

УДК 616.346.2.-008.853.4

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ОСТРОМ АППЕНДИЦИТЕ

Павлова Т.В., Лысов А.Е.

НИУ БелГУ, Белгород, e-mail: toxa_1984@pochta.ru

В статье представлены результаты исследования методом атомно-силовой микроскопии ультраструктурных особенностей клеточных мембран нейтрофилов венозной крови детей с острым аппендицитом. Проведен анализ отличий рельефа клеточной мембраны нейтрофила в динамике при остром деструктивном и недеструктивном аппендиците. Дана оценка полученных данных и представлены характерные достоверные особенности рельефа клеточных мембран нейтрофилов при остром аппендиците. Установлено, что острый деструктивный аппендицит характеризуется не только макроскопическими изменениями и характерными клиническими симптомами, но и перестройкой рельефа нейтрофилов. Причем характерные изменения отношения высоты клетки к ее диаметру, ядерно-цитоплазматического соотношения, высоты и ширины основания микровыступов мембраны весьма специфичны для деструктивного аппендицита и в перспективе могут использоваться в качестве дополнительного диагностического критерия.

Ключевые слова: аппендицит, нейтрофилы, дети, атомно-силовая микроскопия

MORPHOFUNCTIONAL PECULIARITIES OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH ACUTE APPENDICITIS

Pavlova T.V., Lyssov A.E.

NRU BelSU, Belgorod, e-mail: toxa_1984@pochta.ru

The article deals with cell wall ultrastructure characteristics of neutrophils retrieved from venous blood of children with acute appendicitis. The dissimilarities of neutrophil cell wall surface in case of acute destructive and non-destructive appendicitis were analyzed dynamically with atomic force microscopy. Retrieved data were estimated and characteristic peculiarities of neutrophil cell membrane surface in case of acute appendicitis were presented. The authors ascertain that acute destructive appendicitis is characterized not only with macroscopic and clinical peculiarities, but also with cell surface relief rearrangement. Changes in cell diameter and height ratio, cytoplasm-nucleus ratio, height and wideness of cell membrane micropromontories were found to be very indicative for acute destructive appendicitis and may be used as supplementary diagnostic sign.

Keywords: appendicitis, neutrophyl, children, atomic force microscopy

Проблема диагностики острого аппендицита – одна из старейших, наиболее изученных и в то же время – дискуссионных в современной хирургии. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в лечении этого заболевания, низкую летальность (0,7-1,7%), большое количество различных методик хирургического лечения, точная постановка диагноза, своевременное определение четких показаний к хирургическому вмешательству до сих пор является трудной задачей даже для опытного хирурга, особенно когда речь идет о пациентах детского возраста [3]. Описано более 200 аппендикулярных симптомов. Предложена масса дополнительных методов обследования – от определения лейкоцитарной формулы до проведения СКТ органов брюшной полости с контрастированием. Предложено большое количество шкал балльной системы оценки клинических симптомов для объективизации постановки диагноза, однако и по сей день уровень «напрасных» аппендэктомий как в России, так и в мировой практике остается крайне высоким и варьируется от 10–15 до 30% и более [3, 8, 9]. Таким образом, на сегодняшний день остается открытым вопрос о дополнительных методах исследования, которые позво-

лят снизить риск проведения «напрасной» аппендэктомии, повысив точность и специфичность диагностики острого аппендицита. В практической хирургии лабораторная диагностика острого аппендицита носит лишь вспомогательный характер. Целый ряд исследований направлен на выявление специфических маркеров аппендицита. Рассмотрен целый спектр биохимических параметров, клинических симптомов, однако высокочувствительный и специфичный маркер острого аппендицита пока не найден [8, 9].

Целью настоящего исследования явилось изучение морфофункциональных особенностей нейтрофилов венозной крови детей, оперированных по поводу острого аппендицита на момент поступления в стационар и при выписке.

