УДК 616.348-002-07:[616.155.33+616.155.34]

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОЦИТОВ КРОВИ КАК МАРКЕР ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЯЗВЕННОГО КОЛИТА И БОЛЕЗНИ КРОНА

Емельянова В.А., Демидов А.А., Шварц Р.Н.

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, e-mail: sapienti_sa@mail.ru

Цель: оценить информативность определения активности окислительно-восстановительных ферментов нейтрофилов и моноцитов периферической крови как дополнительный критерий дифференциальной диагностики между язвенным колитом и болезнью Крона. У пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) проводилось цитохимическое исследование активности ферментов нейтрофилов и моноцитов: сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) при госпитализации в стационар. Методом регрессионного анализа рассчитывался риск развития язвенного колита (ЯК) и болезни Крона (БК) в зависимости от активности вышеуказанных ферментов. Было составлено уравнение регрессии. Риск развития ЯК и БК у пациентов с недифференцированным колитом = 1,326496 – 0,070957×ЛДГ нейтр. – 0,0226006×Г-6-ФДГ нейтр. + 0,472551×ЛДГ моноц. + 0,2444059×Г-6-ФДГ моноц. При значении коэффициента от –2,78 до 7,12 прогнозируют вероятность развития язвенного колита; при значении от 170,58 до 182,46 – вероятность развития болезни Крона. Результаты указывают на значимую роль определения цитохимической активности нейтрофилов и моноцитов у пациентов с ВЗК для прогнозирования развития язвенного колита и болезни Крона у пациентов с недифференцированным воспалительным заболеванием кишечника.

Ключевые слова: язвенный колит, болезнь Крона, нейтрофилы, моноциты, цитохимия, регрессионный анализ

THE ENZYMATIC ACTIVITY OF NEUTROPHILS AND MONOCYTES BLOOD AS A MARKER FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF ULCERATIVE COLITIS AND CROHN'S DISEASE

Emelyanova V.A., Demidov A.A., Schwarts R.N.

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, e-mail: sapienti_sa@mail.ru

Goal: evaluation the information content of determining the activity of redox enzymes of neutrophils and monocytes blood as an additional criterion for the differential diagnosis between ulcerative colitis and Crohn's disease. In patients with inflammatory bowel disease (IBD), a cytochemical study was conducted of the activity of neutrophil and monocyte enzymes: succinate dehydrogenase (LDH), lactate dehydrogenase (LDH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-FDH) during hospitalization. The method of regression analysis calculated the risk of ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), depending on the activity of the above enzymes. A regression equation was compiled. The risk of developing UC and CD in patients with undifferentiated colitis = 1.326496 – 0.070957×LDH neutr. – 0.0226006×G-6-FDH neutr. + 0.472551×LDH monoc. + 0.2444059×G-6-FDH monoc. If the coefficient value is from -2.78 to 7.12, the probability of ulcerative colitis is predicted; with a value from 170.58 to 182.46 – the likelihood of developing Crohn's disease. The results indicate a significant role in determining the cytochemical activity of neutrophils and monocytes in patients with IBD to predict the development of ulcerative colitis and Crohn's disease in patients with undifferentiated inflammatory bowel disease.

Keywords: ulcerative colitis, Crohn's disease, neutrophils, monocytes, cytochemistry, regression analysis

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), а именно язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК), являются прогрессирующим иммунным воспалением желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). ЯК поражает только толстый кишечник и характер поражения поверхностный, в то время как при болезни Крона поражение трансмуральное и может затронуть любой отдел ЖКТ [1].

Важными элементами воспаления в кишечной стенке являются лимфоциты, нейтрофилы и мононуклеары, которые обильно инфильтрируют последнюю, продуцируя большое количество провоспалительных интерлейкинов, свободных радикалов и активных форм кислорода. Также нейтрофилы, и в меньшей степени моноциты, способны продуцировать кальпротектин, обнаружение которого в кале на данный момент рассматривается как биомаркер, отражающий активность воспаления в кишечнике и весьма специфичен для язвенного колита и болезни Крона [2].

В развитии воспалительной реакции при ВЗК немалое значение имеют В-лимфоциты, синтезирующие специфические антитела к перинуклеарным нейтрофильным антигенам (pANKA), которые чаще всего выявляются при ЯК, и манановому полисахариду клеточной стенки *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), чаще ассоциированные с БК [3, 4].

Обнаружение антител для проведения дифференциальной диагностики между ЯК

и БК недостаточно чувствительный и специфичный метод, а также весьма дорогостоящий. Определение кальпротектина, как в кале, так и в сыворотке крови, несмотря на высокую чувствительность метода, как маркера активности воспаления, оценки эффективности проводимой терапии, не позволяет провести дифференциальную диагностику между ЯК и БК.

