



О.В. Воробьева

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ У НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С НЕКРОТИЗИРУЮЩИМ ЭНТЕРОКОЛИТОМ И БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького.

Ключові слова: НСТ-тест, нейтрофіли, недоношені новонароджені, некротизуючий ентероколіт, бактеріальна інфекція.

Ключевые слова: НСТ-тест, нейтрофилы, недоношенные новорожденные, некротизирующий энтероколит, бактериальная инфекция.

Key words: NBT-test, neutrophils, preterm newborns, necrotizing enterocolitis, bacterial infection.

Досліджено показники НСТ-тесту, співвідношення активних клітин у субпопуляціях нейтрофілів периферичної крові і розрахунок кінетичних параметрів процесу активації нейтрофілів у недоношених новонароджених з некротизуючим ентероколітом і бактеріальною інфекцією та проведено зіставлення цих даних. Отримані результати дозволяють провести диференційовану діагностику некротизуючого ентероколіту у недоношених новонароджених в ранньому неонатальному періоді.

Исследованы показатели НСТ-теста, соотношения активных клеток в субпопуляциях нейтрофилов периферической крови и расчет кинетических параметров процесса активации нейтрофилов у недоношенных новорожденных с некротизирующим энтероколитом и бактериальной инфекцией и проведено сопоставление этих данных. Полученные результаты позволяют провести раннюю и дифференциальную диагностику некротизирующего энтероколита у недоношенных новорожденных в раннем неонатальном периоде.

NBT-test parameters, the correlations of the active cells in subpopulations of peripheral blood's neutrophils and calculation of kinetic parameter process of activation of the neutrophils in preterm newborns with necrotizing enterocolitis and bacterial infection were estimated and comparison of these data was done. The received results allow to conduct differential diagnostics of necrotizing enterocolitis in preterm newborns in early neonate period.

В последние годы отмечается повышение интереса исследователей к изучению активности нейтрофилов крови по способности клеток восстанавливать нитросиний тетразолий (НСТ). Нейтрофилы являются клетками, участвующими в фагоцитарных реакциях и уничтожении (киллинге) бактерий [5]. Одно из звеньев цепи фагоцитоза - генерацию активных форм кислорода (АФК), обладающих бактерицидными свойствами, оценивают в тесте восстановления НСТ (НСТ-тест) *in vitro*, который используют для исследования функционального состояния гранулоцитов, в том числе и нейтрофилов крови [1]. В основе этого диагностического теста лежит учет количества клеток, содержащих гранулы диформаза, образующегося в процессе восстановления НСТ нейтрофилами при участии АФК. НСТ-тест может проводиться как с применением стимулятора фагоцитоза - индуцированный НСТ-тест, так и без него - спонтанный НСТ-тест [10]. Основными параметрами НСТ-теста считаются доля активированных нейтрофилов (ДАН) и индекс активации нейтрофилов (ИАН). При этом ДАН - показатель, характеризующий общее количество диформазансодержащих нейтрофилов, в то время как ИАН показывает среднее количество диформаза, приходящееся на один нейтрофил [1].

В работах, посвященных применению данного метода в диагностике различных патологических состояний, уделяется внимание не только определению ДАН и ИАН, но также изучению состояния активности функционально неравнозначных субпопуляций нейтрофилов - нейтрофилов-киллеров (Нк) и нейтрофилов кейджеров (Нс), исследование которых позволяет более объективно охарактеризовать состояние функций нейтрофилов и эффективно диагностировать их нарушение [2].

Учитывая все возможности НСТ-теста в оценке функциональной активности нейтрофилов и их субпопуляций, использование его в неонатологии может быть ценным для диагностики не только бактериальной инфекции, но и

некротизирующего энтероколита новорожденных (НЭК) [8,9]. НЭК вызывается инфекционными агентами на фоне незрелости механизмов местной защиты и/или гипоксически-ишемического повреждения слизистой кишечника, склонное к генерализации с развитием системной воспалительной реакции [7].

На наш взгляд, представляется интересным сопоставить результаты НСТ-теста при наличии НЭК у недоношенных новорожденных с таковыми при бактериальной инфекции (БИ) разной этиологии, не сопровождающейся НЭК, у недоношенных детей в раннем неонатальном периоде.

