

МЕХАНИЗМ ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЭОЗИНОФИЛОВ ПРИ ЭОЗИНОФИЛИЯХ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА У ДЕТЕЙ

Бондарь Т.П., Эльканова А.Б.¹

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

В статье предпринята попытка изучить механизм изменения морфофункционального состояния эозинофилов при эозинофилиях различного генеза у детей, используя гематологические методы, метод компьютерной цитоморфометрии эозинофилов, атомно-силовую микроскопию и цитохимию. Статистическая обработка полученных результатов позволила установить количественные, морфометрические и цитохимические различия эозинофилов у пациентов в зависимости от генеза инфекционно-аллергического заболевания. В процессе исследования установлена закономерность, предполагающая, что главным запуском защитных механизмов при развитии эозинофилии инфекционно-аллергического генеза являются кислородзависимые реакции, которые проявляются в повышенной дегрануляции клеток.

Ключевые слова: эозинофил, эозинофилия, амброзийный поллиноз, токсокароз, атомно-силовая микроскопия, цитохимия.

MECHANISM OF CHANGE OF THE MORPHOFUNCTIONAL STATUS OF EOSINOPHILS AT EOZINOPHILIYA DIFFERENT GENESIS IN CHILDREN

Bondar T.P., Elkanova A.B.¹

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

The article attempts to examine the mechanism of changing of the morphofunctional status of eosinophils in eozinophiliya different genesis in children, using hematologic methods, the method of computer cytomorfometric eosinophils, atomic force microscopy and cytochemistry. Statistical processing of the obtained results allowed to establish quantitative, morphometric and cytochemical differences of eosinophils in patients depending on the Genesis of infectious and allergic disease. During the study, a pattern, suggesting that the main launch of the safeguards in place for the development of eosinophilia infectious-allergic Genesis are kislородzavisimye reaction, which is manifested in increased cell degranulation.

Keywords: eosinophil, an eozinophiliya, ambrosian pollinoz, toxocariasis, atomic force microscopy, cytochemistry.

Введение

В последние годы внимание специалистов всё больше привлекает изучение функциональных свойств таких клеток крови, как лейкоциты. Немаловажная роль в данной структуре отводится эозинофилам (Эо), которые несут ответственность за обезвреживание чужеродного белка и принимают неотъемлемое участие в противоаллергическом и антипаразитарном иммунитете [1].

Безусловно доказано, что стойкая эозинофилия является постоянным показателем развития, как аллергических заболеваний, так и инвазирования организма. Согласно данным официальной статистики, в нашей стране аллергическими заболеваниями страдают от 15 до 20% населения. При этом на Северном Кавказе число больных достигает около 18% [2]. Другим, не менее значимым заболеванием, являются глистные инвазии. Высокая

зараженность почвы яйцами собачей аскариды, теплый влажный климат делает эту проблему актуальной для Северного Кавказа [6].

В доступной нам научной литературе не найдено четкой информации о зависимости морфофункционального состояния иммунокомпетентной клетки – эозинофила с развитием и течением эозинофилий различного генеза. Благодаря широкому разнообразию методов исследования, появилась возможность глубокого изучения морфофункциональных особенностей эозинофильных гранулоцитов периферической крови с помощью методов компьютерной морфометрии эозинофилов и сканирующей зондовой микроскопии. В соответствии с вышеизложенным, исследование количественных, морфометрических, оптических и функциональных особенностей эозинофилов имеет практический и теоретический интерес, что и определило цель исследования.

Цель исследования: изучить механизм изменения морфофункционального состояния эозинофилов при эозинофилиях различного генеза у детей.

Материал и методы исследования

Для решения поставленных в исследовании задач было обследовано 102 ребенка. Из них – 35 пациентов, с установленным клиническим диагнозом Амброзийный поллиноз городского аллергологического кабинета и 21 пациент гельминтологического центра Ставропольской Краевой клинической инфекционной больницы с положительной серологической реакцией крови к токсокарозу и клинически подтвержденным диагнозом: Токсокароз. Все пациенты были обследованы при первом обращении за медицинской помощью в специализированное лечебно-профилактическое учреждение, после установления клинического диагноза, до назначения патогенетической терапии. Критерии отбора – установленный диагноз и относительная эозинофилия, составляющая более 6-7%.

Контрольную группу составили 46 детей, отобранных при ежегодной диспансеризации школьников, с сопоставимыми возрастными и половыми характеристиками, не имеющих аллергических заболеваний в анамнезе и специфических антител к антигенам токсокар в крови.

