

© АЛИЕВА А. А., 2015

УДК 616.36-002.2-022-07:616.155.34]-055-008.9-092.18-074

Алиева А.А.

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНДЕРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ

ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань

Изучали динамику диафоразной и эстеразной активности нейтрофилов крови у больных хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) низкой степени активности в зависимости от гендерных особенностей в динамике лечения.

Проведено обследование и лечение 113 больных ХВГС низкой степени активности. Определяли диафоразную и эстеразную активность нейтрофилов в динамике лечения. Исследования диафораз проводили по методике Р.П. Нарциссова, содержание эстераз определяли по методу В.М. Вачштейна, Ф.Г. Вольфа. Подсчет результатов осуществляли полуколичественным методом Капlou.

У больных ХВГС низкой степени активности до лечения активность НАД-диафоразы была снижена как у мужчин, так и у женщин. Активность НАДФ-диафоразы до лечения у мужчин незначительно превышало норму, а у женщин соответствовала норме. Применение базисной терапии (БТ) привело к качественному перераспределению клеточного состава реагирующих клеток: все они реагировали по средней степени активности («б»), при этом средний цитохимический показатель реакции у мужчин оставался в норме, а у женщин наблюдали повышение активности. Активность обеих диафораз после применения комплексной терапии (БТ + циклоферон (ЦФ)) полностью нормализовалась как у мужчин, так и у женщин.

Эстеразная активность до лечения была снижена у мужчин и повышена у женщин (альфа-нафтилацетатэстераза – АЭ), а альфа-нафтилбутиратэстераза (БЭ), наоборот, у мужчин повышена, у женщин снижена. После БТ у мужчин наблюдалось повышение эстеразной активности и полное перераспределение качественного состава реагирующих нейтрофилов (со степени «а» на степень «б»). У женщин после лечения активность АЭ снижена, а БЭ повышена. Перераспределения качественного состава клеток не отмечали. Применение ЦФ нормализует активность БЭ у мужчин и АЭ у женщин.

У больных ХВГС низкой степени активности наблюдаются отличия диафоразной и эстеразной активности нейтрофилов в зависимости от гендерных особенностей в динамике лечения.

Ключевые слова: гендерные особенности хронического вирусного гепатита С; диафоразы; эстеразы; цитохимическая активность.

Alieva A.A.

THE ENZYME ACTIVITY OF NEUTROPHILS OF BLOOD IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS C DEPENDING ON GENDER CHARACTERISTICS

The Astrakhan state medical academy of Minzdrav of Russia, Astrakhan, Russia

The study was carried out to analyze dynamics of diaphorase and esterase activity of neutrophils of blood in patients with chronic viral hepatitis C of lower degree of activity depending on gender characteristics in dynamics of treatment. The examination and treatment were organized concerning sampling of 113 patients with chronic viral hepatitis C of lower degree of activity. The diaphorase and esterase activity of neutrophils in dynamics of treatment was detected. The analysis of diaphorases was carried out according R.P. Nartsissov technique. The content of esterase was estimated by V.M. Wachstein-F.G. Wolf technique. The count of results was implemented using Kaplow semiquantitative technique.

In patients with chronic viral hepatitis C of lower degree of activity prior to treatment the activity of NAD-diaphorase was lowered both in males and females. The activity of NADF-diaphorase prior to treatment significantly exceeded standard in males and matched standard in females. The application of basic therapy resulted in qualitative redistribution of cellular composition of reacting cells. All of them reacted following medium degree of activity (b). At that, average cytochemical indicator of reaction was normal in males and in females increasing of activity was observed. The activity of both diaphorases after application of complex therapy (basic therapy and cycloferon) totally returned to normality both in males and females.

The esterase activity prior to treatment was decreased in males and increased in females (alpha-naphthylacetate esterase) and vice versa (alpha-naphthylbutyrate esterase) was increased in males and decreased in females. After application of basic therapy in males increasing of esterase activity was registered and total redistribution of qualitative composition of reacting neutrophils (from degree "a" to degree "b"). In females after treatment the activity of alpha-naphthylacetate esterase was decreased and alpha-naphthylbutyrate esterase was increased. The redistribution of qualitative composition of cells was absent. The application of cycloferon brings to normality the activity of alpha-naphthylbutyrate esterase in males and activity of diaphorase/alpha-naphthylacetate esterase in females.

In patients with chronic viral hepatitis C of lower degree of activity the differences in diaphorase and esterase activity of neutrophils depending on gender characteristics in dynamics of treatment are observed.

Key words: gender characteristics; chronic viral hepatitis C; diaphorase; esterase; cytochemical activity

Для корреспонденции:

Алиева Алтынай Асылбековна, аспирант каф. инф. болезней

Адрес: 414000, Астрахань, ул. Бакинская, 121

E-mail: altynai_aibolit@mail.ru

Вирусный гепатит С (ВГС) занимает лидирующее место среди гепатотропных инфекций в развитых странах, где инфицированы 1–2 % населения [8]. В мире число инфицированных вирусом гепатита С (НСV) достигает 500 млн [7]. В России больных хроническими формами и носителей НCV не менее 2 млн [1, 2].

Широкая распространенность инфекции объясняется тем, что у 75–85 % больных, перенесших острый ВГС, развивается хроническое поражение печени. Столь высокий процент хронизации процесса обусловлен в первую очередь уникальной способностью НCV к генетической изменчивости, что позволяет ему избегать иммунного ответа хозяина [3].

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 патологии невозможны без цитохимического изучения клеток крови. Цитохимический анализ является высокоинформативным и относительно доступным методом изучения клетки [4–6].

Цель исследования – изучить динамику диафоразной и эстеразной активности нейтрофилов крови у больных хроническим ВГС (ХВГС) низкой степени активности в зависимости от гендерных особенностей в динамике лечения.

Задачи исследования:

1) исследовать активность транспорта электронов кислорода и эстеразную активность в нейтрофилах крови у больных ХВГС низкой степени активности в зависимости от гендерных особенностей до лечения;

2) изучить изменения ферментативной активности нейтрофилов крови у больных ХВГС низкой степени активности в зависимости от гендерных особенностей на фоне базисной терапии (БТ);

3) изучить изменения ферментативной активности нейтрофилов крови у больных ХВГС низкой степени активности в зависимости от гендерных особенностей на фоне комплексного лечения с применением циклоферона (ЦФ).

Материалы и методы. Для решения поставленных задач провели цитохимическое обследование и лечение 113 больных (84 (74,34%) мужчин и 29 (25,66%) женщин), страдающих ХВГС низкой степени активности и находившихся на лечении в ГБУЗ «Областная инфекционная клиническая больница им. А.М. Ничоги» г. Астрахани. Возраст больных варьировал от 16 до 65 лет. Большинство (76,2%) пациентов были в возрасте до 40 лет (средний возраст 34,8±2,52 года). В качестве контрольной группы обследовали 82 пациента (57 мужчин и 25 женщин).

Критерии включения больных в исследование: наличие маркеров ХВГС, неупотребление наркотических веществ и алкоголя в анамнезе, отсутствие токсико-алиментарного гепатита в анамнезе, отсутствие противовирусной терапии в анамнезе.

Критерии исключения: обнаружение маркеров ХВГВ, употребление наркотических веществ внутривенно, злоупотребление алкоголем, наличие токсико-алиментарного гепатита, противовирусная терапия в анамнезе.

Все больные дали информированные согласия на обследование и лечение. Всем больным ХВГС проводили БТ, включавшую режим, стол 5 (ОВД), дезинтоксикационную терапию по показаниям (5% раствор глюкозы, реамберин, полийонные растворы, гемодез), витамины группы В, аскорбиновую кислоту, рибоксин, гепатопротекторы (карсил, эссенциале, урсосан и др.), спазмолитические средства (но-шпа, дротаверин, папаверин), желчегонные препараты (холензим, аллохол, хофитол), ферменты (мезим-форте, фестал, панкреатин) и физиотерапевтические процедуры (магнито- и лазеротерапия). К лечению 43 мужчин и 12 женщин, больных ХВГС низкой степени активности, добавили ЦФ.

В нейтрофилах определяли активность ферментов транспорта электронов кислорода: НАД-диафоразы (НАД) и НАДФ-диафоразы (НАДФ) по методу Р.П. Нарцисова (1969). Эстеразную активность α -нафтилацетатэстеразы (АЭ) и α -нафтилбутиратэстеразы (БЭ) определяли по методу В.М. Вачштейна, Ф.Г. Вольфа (1973).

Результаты анализировали с помощью полуколичественного метода Капlou, в основе которого 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 1-ю группу включили клетки низкой степени активности, содержащие единичные гранулы, или же клетки, в которых площадь окраски занимала до 25% цитоплазмы (степень «а»). Ко 2-й группе относили клетки средней степени активности, т. е. те, цитоплазма которых была заполнена гранулами на 30–70% (степень «б»). В 3-ю группу включали клетки высокой степени активности, т. е. заполненные гранулами на 70–100% независимо от того, контролировалось ядро или нет (степень «в»). Кроме того, к степени «в» относили клетки, из которых наблюдали выход гранул.

Для определения среднего цитохимического показателя (СЦП) в мазке подсчитывали 100 клеток (нейтрофилы или моноциты в зависимости от вида мазка). При этом количество клеток каждой из степеней умножали на номер степени, т. е. СЦП определяли по формуле:

$$\text{СЦП} = \langle a \rangle + 2\langle b \rangle + 3\langle v \rangle.$$

Математическую обработку полученных цитохимических данных проводили на персональном компьютере Pentium в программе Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение. У мужчин, больных ХВГС низкой степени активности, до лечения активность НАД (табл. 1) была значительно снижена (9,8±2,03 усл. ед.) по сравнению с таковой в норме. Все реагирующие нейтрофилы классифицировались как степень «а». После БТ произошло полное восстановление активности НАД. При этом количество реагирующих клеток значительно уменьшилось (6,13±0,2%), все они были средней степени активности (степень «б»).

Активность НАДФ до лечения у данных больных превышала норму незначительно (92,66±4,2 усл. ед.) и формировала исключительно клетками степени «а». После курса БТ произошло качественное изменение состава реагирующих клеток: их стало меньше в 2 раза (46,23±0,2%), все они реагировали по средней степени активности («б»). При этом СЦП реакции оставался в норме (92,46±0,2 усл. ед.).

Таблица 1

Диафоразная активность в нейтрофилах у мужчин, больных ХВГС низкой степени активности, в динамике лечения

Фермент	% реагирующих клеток	Степень реакции			СЦП
		«а»	«б»	«в»	
НАД:					
норма	12,95±0,02	12,95±0,02	0	0	12,95±0,02
до лечения	9,80±2,03	9,80±2,03	0	0	9,80±2,03*
БТ	6,13±0,20	0	6,13±0,20	0	12,26±0,20**
БТ + ЦФ	12,21±0,20	12,21±0,20	0	0	12,21±0,20**, ***
НАДФ:					
норма	90,25±0,01	90,25±0,01	0	0	90,25±0,01
до лечения	92,66±4,20	92,66±4,20	0	0	92,66±4,20*
БТ	46,23±0,20	0	46,23±0,2	0	92,46±0,20*, **
БТ + ЦФ	90,25±0,01	90,25±0,01	0	0	90,25±0,01**, ***

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: $p < 0,05$: * – по сравнению с показателями в контрольной группе; ** – с показателями до и после лечения; *** – при сравнении БТ и БТ + ЦФ.

Таблица 2

Диафоразная активность в нейтрофилах у женщин, больных ХВГС низкой степени активности, в динамике лечения

Фермент	% реагирующих клеток	Степень реакции			СЦП
		"а"	"б"	"в"	
НАД:					
норма	12,95±0,02	12,95±0,02	0	0	12,95±0,02
до лечения	9,61±2,03	9,61±2,03	0	0	9,61±2,03*
БТ	13,7±0,01	0	13,7±0,01	0	27,4±0,01*, **
БТ + ЦФ	12,87±0,01	12,87±0,01	0	0	12,87±0,01**, ***
НАДФ:					
норма	90,25±0,01	90,25±0,01	0	0	90,25±0,01
до лечения	91,11±4,20	91,11±4,20	0	0	91,11±4,20*
БТ	51,45±0,01	0	51,45±0,01	0	102,9±0,01*, **
БТ + ЦФ	90,57±0,023	90,57±0,023	0	0	90,57±0,023**, ***

У женщин, больных ХВГС низкой степени активности, до лечения отмечалось некоторое угнетение (9,61±2,03 усл. ед.) активности НАД (табл. 2), обеспеченное клетками степени «а». После курса базисной терапии активность НАД у женщин данной группы превышала таковую в контрольной

группе более чем вдвое (27,4±0,01 усл. ед.). При этом количество реагирующих нейтрофилов увеличилось до 13,7±0,01%, все они были степени «б».

Активность НАДФ до лечения у данных пациенток соответствовала норме, все реагирующие клетки были низкой степени активности. После БТ произошло повышение активности фермента (102,9±0,01 усл. ед.) за счет перераспределения качественного состава реагирующих клеток. Все реагирующие нейтрофилы были степени «б», их количество снизилось (51,45±0,01%).

Активность обеих диафораз после применения комплексной терапии полностью нормализовалась как у мужчин, так и у женщин.

Эстеразная активность также была различной у мужчин и женщин с ХВГС низкой степени активности. У мужчин (табл. 3) до лечения активность АЭ значительно снижалась (16,21±0,01 усл. ед.) по сравнению с таковой в норме. Все реагирующие клетки были степени «а». После курса БТ СЦП реакции значительно превышал нормальные показатели (102,44±0,17 усл. ед.). Все реагирующие клетки классифицировались как степень «б».

Таблица 3

Эстеразная активность в нейтрофилах у мужчин, больных ХВГС низкой степени активности, в динамике лечения

Фермент	% реагирующих клеток	Степень реакции			СЦП
		"а"	"б"	"в"	
АЭ:					
норма	25,70±0,01	25,70±0,01	0	0	25,70±0,01
до лечения	16,21±0,01	16,21±0,01	0	0	16,21±0,01*
БТ	21,3±0,01	0	21,3±0,01	0	42,6±0,01*, **
БТ + ЦФ	23,42±0,11	23,42±0,11	0	0	23,42±0,11**, ***
БЭ:					
норма	86,21±0,01	86,21±0,01	0	0	86,21±0,01
до лечения	91,31±0,11	91,31±0,11	0	0	91,31±0,11*
БТ	51,22±0,14	0	51,22±0,14	0	102,44±0,17*, **
БТ + ЦФ	85,71±0,01	85,71±0,01	0	0	85,71±0,01**, ***

Таблица 4

Эстеразная активность в нейтрофилах у женщин, больных ХВГС низкой степени активности, в динамике лечения

Фермент	% реагирующих клеток	Степень реакции			СЦП
		"а"	"б"	"в"	
АЭ:					
норма	25,70±0,01	25,70±0,01	0	0	25,70±0,01
до лечения	39,23±0,01	39,23±0,01	0	0	39,23±0,01*
БТ	23,94±0,21	23,94±0,21	0	0	23,94±0,21**
БТ + ЦФ	24,12±0,14	24,12±0,14	0	0	24,12±0,14**, ***
БЭ:					
норма	86,21±0,01	86,21±0,01	0	0	86,21±0,01
до лечения	40,55±0,04	0	40,55±0,04	0	81,10±0,07*
БТ	44,95±0,04	0	44,95±0,04	0	89,9±0,04**
БТ + ЦФ	85,67±0,01	85,67±0,01	0	0	85,67±0,01**, ***

После применения комплексной терапии активность АЭ в нейтрофилах мужчин, больных ХВГС низкой степени активности, была ниже нормальной на 2,28 усл. ед. (23,42±0,11 усл. ед.), при полной нормализации активности БЭ (табл. 3). У данных мужчин произошла смена качественного состава реагирующих клеток. Если на фоне БТ все реагирующие нейтрофилы были средней степени активности, то после комплексной терапии все клетки классифицировались как степень «а».

У женщин с ХВГС низкой степенью активности уровень АЭ до лечения (табл. 4) был значительно повышен (39,23±0,01 усл. ед.) по сравнению с таковым в норме, что было обеспечено увеличенным количеством нейтрофилов степени «а». После курса БТ произошла полная нормализация активности АЭ. Активность БЭ у данных женщин до лечения была несколько ниже (81,1±0,07 усл. ед.) нормальной, все реагирующие клетки были степени «б». После лечения активность фермента была несколько выше (89,9±0,04 усл. ед.) нормальной, что обеспечивалось увеличением количества нейтрофилов, реагирующих по типу «б».

Применение комплексной терапии привело к полной нормализации активности АЭ и БЭ у данных женщин. Все реагирующие клетки были степени «а».

Заключение. Таким образом, у больных ХВГС низкой степени активности мы наблюдали гендерные отличия функциональной активности нейтрофилов. Активность диафораз отличалась у мужчин и женщин после БТ. Если у мужчин произошла нормализация активности транспорта электронов кислорода, то у женщин возникло напряжение данных ферментов. При этом все реагирующие клетки меняли свою активность от низшей степени перед началом лечения до средней после лечения.

Эстеразная активность до лечения была снижена у мужчин и повышена у женщин (АЭ), а БЭ, на-

борот, у мужчин повышена, у женщин снижена. После лечения у мужчин наблюдали повышение эстеразной активности и полное перераспределение качественного состава реагирующих нейтрофилов (со степени «а» на степень «б»). У женщин после лечения активность АЭ снижена, а БЭ повышена. Перераспределения качественного состава клеток не отмечалось.

Таким образом, выявили гендерные особенности у больных ХВГС низкой степени активности на фоне применения комплексной терапии (БТ + ЦФ). Применение ЦФ дает положительный эффект как у мужчин, так и у женщин. У мужчин и женщин произошла полная нормализация активности обеих диафораз, а также БЭ у мужчин и АЭ у женщин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов А.В., Малеев В.В. Эпидемиологические и клинические особенности хронического гепатита С. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2008; 2: 32–5.
2. Бондаренко А.Н. Этиотропная терапия вирусных гепатитов у лиц, употребляющих наркотики. *Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова*. 2006; 4: 168–74.
3. Латентные формы вирусных гепатитов В, С и D: *Диагностика, лечение и профилактика*: Методические рекомендации. М.: Воениздат; 2002.
4. Малова Е.С., Юшук Н.Д., Балмасова И.П. и др. CD56+ лимфоциты и иммунопатогенез хронического гепатита С. *Иммунология*. 2010; 31 (6): 310–5.
5. Пигаревский В.Е. *Зернистые лейкоциты и их свойства*. М.: Медицина; 1978.
6. Пигаревский В.Е. Полиморфноядерный лейкоцит и макрофаг в реакциях воспаления и гиперчувствительности. *Архив патологии*. 1983; XV (11): 14–22.

7. Радченко В.Г., Стельмах В.В., Козлов В.К. *Оптимизация этиопатогенетической терапии хронического гепатита С*. СПб.; 2004.
8. Ozkan M., Corapcioglu A., Bakioglu I. et al. Psychiatric morbidity and its effect on the quality of life patients with chronic hepatitis C. *International Journal of Law and Psychiatry*. 2006; 36 (3): 283–97.

REFERENCES

1. Baranov A.V., Maleev V.V. Epidemiological and clinical features of chronic hepatitis C. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2008; 2: 32–5. (in Russian)
2. Bondarenko A.N. Etiotropic therapy of viral hepatitis among people who inject drugs. *Vestnik Sankt-Peterburgskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii im. I.I. Mechnikova*. 2006; 4: 168–74. (in Russian)
3. *The latent form of viral hepatitis B, C and D: Diagnosis, treatment and prevention*. Moscow: Voenizdat; 2002.
4. Malova E.S., Yushchuk N.D., Balmasova I.P. et al. CD56+ lymphocytes and immunopathogenesis of chronic hepatitis C. *Immunologiya*. 2010; 31 (6): 310–5. (in Russian)
5. Pigarevskiy V.E. *Granular leukocytes and their properties*. Moscow: Meditsina; 1978. (in Russian)
6. Pigarevskiy V.E. Polymorphonuclear leukocyte and macrophage in inflammations and hypersensitivity. *Arkhiv patologii*. 1983; XV (11): 14–22. (in Russian)
7. Radchenko V.G., Stel'makh V.V., Kozlov V.K. *Optimization etiopathogenic therapy of chronic hepatitis C*. Saint Petersburg: Taktik-Studio; 2004. (in Russian)
8. Ozkan M., Corapcioglu A., Bakioglu I. et al. Psychiatric morbidity and its effect on the quality of life patients with chronic hepatitis C. *International Journal of Law and Psychiatry*. 2006; 36 (3): 283–97.

Поступила 26.03.14

Received 26.03.14

© ГОРБЕНКО А.С., ОЛЬХОВСКИЙ И.А., 2015

УДК 615.277.3.033.07

Горбенко А.С.¹, Ольховский И.А.^{1,2}

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ НАКОПЛЕНИЯ ДАУНОРУБИЦИНА И РОДАМИНА-123 В КЛЕТКАХ ВЕНОЗНОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ЦИТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

¹Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 660036, г. Красноярск; ²ФГБУН КНЦ СО РАН, 660036, г. Красноярск

В работе представлены сравнительные данные цитометрической оценки накопления даунорубицина и родамина-123 в клетках периферической крови здоровых людей при инкубации веществ в условиях *in vitro*. Показано, что максимальное насыщение тромбоцитов происходит в течение первых 5 мин, лейкоцитов – в течение 45 мин, а эритроциты практически не накапливают эти соединения. Максимальные значения накопления веществ в лейкоцитах характеризуются высокой межиндивидуальной вариацией. Тесная корреляция ($R_s = 0,96-0,98$) параметров накопления веществ в лимфоцитах и нейтрофилах свидетельствует о наличии схожих механизмов контроля активности транспорта ксенобиотиков в ядродержащих клетках крови. Вместе с тем результаты ингибиторного анализа вклада Pgp-зависимых механизмов накопления родамина-123 лейкоцитами отличаются от данных, полученных при использовании даунорубицина, что отражает различия их внутриклеточных сайтов связывания. Выраженные отличия между параметрами накопления даунорубицина и родамина-123 лейкоцитами у разных пациентов определяют необходимость индивидуального подхода в мониторинге развития лекарственной резистентности.

Ключевые слова: множественная лекарственная устойчивость; даунорубицин; родамин-123; форменные элементы крови; проточная цитометрия.

Для корреспонденции:

Ольховский Игорь Алексеевич, д-р мед. наук, директор
Адрес: 660036, Красноярск, ул. Академгородок, 15А
E-mail: kraschemcenter@mail.ru