

© Коллектив авторов, 2006
УДК 616.314.17:616.155.34-076

ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ПАРОДОНТИТОМ. КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОГО ИЗОБРАЖЕНИЯ

А.Г. Авагимов, А.Н. Бондаренко, А.А. Славинский
Кубанский государственный медицинский университет

Патология пародонта - одна из самых распространенных в стоматологии. Пародонтит характеризуется прогрессирующей деструкцией опорного аппарата зуба, включающего поверхностные ткани десны, пародонтальные связки, цемент корня и кость альвеолы. Повреждение пародонтальных связок и резорбция альвеолярной кости способствуют прорастанию десневого эпителия вдоль корня зуба с образованием патологического зубодесневого кармана.

Воспалительный процесс в пародонте возникает под действием повреждающих агентов, наиболее часто - патогенных микроорганизмов. В последние годы установлено, что микроорганизмы, вызывающие пародонтит, способны активировать нейтрофильные лейкоциты. Активированные нейтрофилы выделяют в окружающие ткани ферменты и биооксиданты, которые повреждают мембраны клеток, способствуя повышению их проницаемости, развитию и усугублению патологического процесса [6-9].

Течение и исход заболеваний пародонта в значительной степени зависят от функционального состояния нейтрофильных лейкоцитов, их способности мигрировать из кровеносного русла в патологический очаг, осуществлять захват и киллинг микроорганизмов. Компоненты внутриклеточных антибактериальных систем входят в состав цитоплазматической зернистости нейтрофилов [3].

Цель настоящего исследования - установить на основе компьютерного анализа клеточного изображения закономерности изменения функционально-метаболической активности нейтрофильных лейкоцитов крови у больных пародонтитом.

Материал и методы. Исследована кровь 52 больных пародонтитом взрослых в возрасте от 36

до 64 лет и 17 больных ранним быстро прогрессирующим пародонтитом (РБПП) от 21 до 34 лет. Выполнен компьютерный анализ изображения 27600 нейтрофильных лейкоцитов. Кровь из пальца руки брали для исследования дважды - в стадии обострения болезни и при наступлении ремиссии после проведенного лечения. Контрольная группа состояла из 68 практически здоровых людей от 17 до 64 лет без хронических заболеваний в анамнезе (27200 нейтрофилов). Активность щелочной фосфатазы определяли реакцией азосочетания по методу М.Г.Шубича [5], активность НАДФН-оксидазы - с помощью НСТ-теста в модификации И.В.Нестеровой [1]. Активность миелопероксидазы выявляли бензидиновым методом по А. Sato, нафтол-AS-D-хлорацетат эстеразы - методом А.А.Славинского и Г.В.Никитиной [4].

Компьютерный анализ клеточного изображения осуществляли с помощью телевизионной системы "MagiScop" с программными пакетами "Magisoft" и "ВидеоТест". Изображения нейтрофилов, сформированные иммерсионной системой микроскопа, вводили в видеопамять компьютера цветной телекамерой через фреймграббер, увеличивали с помощью алгоритма линейной аппроксимации, что позволило вывести из области шумов и сделать доступными для измерений внутриклеточные структуры. Обработка изображения включала в себя медианную фильтрацию, контрастирование по яркостному компоненту посредством RGB-LSH преобразования, увеличение резкости, бинаризацию по цвету продукта цитохимической реакции. Определяли количество гранул вещества. Для оценки интенсивности цитохимических реакций в компьютерном изображении клеток использовали интегральный цитохимический показатель (ИЦП)

- произведение суммарной площади цветного продукта реакции и его оптической плотности [2].

Результаты и обсуждение. По данным компьютерного анализа изображения, в нейтрофилах крови здоровых людей активность щелочной фосфатазы составляет $3,17 \pm 0,04$ относительных единиц (отн. ед.), НАДФН-оксидазы - $5,76 \pm 0,07$ отн. ед., миелопероксидазы - $5,25 \pm 0,06$ отн. ед., нафтол-А3-О-хлорацетат эстеразы - $16,84 \pm 0,19$ отн. ед.

В нейтрофилах больных с пародонтитом взрослых ИЦП щелочной фосфатазы составляет 7,97 отн. ед. во время обострения и 5,01 отн. ед. в период ремиссии. Значения ИЦП НАДФН-оксидазы - 13,62 отн. ед. в стадии обострения и 9,77 отн. ед. после наступления ремиссии, активности миелопероксидазы - соответственно 2,60 отн. ед. и 3,39 отн. ед. Активность нафтол-АБ-О-хлорацетат эстеразы была равна 6,50 отн. ед. при обострении и 10,43 отн. ед. в стадии ремиссии.