Изучению цитохимической активности нейтрофилов и моноцитов крови у пациентов терапевтического профиля посвящены единичные работы, что определяет актуальность нашего исследования [5–7].

Цель исследования: оценить информативность определения активности окислительно-восстановительных ферментов нейтрофилов и моноцитов периферической крови, как дополнительный критерий дифференциальной диагностики между язвенным колитом и болезнью Крона.

Материалы и методы исследования

В условиях гастроэнтерологического отделения ГБУЗ АО «Александро-Мариинская областная клиническая больница» было обследовано 69 пациентов с ВЗК в возрасте от 20 до 65 лет: с ЯК 49 человек и 20 человек с БК (55% женщин, 45% мужчин в обеих группах).

Критериями включения в исследование послужили следующие параметры: наличие диагноза «язвенный колит», «болезнь Крона», возраст от 20 до 65 лет.

Критериями исключения явились: злокачественные новообразования, заболевания системы крови, острые бактериальные и вирусные инфекции, возраст старше 65 лет.

Диагноз установлен согласно клиническим рекомендациям Российской гастроэнтерологической ассоциации и ассоциации колопроктологов России.

При поступлении в стационар 26 пациентов с ЯК и все пациенты с БК уже принимали базисную противовоспалительную терапию (5-аминосалициловая кислота, глюкокортикостероиды, азатиоприн), 23 пациента я ЯК подобную терапию не получали.

В контрольную группу вошли 35 здоровых доноров. Средний возраст женщин с ВЗК 44,1 (мин. 31, макс. 54 лет), мужчин 43,3 (мин. 20, макс. 62 лет).

По локализации воспалительного процесса у 65% пациентов с ЯК левосторонний колит, 16,7% – тотальный колит. Среди пациентов с болезнью Крона чаще всего обнаруживался терминальный илеит – 10,0%, илеоколит был выставлен у 8,3%. По характеру течения заболевания у 73,3% пациентов с ЯК и всех пациентов с БК наблюдалось хроническое рецидивирующее, у 5% и 3,3% пациентов с ЯК – хроническое непрерывное и острое течение соответственно. У 59,2% пациентов с ЯК диагностирована средняя степень тяжести атаки заболевания, у 20,4% пациентов лёгкая и у такого же количества пациентов тяжелая степень тяжести по критерию Truelove-Witts. У 11 пациентов (55%) тяжесть атаки БК была расценена как лёгкая, что соответствовало индексу Беста в диапазоне 150–300 баллов, у 9 пациентов (45%) выставлена среднетяжёлая атака с индексом Беста в пределах 301–450 баллов.

Системные проявления ВЗК среди пациентов встречались со следующей частотой: у всех пациентов был выявлен синдром эндотоксемии, метаболические расстройства – у 20,4% пациентов, артрит диагностирован у 18,4% пациентов, узловатая эритема – у 22,4%.

Цитохимические исследования проводились как при поступлении в стационар, так и по выписке. В венозной крови определялась активность метаболических ферментов нейтрофилов и моноцитов, а именно сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) [8]. Для исследования дегидрогеназной активности нейтрофилов и моноцитов использовался метод Р.П. Нарциссова (1970), выделение моноцитов осуществлялось методикой И.С. Фрейдлин (1978).

Для более объективной оценки результатов цитохимических реакций нами применен метод полуколичественной оценки Kaplow [9] с определением среднего цитохимического показателя (СЦП), который является показателем активности реакции в условных единицах. Согласно этому методу, в специально окрашенном препарате крови подсчитывают 100 клеток и разделяют их на группы в зависимости от интенсивности окраски цитоплазмы или количества содержащегося в них цитохимически активного вещества.

– 0 – нулевая группа, цитоплазма не окрашена, гранул нет;

– 1 степень (низкая, степень «а») – в цитоплазме единичные гранулы или слабое диффузное окрашивание;

– 2 степень (средняя, степень «б») – 30–70% цитоплазмы заполнено гранулами, диффузная окраска почти всей цитоплазмы;

– 3 степень (высокая, степень «в») – 70–100% цитоплазмы заполнено гранулами, выраженное окрашивание цитоплазмы.

Средний цитохимический показатель (СЦП) рассчитывали путем подсчета 100 клеток (нейтрофилов или моноцитов) в мазке крови, используя формулу: СЦП = а + 2б + 3в (усл. ед.).