Перед началом исследования функциональной активности нейтрофилов у недоношенных новорожденных, была модифицирована и адаптирована методика проведения НСТ-теста, определена особенность активации нейтрофилов у доношенных и недоношенных детей, ее зависимость от массы и суток жизни в неонатальном периоде [4,6].

ЦЕЛЬ. Провести дифференциальную диагностику некротизирующего энтероколита и бактериальной инфекции у недоношенных новорожденных в раннем неонатальном периоде путем сопоставления результатов исследования функциональной активности нейтрофилов в НСТ-тесте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Обследовали 99 недоношенных новорожденных обоего пола в возрасте 1 - 7 суток. Контрольную группу (условно здоровые) составили 27 недоношенных новорожденных, в анамнезе беременности и родов матерей которых отсутствовали факторы риска внутриутробного и интранатального бактериального инфицирования плода. В группу наблюдения вошли 72 ребенка, из них у 21 диагностирована внутриутробная БИ с первых суток жизни без гастроинтестинальных нарушений и 71 недоношенный ребенок с клинически и лабораторно подтвержденным НЭК [7]: у 24 детей диагностирована II стадия НЭК, у 27



недоношенных - I стадия заболевания. Дети с III стадией НЭК в исследование не включали. Распределение детей по массе тела в зависимости от гестационного возраста (ГВ) представлено в табл. 1.

Таблица 1

ГВ, недели	Масса тела (г) новорожденных			
	Контроль (n=27)	БИ (n=21)	НЭК	
			I (n=24)	II (n=27)
36-35	2100 ± 410	2100 ± 190	–	–
34-32	–	1600 ± 170	1600 ± 180	1600 ± 200
31-28	–	1300 ± 110	1300 ± 100	1300 ± 150
< 28	–	870 ± 90	–	–

Кровь (1 мл) брали по показаниям, гепаринизировали (5 ЕД/мл) и проводили спонтанный НСТ-тест по методике [1] в модификации [3]: к 0,1 мл крови добавляли 0,05 мл 0,2 % раствора НСТ в калий-фосфатном буфере (0,1 М, рН 7,3) и 0,05 мл того же буфера. Реакционную смесь термостатировали на водяной бане при 37°C (30 - 60 мин), делали мазки средней плотности, высушивали на воздухе, фиксировали в этиловом спирте (20 мин), окрашивали водным раствором нейтрального красного (0,1%, 20 мин) и микрокопировали под иммерсией. Среди 100 клеток подсчитывали долю активированных нейтрофилов (ДАН, %), содержащих гранулы диформаза. По количеству отложившегося в клетках диформаза оценивали их активность в условных единицах и рассчитывали индекс активации нейтрофилов (ИАН) [1]:

$$\text{ИАН} = \frac{0 \cdot H_0 + 1 \cdot H_1 + 2 \cdot H_2 + 3 \cdot H_3}{100} \quad (1)$$

где H_0, H_1, H_2, H_3 (%) – количество нейтрофилов с активностью 0, 1, 2 и 3 балла соответственно.

При этом субпопуляцию нейтрофилов H_k составляли клетки H_0 (неактивированные H_k) и H_3 (активированные H_k, H_k^a), а H_c – H_1 и H_2 . Погрешность измерения ДАН не превышала ± 4,7 %.

Среднее (M) и его доверительный интервал (mt) рассчитывали с доверительной вероятностью $P = 0,95$ ($p = 0,05$), корреляционный и регрессионный анализы проводили, используя пакет статистических программ "STATISTICA", v. 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Результаты проведенного анализа представлены в табл. 2. При БИ, как и при НЭК, значения ДАН ∞ и H_k выше, а H_c – ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Исключение составляет доля H_k у новорожденных с БИ, когда уменьшение показателя недостоверно ($p > 0,05$). При этом k_1 , независимо от наличия НЭК имеет тенденцию к уменьшению, однако в последнем случае она выражена в меньшей степени, чем при БИ (табл. 2). Обращает внимание, что по сравнению с контрольной группой доля активных H_k (H_k^a) увеличивается при БИ почти в 2 раза ($p < 0,05$), тогда как при НЭК показатель имеет тенденцию к уменьшению ($p > 0,5$). Приведенный факт свидетельствует о том, что БИ вызывает активацию в системе нейтрофилов, тогда как развитие НЭК, – наоборот, угнетает неспецифическое звено иммунитета, по крайней мере, в периферической крови.

