



УДК: 616. 322-002. 2:611. 322-018. 1

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК НЕБНЫХ МИНДАЛИН У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ТОНЗИЛЛИТОМ

А. В. Староха*, Б. В. Шилов*, Д. А. Долгун**

* Томский филиал ФГУ «НКЦ оториноларингологии Росздрава»
(Директор – Засл. врач РФ, проф. А. В. Староха)

** ГОУ ВПО «Сибирский государственный медуниверситет Росздрава»
(Зав. каф. оториноларингологии – проф., А. В. Староха)

Хронический тонзиллит является наиболее распространенным заболеванием ЛОР-органов, частота которого особенно высока у лиц молодого трудоспособного возраста [15, 16, 19]. Эта патология продолжает занимать одно из ведущих мест в структуре воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей, не просто оставаясь актуальной проблемой оториноларингологии, но и выходя за рамки исключительно ЛОР-проблем, приобретая все черты социальной болезни. Особенно остро стоит проблема декомпенсации ХТ [10, 25], причем иногда – в достаточно раннем возрасте [7, 8, 17, 26].

Современная наука располагает новейшими теоретическими данными о функции и строении тонзиллярного аппарата, которые заставляют пересмотреть вопросы возникновения, хронизации и декомпенсации хронического тонзиллита (ХТ) с учетом богатого и разнообразного материала, накопленного современной клиникой [2].

Существует зависимость между составом и функциональной активностью клеток, присутствующих в небных миндалинах, и развитием или обострением таких заболеваний как, например, ревматоидный артрит [20, 21]. Есть также данные о сопряженном изменении клеточного состава небных миндалин и нарушениями гормонального статуса пациента [24].

В настоящее время большое значение придается цитологическим исследованиям небных миндалин в условиях их хронического воспаления. В то же время цитоморфологическая функциональная характеристика миндалин при ХТ остается далеко не полной и нуждается в дальнейшем уточнении. Предложенные в разное время многочисленные методы оценки иммунофункционального состояния НМ, основанные на исследовании материала с поверхности НМ, смывов из ротовой части глотки [23]; мазков-перепечатков с зевной поверхности НМ [6]; мазков-отпечатков со слизистой оболочки лакун НМ [12]; цитограмм содержимого крипт и ткани НМ [3, 12, 18] имеют определенные недостатки. Требования «доказательной медицины», базирующейся на надежности и точности морфологических диагнозов, связаны с необходимостью максимальной объективизации и оптимизации результатов цито- и гистологических исследований [1]. Кроме того, системный анализ цитоморфологической картины очага воспаления позволит определить факторы, обуславливающие развитие декомпенсированной формы хронического тонзиллита.

Цель исследования. Целью настоящего исследования явилось изучение клеточных особенностей очага хронического инфекционного воспаления у больных хроническим декомпенсированным тонзиллитом с частыми рецидивами ангин. Особое внимание уделялось изучению пероксидазной активности нейтрофильных гранулоцитов у пациентов, поскольку накоплены данные о том, что снижение таковой может стать важной составляющей перехода воспалительного процесса в хроническую, часто рецидивирующую форму [9, 29], а данные об активности МПО нейтрофилов у больных хроническим тонзиллитом крайне малочисленны [30]. Следует отметить, что оценка состояния азурофильных гранул нейтрофилов может способствовать совершенствованию диагностики и прогнозированию течения ХТ [22].

В ходе исследования был изучен операционный материал ткани небных миндалин 20 больных, подвергнутых тонзиллэктомии, с диагнозом «Хронический декомпенсированный тонзиллит, частые рецидивы ангин». Средний возраст обследованных пациентов составил $31,4 \pm 2,6$



года, а средний стаж заболевания – $10,2 \pm 2,1$ года. Средняя частота рецидивов была $5,4 \pm 0,4$ раз в год, при этом минимальным количеством было 4 рецидива заболевания в год, максимальным – 8 раз в год. У 50% обследованных больных частота рецидивов была 5 и более раз в год.