Для обработки полученных данных использовался пакет программ Статистика 8. Достоверность полученных величин определяли с помощью критерия χ^2. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Согласно полученным результатам, статистически значимых различий между активностью окислительно-восстановительных ферментов нейтрофилов и моноцитов пациентов, находящихся на базисной противовоспалительной терапии, и пациентов, не получавших таковую терапию на момент госпитализации в стационар, не обнаружено, поэтому далее мы приведем средние значения. Отсутствие различий объясняется малой продолжительностью предшествующей госпитализации терапии (1–2 месяца).

При поступлении в стационар активность СДГ нейтрофилов пациентов с ЯК превышала норму в 7 раз и составила 108 ± 0,02 у.е. (норма СДГ 15,04 ± 0,02 у.е.). Активность ЛДГ составила 116 ± 0,02 у.е. (норма ЛДГ 15,04 ± 0,02 у.е.), что превышало нормальные значения также более чем в 7 раз. СЦП активности Г-6-ФДГ при норме 15,04 ± 0,02 у.е. составила 152 ± 0,02 у.е., это превышение нормы в 10 раз. Реагирующие клетки по всем трем ферментам были представлены клетками степени «б».

В отношении моноцитов обнаружилась следующая тенденция. Активность СДГ моноцитов составила 76,02 ± 0,01 у.е. (норма СДГ 20,02 ± 0,01 у.е.), ЛДГ – 56,02 ± 0,04 у.е. (норма ЛДГ 15,16 ± 0,04 у.е.), что превысило нормальные значения более чем в 3 раза. Средний цитохимический показатель активности Г-6-ФДГ составил 67 ± 0,04 у.е. при норме 15,60 ± 0,04 у.е. (превышение нормы в 4 раза). Качественный состав реагирующих моноцитов по всем трём ферментам был представлен клетками степени «а» и в меньшей степени «б».

У пациентов с БК мы получали следующие результаты.

При госпитализации в гастроэнтерологическое отделение активность СДГ нейтрофилов составила 92 ± 0,02 у.е. при норме СДГ 15,04 ± 0,02 у.е. (превышение нормы в 6 раз). Активность ЛДГ и Г-6-ФДГ составила 67 ± 0,02 у.е. и 71 ± 0,02 у.е. соответственно (норма 15,04 ± 0,02 у.е.), что превысило нормальные показатели в 4 раза. По всем трем ферментам клетки были 1 степени активности.

Далее мы выявили корреляционные связи средней и высокой силы между активностью ВЗК, клинико-лабораторными показателями и активностью окислительно-восстановительных ферментов нейтрофилов и моноцитов.

У пациентов с ЯК обнаружена сильная положительная корреляционная связь между частотой стула и всеми исследуемыми ферментами нейтрофилов и моноцитов (в среднем $r = 0,8$), температурой тела (в среднем $r = 0,72$) и уровнем СОЭ (в среднем $r = 0,75$). Отрицательная сильная корреляция выявлена между показателем гемоглобина и всеми указанными выше ферментами (в среднем $r = –0,73$), т.е. чем выше активность ферментов, тем выраженней анемия.

У пациентов с БК выявлена положительная сильная корреляция между величиной индекса Беста и активностью ферментов нейтрофилов и моноцитов крови и величиной индекса Беста (в среднем $r = 0,75$). Таким образом, чем выше индекс Беста, отражающий активность заболевания, тем выше активность СДГ, ЛДГ и Г-6-ФДГ нейтрофилов и моноцитов крови.

Обнаружена сильная положительная корреляция между активностью вышеперечисленных ферментов нейтрофилов и моноцитов и уровнем СОЭ (в среднем $r = 0,80$), лейкоцитами (в среднем $r = 0,75$), уровнем СРБ (в среднем $r = 0,81$), отрицательная корреляция средней силы между вышеперечисленными ферментами и уровнем общего белка крови (в среднем $r = –0,73$).

Далее мы прибегли к регрессионному анализу для оценки риска развития ЯК и БК в зависимости от активности СДГ, ЛДГ, Г-6-ФДГ нейтрофилов и моноцитов крови. Этот метод позволяет установить возможную зависимость криториальной, т.е. зависимой переменной (в нашем случае показатель, отражающий основную желудочно-кишечную нозологию) от нескольких предикторов, т.е. независимых переменных (СДГ, ЛДГ, Г-6-ФДГ нейтрофилов и моноцитов крови).

Бета-коэффициенты отражают вклад каждого предиктора в предсказание отклика. СДГ нейтрофилов и моноцитов не вносит вклад в развитие ЯК и БК, поскольку для этих показателей уровень значимости: $p > 0,005$ (таблица).

Бета-коэффициент указывает, насколько увеличивается значение зависимой переменной при увеличении независимой на единицу. Положительный знак коэффициента означает, что с нарастанием уровня ЛДГ и Г-6-ФДГ моноцитов увеличивается вероятность развития болезни Крона (ухудшается прогноз в отношении ВЗК – от язвенного колита к болезни Крона). Отрицательный знак коэффициента означает, что с увеличением активности ЛДГ, Г-6-ФДГ нейтрофилов увеличивается вероятность развития язвенного колита.

Регрессионные коэффициенты

n = 69	Бета	Стандартная ошибка Бета	B	Стандартная ошибка B	t	Уровень значимости P
Свободный член			1,326496	0,020264	64,46187	0,000001
ЛДГ нейтрофилов	–0,070957	0,014119	–0,001488	0,000296	–5,02550	0,000004
Г-6-ФДГ нейтрофилов	–0,226006	0,024985	–0,002889	0,000319	–9,04551	<0,000001
ЛДГ моноцитов	0,472551	0,054018	0,002116	0,000242	8,74807	<0,000001
Г-6-ФДГ моноцитов	0,244459	0,051764	0,001208	0,000256	4,72259	0,000012

Построенное уравнение регрессии имеет вид:

Риск развития ЯК и БК у пациентов с недифференцированным колитом = = 1,326496 – 0,070957×ЛДГнейтр. – – 0,0226006×Г-6-ФДГ нейтр. + 0,472551× ×ЛДГ моноц. + 0,2444059×Г-6-ФДГ моноц.,

где ЛДГ, Г-6-ФДГ нейтрофилов и моноцитов – цифровое выражение количественной оценки активности соответствующих ферментов.

При значении коэффициента от –2,78 до 7,12 прогнозируют вероятность развития язвенного колита; при значении от 170,58 до 182,46 – прогнозируют вероятность развития болезни Крона.

Чтобы проанализировать, адекватна ли построенная модель линейной регрессии, исследуют регрессионные остатки. Если регрессионная модель хорошо описывает истинные данные, регрессионные остатки должны быть независимыми нормально распределенными случайными величинами с нулевым средним. В нашем исследовании анализ регрессионных остатков соответствует вышеуказанному требованию, что делает нашу модель адекватной.

Таким образом, при наличии затруднений в постановке диагноза возможно использовать рассчитанное нами уравнение регрессии в качестве дополнительного диагностического критерия для верификации ЯК или БК, что позволит максимально рано назначить специфическую терапию, снизить инвалидизацию и улучшить качество жизни пациентов.

Список литературы

1. Owczarek D., Cibor D., Gtowacki M., Rodacki T., Mach T. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathology and risk factors for hypercoagulability. World J. Gastroenterol. 2014. vol. 20. no. 1. P. 33–63.

2. Сагынбаева В.Э., Лазебник Л.Б. Сывороточный кальпротектин является маркером для определения активности воспалительного процесса и эффективности терапии при воспалительных заболеваниях кишечника // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2014. Т. 107. № 7. С. 25–31.

3. Барановский А.Ю., Кондрашина Э.А., Харитонов А.Г. Прогноз неблагоприятного течения язвенного колита как показание к проведению антицитокиновой терапии // РЖГГК. 2012. № 2. С. 63–69.

4. Румянцев В.Г. Язвенный колит: руководство для врачей. М.: Медицинское информационное агентство, 2009. 424 с.

5. Клюшникова О.А. Функциональная активность нейтрофилов периферической крови и воспалительная реакция в слизистой оболочке у больных язвенным колитом // X итоговая научная конференция молодых учёных и студентов: тез. докл. Ставрополь, 2002. С. 204.

6. Заводовский Б.В. Клинико-патогенетическое значение исследования метаболизма иммунокомпетентных клеток периферической крови при воспалительных ревматических заболеваниях: дис. … докт. мед. наук. Волгоград, 2004. 322 с.

7. Черняев А.А., Демидов А.А., Чернышева Е.Н. Цитохимическая активность нейтрофилов и моноцитов крови у больных метаболическим синдромом // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 1–1. [Электронный ресурс]. URL: https://science-education.ru/ru/article/view?id=18201 (дата обращения: 24.12.2019).

8. Расщепкина Н.И., Григанов В.И. Дегидрогеназная активность нейтрофилов крови у часто болеющих детей // Молодой ученый. 2011. Т. 2. № 7. С. 131–132.

9. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. М.: Медицина, 1987. 368 с.