

ЗАВИСИМОСТЬ СТЕРЕОМЕТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭОЗИНОФИЛОВ ОТ СТЕПЕНИ ИХ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРИ ЭОЗИНОФИЛИЯХ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Эльканова А. Б., Ракитина Е. Л., Бондарь Т. П.

ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет» Ставрополь, Россия (355009, Ставрополь, ул. Пушкина 1, кор. 3), e-mail: aishat.elkanowa@yandex.ru

В статье предпринята попытка оценить зависимость цитоскелета эозинофилов нормальной и пониженной плотности от цитохимического состава при эозинофилиях различного генеза, используя методы цитохимии и сканирующей зондовой микроскопии. Статистическая обработка полученных результатов позволила установить цитохимические и стереометрические различия эозинофилов нормальной и пониженной плотности у пациентов в зависимости от генеза инфекционно-аллергического заболевания. В процессе исследования выявлена закономерность, предполагающая, что главным запуском защитных механизмов при развитии эозинофилии инфекционно-аллергического генеза являются кислородзависимые реакции, которые проявляются в повышенном синтезе пероксидазы в гранулах. Повышение уровня внутриклеточных катионных белков являются показателем персистенции процесса в организме больного, что, возможно, и приводит к изменению количественных и морфологических показателей эозинофильного звена периферической крови и определяет характер основного заболевания.

Ключевые слова: эозинофил, эозинофилия, инфекционно-аллергические заболевания, сканирующая зондовая микроскопия, пероксидаза, катионные белки.

DEPENDENCE STEREOMETRIC CHARACTERISTICS EOZINOPHILS FROM CYTOTOXICITY DEGREE AT EOZINOPHILIYA VARIOUS GENESIS

Elkanova A. B., Rakitina E. L., Bondar T. P.

¹FGAOU VPO «North Caucasian federal university», Stavropol, Russia (355009, Stavropol, Pushkin St. 1, cor. 2) e-mail: aishat.elkanowa@yandex.ru

In the article an attempt to estimate dependence of cytoskeleton of eosinophil of normal and lowered closeness on citokhimicheskogo composition at the eosinophilias of different genesis is undertaken using the methods of cytochemistry and sweepable probe microscopy. Statistical treatment of the got results allowed to set citokhimicheskies and stereometry distinctions of eosinophil of normal and lowered closeness for patients depending on weight of flow of infectious-allergic disease. In the process of research conformity to law, supposing, is exposed, that the main start of nocifensors at development of eosinophilia of infectious-allergic genesis are kislordzavisimye reactions which show up in the enhanceable synthesis of peroksidazy in granules. Increase of level of vnutrikletochnykh kationnykh albumens are the index of persistencii of process in the organism of patient, that, possibly, and causes the change of quantitative and morphological indexes of eosinofil'nogo link of peripheral blood and determines terms and weight of basic disease.

Keywords: eosinophil, an eosinophiliya, infectious – the allergic diseases, scanning zondovy microscopy, a peroxidase, kationny proteins.

Введение

Одним из наиболее постоянных лабораторных показателей диагностики заболеваний инфекционно-аллергического генеза (глистных инвазий и аллергических болезней) является стойкая эозинофилия, относительный уровень которой иногда может достигать 90 % от количества циркулирующих в периферической крови лейкоцитов [1]. Несмотря на повышенный интерес исследователей к проблеме эозинофилий, в настоящее время механизмы и целесообразность развития гиперэозинофилии крови при патологических процессах изучены недостаточно, а имеющиеся в современной литературе данные касаются, в основном, лишь клинической стороны вопроса.

Исследованиями последних лет было показано, что эозинофил остается одной из наиболее агрессивных эффекторных клеток при возникновении противопаразитарного и противоаллергического иммунитета [2]. Эозинофильные гранулы служат источником большого количества цитотоксических продуктов, повышенное содержание которых обуславливает формирование высокого микробиоцидного потенциала, действующего не только в отношении инородных субстанций, но и окружающих тканей. Таким образом, эозинофилы являются одним из характерных и постоянных маркеров развития паразитоза и аллергии в организме [3]. Эозинофилия – повышение абсолютного количества эозинофилов в крови (более $0,4 \cdot 10^9$ /л у взрослых и $0,6 \cdot 10^9$ /л у детей в абсолютных единицах). Наиболее часто сопровождаются эозинофилией паразитарные заболевания и атопическая аллергия. При аллергических состояниях эозинофилия обычно умеренная – от 0,2 до $1,5 \cdot 10^9$ /л. [4]. Эозинофилы – форменные элементы крови, разновидность полиморфно-ядерных лейкоцитов, обнаруживаемые в крови и тканях, отличающиеся наличием в цитоплазме специфических гранул, эозинофильная зернистость которых, поглощая кислую краску, окрашивает их в красно-оранжевый цвет [5].

В настоящее время благодаря значительному расширению методов лабораторных исследований и внедрению новых технологий в клинической практике появилась возможность детального изучения морфометрических и морфологических особенностей эозинофилов и их плотностных характеристик. В изученной нами литературе не имеется четких представлений о зависимости размеров эозинофилов и их активности при наличии в периферической крови специфических антител к тем или иным глистам. Также ранее не изучалось изменение показателей количественных, морфологических и функциональных особенностей эозинофилов при различном уровне антител к паразитам.

