

**ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОДЕНСИТОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АКТИВНОСТИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭСТЕРАЗЫ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ У ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН И С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

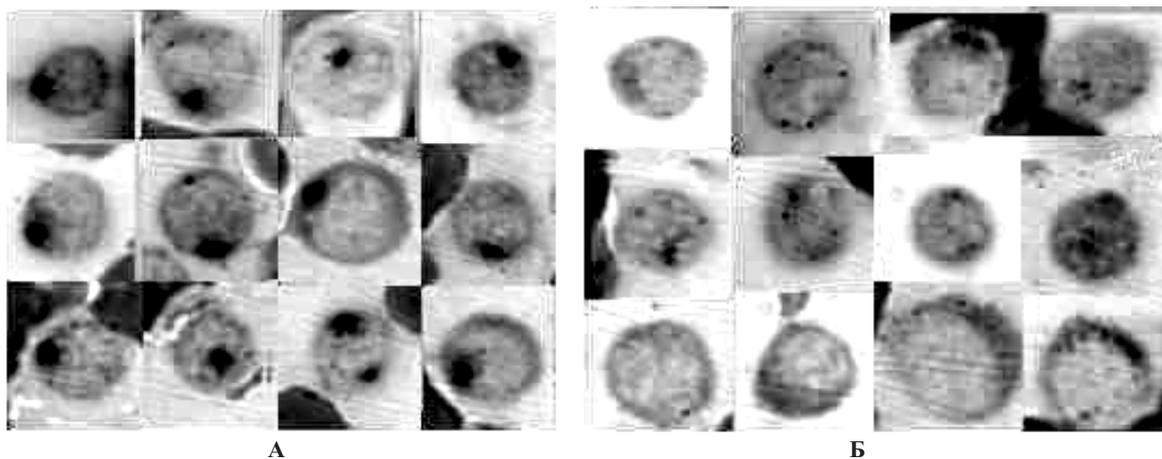
**С.Г. Кадричева, А.А. Савченко\***

*С помощью метода компьютерной морфоденситометрии исследована активность неспецифической эстеразы (НЭ) в лимфоцитах у женщин, здоровых и больных аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) и диффузным токсическим зобом (ДТЗ). Установлено, что у женщин с ДТЗ в лимфоцитах повышение активности НЭ определяется как синтезом фермента, так и его активацией, а в группе больных АИТ обуславливается только синтезом.*

**Введение**

Биохимия эстераз очень сложна, но в цитохимии термином “неспецифическая эстераза” обычно обозначают ферменты, способные гидролизовать простые эфиры N-свободных спиртов и органических кислот [3,10,11]. Неспецифические эстеразы (НЭ) являются лизосомальными ферментами. Эстеразы могут осуществлять различные функции в разных типах лейкоцитарных клеток. В гранулоцитах НЭ обеспечивают протеолитическую и переваривающую функцию. Эстеразная активность Т-лимфоцитов имеет отношение к киллерной функции Т-клеток [8].

Между тем, любой метаболический процесс находится под строгим контролем нейроэндокринной системы. Вне зависимости от характера влияния внешних (стресс, физическая нагрузка, голодание, охлаждение) или внутренних (медиаторы и гормоны) факторов и механизмов их действия, эффекторным звеном выражения их дей-



**Рис. 1. Видеоархивы лимфоцитов с локальным (А) и диффузным (Б) распределением активности НЭ (Компьютерное изображение. Увеличение микроскопа об. гт 100, оп. гт 2,5. Программное увеличение в 6 раз).**

ствия являются различные ферменты, в том числе и участвующие в липидном обмене [3]. Следовательно, уровень активности НЭ может определяться не только типом клетки, но медиаторным и гормональным состоянием организма.

Аутоиммунные заболевания эндокринной системы, в частности аутоиммунный тиреоидит (АИТ) и диффузный токсический зоб (ДТЗ), сопровождаются не только нарушениями иммуноэндокринных взаимосвязей, но и значительными изменениями гормонально-медиаторного фона [2,9]. Вследствие этого в лимфоцитах, имеющих богатый набор рецепторов, происходит перестройка метаболизма, затрагивающая, в том числе, и липидный обмен.