Все пациенты были обследованы при первом обращении за медицинской помощью в специализированное лечебно-профилактическое учреждение до назначения соответствующей терапии (кортикостероидов и других противоаллергических препаратов). Методами кожных проб и определение титра специфических антител к аллергенам выявляли сенсibilизацию на цветение сорных трав (лебеда, полынь, амброзия). Исследование проводилось в период цветения причинно-значимых аллергенов (август – сентябрь).

Для исследования эозинофильных гранулоцитов пациентам выполнялись как унифицированные лабораторные методики (гематологические, цитохимические), так и

исследования с применением компьютерных технологий (компьютерная цитоморфометрия и атомно-силовая микроскопия эозинофилов). Оценка функционального состояния периферической крови и определение относительного количества эозинофилов проводилась с помощью автоматического гематологического анализа с подсчетом лейкоцитарной формулы. Для оценки состояния здоровья в исследуемых группах и осуществления мониторинга изменений в системе крови пациентов нами применялись эозинофильный индекс (ЭИ) и индекс алергизации (ИА). Наличие миелопероксидазы в эозинофилах проводилась по методу Грэхэма – Кнолля. Для установления содержания неферментативных катионных белков эозинофильных гранулоцитов использовался метод М.Г. Шубича с бромфеноловым синим [5]. Оценку функциональной активности гранулоцитарных лейкоцитов проверяли методом НСТ-теста (Пол У., 1989). Исследование геометрических и оптических показателей эозинофилов проводили с помощью метода компьютерной цитоморфометрии. Для изучения закономерности изменения структурных свойств мембраны эозинофилов на нанометровом пространственном разрешении использовался метод сканирующей зондовой микроскопии.

Статистическую обработку данных проводили с помощью методов параметрического анализа с использованием пакета «Microsoft Excel» (Реброва О.Ю., 2006). Определяли основные характеристики описательной статистики: среднее (\bar{X}), ошибку среднего (m) и средне квадратичное отклонение (δ). Достоверность различия средних величин определяли по критерию Стьюдента (t) для коэффициентов вариации, уровень значимости p выбран менее 0,05 [3].

Результаты исследования

С целью изучения различий эозинофильных показателей периферической крови пациентов, имеющих в крови лейкомоидную реакцию в виде эозинофилии, использовали методы гематологического анализа, визуальной микроскопии мазка с подсчетом относительного и абсолютного количества эозинофилов и последующим расчетом эозинофильного индекса и индекса алергизации.

Статистический анализ полученных результатов представлен в таблице 1.

Таблица 1

Изменения лейкоцитарных и эозинофильных показателей гемограммы в группах обследуемых ($\bar{X} \pm m, p < 0,001$)

Показатели	Относительное количество Эо, %	Абсолютное количество Эо, кл/мл	ЭИ, у.е.	ИА, у.е.
Группа сравнения (n=46)	3,18±0,38	177,6±23,3	0,86±0,02	2,08±0,15
Больные с	11,81±1,00	1028,7±131,6	0,55±0,04	3,22±0,37

аллергией (n=35)				
Больные токсокарозом (n=21)	8,01±0,91	1660,0±109,6	0,74±0,03	2,57±0,31
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,005
P ₁	≤0,01	<0,001	≤0,001	>0,1
P ₂	<0,001	<0,001	<0,001	≥0,1

Примечание: P – уровень достоверности внутригрупповых различий показателей здоровых и больных с аллергией;

P₁ – уровень достоверности внутригрупповых различий показателей здоровых и больных токсокарозом;

P₂ – уровень достоверности внутригрупповых различий показателей больных с аллергией и больных токсокарозом.

Как видно из представленной таблицы 1, в периферической крови пациентов, независимо от генеза эозинофилии установлено значительное повышение относительного количества эозинофильных гранулоцитов в крови больных инфекционно-аллергическими заболеваниями, при этом гиперэозинофилия аллергического генеза более выражена, чем паразитарного. Общепринято, что уровень от 500 до 1500 эозинофилов/мкл рассматривается как легкая степень эозинофилии, а свыше 1500 кл/мкл – как гиперэозинофилия: умеренная (1500–5000 кл/мкл) и выраженная (более 5000 кл/мкл) (Чучалин А.Г., 2003). Рассчитанное абсолютное количество эозинофилов в большей мере отражает степень истинной эозинофилии, чем относительное количество клеток, которое может быть следствием снижения или повышения других пулов лейкоцитов. При подсчете у детей обнаружено, что абсолютное количество эозинофилов значительно выше в группе больных токсокарозом и может быть расценено как умеренно выраженная гиперэозинофилия (1660,0±109,6 кл/мкл). При этом абсолютное содержание эозинофилов в крови детей с амброзийным поллинозом является легкой степенью гиперэозинофилии (1028,7±131,6 кл/мкл).