Целью исследования явилось изучение зависимости стереометрических характеристик эозинофилов от внутриклеточного содержания катионных белков и пероксидазы у больных с эозинофилией различного генеза.

Материалы и методы исследования. Всего было обследовано 118 человек. Из них 39 человек с диагнозом амброзийный поллиноз городского аллергологического кабинета, средний возраст $29 \pm 1,12$ лет, 34 – пациенты гельминтологического центра Ставропольской Краевой клинической инфекционной больницы с подтвержденным диагнозом токсокароз, средний возраст $44,7 \pm 6,1$ лет. Контрольную группу составили 45 здоровых людей соответствующего возраста, добровольно согласившихся на исследование, средний возраст $37 \pm 2,25$ лет.

Подсчет эозинофилов и оценка плотности гранул осуществлялись методом световой микроскопии препаратов, окрашенных по методу Романовского. Визуально подтверждение

плотностных характеристик клеток проводилось с помощью морфометрических параметров на аппаратно-программном комплексе «Мекос-Ц».

Основываясь на том факте, что усиление цитотоксичности эозинофилов может быть определено их повышенной дегрануляцией, нами были проведены реакции на присутствие пероксидазы и катионных белков в цитоплазме эозинофилов. Для оценки среднего цитохимического коэффициента пероксидазы (СЦК_П) препараты окрашивались по методу Эпштейна, катионных белков (СЦК_{КБ}) по методу Шубича с бромфеноловым синим. Принцип методов основан на образовании в процессе реакций окрашенных, плохо растворимых веществ, являющихся либо непосредственно продуктами реакций, либо возникшими при участии этих продуктов. Степень окрашивания оценивали в баллах от 0 до 3.

Изучение закономерности изменений структурных свойств мембраны эозинофилов нормальной и пониженной плотности на субнанометровом пространственном разрешении проводилось методом сканирующей зондовой микроскопии при помощи атомно-силового микроскопа «Интегра Прима» в ИТЦ «Нанотехнологии и наноматериалы» Северо-Кавказского федерального университета.

В сканирующих зондовых микроскопах исследование рельефа поверхности мембраны проводился с помощью специальным образом приготовленных микрозондов в полуконтактном режиме, основанном на регистрации параметров взаимодействия колеблющегося кантилевера с поверхностью.

Статистическую обработку данных проводили с привлечением методов параметрического анализа с использованием пакета “Microsoft Office XP”. Определяли основные характеристики описательной статистики: среднее (\bar{X}), ошибку среднего (m) и среднеквадратичное отклонение (δ). Достоверность различия средних определяли по критерию Стьюдента (t) для коэффициентов вариации, уровень значимости p выбран менее 0,05.

Результаты и обсуждения

При оценке данных морфометрии было установлено, что для больных аллергией характерно меньшее количество эозинофилов с пониженной оптической плотностью цитоплазмы, то есть клетки более насыщены гранулами, что подтверждено данными морфометрического анализа. Так, удельная оптическая плотность по зеленой и синей компоненте и интегральный показатель оптической плотности цитоплазмы ИОП у больных с глистными инвазиями составили $0,554 \pm 0,006$ усл. ед., $0,319 \pm 0,004$ усл. ед. и $0,736 \pm 0,006$, а у аллергиков $0,541 \pm 0,004$ усл. ед., $0,282 \pm 0,002$ усл. ед. и $0,705 \pm 0,005$ соответственно, при этом достоверность различия показателей определялся на уровне $p \leq 0,01$.

Это позволило провести количественную оценку морфофункционального состояния клеток, использовали параметр высоты клетки, которую определяли как максимальную вы-

соту профиля относительно подложки ($h = 0$). С помощью специальной программы обработки изображений и оценивали максимальные величины микровыростов, перепада высот. Важнейшими в функциональном отношении являются внутриклеточные катионные протеины. Основываясь на факте, что обуславливающее значительное усиление цитотоксичности эозинофилов может быть повышение их дегрануляции, нами проведено изучение цитохимического состава эозинофилов на присутствие в клетках катионных белков и пероксидазы. Для сопоставления результатов применена полуколичественная оценка результатов, а также был вычислен средний цитохимический коэффициент (СЦК) пероксидазы и катионных белков в эозинофилах. Результаты обследования 118 больных представлены в таблице 1.