Цитохимический метод до сих пор применяется для изучения активности НЭ в лимфоцитах [6,11]. Метод прост в выполнении, однако выражение результатов происходит качественным образом по типу распределения цитохимических гранул. Нами для анализа результатов цитохимического анализа НЭ использован метод компьютерной морфоденситометрии. Этот метод основан на цифровой обработке изображений, что позволяет объективизировать исследования и выражать результаты в строгих количественных значениях [1,5,7]. Целью работы явилось

\* © С.Г. Кадричева, А.А. Савченко, 2003; Красноярский государственный университет

исследование с помощью метода компьютерной морфоденситометрии активности НЭ в лимфоцитах крови у женщин с АИТ и ДТЗ.

**Методика**

На базе Краевого эндокринологического центра при Краевой клинической больнице № 1 обследовано 35 больных АИТ женщины и 30 женщин с ДТЗ. В качестве контроля обследовано 55 здоровых женщин. Возраст всех обследуемых составил от 20 до 45 лет. Диагноз АИТ и ДТЗ выставлялся на основании клинических данных, результатов ультрасонографии щитовидной железы, по анализу концентрации тиреоидных гормонов и антител к микросомальному антигену тиреоцитов.

Активность НЭ в лимфоцитах крови человека определяли модифицированным методом Higgy et al. [4,8]. Для оценки активности НЭ применяется метод компьютерной морфоденситометрии [7]. Для проведения измерений сначала вводится изображение, то есть осуществляется вывод исходного изображения с телевизионной камеры, соединенной с микроскопом, на монитор. При этом получается оцифрованное исходное изображение анализируемого препарата – массив чисел, полученный по яркости исходного изображения. Из введенного фрагмента препарата выделяется интересующий объект, то есть лимфоцит с гранулами продукта ферментативной реакции НЭ. В результате последовательного повторения этой операции составляется видеоархив препарата (рис.1).

Далее проводятся измерения заданных параметров: площадь (S), периметр (P), фактор формы (FF), оптическая плотность гранул (OD), усредненные расстояния между гранулами по осям X и Y (Rx и Ry), интегральная оптическая плотность (IOD). С помощью камеры Горяева нами произведен пересчет количественных параметров геометрических величин. Исходя из этого, морфологические параметры представлены в метрических величинах.

Определение концентраций тиреотропного гормона (ТТГ), трийодтиронина (Т<sub>3</sub>), общего тироксина (Т<sub>4</sub>) и свободного тироксина (FT<sub>4</sub>) в крови определялось радиоиммунологическими методами с использованием тест-наборов производства «Immunotech» (Чешская Республика). Содержание антител к микросомальной фракции тиреоцитов (АВТМА) в сыворотке крови определялось иммуноферментным методом с помощью тест-наборов производства «Мультитест» (Россия) (норма: 0 – 20 Е/мл).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием критерия Манна-Уитни с помощью пакета прикладных программ SPSS 8.0. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент корреляции по Пирсону.

**Результаты и обсуждение**

Обнаружено, что 12,0 ± 1,3 % лимфоцитов крови здоровых женщин содержат локализованную окраску на НЭ, то есть 1 - 2 крупные, близко расположенные гранулы (рис.1А), в то время как 36,2 ± 1,9 % - диффузную (рис.1Б) и 50,7 ± 2,6 % иммунокомпетентных клеток реагируют отрицательно.

Морфоденситометрические параметры цитохимических гранул, образованных в ходе ферментативной реакции НЭ, в лимфоцитах крови здоровых женщин с локальным и диффузным распределением активности представлены в табл.1. Обнаружено, что в лимфоцитах здоровых женщин с диффузным распределением активности НЭ по сравнению с клетками с локальным распределением активности фермента ниже площадь, периметр, оптическая плотность и, как следствие, интегральная оптическая плотность цитохимических гранул. Кроме того, в иммунокомпетентных клетках здоровых женщин с диффузным распределением активности НЭ относительно лимфоцитов с локальным распределением активности фактор формы цитохимических гранул выше, а расстояние по оси Y – ниже.

