

## ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ЦИТОХИМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ЭПИЛЕПСИИ

С. В. Лобзин<sup>1</sup>, М. М. Одинак<sup>2</sup>, А. Н. Кузнецов<sup>3</sup>, Д. Е. Дыскин<sup>2</sup>, А. В. Василенко<sup>1, 4</sup>, Л. С. Онищенко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова Минздравсоцразвития России; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова МО РФ; <sup>3</sup>ФГБУ Национальный медико-хирургический центр им. Н. И. Пирогова Минздравсоцразвития России; <sup>4</sup>ФГБУ Научно-исследовательский психоневрологический институт им. В. М. Бехтерева Минздравсоцразвития России

*Морфологические и цитохимические исследования периферической крови были выполнены у 301 человека. В исследуемую группу вошли 102 больных с локально обусловленной симптоматической эпилепсией, 35 больных с эпилептическими припадками в дебюте инсульта и 43 больных с однократным неспровоцированным генерализованным судорожным эпилептическим припадком. Группу сравнения составил 61 пациент без эпилептических припадков в анамнезе. В контрольную группу были включены 60 практически здоровых лиц. Выявленные морфологические и цитохимические особенности клеток периферической крови свидетельствуют об их важной роли в обеспечении иммунного статуса при локально обусловленной эпилепсии и других пароксизмальных расстройствах сознания эпилептической природы.*

**Ключевые слова:** локально обусловленная эпилепсия, морфологические и цитохимические исследования клеток периферической крови

*The peripheral blood of 301 patients was analyzed using morphologic and cytochemical tests. One hundred and two patients (102) with focal symptomatic epilepsy, thirty five (35) patients with epileptic seizures in the onset of stroke and forty three (43) patients with a single not provoked generalized seizure composed the analyzed group. The comparison group consisted of 61 patients without seizures in the past. Sixty (60) healthy men composed the control group. The revealed morphologic and cytochemical features of peripheral blood cells prove their important role in the immune status maintenance in patients with focal epilepsy and other paroxysmal epileptic disorders.*

**Key words:** focal epilepsy, morphologic and cytochemical tests of peripheral blood cells.

В последние годы для комплексной диагностики эпилепсии и пароксизмальных расстройств сознания (ПРС) эпилептической природы все больше внимания уделяют исследованию участия клеток периферической крови (ПК) в реакции иммунитета [4, 6, 12]. К настоящему времени известно, что пусковым механизмом формирования эпилептогенного очага могут являться различные иммунопатологические процес-

сы [8], однако большинство морфологических исследований клеток ПК при эпилепсии посвящено анализу лишь количественных изменений нейтрофильных гранулоцитов – НГ [5, 11, 13, 16]. Качественные их изменения при эпилепсии и других ПРС эпилептической природы представлены лишь в единичных работах [2, 9]. Что же касается таких цитохимических критериев клеточного иммунитета, как активность миелопероксидазы (МП), нейтральных полисахаридов (НП) и неферментных катионных белков (КБ), то в настоящее время их роль в иммунной реактивности клеток ПК при локально обусловленной эпилепсии (ЛОЭ) практически не изучена.

Целью исследования являлось изучение морфологических и цитохимических особенностей НГ и определение их диагностической значимости в обеспечении иммунного статуса при ЛОЭ.

### Пациенты и методы исследований

Исследуемая группа состояла из 180 пациентов с ПРС эпилептической природы (102 больных с разными формами ЛОЭ, 35 больных с эпилептическими припадками в дебюте инсульта и 43 больных с однократным неспровоцированным генерализованным судорожным эпилептическим припадком), у которых диагноз был установлен или подтвержден на основании стандартного диагностического протокола. Последний включал углубленное клиническое обследование (установление характера и частоты эпилептических припадков, анамнеза и длительности

\*Россия, Санкт-Петербург, 191015, ул. Кирочная, 41  
Russia, Saint-Petersburg, 191015, Kirochnaya str., 41  
Сведения об авторах:

Лобзин Сергей Владимирович – д-р мед. наук, зав. каф. невропатологии ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова Минздравсоцразвития России; Одинак Мирослав Михайлович – д-р мед. наук, проф., зав. каф. нервных болезней ФГБОУ ВПО Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова МО РФ, чл.-корр. РАМН; Кузнецов Алексей Николаевич – д-р мед. наук, проф., 1-й зам., дир. ФГБУ Национальный медико-хирургический центр им. Н. И. Пирогова Минздравсоцразвития России; Дыскин Дмитрий Ефимович – д-р мед. наук, доц. каф. нервных болезней ФГБОУ ВПО Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова МО РФ; Василенко Анна Владимировна – канд. мед. наук, науч. сотр. ФГБУ Научно-исследовательский психоневрологический институт им. В. М. Бехтерева Минздравсоцразвития России, асс. каф. невропатологии ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова Минздравсоцразвития России, e-mail: vasilenko\_anna@list.ru; Онищенко Людмила Семеновна – канд. биол. наук, науч. сотр. НИИ электронной микроскопии и гистохимии НИЦ ФГБОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» МО РФ.

заболевания, неврологического статуса), повторную ЭЭГ и/или видео-ЭЭГ-мониторинг в покое и при функциональных нагрузках, структурную нейровизуализацию с помощью магнитно-резонансной томографии и в части случаев при компьютерной томографии. Группу сравнения составил 61 пациент с разными заболеваниями нервной системы – демиелинизирующими, сосудистыми, болезнями периферической нервной системы, синкопальными состояниями. Необходимо особо отметить, что у всех больных этой группы как на момент обследования, так и в анамнезе отсутствовали эпилептические припадки. Наконец, контрольную группу составили 60 практически здоровых лиц также без эпилептических припадков в анамнезе (табл. 1).

Морфологическое исследование НГ выполнено у всех обследованных и включало оценку состояния ядер и цитоплазмы клеток в мазках ПК, окрашенных азур-эозином по Романовскому–Гимзе [1, 15]. В качестве цитохимических критериев клеточного иммунитета оценивали активность МП, НП и ферментных КБ [10, 14, 17]. Компьютерную обработку изображения клеток с подсчетом количества гранул в цитоплазме выполняли с помощью автоматизированного программного комплекса «Анализ». Полученные данные обрабатывали при помощи общепринятых методик стандартного статистического анализа [3].

### Результаты и обсуждение

С целью изучения морфофункциональных особенностей НГ и определения их диагностической значимости при эпилепсии и других ПРС эпилептической природы нами выполнено комплексное морфологическое и цитохимическое исследование клеток ПК. Морфологическое исследование показало у подавляющего большинства (96,1%) обследованных наличие

Распределение обследованных по группам и методам обследования

Обследованные	Исследование							
	клиническое		ЭЭГ		магнитно-резонансная или компьютерная томография		морфологическое и цитохимическое	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Исследуемая группа	180	100	180	100	180	100	180	100
В том числе больные:								
ЛОЭ	102	100	102	100	102	100	102	100
с эпилептическими припадками в дебюте инсульта	35	100	35	100	35	100	35	100
с однократным неспровоцированным генерализованным судорожным эпилептическим припадком	43	100	43	100	43	100	43	100
Группа сравнения	61	100	36	59,0	45	73,8	61	100
Контрольная группа	60	100	27	45,0	7	11,7	60	100
Итого ...	301	100	243	81,0	232	77,1	301	100

выраженных изменений ядер и цитоплазмы НГ, появившихся непосредственно после эпилептического припадка и сохранявшихся в дальнейшем практически без динамики в течение месяца, как при разных формах ЛОЭ, так и у пациентов с однократным неспровоцированным эпилептическим припадком. Изменения в ядрах НГ характеризовались следующими признаками: гиперсегментацией ядер (до 7–8 сегментов), набуханием кариоплазмы, высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, повышенным содержанием хроматина в целом и увеличением толщины отдельных хроматиновых нитей (рис. 1, а).

Полученные данные позволили установить коэффициент соотношения НГ с изменениями ядер/НГ без изменений ядер, который зависел от частоты и сроков возникновения припадков. Этот коэффициент достоверно снижался при редких припадках, стойкой ремиссии, а также в период более 12 мес после последнего припадка.

Изменения в цитоплазме НГ характеризовались вакуолизацией и наличием токсигенной зернистости (рис. 1, б), которая обнаруживалась вне зависимости от наличия, характера и длительности терапии антиэпилептическими препаратами.

Графическая динамика частоты встречаемости и выраженности

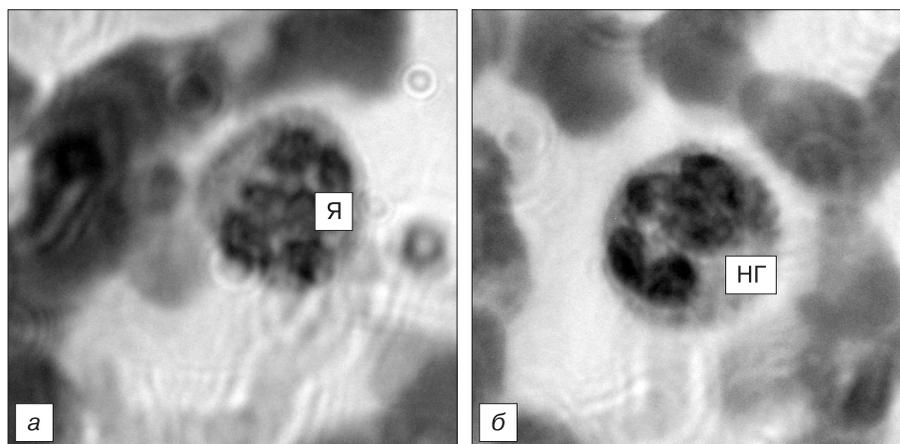


Рис. 1. НГ с типичными изменениями ядра (Я) и цитоплазмы в ранние сроки после эпилептического припадка.

Окраска азур-эозином. Об. 90, ок. 10.; а и б – пояснения в тексте.

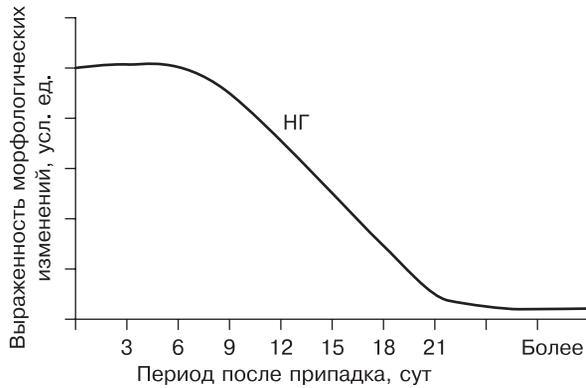


Рис. 2. Динамика частоты встречаемости и выраженности морфологических изменений НГ соответственно срокам после эпилептического припадка.

сти морфологических изменений ядер и цитоплазмы НГ в соответствии с временным интервалом от последнего эпилептического припадка представлена на рис. 2.

Полученная графическая закономерность свидетельствует о том, что совокупность выраженных морфологических изменений появляется после эпилептического припадка уже через 4–5 ч, достигает максимальных значений к концу первых суток и сохраняется в подобном виде в течение 3–4 нед. Как следует из графика, в сроки от 3–4 нед до 5–6 мес выраженность указанных изменений в НГ существенно уменьшается и представлена в основном в виде умеренной гиперсегментации ядер (до 4–5 сегментов) и незначительной токсигенной зернистости цитоплазмы, тогда как набухание кариоплазмы и повышенное содержание хроматина уже не наблюдаются. Наконец, в сроки от 5–6 мес до 1 года отмечаются минимальные изменения НГ в виде незначительной токсигенной зернистости, а через 12 мес и более она определяется лишь в единичных клетках. Следует особо подчеркнуть, что совокупность указанных выше изменений не обнаружена при морфологическом исследовании ни в одном НГ у больных группы сравнения и обследованных контрольной группы.

Цитохимическое исследование ПК, выполнен-

ное у всех пациентов исследуемой группы с ПРС эпилептической природы, показало наличие у 139 (98,6%) больных выраженных изменений в ферментативной активности НГ. Эти изменения появлялись в течение 1-х суток после эпилептического припадка, нарастали к 10–14-м суткам и регрессировали к 3–4-й неделе как у больных с разными формами ЛОЭ, так и у пациентов с однократным неспровоцированным эпилептическим припадком. Типичные цитохимические изменения НГ, развивающиеся после эпилептического припадка, представлены на рис. 3.

Анализ результатов содержания НП в цитоплазме НГ в контрольной группе показал их колебания от 1,44 до 1,58 усл. ед. (в среднем  $1,51 \pm 0,07$  усл. ед.; табл. 2). После забора крови в течение 1-х суток после эпилептического припадка содержание НП в цитоплазме НГ увеличилось на 32% и составило в среднем  $1,99 \pm 0,08$  усл. ед., что статистически значимо отличалось от показателей в контрольной группе ( $p < 0,001$ ). При увеличении срока взятия крови после эпилептического припадка до 5 сут нарастание содержания НП в цитоплазме НГ продолжалось. Среднее значение содержания НП составило  $2,36 \pm 0,11$  усл. ед. и статистически значимо отличалось от показателей как в контрольной группе ( $p < 0,001$ ), так и в предыдущий срок ( $p < 0,05$ ). В дальнейшем при увеличении срока после припадка до 10 сут тенденция к нарастанию НП сохранилась, и прирост их количества в крови относительно 5 сут составил 27%. Увеличение срока взятия крови от последнего приступа до 2 нед не выявило статистически значимого прироста НП в цитоплазме НГ относительно 10 сут и их среднее содержание было  $3,18 \pm 0,11$  усл. ед. ( $p > 0,05$ ), однако количество НП в цитоплазме НГ на этом сроке исследования (2 нед) оставалось повышенным относительно показателя в контрольной группе ( $p < 0,001$ ).

Таким образом, по мере увеличения срока после эпилептического припадка содержание НП в цитоплазме НГ постепенно увеличивается, достигая своего максимума к 2 нед. В дальнейшем наблюдаются постепенное снижение этого показателя и его норма-

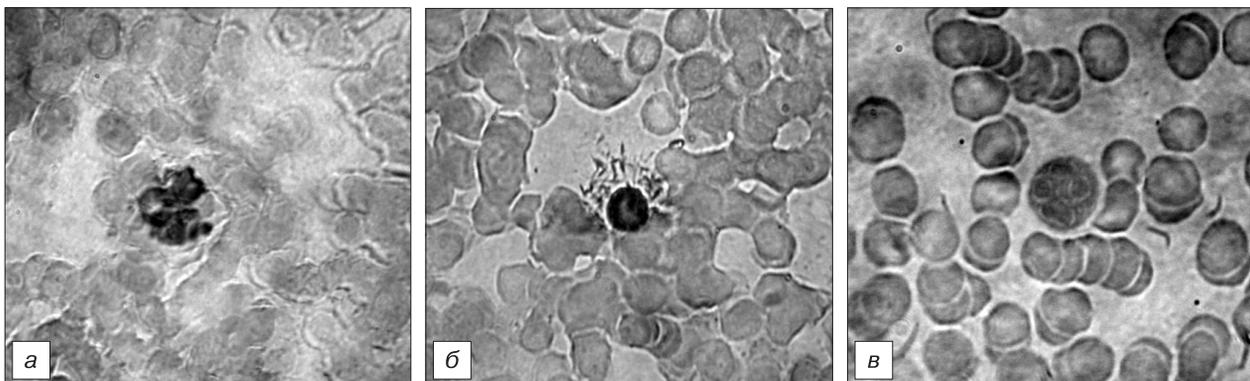


Рис. 3. Типичные цитохимические изменения НГ в ранние сроки после эпилептического припадка.

а — НП (окраска по Пирсу); б — МП (окраска по Sato и Sekija), в — КБ (окраска бромфеноловым синим по М. Г. Шубичу). Об. 90, ок. 10.

Таблица 2

Содержание НП (в усл. ед.) в цитоплазме НГ

Срок исследования	$\bar{X} \pm m$	$p_1$	$p_2$
Контроль	1,51±0,07	–	–
1 сут	1,99±0,08	< 0,001	–
5 сут	2,36±0,11	< 0,001	< 0,05
10 сут	3,00±0,17	< 0,001	< 0,01
2 нед	3,18±0,11	< 0,001	> 0,05

Таблица 3

Активность МП (в усл. ед.) в цитоплазме НГ

Срок исследования	$\bar{X} \pm m$	$p_1$	$p_2$
Контроль	1,46±0,10	–	–
1 сут	1,81±0,09	< 0,01	–
5 сут	2,49±0,07	< 0,001	< 0,001
10 сут	2,76±0,07	< 0,001	< 0,01
2 нед	2,96±0,07	< 0,001	> 0,05

Таблица 4

Содержание КБ (в усл. ед.) в цитоплазме НГ

Срок исследования	$\bar{X} \pm m$	$p_1$	$p_2$
Контроль	0,99±0,04	–	–
1 сут	0,87±0,08	< 0,01	–
5 сут	0,61±0,07	< 0,001	< 0,01
10 сут	0,65±0,07	< 0,001	> 0,05
2 нед	0,71±0,06	< 0,001	> 0,05

лизация в сроки до 3–4 нед после эпилептического припадка (рис. 4).

Анализ результатов изучения активности МП в цитоплазме НГ в контрольной группе показал, что она составляла в среднем 1,46±0,10 усл. ед. (см. табл. 3). При взятии крови в течение 1 сут после эпилептического припадка активность МП в цитоплазме НГ повышалась до 1,81±0,09 усл. ед. (в среднем). Это отличие от контрольных значений было статистически значимо ( $p < 0,01$ ). При увеличении срока взятия крови до 5 сут нарастание активности МП в цитоплазме НГ в крови продолжилось, ее средние значения достигли 2,49±0,07 усл. ед. и статистически значимо отличались от показателя как в контрольной группе,

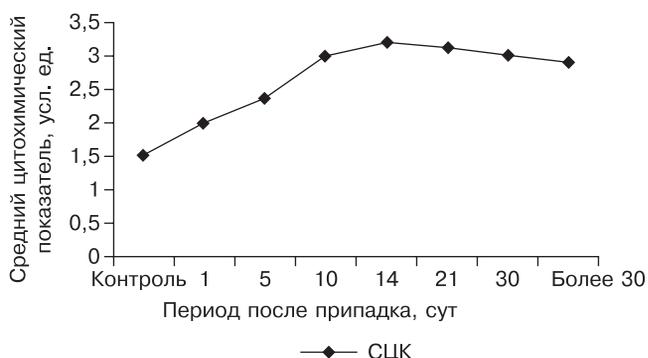


Рис. 4. Динамика содержания НП в цитоплазме НГ.

так и в предыдущий срок исследования ( $p < 0,001$ ). При дальнейшем увеличении срока исследования ПК после припадка до 10 сут тенденция к нарастанию активности МП в НГ сохранилась, и ее прирост относительно 5 сут составил 11% ( $p < 0,001$ ). Увеличение срока исследования ПК после эпилептического припадка до 2 нед не выявило статистически значимого прироста активности МП в цитоплазме НГ, и ее среднее содержание относительно 10 сут составило 2,96±0,07 усл. ед. ( $p > 0,05$ ). Следует отметить, что активность МП через 2 нед оставалась достоверно повышенной относительно контроля ( $p < 0,001$ ).

Таким образом, по мере увеличения срока исследования ПК после эпилептического припадка активность МП в цитоплазме НГ постепенно повышается, достигая своего максимума к 10–14 сут. В дальнейшем наблюдается резкое снижение показателей с возвращением к исходному уровню в срок до 3–4 нед после эпилептического припадка (рис. 5).

Изучение содержания КБ в цитоплазме НГ в контрольной группе показало, что оно составляло в среднем 0,99±0,04 усл. ед. После взятия крови в течение 1-х суток после эпилептического припадка среднее содержание КБ в цитоплазме НГ по сравнению с контролем достоверно уменьшилось до 0,87±0,08 усл. ед. ( $p < 0,01$ ). При увеличении срока взятия крови после припадка до 5 сут содержание КБ в цитоплазме НГ уменьшалось в среднем до 0,61±0,07 усл. ед. и статистически значимо отличалась от показателей как в контрольной группе ( $p < 0,001$ ), так и через 1 сут ( $p < 0,01$ ). При увеличении срока взятия крови до 10 сут тенденция к уменьшению содержания КБ сохранилась, и оно составило 66% ( $p < 0,001$ ) от показателя в контрольной группе. В то же время не было достоверных различий содержания КБ с показателями через 5 сут ( $p > 0,05$ ). Увеличение срока взятия крови после припадка до 14 сут не выявило статистически значимого уменьшения содержания КБ в цитоплазме НГ по отношению к 10 сут. Оно составило 0,71±0,06 усл. ед. ( $p > 0,05$ ), но при этом оставалось достоверно более низким ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контролем.

Таким образом, содержание КБ в цитоплазме НГ в течение 1-х суток после эпилептического припадка было достоверно ниже контрольных значений.

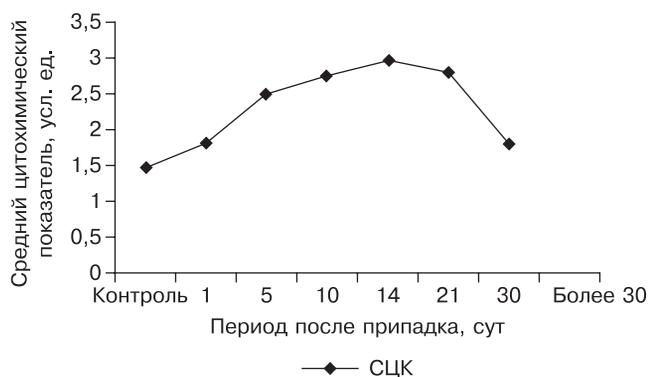


Рис. 5. Динамика активности МП в цитоплазме НГ.

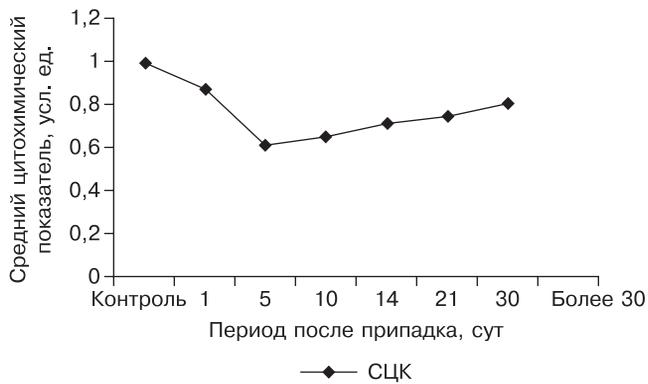


Рис. 6. Динамика содержания КБ в цитоплазме НГ.

В дальнейшем динамика уменьшения сохранялась, достигая своего минимума к 5–10 сут, и постепенно содержание КБ восстанавливалось к 2–3-й неделе (рис. 6).

Проведенное цитохимическое исследование ПК показало возрастание фагоцитарной активности НГ, о чем свидетельствует увеличение содержания НП и активности МП непосредственно после эпилептического припадка и нарастающее в дальнейшем в течение суток как при разных формах ЛОЭ, так и у пациентов с однократным неспровоцированным эпилептическим припадком [2]. Динамика роста активных компонентов цитоплазмы НГ после припадка и дальнейшее восстановление этих показателей несколько различались, но общая тенденция для НП и МП была одинаковой.