В нейтрофилах больных с РБПП активность щелочной фосфатазы в период обострения составляет 12,58 отн. ед., а во время ремиссии - 7,63 отн. ед. Значения ИЦП НАДФН-оксидазы: 18,56 отн. ед. в стадии обострения и 11,43 отн. ед. в период ремиссии, ИЦП у миелопероксидазы 0,86 отн. ед. при обострении и 3,05 отн. ед. в стадии ремиссии. Активность нафтол-А8-Б-хлорацетат эстеразы в стадии обострения составляет 4,51 отн. ед., а во время ремиссии - 8,17 отн. ед.

Таким образом, компьютерный анализ клеточного изображения выявил изменение активности компонентов антибактериальных систем в нейтрофилах больных обеими формами пародонтита.

Активность щелочной фосфатазы при обострении болезни превышает показатели здоровых людей в 2,5 раза ($p < 0,001$) у больных с пародонтитом взрослых и в 4,0 раза ($p < 0,001$) - у больных с РБПП. Во время ремиссии активность фермента у пациентов с пародонтитом взрослых снижается ($p < 0,001$), оставаясь повышенной в 1,6 раза, а у больных с РБПП остаётся увеличенной в 2,4 раза ($p < 0,001$).

Активность НАДФН-оксидазы в стадии обострения увеличена в 2,4 раза ($p < 0,001$) у больных с пародонтитом взрослых и в 3,2 раза ($p < 0,001$) у больных с РБПП. С наступлением ремиссии активность НАДФН-оксидазы снижается ($p < 0,001$), оставаясь повышенной в 1,7 раза у пациентов с пародонтитом взрослых и в 2,0 раза ($p < 0,001$) - у больных с РБПП.

Активность миелопероксидазы в острой фазе заболевания снижена в 2,0 раза ($p < 0,001$) и в 6,1 раза ($p < 0,001$) соответственно у больных с пародонтитом взрослых и больных с РБПП. Ремиссия характеризуется повышением активности фермента, однако у пациентов с пародонтитом взрослых показатель остаётся сниженным в 1,5 раза, а у больных с РБПП - в 1,7 раза ($p < 0,001$).

Активность нафтол-АБ-О-хлорацетат эстеразы снижена в 2,6 раза у больных с пародонтитом взрослых ($p < 0,001$) и в 3,7 раза у больных с РБПП ($p < 0,001$) во время обострения. В стадии ремиссии этот показатель возрастает ($p < 0,001$), оставаясь, тем не менее, ниже нормы в 1,6 раза у больных с пародонтитом взрослых ($p < 0,01$) и в 2,1 раза у пациентов с РБПП ($p < 0,001$).

Результаты компьютерного анализа клеточного изображения свидетельствуют о повышении активности щелочной фосфатазы и НАДФН-оксидазы как результате активации циркулирующих нейтрофилов у больных пародонтитом. Уменьшение при этом активности нафтол-АБ-О-хлорацетат эстеразы и миелопероксидазы можно объяснить дегрануляцией азурофильной зернистости нейтрофилов в системном кровотоке, приводящей к снижению бактерицидного[™] и фагоцитарных свойств этих клеток еще до их миграции в ткани пародонта. Это подтверждается уменьшением количества гранул миелопероксидазы и нафтол-АБ-О-хлорацетат эстеразы - маркерных компонентов азурофильной зернистости.

Так, при обострении пародонтита взрослых число гранул миелопероксидазы уменьшено в 2 раза и у больных с РБПП в 1,3 раза. В стадии ремиссии число гранул миелопероксидазы увеличивается почти до нормы у больных с пародонтитом взрослых и остаётся уменьшенным в тех же пределах у пациентов с РБПП. Количество гранул нафтол-А8-Д-хлорацетат эстеразы в стадии обострения также уменьшено в 1,6 раза у больных с пародонтитом взрослых и в 1,2 раза - при РБПП. Ремиссия сопровождается в обоих случаях увеличением количества гранул этого фермента в нейтрофилах.

Это свидетельствует о потере клетками в кровеносном русле компонентов азурофильной зернистости вследствие дегрануляции. Снижение антибактериального потенциала азурофильных гранул в системном кровотоке до миграции нейтрофилов в ткани можно считать одной из причин неэффективного фагоцитоза в очаге воспаления.

Вывод. Активность цитохимических маркеров антибактериальных систем нейтрофилов достоверно различается в зависимости от характера пародонтита. Результаты компьютерного анализа изображения компонентов зернистости циркулирующих нейтрофилов служат у больных пародонтитом объективным показателем тяжести патологического процесса.

