

УДК 616.379-008.64: 616.33/.34-002.34

О.М. Сулаєва

## ЧУТЛИВІСТЬ НЕЙТРОФІЛІВ ДО ГУМОРАЛЬНИХ ЧИННИКІВ У ПАЦІЄНТІВ З ВИРАЗКАМИ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЇ ЗОНИ, УСКЛАДНЕНИМИ КРОВОТЕЧАМИ

Донецький національний медичний університет ім. М.Горького

З метою визначення механізмів дисфункції нейтрофілів за умов патології гастродуоденальної зони проведено оцінку змін кисень залежного метаболізму нейтрофілів під впливом епінефрину, 5-гідроксітриптофану і гістаміну у 67 хворих з пептичними виразками тіла шлунка (n=17), пілоричного відділу (n=20) та дванадцятипалої кишки (n=30), ускладненими розвитком виразкової кровотечі. Показано, що розвиток виразкових кровотеч асоційований зі зростанням базальної та обмеженням стимульованої інтенсивності НСТ-реакції, що лімітує функціональний резерв кисень-залежного метаболізму нейтрофілів, та вірогідно респіраторного вибуху. Зафіксовані в роботі зміни сенситивності нейтрофілів до адреналіну, серотоніну та гістаміну можуть свідчити про участь даних регуляторів у патогенез виразкових кровотеч, що визначає інформативність дослідження ролі  $\alpha_{2A}$ , 5-НТ<sub>2</sub>, Н<sub>2</sub>-рецепторів для розробки системи критеріїв прогнозування перебігу запально-репаративних та дизрегуляторних процесів у гастродуоденальній зоні.

**Ключові слова:** виразкові кровотечі, нейтрофіли, гуморальні чинники.

Сучасна концепція патогенезу виразкового ураження гастродуоденальної зони (ГДЗ) зазнала значної трансформації – від постулату ролі нервів до вивчення локальних гуморальних систем ГДЗ – гастрину, холецистокініну, гістаміну, серотоніну, соматостатину, ВІП тощо. Особлива увага приділяється визначенню ефектів *Helicobacter pylori* та даного мікроорганізму взаємодій на молекулярному, сигнальному, клітинному та тканинному рівнях з елементами слизової оболонки [9]. Проте вивчення патогенетичних механізмів адгезії, інвазії та морфогенетичних ефектів даного біологічного чинника стали ключем у визначенні молекулярних детермінант різних клінічних варіантів та морфологічних проявів *H. pylori* асоційованої патології ГДЗ [1, 8]. На сьогодні акцент наголошується на особливостях індивідуальної взаємодії мікроорганізму та імунної системи макроорганізму, що у сполученні з теорією нейро-імуно-гуморального імпринтингу визначає новий напрямок наукових досліджень – визначення зв'язків між нейрогуморальними чинниками та клітинами імунної системи, а також механізмів їх порушення за умов різних варіантів запального процесу у слизовій оболонці ГДЗ [4]. Такий підхід є не випадковим, оскільки доведено роль запалення і цитокінів в ульцеро- та канцерогенезі, визначено роль імунокомпетентних клітин, що формують «суперсистему» за рахунок цитокінової мережі та унікальних імунних си-

напсів, у розвитку клінічних симптомів хвороби та детермінації морфологічних змін, зокрема в ГДЗ. Більш того, доведено наявність на плазмолемі лейкоцитів рецепторів до нейрогуморальних чинників, причому не тільки загальних, але й локальних регуляторних систем, що дозволяє визначити органоспецифічні механізми запального ураження [3, 8]. Проте обговорення загальних закономірностей нейро-імуно-гуморальних зв'язків не наближає до розуміння механізмів дисфункції клітин за умов виразкової хвороби та її ускладнень, і зокрема елементів першої лінії захисту на мікробну агресію та альтерацію власних структур – нейтрофілів.

**Метою** даної роботи є визначення механізмів дисфункції нейтрофілів (НФ) шляхом оцінки їх сенситивності до дії різних нейрогуморальних чинників та її ролі у патогенезі виразкової кровотечі. Виходячи зі значущості у фізіології та патології ГДЗ та патогенезі виразкової хвороби, для оцінки нейтрофіл-модуючих ефектів були обрані адреналін, 5-НТ (серотонін) і гістамін.