Площадь и периметр гранул продукта реакции количественно характеризуют фермент, по оптической плотности можно судить об уровне активности НЭ. Следовательно, интегральная оптическая плотность наиболее полно

Таблица 1

**Морфоденситометрические параметры активности НЭ в лимфоцитах крови здоровых женщин (X ± m)**

Показатели	Лимфоциты с локальным распределением активности N=49	Лимфоциты с диффузным распределением активности N=55	P
S, мкм <sup>2</sup>	0,78±0,07	0,43±0,03	<0,001
P, мкм	4,77±0,37	2,57±0,14	<0,001
FF, о.е.	0,85±0,02	0,94±0,01	<0,001
OD, о.е.п.	15,93±0,28	12,1±0,32	<0,001
Rx, (мкм)	0,60±0,08	0,50±0,07	<0,1
Ry, мкм	0,69±0,09	0,49±0,07	
IOD, пиксель <sup>2</sup> г о.е.п.	1402,18± 115,83	744,57± 48,05	<0,001

Морфоденситометрические параметры активности НЭ в лимфоцитах крови больных АИТ и ДТЗ ( $X \pm m$ )

Показатели	Лимфоциты с локальным распределением активности	Лимфоциты с диффузным распределением активности	Р
Больные АИТ			
	N=26	N=34	
S, мкм <sup>2</sup>	0,78±0,07	0,43±0,03	<0,001
P, мкм	4,77±0,37	2,57±0,14	<0,001
FF, о.е.	0,85±0,02	0,94±0,01	<0,001
OD, о.е.п.	15,93±0,28	12,1±0,32	<0,001
Rx, (мкм)	0,60±0,08	0,50±0,07	<0,1
Ry, мкм	0,69±0,09	0,49±0,07	
IOD, пиксель <sup>2</sup> /о.е.п.	1402,18±115,83	744,57±48,05	<0,001
Больные ДТЗ			
	N=20	N=28	
S, мкм <sup>2</sup>	1,19±0,14	0,85±0,13	<0,1
P, мкм	6,05±0,77	4,38±0,51	<0,1
FF, о.е.	0,78±0,04	0,89±0,01	K<0,01
OD, о.е.п.	17,84±0,62	13,47±0,66	K<0,001
Rx, (мкм)	0,45±0,12	0,79±0,14	<0,1
Ry, мкм	0,47±0,13	0,82±0,13	<0,1
IOD, пиксель <sup>2</sup> /о.е.п.	2522,25±252,16	1193,01±151,78	K<0,001

характеризует общую активность НЭ в клетке. Поскольку НЭ является лизосомальным ферментом, то усредненные расстояния между гранулами позволяют характеризовать как внутриклеточное расположение данных оргanelл, так и их количество. Отражением одиночного расположения гранул продукта реакции в клетке служит значение фактора формы, близкое или равное 1 (1 соответствует форме правильного круга).

В сыворотке крови здоровых определяемые значения концентраций тиреоидных гормонов находятся в пределах нормы. У 70 % женщин контрольной группы концентрация АВТМА колеблется в пределах от 1 до 11 Е/мл.

С помощью корреляционного анализа обнаружены взаимосвязи концентрации АВТМА в сыворотке крови здоровых женщин и морфоденситометрических параметров активности НЭ в лимфоцитах с локальной активностью: с фактором формы ( $r=-0,60$ ,  $P<0,05$ ), с интегральной оптической плотностью гранул продукта реакции ( $r=0,57$ ,  $P<0,05$ ). Также выявлены корреляционные связи между концентрацией свободного тироксина в сыворотке крови здоровых с относительным содержанием лимфоцитов с диффузной и отрицательной активностью НЭ ( $r=-0,47$ ,  $P<0,05$  и  $r=0,49$ ,  $P<0,05$ , соответственно), между уровнем общего тироксина и количеством иммунокомпетентных клеток с диффузной реакцией НЭ ( $r=0,50$ ,  $P<0,05$ ), с интегральной оптической плотностью гранул продукта НЭ в лимфоцитах с диффузной активностью ( $r=-0,44$ ,  $P<0,05$ ). В целом, по результатам корреляционного анализа можно заключить, что популяции лимфоцитов с локальной и диффузной активностью НЭ во взаимосвязи с тиреоидным статусом крови ведут себя как отдельные популяции иммунокомпетентных клеток.