Полученные данные подтверждаются значениями эозинофильного индекса, который снижается при нарастании в крови количества эозинофилов. Для оценки степени аллергизации пациентов в периферической крови рассчитывался индекс аллергизации. Оказалось, что при амброзийном поллинозе, сопровождающемся более выраженной эозинофилией, индекс аллергизации достоверно выше, чем при токсокарозе ($p \leq 0,001$).

Таким образом, при инфекционно-аллергических заболеваниях у детей, независимо от генеза эозинофилии, в периферической крови абсолютное и относительное количество эозинофилов, индекс аллергизации повышаются, а эозинофильный индекс снижается. При этом методами рутинного лабораторного обследования не представилось возможности установить различия морфофункционального состояния эозинофила как одной из ключевых клеток иммунного воспаления при эозинофилиях различного генеза.

Для оценки морфофункционального состояния, характера и степени дисфункции клеточного иммунитета информативным показателем служит оценка морфометрических параметров его клеточного состава (Погорелов, В.М., 2003). Морфология клеток крови признана важным клиническим показателем, однако сравнение морфометрических характеристик эозинофилов при эозинофилиях различного генеза по данным изученной нами литературы носят фрагментарный характер. В этой связи в данном разделе нам представляется актуальным с использованием современных цитометрических методов получить сравнительную характеристику эозинофилов периферической крови в обследованных группах. Данные оценки средней площади клетки, ядра, цитоплазмы и ядерно-цитоплазматического соотношения (ЯЦС) представлены в таблице 2.

Таблица 2

Изменения геометрических эозинофильных показателей, полученных методом КЦМЭо и СЗМ в группах обследуемых (X±m, p<0,001)

Показатели (X±m)	Средняя площадь клетки, мкм ²	Средняя площадь ядра, мкм ²	Средняя площадь цитоплазмы, мкм ²	ЯЦС, у.е	Высота эозинофила *10 ⁻⁹ м
Группа сравнения (n=46)	177,5±6,2	57,3±1,5	120,2±4,6	0,49±0,01	230±20,0
Больные с аллергией (n=35)	91,1±7,1	38,1±2,2	52,9±2,7	0,97±0,07	490±40,0
Больные токсокарозом (n=21)	144,7±10,0	51,8±1,4	92,9±3,1	0,59±0,07	500±30,0
P	<0,001	<0,005	<0,001	<0,001	<0,001
P ₁	≤0,05	>0,1	<0,001	>0,1	≤0,01
P ₂	<0,001	≥0,1	<0,001	<0,001	<0,001

Примечание: P – уровень достоверности внутригрупповых различий показателей здоровых и больных с аллергией;

P₁ – уровень достоверности внутригрупповых различий показателей здоровых и больных токсокарозом;

P₂ – уровень достоверности внутригрупповых различий показателей больных с аллергией и больных токсокарозом.

Анализируя данные таблицы 2, видно, что средняя площадь клетки снижается во всех группах обследованных, (91,1±7,1 и 144,7±10,0 мкм², p<0,001 соответственно), но максимальное снижение наблюдается в группе больных амброзийным поллинозом. Изменение размеров клетки происходит за счет снижения площади ядра (38,1±2,2 и 51,8±1,8 мкм², p<0,001 соответственно) и площади цитоплазмы (52,9±2,7 и 92,9±3,1 мкм², p<0,001 соответственно). Расчет ядерно-цитоплазматического соотношения показал, что для эозинофилий аллергического генеза характерна однонаправленность и пропорциональность

уменьшения геометрических размеров внутриклеточных структур эозинофильных гранулоцитов, преобладающих в периферической крови пациентов. Анализ данных высоты профиля мембраны эозинофила показал, что у детей, страдающих инфекционно-аллергическими заболеваниями, высота эозинофилов увеличивается ($490 \pm 40,0$ и $500 \pm 30,0$, $p < 0,001$ соответственно).

Установленная неоднородность морфологического, фенотипического и функционального состояния эозинофилов, вероятно, может отражать определенную фазу жизненного цикла клетки и облегчать адаптацию эозинофила к изменившимся условиям или микроокружению в течение острого воспалительного процесса.

Активация циркулирующего пула эозинофилов приводит к выделению из клеток повышенного количества пероксидазы и внутриклеточных катионных белков, что отражает существующее мнение об усилении кислородозависимых механизмов киллинга в эозинофилах периферической крови и может быть связано с их повышенной функциональной активностью. Результаты статистической обработки среднего цитохимического коэффициента пероксидазы (СЦК_П) и катионных белков (СЦК_{КБ}) представлены в таблице 3.

