

УДК: 616.24-002: 616.32-008.913+616.155.32-007.1

## Нарушение метаболизма в лейкоцитах периферической крови при деструктивном туберкулёзе легких

В.Н. Чернышов

## Malfunction of metabolism in leukocytes of periferal blood in distructive lung tuberculosis

V.N. Chernyshov

*ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Гергиевского», кафедра фтизиопульмонологии, г. Симферополь*

**Ключевые слова:** деструктивный туберкулёз, лейкоциты периферической крови (ЛПК), цитоморфологические нарушения

**В** настоящее время треть населения инфицирована микобактериями туберкулёза и в 21 век человечество вступает с высокой заболеваемостью, являющейся частой причиной смерти [21]. В мире регистрируется около 8 миллионов новых случаев заболевания туберкулёзом органов дыхания. При этом от 20 до 30% заболевших пациентов выделяют возбудитель, устойчивый к действию противотуберкулёзных препаратов [26].

Течение и исход специфического процесса в легких в значительной мере определяется состоянием иммунитета. В работах А.Г. Хоменко и соавт. [19,20,22], В.Я. Гергерт [2], И.С. Хоменко [23], В.Ю. Мишина [12] и др. выявлена четкая связь изменений основных иммунологических показателей и клинко-рентгенологической динамики туберкулёзного процесса в легких.

Немногочисленные литературные данные по цитохимическому изучению окислительно-восстановительных ферментов лимфоцитов и моноцитов свидетельствуют о депрессии их активности при инфицировании детей и прогрессировании туберкулёза лёгких у взрослых [1,6,7,8,11]. Однако, эти исследования проводились только в клинических

условиях и лишь косвенно свидетельствовали о цитоморфологических изменениях в иммунокомпетентных клетках. Объективных цитоморфологических сопоставлений при этом не проводилось и структурная патология клеток крови на различных этапах течения туберкулёза не исследовалась.

Согласно современным представлениям цитоморфологические и функциональные характеристики воспаления тесно связаны со структурой и функцией клеточных мембран [17,25]. Ведущими факторами дезорганизации биологических мембран является разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях, ионный дисбаланс клетки и активация лизосомальных ферментов [16,24]. Нарушение функций митохондрий, т.е. разобщение процессов окисления и фосфорилирования, приводит к энергетическому голоду клетки и является практически первым и серьёзным повреждением клеточных структур, что ведёт к нарушению проницаемости мембран и активации

*195006, Украина, Симферополь, Крым, бульв. Ленина 5/7, e-mail office@csmu.strace.net*

перекисного окисления липидов (ПОЛ). Поскольку продукты ПОЛ являются в свою очередь, лабильными биологических мембран, то накопление продуктов ПОЛ увеличивает их проницаемость. Это способствует потере митохондриями никотиновых ферментов, падению активности ферментов мембран и появлению соединений фенольной природы и др. веществ – ингибиторов ферментов дыхательной цепи. Получается порочный круг, «разорвать» который можно только повышением энергетики клетки и уменьшением ПОЛ [9,10].

Таким образом, изучение внутриклеточного обмена представляет собой большой интерес, т.к. значение цены резистентности в цитоморфологических нарушениях при развитии патологических процессов, в том числе и при туберкулезе, позволит оценить характер течения заболевания в разные фазы нарушения внутриклеточного обмена и позволит разработать единую систему мер коррекции нарушений, возникающих в организме больного, для своевременного использования их в клинических целях.

## Материал и методы исследования.

Для выполнения задач поставленных в этом исследовании на кафедре фтизиопульмонологии КГМУ было обследовано 236 больных различными формами деструктивного туберкулеза легких. У 161 пациента заболевание было впервые выявленным и у 75 – было обострение или рецидив. Из 236 больных было 170 мужчин и 66 женщин.

Всем больным в условиях стационара проводилось детальное клиничко-рентгенологическое обследование. Применялись как обязательные (рентгенологическое исследование, анализ мокроты на МБТ, анализ крови и мочи, туберкулиновые пробы), так и дополнительные и факультативные методы (расширенная бактериологическая диагностика, углубленное рентгенологическое исследование, бронхоскопия, исследование функции печени и почек, сердечно-сосудистой и дыхательной и др. систем).