В крови женщин с АИТ содержание лимфоцитов с локальной активностью НЭ составило  $24,7 \pm 4,2$  %, что статистически достоверно выше среднестатистических значений у здоровых женщин ( $P<0,01$ ). Относительное содержание лимфоцитов с диффузной локализацией НЭ составило  $38,5 \pm 3,1$  %, тогда как с отрицательной реакцией –  $36,8 \pm 5,4$  %, что достоверно ниже выявляемого уровня здоровых женщин ( $P<0,05$ ).

Обнаружены отличия между морфоденситометрическими параметрами гранул продукта НЭ в лимфоцитах крови больных АИТ с локальным и диффузным распределением активности (табл.2). Необходимо отметить, что все выявленные различия между параметрами активности НЭ в исследуемых популяциях иммунокомпетентных клеток однонаправлены с таковыми в контрольной группе.

Также обнаружено, что в лимфоцитах больных АИТ морфоденситометрические параметры гранул, образованных в ходе реакции НЭ, отличаются от аналогичных показателей группы здоровых (табл.1 и 2). Причем все выявленные изменения в морфоденситометрических параметрах НЭ лимфоцитов крови женщин с АИТ по сравнению со здоровыми однозначно отражает выраженную активацию катаболического фермента. Так, в лимфоцитах с диффузным распределением активности НЭ наблюдается увеличение площади ( $P<0,05$ ), периметра ( $P<0,05$ ) цитохимических гранул. Повышение усредненных расстояний между гранулами продукта реакции по осям X и Y

( $P < 0,001$  и  $P < 0,05$ , соответственно) отражает равномерное распределение гранул по всей клетке, в то время как в лимфоцитах здоровых женщин чаще встречаются конгломераты гранул.

Выявляются различия и в величинах морфоденситометрических параметров гранул, образованных в результате ферментативной реакции НЭ, в лимфоцитах с локальным распределением активности. В данной популяции клеток у больных АИТ также видно увеличение площади ( $P < 0,001$ ), периметра ( $P < 0,01$ ) и, соответственно, интегральной оптической плотности ( $P < 0,01$ ) цитохимических гранул. Однако различий по усредненному расстоянию между гранулами у здоровых женщин и больных АИТ не зафиксировано. Данный факт определяется тем, что в лимфоцитах с локальным распределением активности НЭ выявляются преимущественно 1 – 2 близко расположенные гранулы.

В сыворотке больных АИТ повышена концентрация ТТГ ( $P < 0,05$ ), снижено содержание  $T_4$  ( $P < 0,05$ ) и  $FT_4$  ( $P < 0,05$ ), также увеличен уровень АВТМА до  $73,31 \pm 9,38$  Е/мл ( $P < 0,001$ ).

По-видимому, вследствие изменения гормонального статуса и нарушения иммуноэндокринных взаимосвязей в группе больных АИТ выявлена лишь одна корреляционная связь: концентрации АВТМА в сыворотке с усредненным расстоянием по оси X между гранулами продукта НЭ в лимфоцитах с локальной окраской ( $r = 0,49$ ,  $P < 0,05$ ).

Распределение лимфоцитов женщин с ДТЗ по характеру окраски на НЭ статистически не отличается от таковой группы контроля:  $16,0 \pm 3,4$  % лимфоцитов с локальной,  $36,94 \pm 3,02$  % - с диффузной,  $47,04 \pm 4,62$  % - с отрицательной активностью фермента.

В иммунокомпетентных клетках больных ДТЗ с локальным и диффузным распределением активности НЭ установленные различия по величинам площади, периметра, фактора формы, оптической плотности и интегральной оптической плотности гранул продукта реакции совпадают с обнаруженной тенденцией в группах контроля и больных АИТ (табл.2). В лимфоцитах больных ДТЗ с диффузной окраской на НЭ, по сравнению с клетками с локальной, ниже площадь, периметр, оптическая плотность и интегральная оптическая плотность, выше фактор формы гранул. Однако в данной группе больных обнаружены отличия по усредненным расстояниям между гранулами продукта реакции по осям X и Y: в клетках с диффузной активностью данные параметры выше. Следовательно, несмотря на общие для всех обследуемых групп особенности морфоденситометрических параметров активности НЭ, в зависимости от характера окраски лимфоцитов, для иммунокомпетентных клеток больных ДТЗ специфично различие по распределению гранул продукта реакции. А именно, в лимфоцитах женщин с ДТЗ гранулы располагаются в большей степени по всей клетке с диффузной активностью, по сравнению с лимфоцитами с локальной окраской.

