УДК 616-006:612.115

ЛЕЙКОЦИТАРНЫЙ ФИБРИНОЛИЗ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Мельникова С.Л., Степанов А.В.

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия», Чита, e-mail: pochta@medacadem.chita.ru

Установлена ключевая роль лейкоцитарного фибринолиза в нарушении системы гемостаза при сепсисе, при вирусной патологии, при кардиоваскулярных заболеваниях. Целью нашего исследования явилось изучение нарушений лейкоцитарного фибринолиза у онкологических больных. В работе представлены данные по изучению фибринолитической активности лейкоцитов. Стрептаза повышает фибринолитическую активность нейтрофилов здоровых людей более чем в 3 раза. У онкологических больных понижена фибринолитическая активность нейтрофилов. Они в меньшей степени активируются фибринолитиком, чем клетки от здоровых доноров. Нейтрофилы активно адгезируются к фибрину. Сыворотка от здоровых людей препятствует адгезии нейтрофилов к фибрину. Онкологические больные характеризуются повышенной агрегационной активностью нейтрофилов к фибрину. Нарушение лейкоцитарного фибринолиза у онкологических больных повышает угрозу образования у них тромбов.

Ключевые слова: нейтрофилы, фибринолиз, онкология

FIBRINOLYSIS OF LEUKOCYTES AT ONCOLOGICAL PATIENTS

Melnikova S.L., Stepanov A.V.

Chita State Medical Academy, Chita, e-mail: pochta@medacadem.chita.ru

The key role of a leukocytic fibrinolysis in violation of system of a hemostasis is established at sepsis, at virus pathology, at cardiovascular diseases. The purpose of our research was studying of violations of a leukocytic fibrinolysis at oncological patients. In work are submitted data on studying of fibrinolitic activity of leukocytes. Streptasum increases fibrinolitic activity of neutrophils of healthy people in 3 times. At oncological patients fibrinolitic activity of neutrophils is lowered. Neutrophils of patients are to a lesser extent activated fibrinolitiky, than cages from healthy donors. Neutrophils actively stick to fibrin. Serum from healthy people interferes with adhesion of neutrophils to fibrin. At oncological patients it is raised adhesive by activity of neutrophils to fibrin. Violation of a leukocytic fibrinolysis at oncological patients increases threat of formation of blood clots at them.

Keywords: neutrophils, fibrinolysis, oncology

Онкологические больные относятся к группе высокого риска по развитию у них тромботических осложнений. Одним из основных методом лечения является проведение лизиса тромбов в сосудах. Однако стандартная тромболитическая терапия не всегда эффективна, что может быть связано с тем, что в сосуде, где располагается тромб или нет кровотока, или же он резко снижен. Поэтому введение фибринолитических агентов в сосудистое русло не может быть достаточно результативным, тромболитик не может достичь тромба. Другим недостатком данного вида терапии является то, что лекарственные препараты приходится вводить в достаточно высоких концентрациях. Причем существенная часть фибринолитика блокируется многочисленными ингибиторами крови, и клиницист не всегда знает уровень этого потенциала. Причем он может существенно отличаться у различных пациентов. Фибринолитическая терапия также может сопровождаться различными осложнениям: кровотечения, развитие инсульта, аллергические реакции и другие [2].

В настоящее время уделяется значительное внимание фибринолизу, осуществляемому белками плазмы крови, однако, по нашему мнению, незаслуженно забыта фибринолитическая активность клеток крови.

В последние годы установлено, что при некоторых патологических состояниях лейкоцитарный фибринолиз играет весьма важную роль. Установлена его ключевая роль в нарушении фибринолиза при сепсисе [6, 9], при вирусной патологии [8], при кардиоваскулярных заболеваниях [10]. Показано также, что внутривенный тромболизис более эффективен при высокой активности и большем количестве нейтрофилов в крови [7]. В других работах установлено, что на фибринолитическую активность нейтрофилов оказывают влияние некоторые пептиды [3, 4].

Цель исследования: изучение нарушений лейкоцитарного фибринолиза у онкологических больных и в дальнейшем профилактика и лечение тромботических осложнений.

Для решения этой цели необходимо выполнить несколько задач: во-первых, дополнительно нагрузить нейтрофилы фибринолитиками для усиления их фибринолитической активности, во-вторых, повысить тропность нейтрофилов к фибрину, и, в-третьих, заставить нейтрофилы выбросить тромболитики в определенном месте при контакте с тромбом. В данной работе мы пытаемся решить лишь несколько из этих задач.