### Матеріал та методи

Проведено оцінку кисень залежного метаболізму НФ у 67 хворих з пептичними виразками тіла шлунка (n=17), пілоричного відділу (n=20) та дванадцятипалої кишки (n=30), ускладненими розвитком виразкової кровотечі за умов ефективного гемостазу. Серед-

ній вік хворих складав  $57,3 \pm 5,3$  роки. Нейтрофіли виділяли з периферійної крові шляхом градієнтного центрифугування за методом [2]. Для оцінки життєздатності отримані нейтрофіли забарвлювали трипановим синім і підраховували в препараті відсоток забарвлених клітин. Внутрішньоклітинний кисень залежний метаболізм інтерпретували за показниками НСТ-теста в нестимульованих НФ [6]. 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  $37^\circ\text{C}$ . Пробірки центрифугували, з осаду готували мазки, фіксували метанолом, забарвлювали 0,1% розчином сафроніну впродовж 5 хвилин. За цим розраховували інтенсивність спонтанної НСТ-реакції (сНСТ) [2]. Для оцінки інтенсивності індукованої НСТ-реакції (іНСТ) проводили попередню інкубацію НФ з пірогеналом (протягом 1 години). Крім того, розраховували функціональний резерв НФ, який визначали як співвідношення індукованої та спонтанної НСТ-реакції. Для визначення впливу на кисень-залежні процеси в нейтрофілах гуморальних факторів в окремі лунки додавали епінефрин (1 мкМ), 5-гідроксітриптофан (10 мкМ), гістамін (10 мкМ) [3, 7]. Після інкубації протягом 15 хвилин до суспензії клітин додавали НСТ, і далі проводили процедуру за стандартною методикою. Отримані результати обробляли статистично.

### *Результати та обговорення*

На момент госпіталізації хворих із виразковими кровотечами НФ периферійної крові досліджуваних осіб знаходилися в активованому стані. Про це свідчило зростання інтенсивності сНСТ-реакції. Так у здорових людей інтенсивність сНСТ реакції складала  $0,57 \pm 0,01$ . На відміну від цього в групі спостереження медіана даного показника становила  $0,65 \pm 0,014$  ( $0,62-0,67$ ). Проте, як що в контролі інтенсивність іНСТ-реакції при інкубації суспензії НФ з пірогеналом зростала до  $1,59 \pm 0,02$ , то за умов виразкової кровотечі цей показник не перевищував  $1,4 \pm 0,03$ . Така ситуація свідчить про обмеження резервної потужності НАДФ-Н-оксидази, що відбивалося на значному зниженні функціонального резерву з  $2,79 \pm 0,03$  в контролі до  $2,23 \pm 0,04$  у пацієнтів з виразковими кровотечами.

Оцінка ефектів нейрогуморальних факторів на кисень-залежний метаболізм нейтрофілів визначила низку цікавих фактів. В першу чергу було відзначено зниження ефекту адреналіну на інтенсивність НСТ, що може відбивати гіпосенситивність  $\alpha_{2A}$ -адренорецепторів, які експресовані на плазмолемі нейтрофілів [3], за умов виразкової кровотечі може внаслідок активації симпато-адреналової системи. Така ситуація може бути результатом компенсаторно-приспосувальної реакції, спрямованої на обмеження активації НФ у зоні ураження, де вивільнення катехоламінів з нервових закінчень забезпечує не тільки вазоконстрикцію і розвиток ішемії, але й активацію системи комплементу, продукцію цитокінів, рекрутування та активацію НФ [4]. Проте треба відзначити значну варіабельність даного показника, що відбиває широкий діапазон індивідуальної реактивності організму. Цікаво, що за умов виразок тіла шлунка ефект адреналіну на НФ був нижчим за показник не тільки в контролі, але й у пацієнтів з виразками ДПК.

При цьому привертало до себе увагу зростання сенситивності НФ до серотоніну та значна гетерогенність відповіді нейтрофілів на гістамін. Враховуючи, що основним джерелом даних біогенних амінів є ендокринні клітини шлунково-кишкового тракту – відповідно – ЕС та ЕСL-клітини, цікаво було співставити чутливість нейтрофілів до дії цих регуляторів у пацієнтів з різною локалізацією виразкового процесу. Виявилось, що 5-НТ-індукована НСТ-реакція у пацієнтів з виразковими кровотечами була вищою за контроль ( $p < 0,01$ ), причому більш значний підйом було зафіксовано у пацієнтів з виразками шлунка. Така ситуація, по суті означає зростання чутливості НФ та ролі їх 5-НТ<sub>2</sub> рецепторів за умов виразкової кровотечі. Цей факт може бути одним з чинників підвищення спонтанної активності НАДФН-оксидази, оскільки активація системи гемостазу супроводжується вивільненням серотоніну з тромбоцитів. Крім того, відомо, що зміни рН або альтерація слизової оболонки ДПК супроводжуються підвищенням секреції серотоніну ЕС-клітинами як у системний кровоток, так і локально [1]. Останній має певні позитивні ефекти, що проявляються зростанням продукції слизу та бікарбонатів, вивільненням ацетилхоліну, стимуляцією нейро-