Таблица 1

Показатели цитохимического состава гранул и высоты мембраны эозинофилов у больных аллергией и токсокарозом ($X \pm m, p \leq 0,05$)

Показатели/ Единицы измерения	Контрольная группа (n=45)	Больные аллергией (n =39)	Больные токсокарозом (n =34)
Пероксидаза (СЦК _П), усл. ед.	1,66±0,21*	2,78±0,44	1,96±0,34
Внутриклеточные катионные белки (СЦК _{КБ}), усл. ед.	1,83±0,44	1,94±0,12	1,83±0,46
Высота эозинофила (h), x10 ⁻⁹	450±20,1*	234±38,10**	660±25,6***

Достоверность различия показателей в группах:

* – больных аллергией и здоровыми;

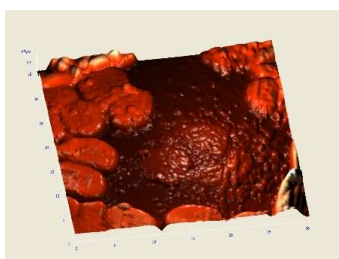
** - больных токсокарозом и здоровыми;

*** - больных аллергией и больных токсокарозом.

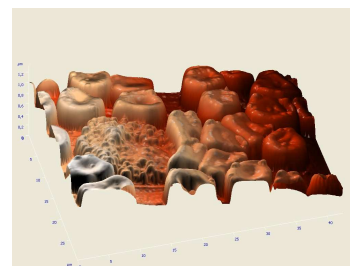
Как видно из таблицы, наибольшее значение среднего цитохимического коэффициента пероксидазы (СЦК_П) отмечается у больных аллергией, у больных токсокарозом увеличение среднего цитохимического коэффициента пероксидазы менее выражено (2,78±0,44 усл. ед. и 1,96±0,34 усл. ед., соответственно, $p \leq 0,05$), но тенденция к увеличению показателя по сравнению со значениями группы сравнения сохраняется. При исследовании среднего цитохимического коэффициента катионных белков (СЦК_{КБ}) эозинофилов периферической крови у больных аллергией установлено некоторое увеличение показателя, а в группе больных токсокарозом значения не отличаются по сравнению с группой здоровых (1,83±0,46 и 1,83±0,44, $p > 0,05$). Статистический анализ данных высоты профиля мембраны эозинофилов относительно подложки позволил установить, что у больных аллергией самое низкое значение высоты мембраны, а в группе больных токсокарозом отмечается увеличение значения высоты профиля мембраны по сравнению с группой здоровых (660±25,6 нм и 450±20,1, соответственно, $p > 0,05$).

Методом атомно-силовой микроскопии в режиме 3D были получены трехмерные изображения плазматической мембраны эозинофила. На трехмерном изображении поверх-

ности мембраны четко выявлялись контуры ядра и гранулы, находящиеся в цитоплазме и над ядром. Результаты представлены на рисунке 1.



А



Б

Рисунок 1. Изображение мембраны А – нормоплотностного эозинофила; Б – эозинофила пониженной плотности в режиме 3D методом АСМ

Заключение

Эозинофилы циркулирующего пула относительно богаты окислительно-восстановительными ферментами, и активность этих ферментов выявляется в виде гранул, которые группируются в различных участках цитоплазмы и над ядром. На молекулярном уровне функциональное сходство белков может достигаться схожестью архитектоники клетки. Ранее было установлено, что фазовая высота клеток отражает состояние хроматина в ядре и уровень его метаболизма в клетке. В результате исследований в сканирующем электронном микроскопе установлено, что эозинофилы периферической крови представляют неоднородную группу.

Таким образом, у аллергиков в периферической крови в отличие от больных токсокарозом преобладают эозинофилы с нормальной оптической плотностью цитоплазмы, которые более функционально активны. Методом атомно-силовой микроскопии установлено, что высота профиля мембраны эозинофила обусловлена цитохимическим составом гранул и пропорциональна оптической плотности цитоплазмы клетки.

Список литературы

1. Анаев Э. Х. Эозинофилы и эозинофилии // Пульмонология, аллергология. – 2002. – Т. 6, №3. – С. 15-18.
2. Бондарь Т. П. Использование атомно-силовой микроскопии для изучения морфофункционального состояния эозинофилов у больных токсокарозом / Т. П. Бондарь, Н. М. Ишкова, Е. А. Мельченко, А. Б. Эльканова // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2010. – № 4. – С.51-55.
3. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов / Е. В. Гублер. – М., 1978. – 294 с.

4. Козинец Г. И. Кровь и инфекция / Г. И. Козинец, В. М. Погорелов. – М.: Триада-фарм, 2001. – 537 с.
5. Луговская С. А. Лабораторная гематология / С. А. Луговская, В. Т. Морозова, М. Е. Почтарь. – М.: ЮНИМЕД-пресс, 2002. – 120 с.
6. Федорова М. З. Использование атомно-силовой микроскопии для оценки морфометрических показателей клеток крови // М. З. Федорова, Н. А. Павлов, Е. В. Зубарева // Биофизика. – 2008. – Т.6, № 53. – С. 10014-10018.
7. Giessibl F. Advances in Atomic Force Microscopy / F. Giessibl // Reviews of Modern Physics. – 2003. – Vol. 75, N 3. – P. 949-983.
8. Hilliman R. S. Hematology in clinical practice / R. S. Hilliman, K. A. Ault, H. M. Rinder. – McGraw-Hill, 2005. – P. 784-788.

Рецензенты:

Алиева Елена Васильевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом бактериологии Института последипломного образования ФГБОУ ВПО «Ставропольская государственная медицинская академия», г. Ставрополь.

Джандарова Тамара Исмаиловна, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры анатомии и физиологии Института живых систем ФГАУО ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь.