

УДК 616.248(-036.224):54-128.4(Ca+Na)

ЦИТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛОКАЛИЗАЦИИ КАТИОНОВ КАЛЬЦИЯ И НАТРИЯ В КЛЕТКАХ ИНДУЦИРОВАННОЙ МОКРОТЫ И БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОЙ ЛАВАЖНОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ**С.В.Зиновьев¹, Г.В.Семенова², С.С. Целуйко¹, С.Д.Чжоу³, Ц.Ли³**¹Амурская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ,
675000, г. Благовещенск, ул. Горького, 95²Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАМН,
675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22³Вторая госпитальная клиника Чунцинского медицинского университета, КНР,
400010, г. Чунцин, ул. Линьцзян, 76**РЕЗЮМЕ**

Цель исследования – оценка информативности выявления катионов кальция и натрия в клетках и микроорганизмах в мазках индуцированной мокроты и бронхоальвеолярной лаважной жидкости у больных бронхиальной астмой. Изучены цитохимические характеристики клеточных элементов в мазках индуцированной мокроты и бронхоальвеолярной лаважной жидкости, полученных у 100 пациентов с бронхиальной астмой в зимнее время года. В результате исследования в мазках обнаружены эозинофильные лейкоциты в количестве от 3 до 70 в 1 поле зрения, отмечается очень низкое содержание бокаловидных клеток с отношением к клеткам цилиндрического бронхиального эпителия менее 1:20. Насыщенным спиртовым раствором ализаринового красного С (pH≤4) окрашиваются гранулы клеток плоского эпителия ротовой полости, гранулы эозинофильных лейкоцитов, ядра и участки цитоплазмы части альвеолярных макрофагов, ядро и цитоплазма нейтрофильных лейкоцитов, лимфоцитов. Ализарин интенсивно окрашивает ядра и апикальную часть клеток десквамированного цилиндрического эпителия. При деструкции клеток в мазках обнаруживаются полиморфные клетки диаметром 4–6 мкм, их цитоплазма диффузно окрашена ализарином, клетки содержат неокрашенный разреженный хроматин, а так же от 2 до 5 окрашенных ализарином ядрышек. При окрашивании мазков индуцированной мокроты и бронхоальвеолярной лаважной жидкости антимоном осмия отмечается локализация катионов натрия в области контактов микроорганизмов с липидами. Ализарин красный С окрашивает продукты кристаллизации бронхоальвеолярного лаважного в цитологических мазках.

Ключевые слова: индуцированная мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, эозинофильные лейкоциты, макрофаги, микробы.

SUMMARY

CYTOCHEMICAL FEATURE OF LOCATION OF CALCIUM AND SODIUM CATIONS IN CELLS OF INDUCED SPUTUM AND BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

S.V.Zinov'ev¹, G.V.Semenova², S.S.Tseluyko¹, X.D.Zhou³, Q.Li³¹Amur State Medical Academy, 95 Gor'kogo Str.,
Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation²Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration of Siberian Branch RAMS,
22 Kalinina Str., Blagoveshchensk,
675000, Russian Federation³The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, 76 Linjiang Road,
Chongqing, 400010, China

The aim of the research is to estimate the informative value of identification of calcium and sodium cations in cells and microorganisms in the swab of induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid in patients with bronchial asthma. Cytochemical characteristics of cell elements in the swab of induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid obtained from 100 patients with bronchial asthma during winter were studied. Eosinophils leukocytes in the number from 3 till 70 in sight were found in the swab. There was very low content of goblet cells with the ratio to the cells of cylindrical bronchial epithelium 1:20. The cells granules of squamous epithelium of the oral cavity, granules of eosinophils leucocytes, nuclei and sections of cytoplasm of alveolar macrophages part, the nuclei and cytoplasm of neutrophilic leucocytes and lymphocytes were painted with saturated alcohol solution of alizarin red C (pH≤4). Alizarin paints the nuclei and apical part of cells of desquamated cylindrical epithelium intensively. At destruction of cells polymorphic cells with the diameter of 4–6 mkm are found in the swab, their cytoplasm is painted with alizarin diffusively, the cells have unpainted rare chromatin and from 2 till 5 nuclei painted with alizarin. At painting of induced sputum swab and bronchoalveolar lavage fluid with osmium antimonate there is localization of sodium cations in the region of contacts with lipid microorganisms. Alizarin red C paints the products of crystallization of bronchoalveolar lavage in cytological swab.

Key words: induced sputum, bronchoalveolar lavage, eosinophils leukocytes, macrophages, microbes.

В настоящее время установлено, что дегидратация тканей слизистых оболочек, обусловленная нарушением функции ионных каналов, является одним из ведущих патогенетических механизмов развития

хронических заболеваний легких в случае общего охлаждения организма [6]. При исследовании кристаллографических маркеров сезонных особенностей дегидратации слизистой оболочки носовой полости и активности ионных каналов клеточных мембран, было обнаружено взаимодействие катионов натрия и кальция с аминокруппами биомолекул при формировании метиленовых мостиков с не клеточной частью назального секрета в момент фиксации цитологических мазков в парах формалина [7]. Ввиду этого обращает на себя внимание тот факт, что в отличие от метода Мак-Ги-Рассела, спиртовой раствор ализаринового красного С ($pH \leq 4$), а так же антимоанат дифференцировано окрашивают ядро и цитоплазму клеток крови и легких экспериментальных животных [4, 5]. При этом остается недостаточно изученной клинико-лабораторная информативность обнаруженных нами закономерностей цитохимического окрашивания клеток органов дыхания у человека.

Целью настоящей работы являлась оценка информативности выявления катионов кальция и натрия в клетках и микроорганизмах в мазках бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) и индуцированной мокроты (ИМ) у больных бронхиальной астмой (БА).

Материалы и методы исследования

Исследование проведено с учетом требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации с соблюдением этических принципов проведения научных медицинских исследований с привлечением человека и в соответствии с Правилами клинической практики в Российской Федерации. Исследование одобрено этическим комитетом Амурской государственной медицинской академии.

Изучена изотоническая БАЛЖ, полученная во время бронхоскопии, у 100 пациентов с комбинированной и эндогенной БА в зимнее время года. БАЛЖ центрифугировали при 800 об/мин в течение 10-15 минут. Надосадочную жидкость отсасывали пипеткой. Осадок клеток ресуспендировали в 300 мкл изотонического физиологического раствора. После проведения холодного теста на гиперреактивность дыхательных путей [7], в зимний период времени года в целях получения ИМ проводилась ингаляция гипертонического раствора натрия хлорида у 30 пациентов с БА [1]. При изготовлении мазков из мокроты мы пропускали этап центрифугирования. В целях изготовления мазка наносили 50 мкл клеточной взвеси на предметное стекло, предварительно нагретое до $37^\circ C$. Затем с помощью стеклянной палочки изготавливали мазок округлой формы диаметром 3 см, высушивали его при температуре $37^\circ C$ в термостате. Толстые участки мазков при фиксации в метаноле сильно обезвоживаются, и клеточный материал отслаивается от предметного стекла. Поэтому использовали щадящую фиксацию в парах формалина. Мазки окрашивали по методу Романовского-Гимза. С целью цитохимического исследования ионов кальция мазки окрашивали 5% спиртовым раствором (96% этанол) ализаринового красного С ($pH \leq 4$) по оригинальной методике [4]. Цитологические мазки БАЛЖ и ИМ на предметных и покровных стеклах вы-

сушиваются на воздухе. Затем, минуя этап фиксации, мазки помещают в стеклянный стаканчик, заполненный 5% спиртовым раствором ализаринового красного С. Окраска мазков проводится при комнатной температуре на протяжении 5 минут (время определяется эмпирически). После окрашивания мазки БАЛЖ и ИМ быстро промываются в дистиллированной воде (от 5 до 10 секунд), затем мазки сушатся на воздухе, после чего микроскопируются. В целях дополнительной оценки зависимости окрашивания от pH после высушивания мазки необходимо на 5 минут поместить в пары аммиака (после чего окрашенные клеточные элементы становятся ярко-лиловыми и красными). Для исследования локализации ионов натрия мазки БАЛЖ и ИМ окрашивали пирогеоксантимонатом калия $K_2H_2Sb_2O_7 \cdot 4H_2O$ (антимоанат) [2]. Микроскопия мазков проводилась под иммерсионным объективом (Ув. 1000×1250), при этом изучалось 100 полей зрения мазка. Подсчет концентрации (цитоз) клеток в ИМ и БАЛЖ проводился в камере Горяева. После окрашивания на мазки напыляли золото, затем их исследовали с помощью растрового электронного микроскопа S-3400 Hitachi (Япония).

Результаты исследования и их обсуждение

В мазках БАЛЖ и ИМ при БА клетки плоского эпителия ротовой полости составляли от 2 до 73% от всех клеток. Эти клетки имеют диаметр 70-200 мкм, ядро и цитоплазма хорошо окрашиваются ализарином. В цитоплазме 10-40% клеток этого типа обнаруживаются крупные (1-7 мкм) окрашенные ализарином гранулы, в количестве 10-20 и более на клетку. В БАЛЖ и ИМ больных БА обнаруживаются комплексы округлых одноклеточных клеток диаметром 15-50 мкм, их цитоплазма окрашивается слабо базофильно, так как состоит из агрегированных базофильных гранул с размытыми краями размером 0,2-0,3 мкм. В цитоплазме содержатся пылевидные включения коричнево-золотистого цвета. Они хорошо видны при окрашивании мазков ализарином и антимоанатом. В тонких участках мазка наблюдается вакуолизация цитоплазмы макрофагов, которая приводит к разрушению цитоплазмы. Ядро макрофагов округлой формы, многоклеточные макрофаги составляют 1-2%. У 70% больных БА обнаруживаются скопления клеток округлой формы, с неокрашенной ализарином цитоплазмой и ядром, диаметр клеток 15-50 мкм, в цитоплазме содержатся пылевидные включения коричнево-золотистого цвета (рис. 1).

