

## ЦИТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Черняев А.А., Демидов А.А., Чернышева Е.Н.

*ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Астрахань, Россия (414000, Астрахань, ул. Бакинская, д.121), e-mail: tolyandiy@mail.ru*

У больных с метаболическим синдромом определяли цитохимическую активность нейтрофилов и моноцитов крови до и после лечения. Для этого было обследовано 102 больных метаболическим синдромом. В нейтрофилах и моноцитах исследовали следующие группы ферментов: 1) метаболические: сукцинатдегидрогеназа (СДГ), отражающая цикл Кребса; лактатдегидрогеназа (ЛДГ), отражающая анаэробный гликолиз; глюкозо-6-фос-фатдегидрогеназа (Г-6-ФДГ), отражающая активность пентозо-фосфатного шунта; 2) ферменты транспорта электронов кислорода: НАД и НАДФ-диафоразы по методике Р.П. Нарциссова; 3) лизосомальные: альфанафтилацетатэстеразы и альфанафтилбутиратэстеразы по методике Вачштейна – Вольфа. Также определяли средний цитохимический показатель (СЦП). Выявленные изменения носили однонаправленный характер и выражались в повышении активности исследуемых ферментов как до, так и после лечения.

Ключевые слова: цитохимическая активность, метаболический синдром (МС), группы ферментов, средний цитохимический показатель (СЦП).

## CYTOCHEMICAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS AND MONOCYTES PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME

Chernyaev A.A., Demidov A.A., Chernyshova E.N.

*Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia (414000, Astrakhan, Bakinskaya str., 121), e-mail: tolyandiy@mail.ru*

Patients with metabolic syndrome, neutrophil activity was determined by cytochemical and blood monocytes before and after treatment. For this purpose were examined 102 patients with metabolic syndrome. In neutrophils and monocytes was investigated following groups of enzymes: 1) Metabolic: succinate dehydrogenase (SDH), reflecting the Krebs cycle; lactate dehydrogenase (LDH), which reflects the anaerobic glycolysis; glucose-6-phos-fatdegidrogenaza (G-6-FDG), which reflects the activity of the pentose phosphate shunt; 2) enzymes of the electron transport oxygen: NAD and NADP-diaphorase the procedure RP Nartsissova; 3) lysosomal: alfanaftilatsetatesterazy and alfanaftilbutiratesterazy the procedure Vachshyteyna-Wolff. Also determined the average cytochemical indicators (SCP). The identified changes were unidirectional and is reflected in increased activity of the enzymes studied both before and after treatment.

Keywords: cytochemical activity, metabolic syndrome (MS), a group of enzymes, the average cytochemical indicators (SCP).

Избыточная продукция кислородных радикалов или недостаточная антиоксидантная защита приводят к опасному дисбалансу в организме. Это запускает патологические механизмы, которые приводят к развитию серьезных патологий. Наиболее важным среди них являются сердечно-сосудистые заболевания. Кроме этого, с окислительным стрессом связано развитие воспалительного процесса, сепсиса, канцерогенез и нейродегенеративные заболевания. Все вышесказанное в полной мере относится к пациентам с метаболическим синдромом (МС) [7]. Важным является то, что нарушения при данном синдроме имеют агрессивную атерогенную направленность [2]. Все данные нарушения взаимосвязаны друг с другом, образуя порочный круг. Именно благодаря этому Kaplan назвал «смертельным квартетом» сочетание НТТ, абдоминального ожирения, артериальной гипертензии,

гипертриглицеридемии, подразумевая способность этих факторов негативно влиять на сердечно-сосудистую систему.

В настоящее время МС рассматривается как совокупность основных факторов риска развития ИБС. Важность выделения МС подтверждается тем, что у пациентов при его наличии имеется высокий риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, и они нуждаются в более активном профилактическом и лечебном воздействии. Важно отметить, что сочетание нескольких факторов риска ИБС у одного больного резко увеличивает суммарный риск ИБС и её осложнений в ближайшие годы.

Известно, что организм человека – сложная иерархическая система, состоящая из клеточных структур, образующих целостный организм [1,6]. Клетка, как наиболее низкий уровень организации организма, в первую очередь отражает те изменения, которые впоследствии можно будет увидеть на макроуровне [5,6]. В то же время отдельный клеточный пул или клетку можно рассматривать как самостоятельную открытую систему. Изменения, происходящие на данном иерархическом уровне, не всегда реализуются в виде заболевания, но снижают резервные возможности организма. Снижение резервных возможностей организма клинически проявляется неспособностью организма адекватно ответить на внешнее воздействие, что можно определить как изменение реактивности. Исходное состояние клетки (резервные возможности) определяет её ответ на действие внешнего патологического фактора. Со снижением резервных возможностей клетки повышается вероятность её гибели и развитие болезни [4].

Рассматривая проблемы формирования здоровья с позиций фундаментального уровня организации – клеточного, мы получаем возможность вынести более детальное и объективное суждение о состоянии здоровья пациента.

Изменения на клеточном уровне появляются зачастую до формирования клинических симптомов болезни и сохраняются некоторое время после их купирования. Современные подходы к оценке и коррекции состояния ряда энергообеспечивающих систем организма в норме и при наличии патологии невозможны без цитохимического изучения клеток крови.

Цитохимия – раздел цитологии, изучающий биохимическими методами строение и функции клеток, внутриклеточных структур и продуктов их жизнедеятельности [10]. В отличие от обычных биохимических исследований, при которых активность фермента (щелочной фосфатазы, ЛДГ и др.) характеризуется только средними цифровыми значениями, цитохимический анализ предусматривает определение активности фермента в целой клеточной популяции. Вполне естественно, что в клеточном пуле клетки находятся на разных уровнях функциональной активности [5]. Соответственно, активность энергетических ферментов в клетках разная, что позволяет выделить различные клеточные

субпопуляции, различающиеся по активности фермента. Цитохимическая экспертиза предусматривает описание характеристик клеточного распределения. Нормативное распределение в состоянии здоровья характеризуется наличием единичных высокоактивных клеток и единичных низкоактивных. Основная масса клеток распределяется вокруг средних значений активности фермента.

Изменение структуры клеточной популяции с преобладанием высоко- или низкоактивных клеток неспецифично и может наблюдаться при различных заболеваниях, так как характеризует фундаментальный уровень организации [8]. С другой стороны, данные параметры распределения клеточной популяции по активности фермента дают представление о фазе течения заболевания, что может использоваться для прогноза его течения и обоснованной ступенчатой терапии, направленной на восстановление энергетического баланса в патологически измененных тканях и органах. Накопленный клинический опыт позволяет с высокой степенью вероятности прогнозировать изменения цитохимических показателей при различной патологии. Цитохимический анализ является высокоинформативным и относительно доступным методом изучения клетки.

Цитохимический анализ является высокоинформативным и относительно доступным методом изучения клетки. В литературе имеется масса работ, посвященных цитохимическим исследованиям в лимфоцитах [9] при самой различной патологии.

Изучению цитохимической активности нейтрофила и моноцита уделяется гораздо меньше внимания. Между тем эти клетки играют огромную роль в неспецифическом иммунитете [10]. Современные технологии позволяют объективно оценить отклонения в функциональной активности внутриклеточных ферментов и нормализовать энергетический обмен клетки, целенаправленно и индивидуально назначив пациенту недостающие элементы [5].

**Цель исследования.** Оценить значение изменения метаболической активности нейтрофилов и моноцитов крови у больных с метаболическим синдромом.

**Материалы и методы исследования.** В исследование вошли 102 человека с метаболическим синдромом в возрасте от 30 до 60 лет. Согласно Рекомендациям экспертов Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению метаболического синдрома (Второй пересмотр, 2009 г.) основным признаком МС является: центральный (абдоминальный) тип ожирения – окружность талии (ОТ) более 80 см у женщин и более 94 см у мужчин. Дополнительные критерии:

- артериальная гипертония (АД  $\geq$  130/85 мм рт. ст.);
- повышение уровня триглицеридов ( $\geq$  1,7 ммоль/л);
- снижение уровня ХС ЛПВП ( $<$ 1,0 ммоль/л у мужчин;  $<$ 1,2 ммоль/л у женщин);

- повышение уровня ХС ЛПНП  $> 3,0$  ммоль/л;
- гипергликемия натощак (глюкоза в плазме крови натощак  $\geq 6,1$  ммоль/л);
- нарушение толерантности к глюкозе (глюкоза в плазме крови через 2 часа после нагрузки глюкозой в пределах  $\geq 7,8$  и  $\leq 11,1$  ммоль/л).

Наличие у пациента центрального ожирения и двух дополнительных критериев является основанием для диагностирования у него метаболического синдрома.

Критериями включения в исследование являлись:

Наличие метаболического синдрома на момент исследования, возраст от 30 до 60 лет.

Критериями исключения служили: острые и хронические воспалительные заболевания в стадии обострения, аутоиммунные заболевания, заболевания системы крови, острые бактериальные и вирусные инфекции, злокачественные новообразования, возраст старше 60 лет.

На базе негосударственного учреждения здравоохранения медико-санитарной части г. Астрахань (НУЗ МСЧ) нами было обследовано 102 больных МС. В качестве контроля обследовалось 43 здоровых донора.

В исследовании вошли 57 женщин и 45 мужчин в возрасте от 30 до 60 лет. На базе негосударственного учреждения здравоохранения медико-санитарной части г. Астрахань (НУЗ МСЧ) нами было обследовано 102 больных с диагнозами: ишемическая болезнь сердца (ИБС) – 3, гипертоническая болезнь (ГБ) – 35, вторичная артериальная гипертензия (вторичная АГ) – 21, ИБС+ГБ – 19, ИБС+Вторичная АГ – 24.

Исследование было одобрено этическим комитетом АГМА от 27 января 2012 года.

Среди наблюдаемых больных основным диагнозом как среди мужчин (25,49 %), так и среди женщин (8,82 %) оказалась гипертоническая болезнь (34,31 %). Второе место составили лица с сочетаниями различных форм ИБС + вторичная артериальная гипертензия (23,54 %). Причем среди мужчин эта патология была на втором месте (18,62 %), а среди женщин лишь на третьем (4,90 %). На втором месте по распространенности среди женщин оказалась вторичная артериальная гипертензия (6,86 %). Диагноз ИБС + ГБ наблюдался в 18,62 % случаях. Причем у мужчин этот показатель составил 15,68 %, а у женщин всего 2,95 %, что значительно меньше.

Наименьшее количество больных составила группа с различными формами ИБС – 3 человека (2,95 %).

По половому признаку все пациенты распределились следующим образом: мужчин – 76,47 %, женщин – 23,53 %. Средний возраст на момент исследования – 56 лет (мин. 30 лет, макс. – 60 лет). Преобладают лица мужского пола (76,47 %). В возрастной группе 30–39 лет количество мужчин составило 6,86 %, увеличиваясь до 21,57 % в возрастной группе 40–49

лет, достигая 48,04 % в возрастной группе от 50 до 60 лет. Преимущественное число больных 48,04 % наблюдалось в возрастной группе 50–60 лет.

Гораздо меньше было женщин (23,53 %). В возрастной группе 50–60 лет (19,61 %). Меньше всего больных с метаболическим синдромом было в возрастной группе 30–39 лет (6,86 %).

Был проведен анализ показателей роста и веса больных МС в зависимости от возраста и пола. У мужчин с МС в возрасте 30–39 лет рост практически не отличался от такового в контрольной группе и в среднем составлял  $177,28 \pm 1,74$  см. При этом вес мужчин данной возрастной группы в среднем превышал таковой в норме на 29,1 кг ( $110,86 \pm 3,15$  кг).

Рост мужчин в возрасте 40–49 лет у больных МС в среднем был несколько выше (на 5 см), чем в контрольной группе ( $179,45 \pm 1,77$  см). В то же время средний вес мужчин данной возрастной группы превышал нормальный на 33,57 кг и составлял  $110,09 \pm 3,06$  кг.

В группе мужчин 50–60 лет средний рост больных с МС также превышал рост контрольной группы на 4,14 см ( $175,24 \pm 0,78$  см), а вес был больше такового в контрольной группе на 19,8 кг ( $101,82 \pm 1,59$  кг).

Среди женщин, больных МС, не было пациенток в возрасте 30–39 лет. Женщины в возрасте 40–49 лет по росту отличались от контрольной группы в пределах 2 см ( $162,5 \pm 1,04$  см). При этом средний вес больных МС в данной возрастной группе составил  $94 \pm 6,27$  кг, что на 44 кг выше нормального для данной группы. У пациенток с МС возрастной группы 50–60 лет средний рост не отличался от такового в контрольной группе ( $162,4 \pm 1,33$  см), тогда как вес превышал нормальные показатели на 34,45 кг ( $98,45 \pm 3,08$  кг).

Показатель ОТ/ОБ у мужчин, больных МС, в возрастной группе 30–39 лет не отличался от такового в контрольной группе ( $1,03 \pm 0,01$ ). У мужчин в возрасте 40–49 и 50–60 лет показатель ОТ/ОБ несколько превышал норму (соответственно,  $1,03 \pm 0,57$  и  $1,04 \pm 0,21$ ).

Индекс массы тела (ИМТ) весьма существенно отличался у мужчин с МС от показателей контрольной группы. В возрастной группе 30–39 лет ИМТ в 1,35 раз превышал таковой в контрольной группе ( $35,29 \pm 1,11$  кг/м<sup>2</sup>); у больных с МС в возрасте 40–49 лет – в 1,36 раз ( $34,19 \pm 0,83$  кг/м<sup>2</sup>); у мужчин с МС в возрасте 50–60 лет – в 1,2 раза ( $33,16 \pm 0,48$  кг/м<sup>2</sup>).

У всех больных проводилось цитохимическое исследование ферментативной активности нейтрофилов и моноцитов. Нейтрофилы определяли в мазке из цельной крови. Выделение моноцитов проводили по методике И.С. Фрейдлин. В нейтрофилах и моноцитах исследовали следующие группы ферментов:

1). Метаболические: сукцинатдегидрогеназа (СДГ), отражающая цикл Кребса; лактатдегидрогеназа (ЛДГ), отражающая анаэробный гликолиз; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г-6-ФДГ), отражающая активность пентозо-фосфатного шунта.

2). Ферменты транспорта электронов кислорода: НАД и НАДФ–диафоразы по методике Р.П. Нарциссова.

3). Лизосомальные: альфанафтилацетатэстеразы и альфанафтилбутиратэстеразы по методике Вачштейна-Вольфа [3].

Оценку результатов цитохимических реакций проводили полуколичественным методом Карлов. В основе этого метода лежит распределение всех клеточных элементов по группам в зависимости от интенсивности окраски и количества выявляемого в клетке цитохимически активного вещества. К нулевой группе относили клетки без гранул. В первую группу включали клетки низкой степени активности, содержащие единичные гранулы, или же клетки, в которых площадь окраски занимала до 25 % цитоплазмы (степень "а"). Ко второй группе относили клетки средней степени активности, то есть те, цитоплазма которых была заполнена гранулами на 30–70 % (степень "б"). К третьей группе относили клетки высокой степени активности, то есть заполненные гранулами на 70–100 % независимо от того, контролировалось ядро или нет (степень "в"). Кроме того, к степени "в" относили клетки, из которых наблюдался выход гранул.

Для определения среднего цитохимического показателя (СЦП) в мазке подсчитывали 100 клеток (нейтрофилов или моноцитов, в зависимости от вида мазка). При этом число клеток каждой из степеней умножали на номер степени, то есть СЦП определяли по формуле:  $СЦП = a + 2б + 3в$ . В условных единицах (у.е.).

Математическая обработка полученных цитохимических данных проводилась на персональном компьютере в программе Статистика 7.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Цитохимический анализ проводили в динамике: при поступлении больного в стационар и при выписке из стационара.

При поступлении процент реагирующих клеток в реакции СДГ составлял  $44,8 \pm 0,3$ . Все реагирующие клетки классифицировались как степень «а» (низшая степень активности). Средний цитохимический показатель, соответственно, также составил  $44,8 \pm 0,2$  у.е., что превышало норму в 3 раза (норма СДГ= $15,04 \pm 0,02$  у.е.).

Активность ЛДГ при поступлении у больных МС превышала таковую в норме в 2,8 раза и составляла  $56,71 \pm 0,5$  у.е. (норма ЛДГ= $20,17 \pm 0,02$  у.е.). Все реагирующие клетки были степени «а», что обусловило процент реагирующих клеток равным СЦП.

Средний цитохимический показатель активности Г-6-ФДГ составлял  $63,21 \pm 0,4$  у.е., что превышало норму (норма Г-6-ФДГ= $35,30 \pm 0,03$  у.е.) в 1,8 раза. Процент реагирующих клеток составлял 63,21, при этом все клетки были степени «а».

Таким образом, у больных МС метаболическая активность нейтрофилов при поступлении в стационар превышала таковую в норме в 2–3 раза.

При выписке из стационара отмечалось небольшое снижение активности СДГ ( $34,7 \pm 0,6$  у.е.), не достигающее нормальных показателей. Все реагирующие клетки ( $34,7 \pm 0,6$  %) были степени «а».

Активность ЛДГ при выписке была несколько ниже таковой при поступлении (СЦП =  $39,61 \pm 0,7$  у.е.). Все реагирующие клетки оставались низкой степени активности (степень «а»), процент реагирующих клеток соответствовал СЦП ( $39,61 \pm 0,7$  %). Активность ЛДГ не возвращалась к нормальным показателям.

Активность Г-6-ФДГ в нейтрофилах при выписке больных МС из стационара практически не отличалась от таковой при поступлении (СЦП =  $62,34 \pm 0,6$  у.е.). Все реагирующие клетки были степени «а».

Таким образом, при выписке больных МС из стационара отмечалась тенденция к нормализации активности СДГ и ЛДГ в нейтрофилах, при практически неизменной активности Г-6-ФДГ.

В моноцитах больных МС наблюдалась схожая картина.

Активность СДГ при поступлении в моноцитах больных МС превышала таковую в норме в 2,6 раза (СЦП =  $51,32 \pm 0,4$  у.е.; норма  $20,04 \pm 0,02$  у.е.). При этом СЦП формировался исключительно клетками степени «а» и соответствовал проценту реагирующих клеток.

Активность ЛДГ в моноцитах при поступлении была значительно выше таковой в норме (СЦП =  $55,81 \pm 0,3$  у.е.; норма  $15,13 \pm 0,02$  у.е.) и превышала ее в 3,7 раз. Все реагирующие клетки классифицировались как степень «а» и соответствовали СЦП.

Повышенной была и активность Г-6-ФДГ в моноцитах. СЦП данной реакции составлял  $61,65 \pm 0,3$  у.е. при норме  $15,60 \pm 0,03$  у.е.

После проведения курса терапии активность СДГ снизилась почти в 2 раза (СЦП =  $28,67 \pm 0,4$  у.е.), все реагирующие клетки оставались степени «а». Активность ЛДГ в моноцитах при выписке имела некоторую тенденцию к снижению, но к нормальным показателям не возвращалась (СЦП =  $46,17 \pm 0,3$  у.е.;). Такие же данные были получены и в отношении активности Г-6-ФДГ в моноцитах (СЦП =  $52,76$  у.е.).

Таким образом, у больных МС выявлены значительные изменения напряжения активности цикла Кребса, анаэробного гликолиза и пентозо-фосфатного шунта как в

нейтрофилах, так и в моноцитах крови, носящих однонаправленный характер, как до, так и после проведения курса лечения. Полученные данные позволяют говорить об активном участии нейтрофилов и моноцитов крови в формировании метаболического синдрома.

### Список литературы

1. Алмазов В.А., Благодосклонная Я.В., Шляхто Е.И. и др. Роль абдоминального ожирения в патогенезе синдрома инсулинорезистентности // Терапевтический архив. – 1999. – №10. – С. 18-22.
2. Балоболкин М.И. //Диабетология. – М.: Медицина, 2000. – С.671.
3. Буеверов А.О. Апоптоз лимфоцитов и гранулоцитов периферической крови при хронических HBV- и HCV-инфекциях / А.О. Буеверов, Е.В. Тихонина, Е.Ю. Москалева и др. // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2010. – № 6. – С.33-36.
4. Бутрова С. А. Метаболический синдром: патогенез, клиника, диагностика, подходы к лечению // Русский медицинский журнал. – 2001. – № 2. – С. 56-60.
5. Василькова В.В., Вишневецкая И.Ф., Ферментативная активность моноцитов крови у больных лихорадкой Ку различных возрастных групп // Клиническая иммунология. – 2006. № 5. – С.158.
6. Зефирова Г.С. Сахарный диабет // «Клиническаяэндокринология» /под ред. Н.Т. Старковой., 3-е изд. – М.: Медицина, 2002. – С.192-262. 108.1
7. Колопкова Т.А., Блинова В. В., Скворцов Ю. И., Субботина В. Г. Метаболический синдром X – пандемия XXI века // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2008. – № 3. – Т. 4. – С.131.
8. Маянская И.В., Шабунина Е.И., Ашкинази В.И. и др. Активность митохондриальных дегидрогеназлимфоцитов периферической крови у детейс болезнью Крона / И. В. Маянская, Е.И. Шабунина, В.И. Ашкинази и др. // Вопр. диагн. в педиат. – 2009. – Т. 1, № 1. – С. 28-32.
9. Нестерова И.В. Диагностика и коррекция иммунодефицитов по системе нейтрофильных гранулоцитов в эксперименте и клинике// 1-й Всесоюзный иммунологический съезд: тезисы докл. – М.,2009. – С. 342.
10. Фрейдлин И.С., Тотолян А.А. Клетки иммунной системы. (Т.3; Т.4; Т.5) //Наука. – 2001. – С.390.

### Рецензенты:

Полунина О.С., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой внутренних болезней педиатрического факультета ГБОУ ВПО Астраханский ГМУ МЗ РФ, г. Астрахань;



Антонян В.В., д.м.н., доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней ГБОУ ВПО Астраханский ГМУ МЗ РФ, г. Астрахань.