Материалы и методы исследования

Выполнены исследования нейтрофилов периферической крови 35 детей, находившихся на лечении в отделении гнойной хирургии Детской областной клинической больницы г. Белгорода по поводу острого аппендицита. 1 группу составили 6 детей, прооперированных по поводу острого недеструктивного аппендицита (катаральный аппендицит, мезаденит, пельвиоперитонит). 2 группу составили 29 детей, оперированных по поводу деструктивных

форм аппендицита (флегмонозный, гангренозный, гангренозно-перфоративный). Забор крови производился с согласия родителей ребенка по стандартной методике путем пункции кубитальной вены. Кровь набиралась в стерильную одноразовую вакуумную пробирку с добавлением гепарина в дозе 10 ед./мл в день поступления и при выписке. Для оценки ультраструктуры и упругих свойств клеточной поверхности использовали атомно-силовой микроскоп NTEGRA Vita фирмы NT-MDT (г. Зеленоград). В каждой серии эксперимента сканировали по 10 клеток во влажной камере в полуконтактном режиме [4]. Проводили измерения высоты клеток, рассчитывали их площадь, изучали структуру поверхности. Все вышеперечисленные параметры отражают функциональную активность гранулоцита, поскольку активная трансляция ДНК требует деспирализации хромосом, что снижает плотность ядра, уменьшая его фазовую высоту. Таким образом, исходя из фазовой высоты клетки, можно получить косвенные данные о состоянии ядерного хроматина и уровне метаболизма [1, 2, 5, 6].

Для оценки морфофункционального состояния клеток мы использовали высоту профиля клетки, то есть максимальную его высоту от подложки; с помощью прилагающейся АСМ графической программы рассчитывались максимальные высота и ширина основания микровыростов, перепады высот.

В режиме 3D нами были получены трехмерные реконструкции плазматической мембраны нейтрофилов, где четко определялись контуры ядра и микровыросты цитоплазмы, контурировались рельеф цитоскелета, определялись глобулы, являвшиеся, вероятно, белковыми комплексами плазмолеммы. В разных участках клетки по скоплениям гранул можно косвен-

но судить об активности окислительно-восстановительных реакций.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета «Microsoft Office XP» методами параметрического анализа [7]. Определяли среднее (\bar{X}), ошибку среднего (m) и среднеквадратичное отклонение (δ). Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента. Уровень значимости p выбран менее 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Поверхность мембраны нейтрофилов у детей с деструктивным аппендицитом характеризовалась следующими особенностями. При поступлении профиль ядра был относительно низким. Высота цитоплазмы относительно ядра составила $63,9 \pm 8,8$ нм; количество микровыступов на выбранном в качестве стандартного квадратном участке мембраны нейтрофила со стороной 2,2 мкм – $14,2 \pm 3,2$, максимальная высота выступа $45 \pm 8,8$ нм, максимальный диаметр основания 630 ± 139 нм. Следует отметить, что местами, особенно при поступлении, на поверхности мембран нейтрофилов образовывались достаточно крупные возвышения, и составлявшие их микровыступы, слившиеся воедино, было трудно дифференцировать друг от друга. Такие агломераты оценивались и измерялись как единое целое (рис. 1).

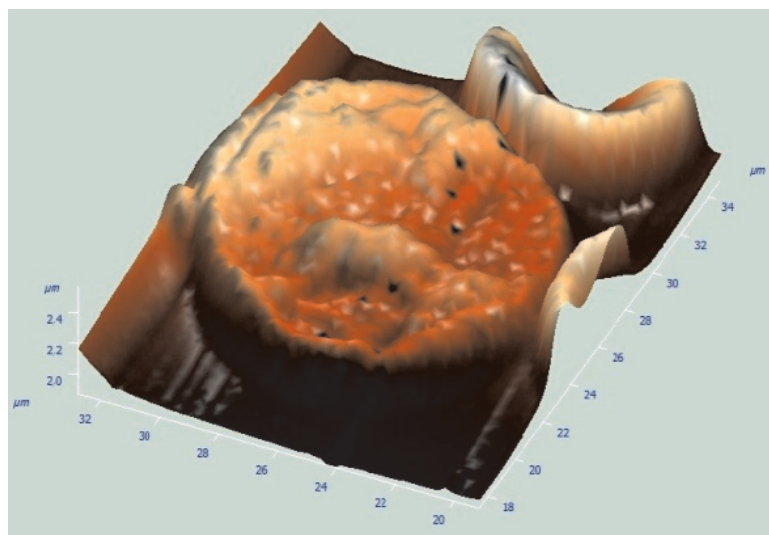


Рис. 1. 3D-реконструкция поверхности нейтрофила венозной крови при поступлении у ребенка с диффузным аппендикулярным перитонитом

К моменту выписки поверхность нейтрофилов у детей с деструктивными формами аппендицита претерпевала ряд изменений. Цитоплазма и ядро имели практически одинаковую высоту (перепад составлял около $4,2 \pm 4,9$ нм; количество микровыступов на

стандартном квадратном участке мембраны нейтрофила со стороной 2,25 мкм сокращалось до $7,7 \pm 1,8$, максимальная высота выступа – в среднем до $20,2 \pm 3,2$ нм, максимальный диаметр основания – до 267 ± 22 нм. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1
Рельеф поверхности нейтрофилов у детей с деструктивными формами острого аппендицита, $p < 0,05$

	Поступление	Выписка
Число выступов	$14,2 \pm 3,2$	$7,7 \pm 1,8$
Высота выступов, нм	$45 \pm 8,8$	$20,2 \pm 3,2$
Ширина основания выступов, нм	630 ± 139	267 ± 22
Перепад высот между цитоплазмой и ядром, нм	$63,9 \pm 8,8$	$4,2 \pm 4,9$

В группе детей с недеструктивным аппендицитом структура нейтрофилов была иной. При поступлении соотношение высоты профиля цитоплазмы и ядра было обратным – ядро было выше цитоплазмы на $22,7 \pm 4,7$ нм; количество микровыступов на стандартном квадратном участке мембраны нейтрофила со стороной $2,25$ мкм – $14,3 \pm 3$, максимальная высота выступа – $22 \pm 0,67$ нм, максимальный диаметр основания – $246,8 \pm 28,8$ нм.

К моменту выписки поверхность нейтрофилов у детей с недеструктивными формами острого аппендицита претерпевала ряд изменений (рис. 2).

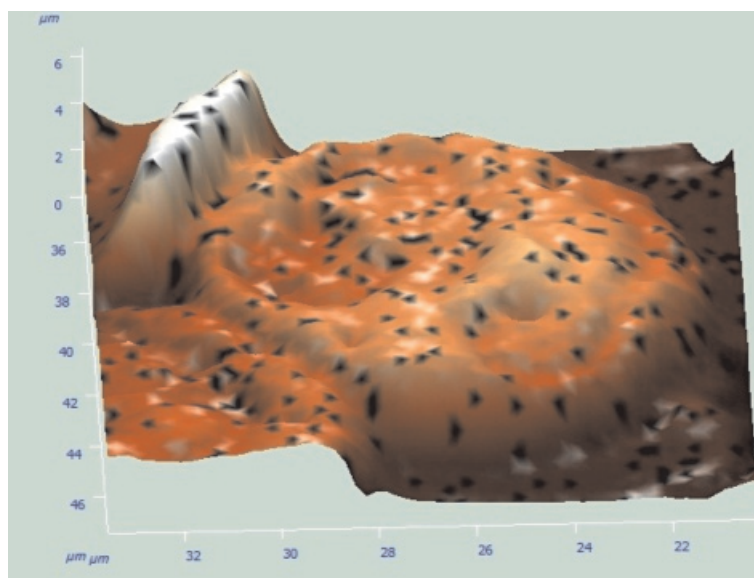


Рис. 2. 3D-реконструкция поверхности нейтрофила венозной крови при выписке у ребенка с недеструктивным аппендицитом

Профиль ядра относительно цитоплазмы был выше на $5 \pm 5,9$ нм; количество микровыступов на стандартном квадратном участке мембраны нейтрофила со стороной $2,25$ мкм сокращалось в среднем до $9,7 \pm 3,1$, максимальная высота выступа – до $14,9 \pm 3,4$ нм, максимальный диаметр основания – до

$181,4 \pm 37,2$ нм. Таким образом, у детей, оперированных по поводу недеструктивных форм острого аппендицита отличия в морфофункциональных свойствах нейтрофилов при поступлении и при выписке были выражены в меньшей степени. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2
Рельеф поверхности нейтрофилов у детей с недеструктивными формами острого аппендицита, $p > 0,05$

	Поступление	Выписка
Число выступов	$14,3 \pm 3$	$9,7 \pm 3,1$
Высота выступов, нм	$22 \pm 0,67$	$14,9 \pm 3,4$
Ширина основания выступов, нм	$246,8 \pm 28,8$	$181,4 \pm 37,2$
Перепад высот между цитоплазмой и ядром, нм	$-22,7 \pm 4,7$	$-5 \pm 5,9$

Расчет t-критерия Стьюдента показал, что в группе детей с деструктивным аппендицитом при поступлении достоверно отличались от таковых в группе с недеструктивным аппендицитом ($p < 0,05$). При этом в первой группе перепад высот парануклеарного углубления относительно цитоплазмы, перепад высот между ядром и парануклеарным углублением, количество и максимальная высота микровыступов мембраны, а также максимальный диаметр их основания достоверно отличались при поступлении и при выписке ($p < 0,05$).