При ДТЗ в лимфоцитах женщин также обнаружена активация НЭ относительно группы здоровых (табл. 1 и 2). Так, в лимфоцитах с диффузным распределением активности НЭ выявляется увеличение площади ( $P < 0,001$ ), периметра ( $P < 0,001$ ), оптической плотности ( $P < 0,01$ ) и, как следствие, интегральной оптической плотности ( $P < 0,01$ ) цитохимических гранул. Повышение усредненных расстояний между гранулами продукта реакции НЭ по осям X и Y ( $P < 0,05$  и  $P < 0,05$ , соответственно) и снижение фактора формы ( $P < 0,01$ ) гранул отражают равномерное распределение конгломератов гранул по всей клетке.

Выявляются различия и в величинах морфоденситометрических параметров гранул, образованных в результате ферментативной реакции НЭ, в лимфоцитах с локальным распределением активности у здоровых женщин и больных ДТЗ. В данной популяции клеток у женщин с ДТЗ также обнаружено увеличение площади ( $P < 0,01$ ), периметра ( $0,1 > P > 0,05$ ), оптической плотности ( $P < 0,01$ ) и, соответственно, интегральной оптической плотности ( $P < 0,001$ ) цитохимических гранул. При этом различий по усредненному расстоянию между гранулами у здоровых женщин и больных ДТЗ не найдено, так как в лимфоцитах с локальным распределением активности НЭ присутствуют преимущественно 1 – 2 крупные гранулы. Причем цитохимические гранулы располагаются близко, о чем свидетельствует снижение фактора формы в лимфоцитах с локальным распределением активности НЭ больных ДТЗ ( $0,1 > P > 0,05$ ).

Обнаружено, что в группе женщин с ДТЗ снижено содержание ТТГ ( $P < 0,001$ ), повышены концентрации  $T_3$  ( $P < 0,001$ ),  $T_4$  ( $P < 0,001$ ) и  $FT_4$  ( $P < 0,001$ ). К тому же в сыворотке крови больных ДТЗ выше уровень АВТМА, по сравнению с контролем ( $108,75 \pm 30,04$ ,  $P < 0,001$ ).

В группе больных ДТЗ с применением корреляционного анализа по Пирсону обнаружены связи концентрации АВТМА с оптической плотностью и интегральной оптической плотностью гранул продукта реакции в лимфоцитах с диффузной окраской НЭ ( $r = -0,87$ ,  $P < 0,01$  и  $r = -0,76$ ,  $P < 0,05$ , соответственно).

Следовательно, НЭ в лимфоцитах больных АИЗЩЖ активирована по сравнению с контрольной группой. При этом анализ морфоденситометрических параметров активности НЭ в лимфоцитах женщин с АИЗЩЖ выявил более высокую активность фермента в иммунокомпетентных клетках больных ДТЗ.

Необходимо отметить, что в лимфоцитах с диффузной реакцией больных АИТ повышенная активность НЭ определяется синтезом фермента (S и P), а у женщин с ДТЗ – как синтезом, так и более высокой активностью, вследствие чего статистически достоверно увеличены, кроме площади и периметра гранул, их оптическая плотность и интегральная оптическая плотность. К тому же в лимфоцитах с диффузным распределением активности

НЭ женщин с ДТЗ относительно группы больных АИТ повышены площадь ( $0,1 > P > 0,05$ ), периметр ( $0,1 > P > 0,05$ ), оптическая плотность ( $0,1 > P > 0,05$ ) и, следовательно, интегральная оптическая плотность ( $P < 0,01$ ), но снижен фактор формы гранул ( $P < 0,01$ ). Следовательно, у больных ДТЗ в лимфоцитах увеличена активность НЭ по сравнению данной популяцией иммунокомпетентных клеток женщин с АИТ.