Особое значение предавалось изучению метаболизма лейкоцитов периферической крови (ЛПК). Состояние аэробных энергетических процессов изучали по активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) – центрального фермента цикла Кребса и активности восстановленной никотинамиддинуклеотид дегидрогеназы (НАДНДГ) – комплексного показателя состояния митохондриальных ферментов и суммарного переносчика электронов по дыхательной цепи. Состояние анаэробных процессов образования энергии в клетке изучали по активности восстановленной никотинамиддинуклеотидфосфат дегидрогеназы (НАДФНДГ) и глюкозо-6 – фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) – ферментов характеризующих активность немитохондриальных дегидрогеназ, связанных с анаэробным окислением глюкозы. Данные ферменты локализованы в цитозоле клет-

ки.

Преимуществом и синхронностью процессов биологического окисления и анаэробного гликолиза исследовали по активности альфа-глицерофосфат дегидрогеназы (а-ГФДГ) – компонента глицерофосфатного шунта, который связывает цикл Кребса и гликолиз и является индикатором состояния энергетического метаболизма. Также изучалась активность кислой фосфатазы (КФ), которая осуществляет защитную функцию при переваривании чужеродных антигенов. Такие цитохимические исследования позволяют объективно оценивать состояние метаболизма ЛПК [5].

Активность дегидрогеназ ЛПК определялась количественным цитохимическим методом [13]. Метод основан на свойстве паранитротетразолия фиолетового при восстановлении в процессе реакций катализируемых дегидрогеназами, образовывать в местах локализации фермента нерастворимые округлые гранулы формазана.

В зависимости от выявляемого фермента в основную среду добавляли следующие субстраты: 540 мг сукцината натрия (для определения активности СДГ), 630 мг альфа-глицерофосфата натрия (для определения а-ГДФ), 61 мг динатриевой соли глюкозо-6-фосфорной кислоты, 15 мг никотинамидаденин-динуклеотида восстановленного динатриевой солью (для выявления активности НАДНДГ), 15 мг никотин-амид-аденин-динуклеотид-фосфата восстановленного тетранатриевой солью (для выявления активности НАДФНГ).

Состав инкубационной среды без субстрата был следующим:

1. 10 мл фосфатного буфера 0,2 М, рН 7,5-7,4;
2. 13 мг пара-нитротетразолин фиолетового (растворенного первоначально в 10 мл дистиллированной воды);
3. 15 мг трилона Б;
4. 20 мл дистиллированной воды общим объемом до 40 мл при рН 7,2-7,4.

Реакция проводилась в мазках (по два мазка из пальца) не более чем через 1 час после взятия крови. Подсчет гранул формазана после проведения реакции проводился в 30-50 клетках крови (лимфоцитах и моноцитах) и не позднее 2 часов после инкубации мазков с конкретным субстратом. Количество очагов проявления ферментативной активности является показателем, характеризующим функциональное состояние ЛПК. Произведенные расчеты показали, что одна гранула формазана, как продукта цитохимической реакции, соответствует около 10 моль/мин, активности фермента [15].

Кислая фосфатаза (КФ) лейкоцитов периферической крови определялась методом азосочетания в модификации Р.П. Нарциссова [14], в основе которого лежит гидролитическое расщепление фосфатазой моноэфира фосфорной кислотой.

Для оценки активности изучаемых ферментов лимфоцитов и моноцитов периферической крови

Распределение больных деструктивным туберкулёзом легких по клиническим формам в наблюдаемых группах ( $M \pm m$ )

Группа больных	Число больных	Клиническая форма туберкулёза лёгких			
		Очаговая	Инфильтративная	Казеозная пневмония	Кавернозная
1-я абс.	78	47	21	-	10
%	100	60,3±5,5*	26,9±5,0*	-	12,8±3,8*
2-я абс.	87	13	65	-	9
%	100	14,9±3,8*	74,7±4,7*	-	10,3±3,2*
3-я абс.	71	-	49	22	-
%	100	-	69,0±5,5*	31,0±5,4*	-

Примечание - \* -  $P < 0,05$  при сравнении между группами.

интенсивность цитохимических реакций оценивалась в следующих показателях. Для дегидрогеназы – использовали среднее количество гранул в одной клетке. Для КФ- процент клеток с положительной реакцией на фермент.

На основании количественного цитохимического исследования ЛПК у 20 здоровых доноров и в соответствии с общепринятыми методами математической статистики [3] показатели колебаний активности ферментов ЛПК были следующими. Для СДГ – 10,5 – 28,5 гранул формазана на клетку; для НАДНДГ – 15,1-36,9; для а-ГДФ – 6,0-15,1; для Г-6-ФДГ – 9,0-18,2; для НАДФНДГ – 9,2-18,2. Для КФ предел колебаний фосфатазо-положительных клеток составлял от 30 до 50%.

## Результаты исследований

На основании исходных данных, изучения активности ферментов ЛПК, было выделено 3 группы больных.