м'язової трансмісії та перистальтики ШКТ. Проте локальне зростання рівню 5-НТ може відбиватися й на характеристиках запального процесу. Так, за рахунок активації 5-НТ<sub>2</sub> рецепторів, асоційованих з G<sub>q</sub>-білком та Фосфоліпазою С, серотонін через Ca<sup>2+</sup>-залежні механізми, стимулює активність нейтрофілів та моноцитів-макрофагів, активуючи в них низку процесів, у тому числі – продукцію активних радикалів кисню, прозапальних цитокінів (ІЛ-1β, ІЛ-6 тощо), хоча й обмежує секрецію ФНП $\alpha$  [8]. Хоча в літературі є дані щодо пригнічуючого ефекту серотоніну на активність мієлопероксидази та обмеження респіраторного вибуху [6]. Окрім цього, відомі імуномодуючі ефекти 5-НТ на поляризацію імунної відповіді, що здійснюється переважно за рахунок 5-НТ<sub>4</sub> та 5-НТ<sub>7</sub> рецепторів, які на відміну від 5-НТ<sub>2</sub> рецепторів реалізують свій сигнал через G<sub>s</sub>-білок та аденілатциклазну сигнальну систему [9].

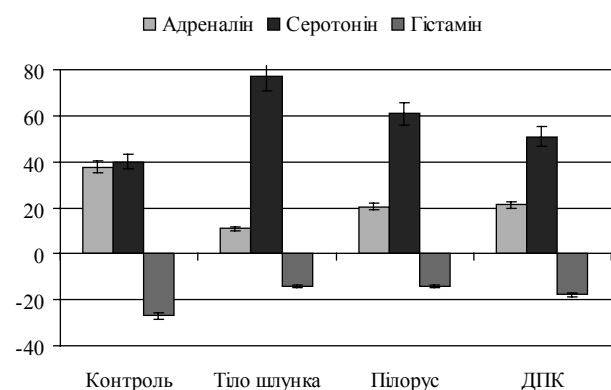
На відміну від серотоніну, гістамін обмежував індуковану НСТ-реакцію, як в контролі, так і за умов виразкової кровотечі. Хоча на нейтрофілах доведено наявність кількох типів рецепторів до гістаміну, вірогідно, цей ефект пов'язаний з активацією H<sub>2</sub> рецепторів, які реалізують сигнал через активацію G<sub>s</sub> білка аденілатциклазної системи, що веде до підвищення внутрішньоклітинного рівня цАМФ та обмеження підйому Ca<sup>2+</sup> в цитозолі за умов активації [7]. Проте у хворих з виразковими кровотечами антиоксидантні ефекти гістаміну на НФ були значно обмеженими - пригнічуючий ефект гістаміну на інтенсивність індукованої НСТ-реакції були майже в 2 рази нижчими за показники в контролі (p<0,01). Така ситуація може відбивати обмеження чутливості H<sub>2</sub>-рецепторів або за рахунок зростання рівня агоністу в крові під час кровотечі, або внаслідок фармакологічної блокади H<sub>2</sub> рецепторів, оскільки всі пацієнти отримували базисну антисекреторну терапію, одним з варіантів якої є блокатори H<sub>2</sub> рецепторів.

Визначені в роботі факти щодо зміни чутливості НФ до гуморальних факторів з протилежними ефектами за умов виразкових кровотеч досить складно трактувати, оскільки нейтрофіли мають численні рецептори до різноманітних регуляторів. Їх сумарний ефект визначає не тільки ступінь прозапальної активації НФ, але й їх життєвий цикл та ефективність

механізмів розрешення запалення. Вочевидь, що мова йдеться про зміни Ca<sup>2+</sup>-залежних механізмів регуляції НФ. У свою чергу, контроль внутрішньоклітинного Ca<sup>2+</sup>-гомеостазу є багатобактерною динамічною системою, у формуванні якої беруть участь різні внутрішньоклітинні сигнальні системи, що ініціюють активність протеїнкіназ А, В, С і G [6], тирозинкінази і тирозин фосфатази, які реалізують ефекти різних агоністів, впливають на транспорт Ca<sup>2+</sup> через плазмолемму чи його мобілізацію з внутрішньоклітинних депо [3]. В цілому внутрішньоклітинний рівень Ca<sup>2+</sup> залежить від характеру взаємозв'язку і ступеня спряженості роботи даних внутрішньоклітинних сигнальних систем. Причому домінування ефекту кожної з зазначених систем сигналізації визначає не тільки динаміку рівня Ca<sup>2+</sup>, але й специфіку функціональної активності НФ на різних етапах запального каскаду.