Вместе с тем выявленное после эпилептического припадка снижение важнейшего фактора бескислородной киллинговой системы — ферментных КБ — свидетельствует о нарушениях дифференциации и функциональной морфологии НГ в виде наличия выраженной токсигенной зернистости цитоплазмы, свидетельствующей, по-видимому, о патологических изменениях в лизосомах. Это обстоятельство может обусловить повышение кислотности внутри клетки, активацию свободнорадикальных процессов (перекисного окисления липидов), значительное нарушение мембранных структур клетки, нарушение функции и гибель клетки [7].

Таким образом, выявленные морфологические и цитохимические особенности НГ свидетельствуют об их важной роли в обеспечении иммунного статуса при локально обусловленной эпилепсии и других пароксизмальных расстройствах сознания эпилептической природы. Комплексное морфологическое и цитохимическое изучение НГ ПК позволяет оптимизировать стандартный алгоритм диагностики ЛОЭ, поскольку такая совокупность

изменений на клеточном уровне нехарактерна для других заболеваний нервной системы без эпилептических припадков и не встречается у здоровых лиц. Выявленные изменения НГ можно рассматривать как маркер, характерный для эпилепсии и других пароксизмальных расстройств сознания эпилептической природы, что представляется актуальным для разработки новых перспективных направлений их фармакотерапии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Альтгаузен, А. Я. Клиническая лабораторная диагностика. — М.: Медгиз, 1959.
2. Василенко А. В. Комплексная клиничко-инструментальная и морфоцитохимическая диагностика локально обусловленной эпилепсии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб, 2010.
3. Гарсия А. Одноволновой метод двух площадей, применяемый для цитофотометрии мазков и отпечатков тканей // Введение в количественную цитохимию — М.: Мир, 1969.
4. Гусаров В. Г. Сравнительное клиничко-иммунологическое исследование больных эпилепсией различного возраста: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 1970.
5. Лапина Е. Ю. Клиничко-функциональные аспекты симптоматической эпилепсии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Новосибирск, 2007.
6. Липатова Л. В. Клиничко-нейроиммунные нарушения, их патогенетическая роль и значение для диагностики и лечения эпилепсии, осложненной энцефалопатией: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — СПб: ВМедА, 2009.
7. Лобзин С. В., Одинак М. М., Дыскин Д. Е. и др. Оксидантный стресс и его значение в этиопатогенезе локально обусловленной эпилепсии (обзор литературы) // Вестн. Рос. ВМедА. — 2010. — № 3 (31). — С. 250–253.
8. Одинак М. М., Дыскин Д. Е. Эпилепсия: этиопатогенез, клиника, дифференциальная диагностика, медикаментозное лечение. — СПб: Политехника, 1997.
9. Одинак М. М., Селиванов Е. А., Лобзин С. В. и др. Сопоставление результатов клиничко-морфологического, компьютерного и цитоморфологического исследования при инсультах с эпилептическим синдромом // Вестн. СПбМАПО. — 2009. — Т. 1, № 1. — С. 23–28.
10. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. — М.: Мир, 1962.
11. Поздняков В. С. Регуляция некоторых гемодинамических показателей в различных стадиях эпилептического процесса: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1975.
12. Скулябин Д. И. Клиничко-нейрохимическая диагностика височной эпилепсии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб.: ВМедА, 2002.
13. Худгарян М. В., Меграбян А. А. Эффект карбоната лития на лимфоциты при эпилепсии // Журн. невропатол. и психиатр. — 1987. — Вып. 6. — С. 863–866.
14. Шубич М. Г. Выявление катионного белка в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего // Цитология. — 1974. — № 10. — С. 1321–1322.
15. Эренрейса Е. А. Организация хроматина в ядре интерфазной клетки. — Рига: Зинатне, 1990.
16. Laad G., Miranda M. F. Eosinophilic leukemoid reaction associated with carbamazepine hypersensitivity // Indian J. Dermatol. Venerol. Leprol. — 2005. — Vol. 71, N 1. — P. 35–37.
17. Sato, Sekija. // J. Clin. Med. — 1928. — Vol. 13. — P. 1058.