В 1-ю группу вошли 78 (33,1%) больных, у которых активность ферментов ЛПК находилась в пределах колебаний показателей лиц контрольной группы.

2-ю группу составили 87 (36,9%) больных с умеренным цитоморфологическими и функциональными нарушениями ЛПК, у которых при этом отмечалась низкая активность ферментов, связанных с циклом Кребса и окислительным фосфорилированием (активность для СДГ – 16,1±0,66 гранул формазана на 1 клетку, НАДНДГ – 17,2 ±0,85 и а-ГФДГ

– 10,9±0,99), но повышенная активность ферментов, участвующих в анаэробном гликолизе (активность Г-6-ФДГ – 26,4±0,67 гранул формазана на одну клетку, НАДФНДГ – 28,6±0,49). Наблюдается тенденция к снижению активности а-ГФДГ – фермента, осуществляющего преобразование аэробного и анаэробного путей образования энергии в клетке, а также определяющего стабильность клеточных мембран, что определенным образом снижает функциональную активность клетки [4,18].

В 3-ю группу были включены 71 (30,0%) больных со значительными цитоморфологическими и функциональными нарушениями ЛПК. При этом определялась стойкая депрессия активности всех энергетических ферментов (активность СДГ – 7,9±0,23 гранул формазана на 1 клетку; НАДНДГ – 12,4±0,77; а-ГФДГ – 5,4±0,11; Г-6-ФДГ – 12,8±0,54 и НАДФНДГ – 11,1±0,41) при высоком количестве (89,8±6,49%) циркулирующих в периферической крови фосфатазо-положительных клеток и с высокой активностью КФ, что определяет уже значительные цитоморфологические и функциональные нарушения внутриклеточного метаболизма и дестабилизации биологических мембран.

Как видно из таблицы 1 у больных деструктивным туберкулёзом легких с выраженными цитоморфологическими и функциональными нарушениями ЛПК, как правило, выявлялись более тяжелые клинические формы туберкулёза легких: инфильтративная и казеозная пневмония.

Клиническая форма туберкулёза легких не всегда отражает распространенность специфического

Распространенность инфильтрации в легочной ткани у больных деструктивным туберкулёзом легких в наблюдаемых группах ( $M \pm m$ )

Группа больных	Число больных	Распространенность инфильтрации легких		
		1-2 сегмента	1-2 доли	3 и более долей
1-я абс.	78	78	-	-
%	100	100	-	-
2-я абс.	87	24	63	-
%	100	27,6±5,1*	72,4±5,1*	-
3-я абс.	71	-	30	41
%	100	-	42,2±5,9*	57,7±5,9*

процесса в легких. Поэтому в таблице 2 приводятся данные по протяженности инфильтрации в легочной ткани у больных деструктивным туберкулезом в выделенных группах.

Таким образом приведенные данные свидетельствуют об определенной взаимосвязи распространенности инфильтрации в легочной ткани и выраженностью цито-морфологических и функциональных нарушений ЛПК. Чем более распространен специфический процесс в легочной ткани, тем более выражены цито-морфологические и функциональные нарушения ЛПК.

## Выводы

1. Сравнительное изучение клинических проявлений и тяжести течения деструктивного туберкулеза у больных с различными цито-морфологическими и функциональными нарушениями ЛПК показало, что эти характеристики взаимосвязаны.
2. Наиболее тяжелое течение болезни с выраженными явлениями интоксикации и обширными специфическими поражениями легких характерно для депрессии активности окислительно-восстановительных и гликолитических ферментов ЛПК.
3. Циркулирование большого количества фосфатазоположительных клеток с высоким уровнем КФ при сниженной активности выше указанных ферментов ЛПК является плохим прогностическим признаком.
4. Менее выраженные клинические проявления и относительно нетяжелое течение деструктивного туберкулеза, как правило, протекает при нормальных или не резко выраженных цито-морфологических и функциональных нарушениях ЛПК.

## Литература:

1. Волчкова И.А. Дифференцированная профилактика туберкулеза у контактных детей раннего и дошкольного возраста: Автореф. дис... канд. мед. наук. - Саратов, 1987. - 22с.
2. Гергерт В.Я., Хоменко П.С., Абрамова З.П. и др. Комплексная терапия больных деструктивным туберкулезом легких химиопрепаратами в сочетании с Т-активином // Пробл. туб., 1986. - № 2. С. 28-51
3. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. - А., 1978. - 294 с.
4. Ерохин В.В. Функциональная морфология респираторного отдела легких. - М., 1987. - 272 с.
5. Журавлева Т.Б., Прочуханов Р.А. Введение в количественную гистохимию ферментов. - М., 1979. - 245 с.