Цитологические препараты были приготовлены методом щелочной диссоциации с 50%-ным раствором КОН с предварительной фиксацией в формалине. Окраску препаратов производили по методу Романовского-Гимза [11]. Определяли относительное содержание клеточных элементов, подсчитывая 400 клеток каждого препарата. Состояние ядер и показатели клеточной структуры, необходимые для объединения клеток в различные субпопуляции, оценивали при помощи компьютерного анализа изображений [31], выполненного с использованием программы ImageJ [27]. Производили специфическую реакцию выявления активности МПО в цитоплазме нейтрофилов. Принцип метода основан на окислении бензидина системой перекись водорода-пероксидаза [22]. Результаты оценивали количественным методом с использованием принципа Astaldi и при помощи программы ImageJ, коэффициент корреляции Спирмана.

Программа ImageJ предназначена для изучения различных параметров изображений. ImageJ это публично доступный графический процессор, написанный с использованием графического ядра языка Java и для использования не требует лицензии. Эта программа идеологически подготовлена и разработана группой NIH Image изначально для платформы Macintosh. Она может быть запущена как online applet непосредственно внутри web-браузера или может работать как загруженное и установленное на Ваш компьютер приложение, что является наиболее привычным для компьютерного пользователя вариантом использования. Программа имеет открытый источник кода, написанного на языке Java, что позволяет редактировать и рекомпилировать любой модуль программы. ImageJ может быть установлена на любой компьютер, имеющий виртуальную машину Java 1.1 или более позднюю ее версию. Загружаемые версии этой программы доступны также для платформ Windows, Mac OS X, Linux а также Sharp Zaurus PDA.

ImageJ позволяет отображать, редактировать, анализировать, обрабатывать, сохранять и печатать различные цифровые изображения. ImageJ это наиболее быстрая на сегодняшний день программа обработки изображений в мире. Она может совершать операцию фильтрации изображения размером 2048×2048 за 0,1 секунды. У этой программы есть возможность автоматизировать задачи и создавать пользовательские инструменты, используя механизм макросов.

Программа позволяет проводить различные виды выделений на изображении. В частности, выделять полигональную, эллиптическую область или фигуру неправильной формы. Выделение можно вырезать, очистить, закрасить, обвести, отфильтровать.

Результаты и их обсуждение. Анализ состава клеток очага воспаления выявил наличие лимфоидных клеток, макрофагов и нейтрофилов. У всех обследованных пациентов было отмечено достоверное преобладание макрофагов над нейтрофилами в операционном материале: $18,63 \pm 0,71\%$ против $8,91 \pm 1,42$ ($p < 0,01$). Такая картина соответствует представлению о снижении противовоспалительной активности нейтрофила при длительном стаже инфекционного процесса [4].

Популяция лимфоидных клеток очага воспаления у больных хроническим декомпенсированным тонзиллитом состояла из четырех типов клеток:

- больших гранулярных лимфоцитов,
- малых светлых лимфоцитов,
- малых темных лимфоцитов и лимфоцитов, подобных бласттрансформированным.

Большую часть популяции лимфоидных клеток составляли малые темные лимфоциты – $47,79 \pm 3,16\%$. Эти клетки имели ядра с признаками дегенерации, что характеризовалось наличием пикноза и рексиса: в 79% и 58% изученных ядер подобных клеток соответственно. Малые светлые лимфоциты составили $19,13 \pm 2,19\%$ общего пула лимфоидных клеток очага воспаления, а большие гранулярные – $4,11 \pm 1,03\%$. Наибольший интерес представляла субпопуляция лимфоидных клеток, подобных бласттрансформированным, относительное количество которых оказалось равным $1,78 \pm 0,12\%$. Обнаружение таких клеток в операционном материале объясняет присутствие подобных клеток в периферической крови больных хроническим тонзиллитом, выявленное нами в предыдущих исследованиях. Присутствие клеток, подобных бласттрансфор-



мированным, в очаге хронического воспаления может быть следствием наличия в нем факторов, способных вызывать трансформацию лимфоидных клеток. Некоторые авторы отмечают, что гипертрофия небных миндалин при длительном стаже ХТ ведет к снижению уровня апоптоза в лимфоцитах, что способствует повышению их пролиферации [28].

Нейтрофилы очага воспаления у пациентов с декомпенсированной формой заболевания отличались высокой гиперсегментацией ядра (в среднем, $5,7 \pm 0,5$ сегмента; 95% всех обследованных ядер нейтрофилов имеют средний показатель количества сегментов от 4,78 до 6,26). Аналогичное увеличение сегментации ядер нейтрофильных гранулоцитов сохранено и на периферии: $5,2 \pm 0,4$ сегмента. Этот феномен может быть расценен, с одной стороны, как проявление токсикемии вследствие длительного контакта с микробной флорой, с другой стороны – как свидетельство нарушений в созревании и формировании функциональной активности клеток нейтрофильного ряда.