Таблица 3

Оценка цитохимического состава гранул эозинофилов в группах обследуемых ($X \pm m$, $p \leq 0,001$)

Показатели	(СЦК _П), у.е. ²	(СЦК _{КБ}), у.е.	НСТ-тест, %
Группа сравнения (n=46)	$3,2 \pm 0,09$	$2,4 \pm 0,02$	$10,3 \pm 0,8$
Больные с аллергией (n=35)	$2,8 \pm 0,07$	$2,1 \pm 0,04$	$33 \pm 2,0$
Больные токсокарозом (n=21)	$1,6 \pm 0,06$	$2,1 \pm 0,03$	$78 \pm 4,2$
P	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$
P ₁	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	$< 0,001$
P ₂	$< 0,001$	$> 0,1$	$< 0,001$

Примечание: P – уровень достоверности внутригрупповых различий показателей здоровых и больных с аллергией;

P₁ – уровень достоверности внутригрупповых различий показателей здоровых и больных токсокарозом;

P₂ – уровень достоверности внутригрупповых различий показателей больных с аллергией и больных токсокарозом

Как видно из таблицы 3 средний цитохимический коэффициент пероксидазы снижается во всех группах обследованных ($2,8 \pm 0,07$ у.е. и $13,6 \pm 0,06$ у.е. соответственно). СЦК_{КБ} также снижаются в обеих группах пациентов ($2,1 \pm 0,04$ у.е. и $21 \pm 0,03$ у.е. соответственно). Наиболее яркие изменения наблюдаются у детей больных токсокарозом. Оценивая данные НСТ-теста, установлено, что количество функционально активных клеток

увеличивается при токсокарозе больше, чем при амброзийном поллинозе ($78\pm 9,2\%$ и $33\pm 3,0\%$ соответственно).

Заключение

При амброзийном поллинозе механизм эозинофилии запускается этиотропным фактором – пылью растений, развивается аллергическая реакция немедленного типа. Механизм данного типа аллергической реакции связан с образованием антител (IgE), которые фиксируются на эозинофилах. При соединении IgE с соответствующим аллергеном, происходит дегрануляция эозинофилов с выделением катионных белков, активизирующих действие тучных клеток и выброс медиаторов (гистамин, лейкотриены, хемотаксические факторы, гепарин).

При токсокарозе эозинофилы осуществляют внеклеточное уничтожение гельминтов. Гранулы клеток имеют рецепторы для C3b, который, фиксируясь на мембранах паразита, через специфический рецептор активирует эозинофилы. Это приводит к выделению эозинофильной пероксидазы, а также «дыхательному взрыву», сопровождающемуся выработкой активных форм кислорода. Происходящий процесс приводит к повреждению мембраны гельминта.

Таким образом, у детей больных и амброзийным поллинозом и токсокарозом, в равной мере активизируется эозинофилопоэз, изменяются морфометрические характеристики эозинофилов: доминируют клетки меньших размеров, с пикнотичным ядром и дегранулированной вакуолизированной цитоплазмой, что подтверждается увеличением высоты клетки и уменьшением содержания катионных белков. При этом для амброзийного поллиноза более характерно уменьшение размеров клетки, уменьшение площади ядра и цитоплазмы, а для токсокароза – снижение содержания пероксидазы в гранулах и активация фагоцитоза. Что свидетельствует о повышенной функциональной активности клеток.

Список литературы

1. Базанов, Г.А. Аллергия и аллергические заболевания / Г.А. Базанов, А.А. Михайленко. – М.: Изд. МИА, 2009 – 304 с.
2. Горячкина, Л.А. Клиническая иммунология и аллергология / Л.А. Горячкина, К.П. Кашкин. – Изд.: Миклош, 2011. – 432 с.
3. Гублер, Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов / Е.В. Гублер. – М., 1978. – 294 с.
4. Меньшиков, В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / В.В. Меньшиков. – М.: «Медицина», 1987. – 348 с.
5. Пол, У. Иммунология / У. Пол. – М.: Мир, 1989. – С. 34-40.

6. Солдатова М.В. Эколого-социальные основы профилактики аскаридоза на юге европейской части России на примере Ставропольского края: дис...канд. мед. наук / М.В. Солдатова. – М., 2007. – 147 с.

Рецензенты:

Цатурян Л.Д., д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет», г. Ставрополь.

Джандарова Т.И. д.б.н., профессор кафедры анатомии и физиологии Института живых систем ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь.