

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОЦИТОВ КРОВИ НА РИСК РАЗВИТИЯ ЯЗВЕННОГО КОЛИТА И БОЛЕЗНИ КРОНА

Емельянова В.А.¹, Демидов А.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, e-mail: sapienti_sa@mail.ru

Цель: оценить риск развития язвенного колита и болезни Крона в зависимости от метаболической активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови. У пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК), находящихся на стационарном лечении, исследовалась активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) нейтрофилов и моноцитов. В зависимости от активности этих окислительно-восстановительных ферментов с помощью метода «дерево классификаций» прогнозировался риск развития язвенного колита (ЯК) и болезни Крона (БК). Была построена модель прогнозирования исхода недифференцированного колита в ЯК и БК. При активности СДГ $\geq 99,0$, ЛДГ ≥ 90 , Г-6-ФДГ ≥ 120 у.е. нейтрофилов и $50 < \text{СДГ} < 100$, $40 < \text{ЛДГ} < 100$, $50 < \text{Г-6-ФДГ} < 100$ у.е. моноцитов риск развития ЯК составлял 97,9%, при активности $88 < \text{СДГ} < 99$, $60 < \text{ЛДГ} < 90$, $50 < \text{Г-6-ФДГ} < 120$ у.е. нейтрофилов и $\text{СДГ} \geq 250$, $\text{ЛДГ} \geq 250$, $\text{Г-6-ФДГ} \geq 250$ у.е. моноцитов риск развития БК составлял 95,0%. Результаты исследования демонстрируют значимость определения метаболической активности нейтрофилов и моноцитов крови при прогнозировании вероятности развития ЯК или БК у пациентов с недифференцированным воспалительным заболеванием кишечника.

Ключевые слова: язвенный колит, болезнь Крона, нейтрофилы, моноциты, сукцинатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, дерево классификаций.

ASSESSMENT OF THE EFFECT OF METABOLIC ACTIVITY OF NEUTROPHILS AND MONOCYTES BLOOD ON THE RISK OF ULCERATIVE COLITIS AND CROHN'S DISEASE

Emelyanova V.A.¹, Demidov A.A.¹

¹Astrakhan State Medical University, Astrakhan, e-mail: sapienti_sa@mail.ru

Assess the risk of ulcerative colitis and Crohn's disease depending on the metabolic activity of neutrophils and monocytes peripheral blood. The activity of succinate dehydrogenase (SDH), lactate dehydrogenase (LDH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-FDH) neutrophils and monocytes was studied in patients with inflammatory bowel diseases (IBD) who were under inpatient treatment. Depending on the activity of these redox enzymes, the risk of ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) was predicted using the classification tree method. A model for predicting the outcome of undifferentiated colitis in UC and CD was constructed. The activity of LDH $\geq 99,0$, LDH ≥ 90 , G-6-FDH ≥ 120 conventional units neutrophils and $50 < \text{LDH} < 100$, $40 < \text{LDH} < 100$, $50 < \text{G-6-PDH} < 100$ conventional units monocytes the risk of the UC accounted for 97.9%, activity $88 < \text{SDG} < 99$, $60 < \text{LDH} < 90$, $50 < \text{G-6-PDH} < 120$ conventional units neutrophils and LDH ≥ 250 , LDH ≥ 250 , G-6-FDH ≥ 250 conventional units monocytes the risk of developing CD was 95,0%. The results of the study demonstrate the significance of determining the metabolic activity of neutrophils and monocytes blood in predicting the likelihood of UC or CD in patients with undifferentiated inflammatory bowel disease.

Keywords: ulcerative colitis, Crohn's disease, neutrophils, monocytes, succinate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, glucose-6- phosphate dehydrogenase, classification tree.

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), среди которых выделяют язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК), представляют собой хронические рецидивирующие аутоиммунные заболевания, в основе патогенеза которых лежат срыв иммунологической толерантности к собственной кишечной микробиоте и, как следствие, обильная инфильтрация стенки кишечника клетками специфического и неспецифического

иммунитета, а также синтез аутоантител. Основным различием между ЯК и БК является характер поражения желудочно-кишечного тракта (ЖКТ): при ЯК воспаление поверхностное и охватывает только толстый кишечник, в то время как при БК воспаление трансмуральное и вовлекает любой отдел ЖКТ [1].

Важнейшими критериями дифференциальной диагностики ЯК и БК являются данные эндоскопических методов визуализации и гистологический материал. Сложность диагностики заключается в том, что не всегда возможно правильно интерпретировать морфологические изменения ввиду отсутствия в биоптате характерных клеточных маркеров [2]. В связи с этим вопросу диагностики ВЗК посвящено множество работ. Наиболее интересными нам представляются методы поиска диагностических маркеров в биологических субстратах: сывороточного и фекального кальпротектина, аутоантител крови (к перинуклеарным нейтрофильным антигенам (pANCA) и манановому полисахариду клеточной стенки *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)), антител к гликопротеину 2 (анти-GP2 IgA) в копроэкстрактах и т.д. [3, 4]. Однако обнаружение антител является дорогостоящим и недостаточно чувствительным методом, а определение уровня кальпротектина при относительной доступности и высокой чувствительности не позволяет дифференцировать ЯК и БК между собой.

Основой воспалительного инфильтрата кишечной стенки при ВЗК, помимо лимфоцитов, являются активированные нейтрофилы и макрофаги, продуцирующие провоспалительные интерлейкины, активные формы кислорода и свободные радикалы. Перспективно изучение цитохимической активности именно этих клеток у пациентов с ВЗК. Актуальность исследования метаболической активности нейтрофилов и моноцитов крови обусловлена немногочисленностью работ, посвященных этому вопросу [5, 6, 7].

Цель исследования: оценить риск развития язвенного колита и болезни Крона в зависимости от метаболической активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови.

Материалы и методы исследования

В наше исследование были включены 69 пациентов с ВЗК гастроэнтерологического отделения ГБУЗ АО «Александрo-Мариинская областная клиническая больница», из них 49 пациентов с ЯК и 20 – с БК. Средний возраст пациентов с ЯК и БК составил 44,4 года и 40,4 года соответственно. По половому признаку пациенты обеих групп распределились одинаково: 55% женщин и 45% мужчин.

Критерии включения в исследование: диагнозы «язвенный колит», «болезнь Крона», возраст от 20 до 65 лет.

Критерии исключения: злокачественные заболевания в анамнезе, декомпенсированные хронические заболевания, тяжелые гематологические заболевания, острые инфекционные заболевания, отказ испытуемых от участия в исследовании, возраст старше 65 лет.

Диагноз был выставлен на основании диагностических критериев, утвержденных в клинических рекомендациях Российской гастроэнтерологической ассоциации и ассоциации колопроктологов России.

Первичных пациентов с ЯК, не получавших ранее базисную противовоспалительную терапию (БПВП), при поступлении в стационар было 26 человек; 23 пациента с ЯК и все пациенты с БК уже получали соответствующую терапию (5-аминосалициловая кислота, иммуносупрессоры, глюкокортикостероиды).

В качестве контрольной группы выступили 35 здоровых доноров.

Распределение пациентов с ВЗК по локализации воспаления: у 79,6% пациентов с ЯК диагностирован левосторонний колит, у 20,4% – тотальный колит, терминальный илеит выявлен у 55,0% пациентов с БК, илеоколит – у 45%. У всех пациентов с БК и у большинства пациентов с ЯК (63,7%) течение заболевания расценивалось как хроническое рецидивирующее, у 4,3% пациентов с ЯК – как хроническое непрерывное и у 2,9% пациентов – как острое. Степень тяжести воспалительной атаки, установленная с помощью критерия Truelove-Witts, у 59,2% пациентов с ЯК была определена как средняя; легкая и тяжелая степени тяжести заболевания были определены у 20,4% пациентов. Тяжесть атаки БК устанавливалась согласно индексу Беста (баллы): у 55% пациентов установлена легкая степень тяжести атаки (150–300 баллов), у 45% – среднетяжелая атака (301–450 баллов).

У 38,8% пациентов с ВЗК системные проявления не диагностированы, у 61,2% пациентов были выявлены: у всех – синдром эндотоксемии, метаболические расстройства – у 20,4%, артрит – у 18,4%, узловатая эритема – у 22,4%.

Метаболическая активность нейтрофилов и моноцитов исследовалась в день госпитализации в стационар и в день выписки. В венозной крови определялась активность следующих окислительно-восстановительных ферментов: сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) [8]. Исследование активности нейтрофилов проводилось с использованием метода Р.П. Нарцисова (1970), выделение моноцитов осуществлялось по методике И.С. Фрейдлин (1978).

Метод полуколичественной оценки Карлов [9] с определением среднего цитохимического показателя (СЦП) использовался для объективной интерпретации результатов цитохимических реакций. Описание этого метода мы приводили в ранее опубликованной работе [10].

Обработку полученных результатов производили с использованием пакета программ Статистика 8. Достоверность полученных величин определяли с помощью критерия χ^2 . Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Несмотря на ожидаемые различия в активности ферментов нейтрофилов и моноцитов крови у первичных пациентов и пациентов, получающих БПВП, статистически значимых различий между ними не было выявлено, в связи с чем далее мы приводим усредненные показатели. Этот феномен можно объяснить непродолжительностью приема БПВП пациентами, находящимися на терапии до госпитализации (1–2 месяца).

Сравним степень активности окислительно-восстановительных ферментов нейтрофилов и моноцитов крови пациентов с ЯК и БК (табл. 1).

Таблица 1

Сравнительный анализ активности окислительно-восстановительных ферментов нейтрофилов и моноцитов крови у пациентов с БК и ЯК до курса стационарного лечения

ВЗК	Ферменты нейтрофилов			Ферменты моноцитов		
	СДГ	ЛДГ	Г-6-ФДГ	СДГ	ЛДГ	Г-6-ФДГ
БК (n=20)	95,0 [92,0; 99,0]* **	70,0 [65,0; 74,0]* **	73,0 [71,0; 78,0]* **	282,0 [277,0; 285,0]* **	279,0 [276,0; 285,0]* **	269,0 [266,0; 274,0]* **
ЯК (n=49)	105,5 [101,0; 108,0]**	113,5 [110,0; 117,0]**	150,0 [146,0; 152,0]**	74 [68,0; 76,0]**	54,0 [48,0; 57,0]**	65,5 [60,0; 68,0]**
Контроль (n=35)	15,07±0,35	20,25±0,80	34,97±0,33	15,04±0,02	14,98±0,38	15,15±0,51

Примечание: * $p < 0,05$ – при сравнении пациентов с БК и ЯК.

** $p < 0,05$ – при сравнении активности ферментов нейтрофилов и моноцитов крови пациентов обеих групп с активностью ферментов в норме.

Наблюдаются достоверные различия активности окислительно-восстановительных ферментов нейтрофилов и моноцитов крови у пациентов с ЯК и БК. У пациентов с ЯК в большей степени возросла метаболическая активность нейтрофилов, а у пациентов с БК – моноцитов крови. Также отмечены достоверные различия активности ферментов нейтрофилов и моноцитов крови у пациентов контрольной группы и пациентов с ЯК и БК. Так, активность окислительно-восстановительных ферментов нейтрофилов у пациентов с ЯК превышала аналогичные показатели пациентов контрольной группы в 7–10 раз, а моноцитов – в 3–4 раза. СЦП ферментов нейтрофилов был представлен клетками средней степени активности. Качественный состав реагирующих моноцитов по всем трем ферментам был представлен клетками низкой и средней степени активности.

У пациентов с БК метаболическая активность нейтрофилов превышала активность соответствующих клеток контрольной группы в 4–6 раз, моноцитов – в 17–18 раз. По всем трем ферментам нейтрофилов клетки были низкой степени активности. СЦП ферментов моноцитов был представлен клетками высокой степени активности.

В рамках нашего исследования обнаружено, что метаболическая активность нейтрофилов и моноцитов имеет средние и сильные корреляционные связи с клинико-лабораторной активностью ВЗК.

Сильная положительная корреляция наблюдалась между всеми ферментами как нейтрофилов, так и моноцитов пациентов с ЯК и частотой стула (в среднем $r=0,8$), температурой тела (в среднем $r=0,72$), уровнем СОЭ (в среднем $r=0,75$); сильная отрицательная – между соответствующими ферментами и показателем гемоглобина (в среднем $r=-0,73$).

У пациентов с БК определены положительная сильная корреляционная связь между метаболической активностью нейтрофилов и моноцитов крови и величиной индекса Беста (в среднем $r=0,75$), уровнем СОЭ (в среднем $r=0,80$), лейкоцитами (в среднем $r=0,75$), уровнем СРБ (в среднем $r=0,81$) и отрицательная корреляционная связь средней силы между вышеперечисленными ферментами и уровнем общего белка крови (в среднем $r=-0,73$).

Для оценки диагностической точности определения активности окислительно-восстановительных ферментов нейтрофилов и моноцитов крови у пациентов с ЯК и БК была произведена оценка абсолютных и относительных рисков с расчетом значимости каждого фактора с помощью критерия Хи-квадрат Пирсона (табл. 2).

Таблица 2

Оценка абсолютных и относительных рисков развития ЯК и БК в зависимости от активности окислительно-восстановительных ферментов нейтрофилов и моноцитов крови

Фактор (у.е.)	Клетки	Группа	Наличие ВЗК		Изменени риск (95% ДИ)	Уровень (df=1)	Хи- квадрат
			Фактор: нет Частота (абс. риск)	Фактор: есть Частота (абс. риск)			
СДГ $\geq 99,0$	нейтрофилы	Язвенный колит	2 (4,8%)	47 (97,9%)	93,2	<0,0001	78,3
ЛДГ $\geq 90,0$			2 (4,8%)	47 (97,9%)	93,2	<0,0001	78,3
Г-6-ФДГ $\geq 120,0$			2 (4,8%)	47 (97,9%)	93,2	<0,0001	78,3
50 < СДГ < 100	моноциты		1 (2,4%)	48 (98%)	95,5	<0,0001	82,1
40 < ЛДГ < 100			1 (2,4%)	48 (98%)	95,5	<0,0001	82,1
50 < Г-6-ФДГ < 100			2 (4,8 %)	47 (97,9%)	93,2	<0,0001	78,3

88 < СДГ < 99	нейтрофилы	Болезнь Крона	1 (5,0%)	19 (95%)	90,0	<0,0001	32,4
60 < ЛДГ < 90			1 (5,0%)	19 (95%)	90,0	<0,0001	32,4
50 < Г-6-ФДГ < 120			1 (5,0%)	19(95%)	90,0	<0,0001	32,4
СДГ ≥ 250,0	моноциты		1 (5,0%)	19(95%)	90,0	<0,0001	32,4
ЛДГ ≥ 250,0			1 (5,0%)	19 (95%)	90,0	<0,0001	32,4
Г-6-ФДГ ≥ 250,0			1 (5,0%)	19 (95%)	90,0	<0,0001	32,4

Исходя из полученных данных все изученные нами ферменты как нейтрофилов, так и моноцитов являются значимыми для диагностики ЯК и БК.

Далее мы использовали метод «дерево классификации» для прогнозирования вероятности ЯК или БК по активности ЛДГ, СДГ и Г-6-ФДГ нейтрофилов и моноцитов крови. Данный метод позволяет предсказать принадлежность наблюдений (объектов) в зависимости от значений одной или нескольких предикторных переменных к тому или иному классу зависимой категориальной переменной. Этот метод удобен для нашего исследования, поскольку благодаря ему возможно изучить эффект влияния отдельных переменных последовательно, а также выполнить одномерное ветвление для анализа вклада этих переменных (табл. 3).

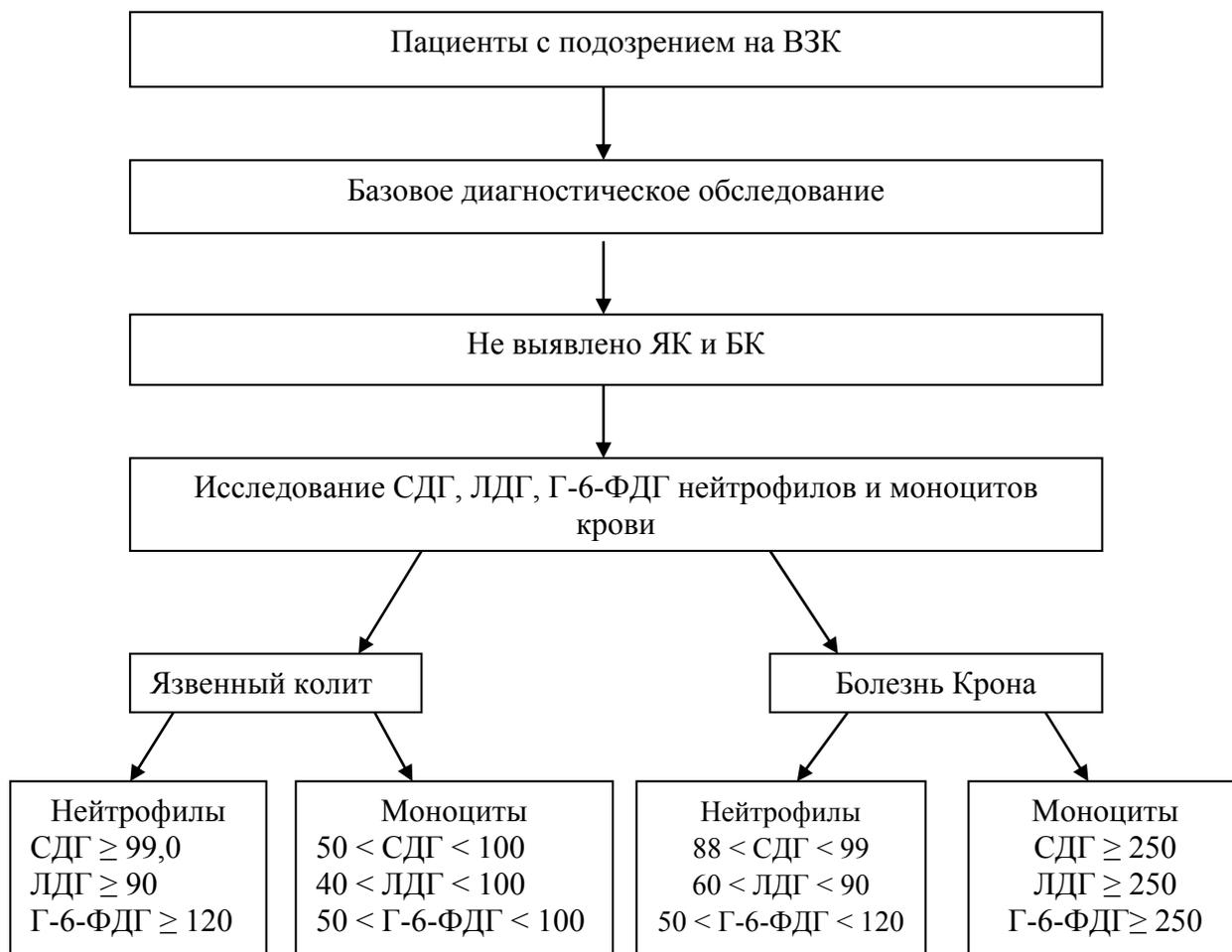
Таблица 3

Результаты построения дерева решений

№	Правило	Клетки	Объем группы	Риск
1	ЯК и СДГ ≥ 99,0	нейтрофилы	49	97,9%
2	ЯК и ЛДГ ≥ 90		49	97,9%
3	ЯК и Г-6-ФДГ ≥ 120		49	97,9%
4	ЯК и 50 < СДГ < 100	моноциты	49	97,9%
5	ЯК и 40 < ЛДГ < 100		49	97,9%
6	ЯК и 50 < Г-6-ФДГ < 100		49	97,9%
7	БК и 88 < СДГ < 99	нейтрофилы	20	95%
8	БК и 60 < ЛДГ < 90		20	95%
9	БК и 50 < Г-6-ФДГ < 120		20	95%
10	БК и СДГ ≥ 250	моноциты	20	95%
11	БК и ЛДГ ≥ 250		20	95%
12	БК и Г-6-ФДГ ≥ 250		20	95%

Если активность СДГ, ЛДГ или Г-6-ФДГ как нейтрофилов, так и моноцитов крови у пациентов с ЯК и БК выходила за указанные в таблице 3 границы, вероятность развития соответствующего заболевания составляла не более 5%.

Для показателя «ВЗК» смоделировано дерево решений и составлен диагностический алгоритм (рисунок). Предложенная модель получилась достаточно удачной: AuROC=0,98, эффективность=97% (чувствительность 95,7%, специфичность 98,3%), это означает, что более 95% всех случаев идентифицированы верно.



Алгоритм дифференциальной диагностики ЯК и БК

Заключение

Таким образом, мы построили достаточно адекватную модель, благодаря которой можно прогнозировать исход недифференцированного колита в ЯК или БК. Это даст возможность в максимально ранние сроки подобрать специфическую терапию для таких пациентов, тем самым снизив процент инвалидности и улучшив 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. Орлинская Н.Ю., Широкова Н.Ю., Шумилова О.В., Давыдова Д.А., Давыденко Д.В., Соколова И.Л. Значение морфологических исследований при воспалительных заболеваниях кишечника у детей // Медицинский альманах. 2018. Т. 34. №3. С 31-35.
3. 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.
4. Сагынбаева В.Э., Лазебник Л.Б. Антитела к *Saccharomyces Cerevisiae* как предиктор осложненного течения болезни Крона // Экспериментальная клиническая гастроэнтерология. 2013. № 3. С. 48-52.
5. Ключникова 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: 27.02.2020).
8. Галимзянов Х.М., Алиева А.А., Буркин А.В., Горева О.Н. Динамика ферментативной активности фагоцитов крови у больных с хроническим вирусным гепатитом С в зависимости от генотипа // Астраханский медицинский журнал. 2014. Т. 9. № 7. С. 19-24.
9. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник. М.: Медицина, 1987. 368 с.
10. Емельянова В.А., Демидов А.А., Костенко Н.В., Чернышева Е.Н., Гребнева О.С. Значение определения активности окислительно-восстановительных ферментов нейтрофилов и моноцитов крови у пациентов с язвенным колитом // Крымский терапевтический журнал. 2018. № 1. С. 45-48.