Существенно, что различия между значениями H_{ka} при БИ и при наличии НЭК статистически значимы ($p < 0,01$).

Полученные результаты указывают на то, что имеется возможность дифференциально диагностировать НЭК от бактериальных инфекций иной этиологии. Для этого необходимо сопоставить результаты измерений, например, ДАН ∞ (или H_c или H_k) и H_k^a . В том случае, когда значение ДАН ∞ превышает 40 %, а доля H_k^a находится на уровне не более 5 %, можно с определенной вероятностью предполагать наличие НЭК, но не БИ.

Таким образом, измерение показателей НСТ-теста и расчет кинетических параметров процесса активации нейтрофилов, а также определение соотношений активных клеток в субпопуляциях нейтрофилов позволяют получить дополнительную информацию для ранней и дифференциальной диагностики НЭК.

Таблица 2

Показатели НСТ-теста у недоношенных новорожденных при наличии бактериальной инфекции и некротизирующего энтероколита

Новорожденные	ДАН, %	$k_1 \cdot 10^3, c^{-1}$	$H_c, \%$	$H_k, \%$	$H_k^a, \%$
Контроль	36±2,9	27±0,3	32±4,4	69±3,9	5±2,3
БИ	47±3,7 ^к	23±0,28	35±6,8	66±4,7	11±4,2 ^к
НЭК	44±1,5 ^к	25±0,31	39±2,5 ^к	61±2,8 ^к	3±1,3 ^{БИ}

Примечания: 1. * - отличия с уровнем значимости $p < 0,05$; 2. индексы указывают на отличие данного значения от: "к" - контроля; БИ - подгруппы с БИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виксман М. Е., Маянский А. Н. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: Метод. рекомендации (М. Е. Виксман, А. Н. Маянский). – Казань: Казанский НИИЭМ, 1979. – 11 с.
2. Герасимов И. Г. Функциональная неоднородность нейтрофилов // Клин. лаб. диагн. – 2006. – № 2. – С. 34–36.
3. Герасимов И. Г. и др. Кинетика реакции восстановления нитросинего тетразолия нейтрофилами крови человека // Цитология. – 2000. – Т. 42, № 2. – С. 160 – 165.
4. Особенности спонтанного НСТ-теста у новорожденных / Татарченко В. В., Игнатов Д. Ю., Воробьева О. В. и др. // Лабораторная диагностика. – 2007. - № 2 (40). – С. 57 -59.
5. Медвецький Є. Б. Роль взаємодієносин нейтрофілних гранулоцитів, ендотеліоцитів та мононуклеарних макрофагів у виникненні і перебігу гнійно-септичних станів // Клін. хірургія. – 2003. – Т. 39. – С. 53–55.
6. Тест восстановления нейтрофилами нитросинего тетразолия в диагностике некротизирующего энтероколита у недоношенных новорожденных / Клименко Т. М., Воробьева О. В., Герасимов И. Г. // Здоровье ребенка. – 2008. - № 3 (12). – С. 104 – 107.
7. Шабалов Н. П. Неонатология: Учебное пособие: в 2-х томах. – М.: МЕДпресс., в 2 т. – 2006. – 565 с.
8. Gessler P. et oth. Neutrophil respiratory burst in term and preterm neonates without signs of infection and in those with increased levels of C-reactive protein // Pediatr. Res. – 1996. – Vol. 95, № 4. – P. 843–848.
9. Marodi L. Innate cellular immune responses in newborns // Clinical Immunology. – 2006. – Vol. 118, № 9. – P. 137–144.
10. Richardson M. P. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamide for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitroblurtetrazolium test // J. Immunol. Methods. – 1998. – Vol. 219, № 1–2. – P. 87–93.

Сведения об авторе: Воробьева О.В. – ассистент кафедры педиатрии и неонатологии, к.мед.н. тел. раб. (0622) 94-53-15 e-mail: anvovv@rambler.ru г. Донецк – 54, 83054 ул. Трудовая аллея, д. 14, кв.5