При анализе морфологических особенностей нейтрофилов в обеих группах при поступлении и при выписке нами были обнаружены следующие отличия. При поступлении у детей с острым деструктивным аппендицитом отмечается тенденция к уменьшению площади поверхности нейтрофилов ($202,75 \pm 25,25$ при поступлении и $207,43 \pm 35,86$ при выписке $p > 0,05$) и увеличение объема клетки ($62,06 \pm 9,46$ при поступлении и $61,6 \pm 7,16$ при выписке, $p > 0,05$). При этом отмечается достоверное уменьшение диаметра ($12,14 \pm 0,73$ при поступлении и $12,7 \pm 0,9$ при выписке, $p < 0,05$) и увеличение высоты клетки ($0,56 \pm 0,13$ при поступлении и $0,46 \pm 0,09$ при выписке $p < 0,05$). Учитывая, что изолированная оценка диаметра и высоты клетки для характеристики ее функциональной активности явно недостаточна, и эти взаимосвязанные параметры должны рассматриваться в комплексе, нами был введен коэффициент распластанности клетки, представляющий собой отношение диаметра нейтрофила к его высоте. Расчет этого коэффициента показал значительно меньшую распластанность клеток при поступлении ($23,96 \pm 6$), нежели при выписке ($28,82 \pm 5,62$), $p < 0,05$.

При поступлении у детей с острым недеструктивным аппендицитом отмечается тенденция к увеличению площади поверхности нейтрофилов ($194,07 \pm 13,27$ при поступлении и $183,73 \pm 20,49$ при выписке, $p > 0,05$) и увеличение объема клетки ($63,24 \pm 5,82$ при поступлении и $49,13 \pm 6,84$ при выписке, $p > 0,05$). При этом отмечается тенденция к увеличению диаметра ($11,47 \pm 0,87$ при поступлении и $10,78 \pm 0,88$ при выписке, $p > 0,05$) и увеличение высоты клетки ($0,6 \pm 0,08$ при поступлении и $0,47 \pm 0,06$ при выписке, $p > 0,05$). Также в данной группе отмечается снижение распластанности нейтрофилов ($19,79 \pm 4,01$ при поступлении и $23,62 \pm 3,49$ при выписке, $p > 0,05$). Следовательно, наличие острого

воспалительного процесса в брюшной полости не влияет на такие фундаментальные параметры морфологии нейтрофилов, как объем клетки и площадь мембраны. Однако имеются статистически достоверные отличия в функциональных параметрах клетки, наглядной иллюстрацией которых служит коэффициент распластанности клетки.

Подводя итог, можно утверждать, что цитоморфометрические показатели нейтрофилов при поступлении достоверно отличаются от таковых при выписке. Деструктивный аппендицит характеризуется не только макроскопическими изменениями и характерными клиническими симптомами, но и перестройкой ультраструктуры поверхности нейтрофилов, а также изменением пластичности клетки. Характерные изменения ядерно-цитоплазматического соотношения, высоты и ширины основания микровыступов мембраны весьма специфичны для деструктивного аппендицита и в перспективе могут использоваться в качестве дополнительного диагностического критерия.