### З а к л ю ч е н н я

Отже у хворих з виразковими кровотечами зареєстроване зростання базальної та обмеження стимульованої інтенсивності НСТ-реакції, що визначає обмеження функціонального резерву кисень-залежного метаболізму, та вірогідно респіраторного вибуху. Зафіксовані в роботі зміни чутливості нейтрофілів до адреналіну, серотоніну та гістаміну (див.рис.) можуть свідчити про участь даних регуляторів у патогенез виразкових кровотеч, що визначає інформативність дослідження ролі  $\alpha_2$ , 5-НТ<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>-рецепторів для роз-



**Рис.** Зміна чутливості нейтрофілів до гуморальних чинників.

Примітка: по осі абсцис – локалізація виразки, ускладненою кровотечею; по осі ординат – зміни інтенсивності НСТ-реакції, індукованої різними гуморальними чинниками (у %).

робки системи критеріїв прогнозування перебігу запально-репаративних та дизрегенераторних процесів у ГДЗ.

#### ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ К ГУМОРАЛЬНЫМ ФАКТОРАМ У ПАЦИЕНТОВ С ЯЗВАМИ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЙ ЗОНЫ, ОСЛОЖНЕННЫМИ КРОВОТЕЧЕНИЕМ

*О.Н. Сулаева*

С целью определения механизмов дисфункции нейтрофилов в условиях патологии гастродуоденальной зоны проведена оценка изменений кислород зависящего метаболизма нейтрофилов под влиянием эпинефрина, 5-гидрокситриптофана и гистамина у 67 больных с пептическими язвами тела желудка (n=17), пилорического отдела (n=20) и двенадцатиперстной кишки (n=30), осложненными развитием язвенной кровотоечения. Показано, что развитие язвенных кровотоечений ассоциированы с повышением базальной и ограничением стимулированной интенсивности НСТ-реакции, лимитирующим функциональный резерв кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов и достоверно респираторного взрыва. Зафиксированные в работе изменения чувствительности нейтрофилов до адреналина, серотонина и гистамина могут свидетельствовать об участии данных регуляторов в патогенезе язвенных кровотоечений, определяющий информативность исследования роли  $\alpha_{2A}$ , 5-HT<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>-рецепторов для разработки системы критериев прогнозирования течения воспалительно-репаративных и дизрегенераторных процессов в гастродуоденальной зоне.

**Ключевые слова:** язвенные кровотоечения, нейтрофилы, гуморальные факторы.

#### SENSITIVITY OF NEUTROPHILS TO HUMORAL FACTORS IN PATIENTS WITH GASTRODUODENAL ULCERS COMPLICATED WITH BLEEDING

*O.N. Sulayeva*

To determine mechanisms of neutrophil dysfunction in gastroduodenal pathology the changes in oxygen-dependent metabolism of neutrophils under the influence of epinephrine, 5-hydroxytryptophan and hista-

mine were estimated in 67 patients with peptic gastric and duodenal ulcers, complicated by bleeding. It was shown that development of ulcer bleeding associated with increased basal but decrease of induced intensity of NBT-reaction, that led to limitation of functional reserve of oxygen-dependent metabolism in neutrophils and respiratory burst potency. Changes of neutrophil sensitivity to adrenaline, serotonin and histamine may indicate involvement of these regulators in the pathogenesis of ulcer bleeding, which determines informative study on the role  $\alpha_{2A}$ , 5-HT<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>-receptor for the development of criteria for predicting of inflammatory and reparative processes in the gastroduodenal zone.

**Key words:** ulcer bleeding, neutrophils, humoral factors.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Аруин Л.И. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника / Л.И. Аруин, Л.Л. Капуллер, В.А. Исаков. – М. – 1998. – 496 с
2. Баринаева М.Э. Функциональная активность нейтрофилов крови больных сахарным диабетом при гнойно-некротическом поражении стопы / М.Э. Баринаева, О.Н. Сулаева, Б.П. Терещук // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2007. – Т. 7, вип. 1-2. – С. 17–20.
3. Долгушин И.И. Нейтрофилы и гомеостаз / И.И. Долгушин. – Екатеринбург, 2001. – 315 с.
4. Кондратенко П.Г. Острое кровотоечение в просвет органов пищеварительного канала / П.Г. Кондратенко, Н.Л. Смирнов, Е.Е. Раденко. – Донецк, 2006. – 420 с.
5. Лях Ю.Е. Основы компьютерной биостатистики / Ю.Е. Лях, Г.В. Гурьянов, В.Н. Хоменко, О.А. Панченко. – Д. – 2006. – 211 с.
6. 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.
7. Flamand N. Histamine-induced inhibition of leukotriene biosynthesis in human neutrophils: involvement of the H<sub>2</sub> receptor and cAMP/ N. Flamand, H. Plante, S. Picard // Br. J. Pharmacol. – 2004. – Vol. 141. – P. 552-561
8. Hofman P.M. Pathobiology of the neutrophil-intestinal epithelial cell interaction: Role in carcinogenesis / P.M. Hofman // World J Gastroenterol. – 2010. – Vol. 46. – P. 5790-5800.
9. 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.

Стаття надійшла 01.06.2011