Таким образом, с использованием компьютерного морфоденситометрического анализа исследована активность НЭ в лимфоцитах крови здоровых женщин, больных АИТ и ДТЗ. Так в лимфоцитах женщин как здоровых, так и больных аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы с диффузным распределением по сравнению с популяцией клеток с локальным распределением активности НЭ, ниже синтез фермента, сопровождающийся меньшей его активностью. С помощью морфоденситометрического анализа установлено, что в иммунокомпетентных клетках с локальной и диффузной реакцией НЭ больных аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы выше активность фермента, относительно контрольной группы. Причем у женщин с ДТЗ в лимфоцитах с локальной и диффузной реакцией повышение активности НЭ определяется как синтезом фермента, так и его активностью, а в группе больных АИТ обуславливается только синтезом. Поэтому неудивительно более высокая активность НЭ в лимфоцитах крови с диффузной реакцией больных ДТЗ. В связи с нарушением иммуноэндокринных взаимоотношений вследствие изменения гормонального фона обнаружена трансформация корреляционных связей между уровнем тиреоидных гормонов, АВТМА и параметрами активности НЭ у больных ДТЗ и АИТ.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРА**

1. Автандилов Г.Г., Григорьева С.Г. Оценка плоидности ядер клеток железистого и протокового эпителия молочной железы при диагностике стадий канцерогенеза// Клин. лаб. диагн.-2001.-№8.-С.10-14.
2. Благодосклонная Я.В., Кетлинский С.А., Красильникова Е.И. и др. Содержание фактора некроза опухоли 2 и интерлейкина 1 в сыворотке крови пациентов при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы//Пробл. эндокринологии.-1998.-Т.44, №4.-С.22-24.
3. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия.-М.:Высш. шк., 1998.-479 с.
4. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике.-М.:Медицина, 1987.
5. Нарциссов Р.П. Анализ изображения клетки – следующий этап развития клинической цитохимии в педиатрии// Педиатрия.-1998.-№4.-С.101-105.
6. Робинсон М.В., Труфакин В.А. Активность неспецифической эстеразы в лимфоцитах мышей при экспериментальном аутоиммунном процессе//Бюлл. СО АМН.-1987.-№ 2.-С.29-31.
7. Славинский А.А., Никитина Г.В. Компьютерный анализ изображения нейтрофильных лейкоцитов: нафтол-AS-D-хлорацетат-эстераза//Клин. лаб. диагн.-2000.-№5.-С.34-37.
8. Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия.-М.:Медицина, 1983.-320 с.
9. Ширинский В.С. Аутоиммунные заболевания: проблемы патогенеза, диагностики и лечения//Russian Journal of Immunology.-1999.-Vol.4, №1.-P.127-130.
10. Calore E.E., Sesso A., Puga F.R. et al. Sarcoplasmic lipase and non-specific esterase inhibition in myofibers of rats intoxicated with the organophosphate isofenphos//Exp. Toxicol. Pathol.-1999.-Vol.51, № 1.-P.27-33.
11. Cook F., Eales L.J. Flow cytometric measurement of non-specific esterase activity//J.Immunol.Methods.-1994.-Vol.168, №2.-P.203-208.

### **THE CHARACTERISTICS OF MORPHODENSITOMETRIC PARAMETERS OF THE ACTIVITY OF NON-SPECIFIC ESTERASE IN BLOOD LYMPHOCYTES IN HEALTHY FEMALES AND IN AUTOIMMUNE DISEASES OF THYROID GLAND PATIENTS**

**S.G. Kadritcheva, A.A. Savchenko**

#### **ABSTRACT**

*Using the technique of computer morphodensitometry we studied the activities of non-specific esterase (NE) in blood lymphocytes in healthy females and in autoimmune thyroiditis (AIT) and Grave's disease (GD) female patients. We revealed that for the women with GD in lymphocytes the increase of NE activity is determined both synthesis of an enzyme, and its activation. In AIT group higher NE activity was caused only by synthesis.*