Компьютерный анализ изображения нейтрофильных лейкоцитов позволяет осуществлять тонкий цитохимический мониторинг азурофильной зернистости, содержащей компоненты внутриклеточных антибактериальных систем, что представляется перспективным в клинической лабораторной диагностике для оценки эффективности лечения, прогнозирования течения и исхода заболеваний пародонта.

Литература

1. Нестерова, И.В. Клинико-диагностическое значение NBT-теста при стафилококковых пневмониях у детей / И.В. Нестерова // Педиатрия. - 1980. - № 5. - С. 50.
2. Славинский, А.А. Критерии функциональной активности нейтрофильных лейкоцитов, основанные на компьютерном анализе изображения и люминесценции: Автореф. дис. ... докт. биол. наук / А.А. Славинский. - М., 2000.
3. Славинский, А.А. Цитоплазматическая зернистость нейтрофильных лейкоцитов / А.А. Славинский // Клин. лаб. диагностика. - 2002. - № 3. - С. 39-43.
4. Славинский, А.А. Компьютерный анализ изображения нейтрофильных лейкоцитов: нафтол-АБ-О-хлорацетат эстераза / А.А. Славинский, Г.В. Никитина // Клин. лаб. диагностика. - 2000. - № 5. - С. 34-37.
5. Шубич, М.Г. Цитохимическое определение щелочной фосфатазы

/ М.Г. Шубич // Лабор. дело. - 1965 а. - № 1. - С. 10-14.

Biasi, D. Neutrophil migration, oxidative metabolism and adhesion in early onset periodontitis / D. Biasi, L.M. Bambara, A. Carletto // J. Clin. Periodontol. - 1999. - Vol. 26, - № 9. - P. 563-568.

Figueredo, C.M. Expression of intracellular elastase activity in peripheral neutrophils from patients with adult periodontitis / C.M. Figueredo, A. Gustafsson, B. Asman, K. Bergstrom // J. Clin. Periodontol. - 2000. - Vol. 27, № 8. - P. 572-577.

Lipid peroxidation caused by oxygen radicals from fusobacterium-stimulated neutrophils as a possible model for the emergence of periodontitis / M. Sheikhi, R.K. Bouhafs, K.J. Hammarstrom, C. Jarstrand // Oral. Dis. - 2001. - Vol. 7, № 1. - P. 41-46.

Sheikhi, M. Cytokine, elastase and oxygen radical release by fusobacterium nucleatum-activated leukocytes: a possible pathogenic factor in periodontitis / M. Sheikhi, A. Gustafsson, C. Jarstrand // J. Clin. Periodontol. - 2000. - Vol. 27, № 10. - P 758-762.

FUNCTIONAL METABOLIC ACTIVITY OF BLOOD NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH PERIODONTITIS. COMPUTER ANALYSIS OF THE CELLULAR IMAGE

AVAGIMOV A.G., BONDARENKO A.N., SLAVINSKY A.A.

А.Г. АВАГИМОВ, А.Н. БОНДАРЕНКО, А.А. СЛАВИНСКИЙ

Компьютерный анализ клеточного изображения выявил существенные различия активности щелочной фосфатазы, НАДФН-оксидазы, миелопероксидазы и нафтол-АЗ-б-хлорацетат эстеразы в нейтрофильных лейкоцитах периферической крови у больных пародонтитом взрослых и ранним быстро прогрессирующим пародонтитом. Активность цитохимических маркеров антибактериальных систем нейтрофилов достоверно различается в зависимости от характера пародонтита. Результаты компьютерного анализа изображения компонентов зернистости нейтрофилов служат объективным показателем тяжести патологического процесса и могут использоваться для оценки эффективности лечения, прогнозирования течения и исхода заболеваний пародонта.

Ключевые слова: пародонтит, ферменты нейтрофилов, компьютерный анализ изображения

The computer analysis of the cellular image has revealed essential distinctions in alkaline phosphatase, NADPH-oxylase, myeloperoxidase and naphthol-AS-D-chloroacetate esterase activity in peripheral blood neutrophilic leukocytes of adults with periodontitis and in the cases of early rapid disease progression. Activity of cytochemical markers of neutrophils antibacterial systems authentically depended on the course of periodontitis. Results of the computer analysis of the image of neutrophils granularity components serve as an objective parameter of the disease severity and can be used for estimation of treatment response and forecasting of the course and outcomes of parodontium pathology.

Key words: periodontitis, neutrophils enzymes, computer analysis of the image