6. Иванова Л.А. Цитохимия клеток крови в диагностике и оценке характера течения и эффективности терапии некоторых профессиональных заболеваний: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. - М., 1991. - 47-213 С.
7. Каминская Г.О., Абдуллаев Р.Ю. Взаимосвязь оксидативных процессов в лейкоцитах крови и защитных метаболических реакций в организме больных туберкулезом легких. // Материалы, 62 Российского съезда фтизиатров 2003.
8. Кириак Е.А. Клиническая и прогностическая значимость митохондриальных ферментов лимфоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - А., 1989. - 18с.
9. Кожевников Ю.Н. О перекисном окислении липидов в норме и патологии (обзор) // Вопр. мед. химии, 1985. - № 5. - С. 2-7.
10. Кондрашова М.Н., Евтодиенко Ю.В., Гюльханьян А.В. Противоположные реакции высоко- и низкоорганизованных митохондрий // Митохондрия. - М., 1977. - С. 56-66
11. Мишин В.Ю. Течение туберкулеза при различных нарушениях метаболизма и функциональной активности лимфоцитов и моноцитов периферической крови: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. - М., 1995. - 41с.
12. Мишин В.Ю. Диагностика нарушений процессов активации иммунокомпетентных клеток у больных туберкулезом легких // Кубанский науч.-мед. вестник., 1997. - № 6. - С. 32-36.
13. Нарцисов Р.П. Применение п-нитротетразолия фиолетового для количественной цитохимии дегидрогеназ лимфоцитов человека // Арх. анат. гистол. П эмбриол., 1969. - № 5. - С. 85-91.
14. Нарцисов Р.П. Биохимические и цитохимические методы определения активности ферментов и фермент-субстратных систем различной клеточной локализации. - М., 1982. - 40с.
15. Нарцисов Р.П. Прогностические возможности клинической цитохимии // Советская педиатрия, - А., 1984. - Вып. 2. - С. 267-284.
16. Панин А.Е., Маянская Н.Н. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении. - Новосибирск., 1987. - 197с.
17. Саркисов Д.С. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций. - М., 1987. - 446с.
18. Струков А.П., Хмельницкий О.К., Петленко В.П. Морфологический эквивалент функции. - М., 1982. - 206с.
19. Хоменко А.Г., Авербах М.М., Литвинов В.П. и др. Динамика иммунологических показателей у впервые выявленных больных туберкулезом легких в зависимости от сроков прекращения бактериовыделения и закрытия полостей распада // Пробл. туб., 1982. - № 10. - С. 21-26.
20. Хоменко А.Г. Современные представления о патогенезе туберкулеза // Пробл. туб., 1988. - № 9 - С. 57-62.
21. Хоменко А.Г. Современные тенденции распространения туберкулеза в России // Русский мед. журнал., 1998. - № 17. - С. 1121-1125.
22. Хоменко А.Г., Мишин В.Ю., Чуканов В.П. и др. Диагностика, клиника и тактика лечения остро прогрессирующих форм туберкулеза легких в современных эпидемиологических условиях // Пробл. туб., 1999. - № 1. - С. 22-27.
23. Хоменко П.С., Чуканов В.П., Гергерт В.Я. и др. Эффективность противотуберкулезной химиотерапии в сочетании с кортикостероидами и иммуномодуляторами // Пробл. туб., 1990. - № 1. - С. 24-28.
24. (Kagava J.) Кагава Я. Биомембраны. - М., 1985.
25. (Musił J.) Мусил Я. Основы биохимии патологических процессов. - М., 1988. - 314 с.
26. World Health Organization. Guidelines for national programmes: Treatment of tuberculosis // Geneva. - 1997. 77p.

## Нарушение метаболизма в лейкоцитах периферической крови при деструктивном туберкулезе легких

*В.Н. Чернышов*

Важной медицинской проблемой в современном мире является стремительный распространения захворюванності туберкулезом; возбудитель болезни становится все более устойчивыми к традиционным схемам лечения, что требует разработки новых методов оценки эффективности лечения, прогнозирования течения болезни. Изучали активность дегидрогеназ аэробного и анаэробного гликолізу и кислой фосфатазы в лейкоцитах периферической крови (ЛПК). Была обнаружена зависимость между клінічними проявленнями і тяжесть течения деструктивного туберкулеза легких и разнообразными цито- морфологических і функциональными нарушениями ферментных систем ЛПК. Есть перспектива использования этих данных при оцінюванні ефективності терапії деструктивных форм туберкулеза и прогнозирования течения заболевания в целом.