В качестве маркера функциональной активности нейтрофилов была изучена миелопероксидазная активность этих клеток. Миелопероксидаза (МПО) – один из основных биомаркеров, отражающих активность хронического воспалительного процесса – локализована в азурофильных гранулах нейтрофилов. Активные нейтрофилы реализуют функции клеточных эффекторов системы неспецифической резистентности организма через выброс гранул, содержащих вещества с выраженными цитотоксическими свойствами, в том числе МПО. Таким образом, признаком активации нейтрофилов является исчезновение гранул, содержащих МПО, либо резко сниженное их количества вследствие экзоцитоза, либо секреторной дегрануляции [13, 14].

Анализ состояния первичных азурофильных гранул нейтрофилов показал преобладание в очаге и на периферии клеток со слабовыраженной реакцией на МПО: $76,81 \pm 2,12\%$ в крови и $50,00 \pm 10,59\%$ в небных миндалинах, причем очаг воспаления содержал достоверно меньшее число таких клеток ($p < 0,01$). Активных нейтрофилов, высвободивших гранулы и показавших отрицательную реакцию на МПО, напротив, оказалось больше в очаге воспаления: $6,43 \pm 0,90\%$ в препаратах миндалин против $0,75 \pm 0,45\%$ в мазках периферической крови ($p < 0,01$). Следовательно, клиническая ремиссия в условиях хронического тонзиллита сопровождается выраженной функциональной активностью эффекторов естественного иммунитета организма. Количество клеток с положительной и резкоположительной реакцией на МПО в крови и в очаге хронического воспаления достоверно не отличалось.

Нами отмечена сниженная активность азурофильных гранул, проявляемая слабopоложительной реакцией на МПО. Снижение интенсивности реакции цитоплазмы нейтрофильных гранулоцитов на МПО как в крови, так и в миндалинах, сопровождалось увеличением количества сегментов в ядрах нейтрофилов. Возможно, наряду с появлением пролиферативной активности среди лимфоидных клеток длительный срок заболевания ХТ сопровождается нарушением созревания нейтрофильных гранулоцитов. Проведенный корреляционный анализ подтверждает это положение. Так, уменьшение числа нейтрофилов с резкоположительной реакцией на МПО отрицательно коррелирует с длительностью заболевания (Рис. 1). Напротив, продолжительность хронического тонзиллита обнаруживает тесную положительную связь с количеством нейтрофилов, дающих слабовыраженную реакцию на МПО в операционном материале (Рис. 2). Кроме того, у обследованных больных снижение активности миелопероксидазы в нейтрофилах было положительно связано с частотой обострений хронического тонзиллита (Рис. 3)

Таким образом, проведенное цитологическое исследование операционного материала, полученного при тонзиллэктомии от больных, чей стаж заболевания ХТ превышал 10 лет, подтвердило мнение ряда авторов, что при наличии хронического воспаления в лимфоэпителиальных органах, которыми являются НМ, происходит нарушение или снижение функционирования местных защитных механизмов слизистых оболочек [5]. Это не только приводит к первоначальной дезорганизации клеточного антибактериального «барьера», но и вызывает изменение цитоморфологической картины органа. Цитохимический анализ функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов, как очага воспаления, так и периферического русла, показал, что длительный срок заболевания ХТ снижает активность первичных азурофильных гранул этих клеток.

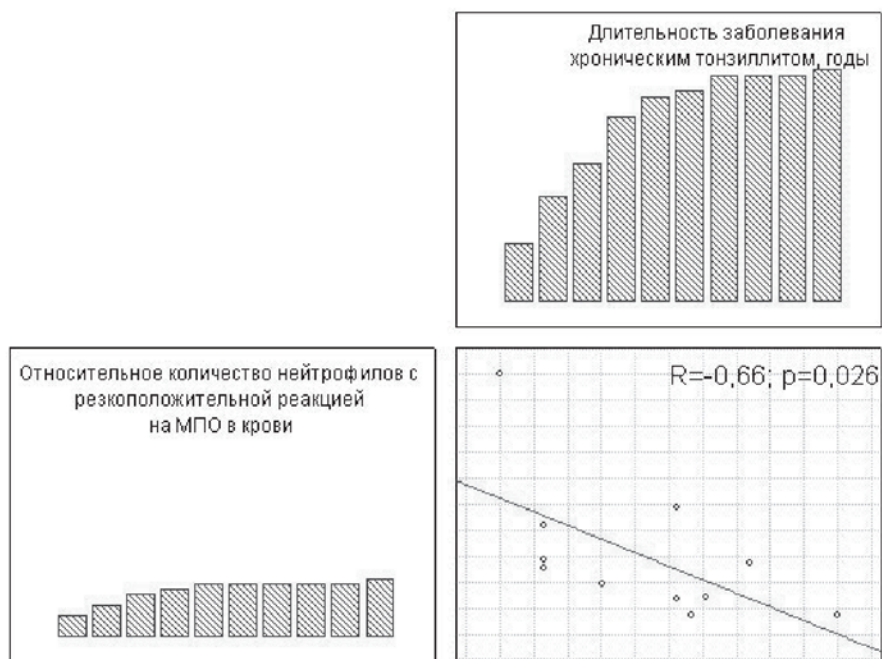


Рис. 1. Зависимость между длительностью заболевания хроническим тонзиллитом и относительным количеством нейтрофилов с резкоположительной реакцией на миелопероксидазу в крови.

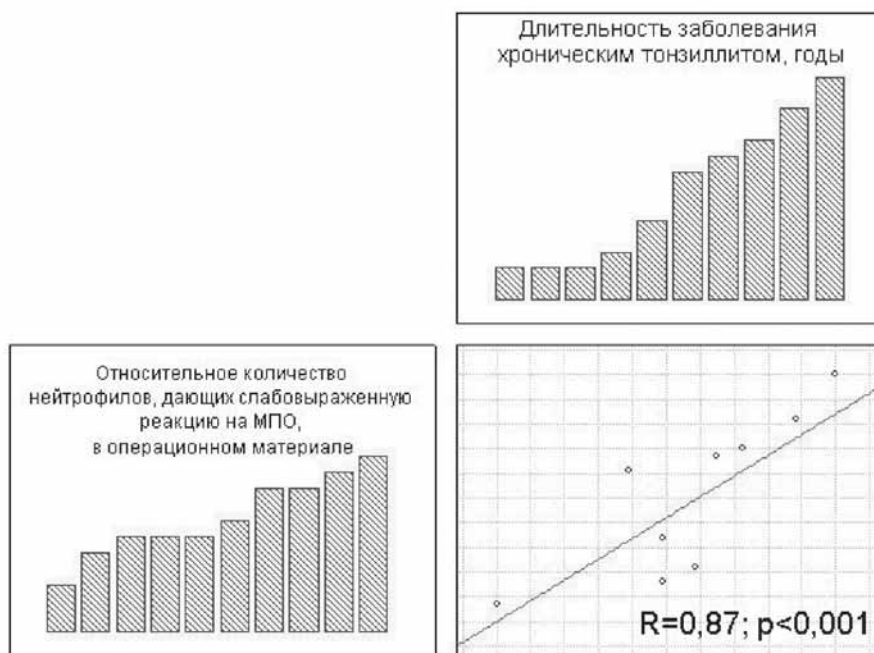


Рис. 2. Зависимость между длительностью заболевания хроническим тонзиллитом и относительным количеством нейтрофилов со слабовыраженной реакцией на миелопероксидазу в операционном материале.

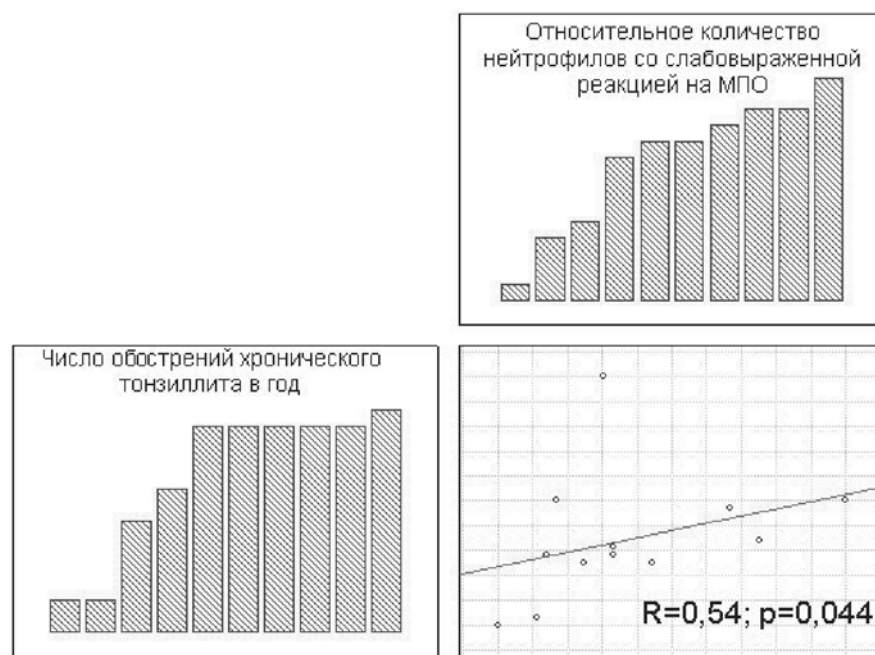


Рис. 3. Зависимость между частотой обострений хронического тонзиллита и относительным количеством нейтрофилов со слабовыраженной реакцией на миелопероксидазу в операционном материале.

Выводы:

1. В ходе проведенного морфоцитохимического анализа состава небных миндалин у больных декомпенсированным хроническим тонзиллитом в операционном материале выявлено преобладание макрофагов над нейтрофилами.
2. При изучении операционного материала выявлены признаки пролиферативной активности лимфоидных клеток, которые выражаются в наличии в очаге хронического воспаления лимфоцитов, морфологически подобных бласттрансформированным.
3. Нейтрофильные гранулоциты очага воспаления характеризуются гиперсегментированным ядром и высоким количеством клеток со слабовыраженной реакцией на миелопероксидазу.
4. Уменьшение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов, выраженное в снижении реакции их цитоплазмы на миелопероксидазу, сопряжено с длительностью заболевания хроническим тонзиллитом и частотой его рецидивов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Перспективы развития диагностической медицинской морфометрии. / Г. Г. Автандилов // Научно-практический журнал Клинико-лабораторный Консилиум, 2004, № 2, С. 39–42
2. Антонив В. Ф. Новый взгляд на гипертрофию глоточной миндалины: аденоиды – аденоидная болезнь / В. Ф. Антонив., В. М. Аксенов, П. А. Рауцкис // Рос. медицинский журн., 2004, № 3, С. 45–46.
3. Арефьева Н. А. Иммунный статус небных миндалин и методы его оценки: / Н. А. Арефьева, Л. Ф. Азнабаева, В. В. Сперанский // Метод. рекомендации. Уфа, 1997. – 18 с.
4. Букреева Е. Б. Этиология инфекционного процесса и особенности воспаления при хронической обструктивной болезни легких: Автореф. дис. / Е. Б. Букреева // Е. Б. Букреева. – Томск, 2004. – 40 с.
5. Быкова В. П. Лимфоэпителиальные органы в системе местного иммунитета оболочек. / В. П. Быкова // Арх. пат. 1995; 57: 1: 11–16.
6. Кандауров И. Ф. О диагностической ценности препаратов-отпечатков с небных миндалин у детей при различных формах хронического тонзиллита. / И. Ф. Кандауров // Вестн. оторинолар. 1969; 1: 109–110.
7. Ковалева Л. М. Вариант тонзиллотомии. / Л. М. Ковалева, А. А. Ланцов. // Журн. ушн. нос. и горл. бол. 1994; 4: 9–13.
8. Ковалева Л. М. Клинико-морфологическое обоснование тонзиллэктомии у детей дошкольного возраста. / Л. М. Ковалева, А. А. Ланцов, Н. М. Хмельницкая // Диагностика и реабилитация при заболеваниях верхних дыхательных путей. Сб. научн. тр. СПб НИИ уха, горла, носа и речи. СПб 1992; 31–38.



9. Коган, А. Х. Фагоцитзависимые кислородные – свободнорадикальные механизмы аутоагрессии в патогенезе внутренних болезней / А. Х. Коган // Вестн. РАМН. – 1999. – № 2. – С. 3–10.
10. Кусков В. В. Лимфаденоидное глоточное кольцо в норме и при хроническом тонзиллите. / В. В. Кусков, А. В. Староха – Томск: Изд-во Томск ун-та, 1984. – 154 с.
11. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В. В. Меньшикова. М., 1987. – 368 с.
12. Матвеева Л. А. Метод цитологического анализа назального секрета. / Л. А. Матвеева // Сб. тр. Томского мед. ин-та 1981.
13. Маянский Д. Н. Хроническое воспаление / Д. Н. Маянский. – М.: Медицина, 1991. – 272 с.
14. Маянский Д. Н. Клинические аспекты фагоцитоза / Д. Н. Маянский, О. И. Пикуоза. – Казань: Магариф, 1993. – 192 с.
15. Пальчун В. Т. Роль и место учения об очаговой инфекции в патогенезе и современных подходах к лечебной тактике при хроническом тонзиллите. / В. Т. Пальчун, Б. М. Сагалович // Вестн оторинолар 1995; 5: 5–12.
16. Пальчун В. Т. Болезни уха, горла, носа / В. Т. Пальчун, Н. А. Преображенский. – 2 – е изд., стереотипное – М.: Медицина, 1980. – 488 с.
17. Плужников М. С. Ангина и хронический тонзиллит / М. С. Плужников – СПб.: Диалог, 2002. – 154 с.
18. Пономарев Л. Е. Исследование содержимого крипт небных миндалин в диагностике хронического тонзиллита. / Л. Е. Пономарев, В. Г. Назаретян, Л. А. Лукьяненко // Клиническая оториноларингология: проблемы и достижения: Научн. тр. Кубан. гос. мед. акад. Краснодар 1997; 7–9.
19. Попа В. А. Хронический тонзиллит. / В. А. Попа. – Кишинев: Штиинца 1984.
20. Преображенский Б. С. Хронический тонзиллит и его связь с другими заболеваниями. / Б. С. Преображенский – М., 1954. – 57 с.
21. Преображенский Б. С. Ангина, хронический тонзиллит и сопряженные с ними общие заболевания. / Б. С. Преображенский, Г. Н. Попова – М: Медицина, 1970.
22. Саидов М. З. Определение активности миелопероксидазы / М. З. Саидов, Б. В. Пинегин // Лабораторное дело. – 1991. – № 3. – С. 56–60.
23. Салицилаты. / М. А. Ясиновский, А. Ф. Лещинский. и др. М., 1975.
24. Скочиллов В. В. Функции коры надпочечников у пациентов с хроническим тонзиллитом / В. В. Скочиллов // Воен. мед. журн. – 1972, № 10. – С. 80–81.
25. Староха А. В. Клинико-иммуноморфологическое состояние лимфаденоидного глоточного кольца при хроническом тонзиллите: Автореф. дис.... докт. мед. наук. / А. В. Староха – Томск, 1980. – 20 с.
26. Храппо Н. С. Возрастные особенности патологии уха и верхних дыхательных путей / Н. С. Храппо // Рос. оторинолар. – 2005. – № 6. – С. 51–54.
27. Abramoff M. D. «Image Processing with ImageJ». / M. D. Abramoff, P. J. Magelhaes, S. J. Ram // Biophotonics International, volume 11, issue 7, pp. 36–42, 2004.
28. Apoptosis and cell proliferation in chronic tonsillitis and oropharyngeal carcinoma: role of nitric oxide and cytokines / Kucera T., Pacova H., Vesly D. et al // Biomed. Papers. – 2004, N2. – p. 225–227.
29. Gorfien J. L. Comparison of the microanatomical distributions of macrophages and dendritic cells in normal and diseased tonsils / J. L. Gorfien, B. Noble, L. Brodsky // Ann Otol Rhinol Laryngol. – 2001. – Vol. 110. – № 2. P. 173–82.
30. Rudack C. Biologically active neutrophil chemokine pattern in tonsillitis. / C. Rudack, S. Jorg, F. Sachse // Clin Exp Immunol. – 2004. – Vol. 135. – № 3. P. 511–518.
31. Zabel-Olejnik J. Image cytometry appliance in chronic tonsillitis / J. Zabel-Olejnik, M. Grzegorowski, J. Warchol // Otolaryngol Pol. – 2003. – Vol. 57. – № 4. – P. 523–526.