Материал и методы исследования

Исследования проводили на крови 21 здорового донора и 12 онкологических больных с раком желудка после хирургического вмешательства. Во всех экспериментах использовали нейтрофилы, выделенные из венозной гепаринизированной крови по стандартной методике на градиенте плотности фикол-верографин. Для определения фибринолитической активности клеток лейкоцитарную взвесь инкубировали на фибрине, после чего отбирали пробы супернатанта с последующим определением продуктов деградации фибрина иммуноферментным методом. Фибринолитическую активность клеток выражали в мкг продуктов деградации фибрина (ПДФ) в супернатанте [4]. Каждую взвесь нейтрофилов использовали в 4 сериях экспериментов.

Степень адгезии нейтрофилов к поверхности фибринового геля оценивали через 1 час инкубации клеточной суспензии в лунках плоскодонного полистеролового планшета. Накануне эксперимента лунки планшета покрывали слоем фибрина. Для этого в них вносили по 200 мкл смеси 1% раствора фибриногена человека и раствор тромбина (активность 50 ед./мл) в соотношении 4:1. Сразу же после заполнения лунок содержимое вытряхивали и свертывание оставшегося количества смеси приводило к образованию тонкого слоя фибрина.

После удаления неприлипших клеток лунки отмывали культуральной средой. Затем проводили фиксацию метанолом (10 минут) и окрашивали по Романовскому [5]. Адгезивность клеток определяли при увеличении ×150 раз по их количеству в единице площади окулярной сетки микроскопа в 5 квадратах, установленных методом случайного отбора.

Полученные данные обработаны с помощью пакета статистических программ Statistica, версия 6,0, пакета программ Biostat и Microsoft Excel 2003 с расчетом статистически значимых различий (p).

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе мы попытались повысить фибринолитическую активность нейтрофилов. С этой целью мы использовали три группы веществ:

1. Фибринолитические ферменты (стрептаза, урокиназа).
2. Известные стимуляторы лейкоцитов (зимозан, продигиозан).
3. Прочие вещества (конкавалин А, хлористый аммоний).

Наибольшую стимулирующую активность на нейтрофилы оказывали фибринолитические ферменты.

Метод определения фибринолитической активности клеток предложен нами, поэтому вначале необходимо было определить наиболее оптимальные режимы. Нейтрофилы, выделенные из крови здоровых доноров, помещали в среду 199, содержащую стрептазу в различных концентрациях, определяли доза-эффект, а также инкубировали различные промежутки времени для определения время-эффекта. После тщательного отмывания в среде клетки наносили на фибриновые пластины для определения фибринолитической активности клеток. Контролем служили интактные нейтрофилы.

Установлено, что уже на первых минутах контакта клеток с ферментом их способность лизировать фибрин достоверно возрастает (табл. 1). Активация наивысшей степени наблюдается на 10 минуте инкубации. Максимально активирующей выявлена концентрация стрептазы 100 и 200 ед./мл среды.

Таким образом, увеличение тромботической активности нейтрофилов связано с накоплением фибринолитического препарата внутри клеток и сохранением его активности с возможностью дальнейшего выделения в окружающую среду.

Таблица 1

Влияние преинкубации со стрептазой на фибринолитическую активность нейтрофилов (M ± m, n = 12)

Время инкубации (минуты)	Концентрация стрептазы ЕД/мл				
	50	100	200	500	1000
контроль	1,88 ± 0,27				
1	3,25 ± 0,25*	4,13 ± 0,27*	4,36 ± 0,30*	4,31 ± 0,32*	4,46 ± 0,35*
3	4,18 ± 0,26*	4,95 ± 0,29*	4,62 ± 0,31*	4,91 ± 0,34*	5,38 ± 0,37*
5	4,36 ± 0,37*	4,92 ± 0,40*	4,79 ± 0,42*	5,16 ± 0,45*	5,93 ± 0,47*
10	4,88 ± 0,41*	5,63 ± 0,43*	6,33 ± 0,46*	6,25 ± 0,48*	6,15 ± 0,49*
20	5,06 ± 0,43*	6,16 ± 0,45*	6,35 ± 0,47*	6,24 ± 0,48*	6,25 ± 0,52*

Примечание (статистически значимые различия): * – $p < 0,05$ между контролем и опытами.