Список литературы

1. Бондарь Т.П. Наностроение поверхности мембран эозинофилов у пациентов с токсокарозом / Т.П. Бондарь, Н.М. Ишкова, Е.А. Мельченко // Вестник Ставропольского государственного университета. – 2009. – № 63. – С. 223–227.
2. 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.
3. Карасева О.В., Капустин В.А., Брянцев А.В. Лапароскопические операции при абсцедирующих формах аппендикулярного перитонита у детей // Детская хирургия. – 2005. – № 3. – С. 25–29.
4. Лабораторная гематология / С.А. Луговская, В.Т. Морозова, М.Е. Почтарь, В.В. Долгов. – М.: Изд-во ЮНИМЕДпресс, 2002. – 120 с.
5. Новицкий В.В. Молекулярные механизмы нарушения взаимодействия эффекторных клеток крови при патологии инфекционной и неинфекционной природы / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Л.С. Литвинова // Бюллетень Сибирского отделения РАМН. – 2008. – № 4. – С. 36–47.
6. Полетаева О.Г. Учет результатов иммуноферментного анализа при тканевых гельминтозах в антительных единицах / О.Г. Полетаева, Т.В. Старкова, Н.Н. Красовская // Медицинская паразитология и паразитологические болезни. – 2007. – № 1. – С. 24–26.
7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. – М., 2006. – 312 с.
8. Bruno Ramalho de Carvalho; Augusto Diogo-Filho; Cleiton Fernandes; Cristiane Borges Barra Leucograma, proteína C reativa, alfa-1 glicoproteína ácida e velocidade de hemossedimentação na apendicite aguda // Arquivos de Gastroenterologia. – 2003. – Vol. 40. – № 1.
9. Gerald D.G. Brennan Pediatric appendicitis: pathophysiology and appropriate use of diagnostic imaging // Canadian journal of emergency medicine. – 2006. – № 8(6). – P. 425–432.

References

1. Bondar', T.P. Nanostroenie poverhnosti membran jeozinofilov u pacientov s toksokarozom / T.P. Bondar', N.M. Ishkova, E.A. Mel'chenko // Vestnik Stavropol'skogo gosudarstvennogo universiteta 2009. no. 63. pp. 223–227.
2. Bondar', T.P. Ispol'zovanie atomno-silovoj mikroskopii dlja izuchenija morfofunkcional'nogo sostojanija jeozinofilov u bol'nyh toksokarozom / T.P. Bondar', N.M. Ishkova, E.A. Mel'chenko, A.B. Jel'kanova // Medicinskij vestnik Severnogo Kavkaza. 2010. no. 4. p.
3. Karaseva O.V., Kapustin V.A., Brjancev A.V. Laparoskopicheskie operacii pri abscedirujushhijh formah appendikuljarnogo peritonita u detej // Detskaja hirurgija. 2005. no. 3. pp. 25–29.
4. Lugovskaja S.A., Morozova V.T., Pochtar' M.E., Dolgov V.V. Laboratornaja gematologija. M.: Izd-vo JuNIMEDpress, 2002. 120 p.
5. Novickij, V.V. Molekuljarnye mehanizmy narushenija vzaimodejstvija jeffekturnykh kletok krovi pri patologii infekcionnoj i neinfekcionnoj prirody / V.V. Novickij, N.V. Rjazanceva, L.S. Litvinova // Bjulleten' Sibirskogo otdelenija RAMN. 2008. № 4. S. 36-47.
6. Poletaeva, O.G. Uchet rezul'tatov immunofermentnogo analiza pri tkanevyh gel'mintozah v antitel'nyh edinicah / O.G. Poletaeva, T.V. Starkova, N.N. Krasovskaja // Medicinskaja parazitologija i parazitologicheskie bolezni. 2007. no. 1. pp. 24–26.
7. Rebrova, O.Ju. Statisticheskij analiz medicinskih dannyh / O.Ju. Rebrova. M., 2006. 312 p.
8. Bruno Ramalho de Carvalho; Augusto Diogo-Filho; Cleiton Fernandes; Cristiane Borges Barra Leucograma, proteina C reativa, alfa-1 glicoproteina ácida e velocidade de hemossedimentação na apendicite aguda // Arquivos de Gastroenterologia. 2003. vol. 40 no. 1
9. Gerald D.G. Brennan Pediatric appendicitis: pathophysiology and appropriate use of diagnostic imaging // Canadian journal of emergency medicine. 2006. no. 8(6) pp. 425–432.

Рецензенты:

Чеботарев П.А., д.м.н., доцент, зав. кафедрой безопасности жизнедеятельности и охраны труда Полоцкого государственного университета, г. Новополоцк;

Суворова К.Н., д.м.н., профессор-консультант медицинского Центра «Ваша клиника» ООО «БелМедИнвест», г. Москва.

Работа поступила в редакцию 18.07.2013.