## Порушення метаболізму лейкоцитів периферичної крові при деструктивному туберкульозі легень

*В.Н. Чернышов*

Важливою медичною проблемою у сучасному світі є стрімке розповсюдження захворюванності туберкульозом; збудник хвороби стає все більш стійким до традиційних схем лікування, що потребує розробки нових методів оцінки ефективності лікування, прогнозування перебігу хвороби. Вивчали активність дегидрогеназ аэробного та анаэробного гликолізу та кислої фосфатази в лейкоцитах периферичної крові (ЛПК). Була виявлена залежність між клінічними проявами і тяжкістю перебігу деструктивного туберкульозу легень та різноманітними цито-морфологічними і функціональними порушеннями ферментних систем ЛПК. Є перспектива використання цих даних при оцінюванні ефективності терапії деструктивних форм туберкульозу та прогнозування перебігу захворювання в цілому.

Ключові слова: деструктивний туберкульоз, лейкоцити периферичної крові (ЛПК), цито-морфологічні порушення.

## Malfunction of metabolism in leukocytes of periferal blood in dis- tructive lung tuberculosis

*V.N. Chernyshov*

The important medical problem at present is quick spreading of tuberculosis sick rate; the agent of the disease becomes more resistant to traditional forms of treatment and this demands the elaboration of new methods of estimation of treatment efficiency, prediction of the process of the disease. The activity of dehydrogenase of aerobic and anaerobic glycolysis and acid phosphatase in leukocytes of peripheral blood (LPB) have been studied.

The dependence between clinical manifestation and severity of the process of destructive lung tuberculosis and diverse cito-morphological and functional malfunction of ferment system of LPB has been revealed. There is a perspective of using this data in estimation of efficiency of therapy of destructive forms of tuberculosis and prediction of the process of the disease in general.

About 8 million of new cases of illness of respiratory organs with tuberculosis are registered in the world annually. At the same time from 20-30% of patients secretes the agent resistant to the efficiency of antituberculosis medicines.

The clinical course and the result of specific process in lungs are mostly determined by immunity condition. 236 patients with diverse forms of destructive lung tuberculosis were investigated at the chair of phthisiopulmonology. 161 patients had this disease for the first time and 75 patients had aggravating or relapse.

Special attention was given to the study of metabolism of leukocytes of peripheral blood (LPB). The state of energy process in leukocytes were studied according to the activity succinate dehydrogenase (SDG), nicotinamide (NAD) reduced nicotinamide-dinucleotide phosphate dehydrogenase and glucose-6 phosphate dehydrogenase.

Succession and synchronism of the process of biological oxidation and anaerobic glycolysis were investigated according to the activity of alpha-glycerophosphate dehydrogenase. The activity of dehydrogenases was determined by quantitative citochemical method. 3

groups of patient based on the date of studying of activity of pherments were revealed. The patients of the first group 78 persons (33.1%) had the activity of pherments LPB were within the indexes of the patients of the control group.

The patients of the second group 87 persons (36.9%) had moderate citomorphological and functional malfunction of LPB, they had low activity of ferments connected with Crebs cycle and oxidative phosphorylation (activity for SDG – 16.1 +/- 0.66 granule of phormason per 1 cell, nicotinamide dinucleotide dehydrogenase – 17.2 +/- 0.85 and alpha-glycerophosphate dehydrogenase – 10.9 +/- 0.99), but increased activity of ferments taking part in anaerobic glycolysis (activity G-6-FDG – 26.4 +/- 0.67 granules phormasana per 1 cell, nicotinamide dinucleotide dehydrogenase – 28.6 +/- 0.49).

The patients of the third group 71 persons (30.0%) had considerable citomorphological and functional malfunction LPB. The patients had firm depression of activity of all energy ferments (activity of SDG – 7.9 +/- 0.23 granule phormasane per 1 cell; nicotinamide dinucleotide dehydrogenase – 12.4 +/- 0.77; alpha-glycerophosphate dehydrogenase – 5.4 +/- 0.11; nicotinamide dinucleotide phosphate dehydrogenase – 11.1 +/- 0.41) with high quality (89.8 +/- 6.49%) phosphate-positive cells circulating in peripheral blood and high activity of KPh. The comparative studying of clinical manifestation and severity of the process of destructive tuberculosis of patients with diverse cito-morphological and functional malfunction LPB showed that these characteristics are associated.

Key words: destructive tuberculosis, leukocytes of peripheral blood (LPB), cito-morphological malfunction.