В следующих сериях экспериментов нейтрофилы инкубировали в течение 10 минут со стрептазой при активности 100 ед. в 0,1 мл суспензии клеток. Изучали фибринолитическую активность нейтрофилов здоровых и больных людей. Все пациенты были разделены на 2 группы: 1 группа (изучали интактные нейтрофилы), 2 группа (изучали нейтрофилы, активированные стрептазой). Установлено, что стрептаза

у здоровых людей повышает фибринолитическую активность почти в 3 раза. У онкологических больных резко снижена фибринолитическая активность нейтрофилов, и при стимуляции их тромболитический потенциал не достигает уровня активированных клеток здоровых доноров. Однако у больных с раком желудка нейтрофилы сохраняли способность к активации фибринолитиком (табл. 2).

Таблица 2

Влияние стрептазы на фибринолитическую активность нейтрофилов здоровых и онкологических больных, M ± m

	Здоровые люди		Больные люди	
	1 группа (контроль) $n = 72$	2 группа (опыт 1) $n = 72$	1 группа (опыт 2) $n = 48$	2 группа (опыт 3) $n = 48$
Концентрация ПДФ, мкг/мл	1,84 ± 0,21	5,25 ± 0,40*	0,45 ± 0,11*	2,85 ± 0,32*

Примечание (статистически значимые различия): * – $p < 0,05$ между контролем и опытом 1, 2 и 3.

Таким образом, нами выявлены значительные нарушения в фибринолитической активности нейтрофилов.

В другой серии экспериментов мы постарались изучить адгезивную активность нейтрофилов. Исследовали нейтрофилы здоровых доноров, находящихся в питательной среде (контроль), нейтрофилы здоровых доноров с добавлением интактной сыворотки (опыт 1) и нейтрофилы от онкологических больных, находящиеся в питательной среде (опыт 2).

Установлено, что клетки активно прилипают к фибрину, если находятся в питательной среде. Обработка же фибрина интактной сывороткой значительно подавляет данный процесс (в 8,9 раза). Возможно, сывороточные белки за счет неспецифической адсорбции «маскируют» поверхность фибринового геля и ослабляют его адгезивные свойства, возможно, блокируются определенные рецепторы нейтрофилов (табл. 3). Выявленный феномен присутствует в кровотоке даже в норме, что, возможно, угрожает нарушением растворения фибрина у части пациентов.

Таблица 3

Количество нейтрофилов, адгезированных к фибриновому гелю, M ± m

	Контроль $n = 72$	Опыт 1 $n = 72$	Опыт 2 $n = 48$
Количество клеток	68,5 ± 3,7	7,8 ± 0,4*	97,4 ± 5,2*

Примечание (статистически значимые различия): * – $p < 0,05$ между контролем и опытом 1 и 2.

В то же время у больных людей адгезивная активность нейтрофилов почти в полтора раза выше, чем у здоровых пациентов. Причем это происходит на фоне того, что у всех онкологических больных наблюдался выраженный лейкоцитоз, обусловленный нейтрофилезом. Учитывая, что у таких пациентов прослеживаются выраженные нарушения свертывания крови и фибринолитической активности плазменных ферментов [1], изменения в функционировании нейтрофилов являются дополнительным фактором, повышающим угрозу тромботических осложнений у таких пациентов.

Таким образом, нами впервые выявлена возможность повышения фибринолитической активности у самой распространенной группы клеток крови, а также установлены особенности адгезивной способности нейтрофилов.

В следующих сериях экспериментов мы планируем проведение исследований in vivo. Предполагается, что введение активированных и нагруженных лейкоцитов приведет к их накоплению в районе тромба. Известно, что эти клетки способны самостоятельно перемещаться в тканях, поэтому они не зависят от наличия или отсутствия кровотока. При взаимодействии антифибриновых антител с тромбом происходила активация нейтрофилов и выброс как собственных ферментов, так и гранул с тромболитиками, которыми мы их нагрузили. Причем доза фибринолитика, используемая для лечения, на порядок меньше, чем при проведении стандартной методики его введения.

Мы предполагаем, что, по-видимому, в дальнейшем данный способ может найти свое место в клинической практике, так

как по сравнению со стандартным методом лечения он является более эффективным и обладает менее выраженными побочными эффектами. Возможно, его стоит рекомендовать в стационаре при неэффективности внутривенной тромболитической терапии.

Выводы

1. Стрептаза существенно повышает фибринолитическую активность нейтрофилов здоровых людей.
2. У онкологических больных резко снижена фибринолитическая активность нейтрофилов. Также они в меньшей степени активируются фибринолитиком, чем клетки от здоровых доноров.
3. Сыворотка от здоровых людей препятствует адгезии нейтрофилов к фибрину.
4. Онкологические больные характеризуются повышенной адгезивной активностью нейтрофилов к фибрину.

Список литературы

1. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. – Чита: Экспресс издательство, 2010. – 827 с.

2. Макацария А.Д. Злокачественные новообразования, тромбофилии и тромбозы / А.Д. Макацария, В.О. Воробьев, А.М. Бицадзе – М.: Триада-Х, 2008. – 783 с.

3. Степанов А.В. Пептидные регуляторы гуморального иммунитета / А.В. Степанов, В.Л. Цепелев, С.Л. Цепелев. – Чита: Книжное изд-во «Поиск», 2002. – 180 с.

4. Степанов А.В. Механизмы иммунокоррегирующего действия пептидов из лимфоидной ткани при иммунодефицитных состояниях и воспалении : автореф. дис. … д-ра мед. наук. – Иркутск, 1995. – 40 с.

5. Цыбиков Н.Н. Лейкофибринолиз, усиленный адгезией лейкоцитов к сгустку антифибриновыми антителами / Н.Н. Цыбиков, А.В. Краденов // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1991. – № 5. – С. 12–13.

6. Moir E. Polymorphonuclear leukocytes from patients with severe sepsis have lost the ability to degrade fibrin via u-PA / E. Moir, M. Greaves, G.D. Adey, // Journal of Leukocyte Biologyvol. – 2004. – № 76 no. 3 – P. 571–576.

7. Nomura E. Leukocytes May Have 2 Opposing Effects in Intravenous rtPA Treatment for Ischemic Stroke / E. Nomura, H. Naka, S.Wakabayashi // Clin Appl Thromb Hemost. – 2012. – № 11 – P. 571–576.

8. Saha P. Leukocytes and the Natural History of Deep Vein Thrombosis / P. Saha, J. Humphries, B. Modarai // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology – 2011. – № 31 – P. 506–512.

9. Wohner N. Role of Cellular Elements in Thrombus Formation and Dissolution // Cardiovascul. Hematol. Agents Med. Chemistry. – 2008. – № 6 – P. 224–228.

10. Zouaoui B.K. Fibrinolysis and cardiovascular risk factors: association with fibrinogen, lipids, and monocyte count // Eur.J. Intern Med. – 2006. – № 17. – P. 102–110.

References

1. Kuznik B.I. Kletochnye i molekuljarnye mehanizmy reguljacii sistemy gemostaza v norme i patologii. Chita: Jekspress izdatel'stvo, 2010, 827 p.

2. Makacarija A.D. Vorob'ev V.O., Bicadze A.M. Zlokachestvennye novoobrazovanija, trombofilii i trombozy. M.: Triada-H, 2008, 783 p.

3. Stepanov A.V., Tsepelev V.L., Tsepelev S.L. Peptidnye reguljatory gumoral'nogo immuniteta. Chita : Knizhnoe izd-vo «Poisk», 2002, 180 p.

4. Stepanov A.V. Mekhanizmy immunokorregiruyushhego dejstviya peptidov iz limfoidnoj tkani pri immunodefitsitnykh sostoyaniyakh i vospalenii: autoref. doct. med. nauk, 1995, 40 pp.

5. Cybikov N.N., Kradenov A.V. Bjull. jeksperim. biol. i med. 1991. no. 5. pp. 12–13.

6. Moir E., Greaves M., Adey G. D. Journal of Leukocyte Biologyvol. 2004. no. 76, pp. 571–576.

7. Nomura E. Naka H., Wakabayashi S. Clin Appl Thromb Hemost. 2012. no. 11, pp. 571–576.

8. Saha P., Humphries J., Modarai B. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2011. no. 31, pp. 506–512.

9. Wohner N. Role of Cellular Elements in Thrombus Formation and Dissolution / N. Wohner // Cardiovascul. Hematol. Agents Med. Chemistry. 2008. no. 6 pp. 224–228.

10. Zouaoui B.K. Eur J. Intern Med. 2006. no. 17, pp. 102–110.

Рецензенты:

Малежик Л.П., д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии, ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия», г. Чита;

Авходиев Г.И., д.м.н, профессор, заведующий кафедрой судебной медицины, ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия», г. Чита.

Работа поступила в редакцию 29.01.2013.