім змін кисень-залежних процесів, Нф хворих з виразковими кровотечами відрізнялися порушенням фагоцитарної активності. В 1-й групі визначено значне зростання фагоцитарного індексу (ФІ) порівняно з контролем. Проте фагоцитарне число (ФЧ) було статистично значуще нижчим за показник у здорових людей ($p<0,01$), що свідчить про дисбаланс між процесами адгезії та захоплюючої активності НфФ. Ця ситуація, можливо відбиває особливості організації цитоскелету та зміни тирозинового фосфорилування в клітинах за умов тривалого інфекційно-запального процесу в організмі. Ситуація в 2-й групі характеризувалася синхронним зниженням як ФІ ($p<0,05$), так і ФЧ ($p<0,001$), причому ці показники відрізнялися й від значень в 1 групі ($p<0,01$). Така ситуація, по суті відбиває виразну дисфункцію нейтрофілів у частини пацієнтів з виразковими кровотечами та роль цього феномену в детермінації перебігу деструктивно-запального процесу у стінці шлунка та дванадцятипалої кишки.

Таблиця 1

Показники метаболізму та функціональної активності нейтрофілів у пацієнтів з кровотечами з виразок гастродуоденальної зони

Показник (ум. од)	Контроль M \pm m	1 група, n=77 Me \pm m	2 група, n=23 Me \pm m
НСТс	0,57 \pm 0,02	0,65 \pm 0,02 (0,61-0,67) $p_1<0,05$	1,30 \pm 0,02 (1,20-1,40) 0,39 \pm 0,03 (0,37-0,41) $p_1<0,01$; $p_2<0,001$
НСТі	1,59 \pm 0,03	1,40 \pm 0,02 (1,30-1,50) $p_1<0,05$	1,40 \pm 0,02 (1,30-1,50) $p_1<0,001$
ФР	2,83 \pm 0,03	1,97 \pm 0,04 (1,83-2,10) $p_1<0,001$	1,02 \pm 0,01 (1,00-1,07) $p_1<0,001$; $p_2<0,01$
КФ	61,10 \pm 0,65	39,00 \pm 0,67 (38-40) $p_1<0,001$	27,00 \pm 0,68 (26-29) $p_1<0,05$; $p_2<0,001$
МПО	198,80 \pm 4,39	142,0 \pm 1,4 $p_1<0,01$	102,0 \pm 2,4 $p_1<0,001$; $p_2<0,01$

Примітка: p_1 – достовірність різниці у порівнянні з контролем; p_2 – достовірність різниці у порівнянні 1 групою.

Обмеження кисень-залежного метаболізму та фагоцитарної активності нейтрофілів у хворих з виразковими кровотечами були асоційовані з певними змінами цитохімічних показників (таблиця 1). Так, у всіх хворих з виразковими кровотечами відзначено зниження активності КФ і МПО ($p<0,01$). Враховуючи роль ферментів неспецифічних гранул у внутрішньоклітинному бактеріолізі та кілінгу мікроорганізмів, можна констатувати зміну всіх елементів системи антимікробного захисту НФ хворих на виразки ГДЗ, ускладнені розвитком кровотечі. Оскільки неспецифічні гранули утворюються ще на ранніх етапах морфологічного диференціювання НФ, така ситуація у поєднанні зі змінами фагоцитарної активності та кисень-залежного метаболізму відбиває зниження «якості» гранулоцитопоезу.

Це з одного боку не дивно, з огляду на хронічну мікробну агресію за умов гастродуоденальної патології, порушення нейрогуморальної та цитокінової системи контролю, а з іншого - стимулює до пошуку молекулярних мішеней керування функціональним станом нейтрофілів за умов ульцерогенезу. Крім того, така ситуація визначає порушення неспецифічного імунологічного захисту організму, неспроможність обмеження деструкції та запалення у просторі та часі, та прогресування альтерації у ГДЗ, що призводить до розвитку первинних та повторних кровотеч.

Висновок. Розвиток виразкових кровотеч асоційований з дисфункцією нейтрофілів, яка полягає у порушенні рецепторного апарату, цитоскелету, ензиматичного складу лізосом та кисень-залежного метаболізму клітин. Порушення

функціонального стану нейтрофілів не тільки демонструє обмеження неспецифічного захисту організму у хворих з виразковими кровотечами, але й відбиває зміни регуляції їх життєвого циклу, що може лежати в основі порушенням механізмів розрешення запалення та неефективністю регенерації ушкоджених структур в гастродуоденальній зоні.

Перспективи подальших розробок. Визначення механізмів дисфункції нейтрофілів за умов виразкових кровотеч є основою розробки стратегії корекції порушень запально-репаративного процесу.

Список літературних джерел

Аруин Л. И. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника / Л. И. Аруин, Л. Л. Капуллер, В. А. Исаков // – М. – 1998. – 496 с.

Барина М. Э. Цитохимическая характеристика и фагоцитарная активность нейтрофилов у больных сахарным диабетом при длительно незаживающей ране стопы / М. Э. Барина, Н. В. Свиридов, О. Н. Сулаева // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2007. – Т. 8, № 1. – С. 98–101.

Барина М. Э. Функциональная активность нейтрофилов крови больных сахарным диабетом при гнойно-некротическом поражении стопы / М. Э. Барина, О. Н. Сулаева, Б. П. Терещук // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2007. – Т. 7, вип. 1-2. – С. 17–20.

Долгушин И. И. Нейтрофилы и гомеостаз / И. И. Долгушин. – Екатеринбург, 2001. – 315 с.

Кондратенко П. Г. Острое кровотечение в просвет органов пищеварительного канала / П. Г. Кондратенко, Н. Л. Смирнов, Е. Е. Раденко. – Донецк, 2006. – 420 с.

Лях Ю. Е. Основы компьютерной биостатистики / Ю. Е. Лях, Г. В. Гурьянов, В. Н. Хоменко, О. А. Панченко. – Д. – 2006. – 211 с.

Dahlgren C. Measurement of respiratory burst products generated by professional phagocytes / C. Dahlgren, A. Karksson, J. Bylund // Methods Mol. Biol. – 2007. – Vol. 412. – P. 349–363.

Konturek S. J. From nerves and hormones to bacteria in the stomach; Nobel prize for achievements in gastrology during last century / S. J. Konturek, P. C. Konturek, T. Brozowski // J. Physiol. Pharmacology. – 2005. – Vol. 56. – P. 507-530.

Сулаева А.М. Дисфункция нейтрофилов у больных с пептической язвой, осложненной кровотечением.

Резюме. Для анализа дисфункции лейкоцитов в патогенезе язвенных кровотечений проводили оценку кислород зависимых процессов, фагоцитарной активности и цитохимических показателей нейтрофилов 100 больных с кровотечениями из язв желудка и двенадцатиперстной кишки при эффективном гемостазе (1 группа, n = 77) и развитии рецидива кровотечения (2 группа, n = 23). Определено, что развитие язвенной кровотечения у пациентов 1-й группы ассоциировано с повышением спонтанной продукции активных радикалов кислорода, ограничением индуцированной активности НАДФН оксидазы, снижением активности кислой фосфатазы, миелопероксидазы и снижением фагоцитарного числа при росте фагоцитарного индекса. Фактором риска развития повторных кровотечений у пациентов 2-й группы был резкий рост спонтанной НСТ на фоне нивелирования функционального резерва кислородзависимого метаболизма нейтрофилов при значительном ингибировании фагоцитарной активности и снижение активности лизосомальных ферментов.

Ключевые слова: нейтрофилы, пептические язвы, кровотечения.