В части клеток альвеолярных макрофагов, напротив, окрашивается ализарином ядро, цитоплазма этих клеток окрашена слабо (рис. 2). Особенности цитохимической реакции в другой части макрофагальных клеток могут быть обусловлены кариорексисом, ядро макрофага, окрашенное ализарином, в данном случае располагается эксцентрично. Количество окрашенных ализарином макрофагальных клеток варьирует от 10 до 90% индивидуально у каждого пациента. В цитоплазме 10-20% макрофагов так же обнаруживаются гранулярно окрашенные ализарином структуры размером 0,5-2 мкм (рис. 2).

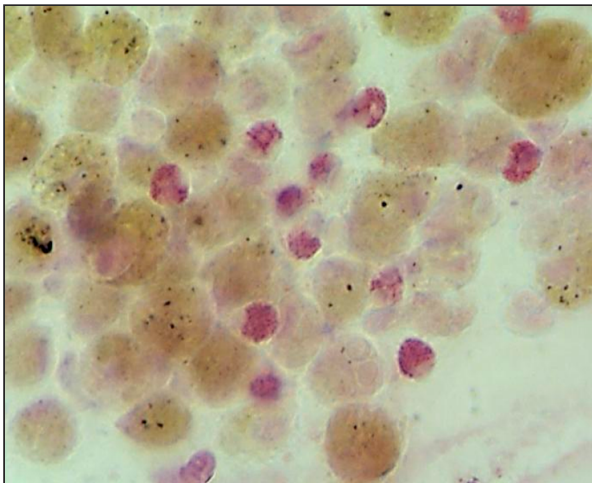


Рис. 1. Эозинофильные лейкоциты и макрофаги в БАЛЖ. Окраска: спиртовой раствор ализарин красный С. Увеличение: 1250.

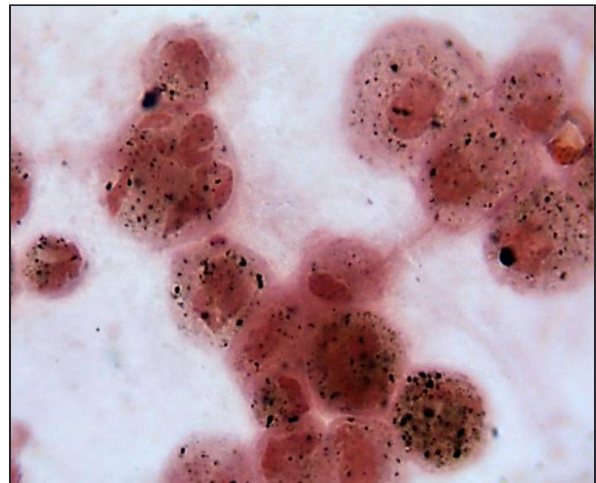


Рис. 2. Макрофаги в ИМ. Окраска: спиртовой раствор ализарин красный С. Увеличение: 1250.

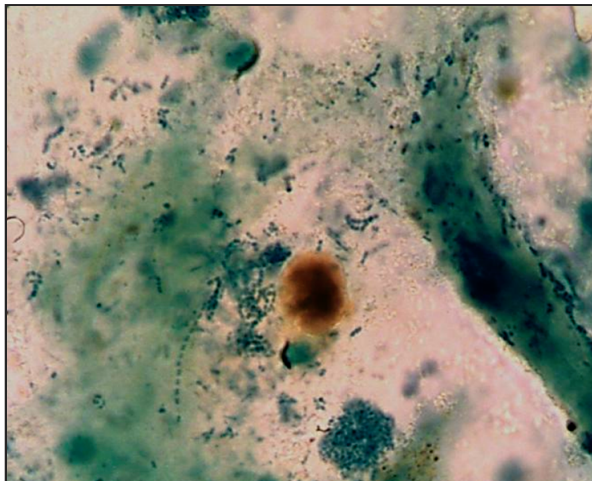


Рис. 3. Контакт микробов с липидной каплей в БАЛЖ. Окраска: антимолат осмия. Увеличение: 1250.

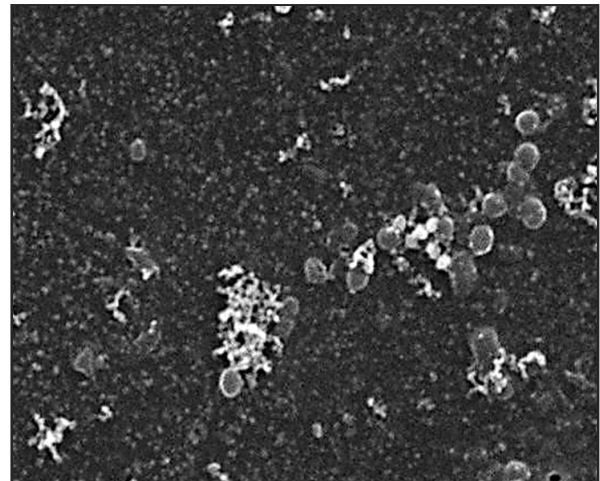


Рис. 4. Отложение катионов натрия на поверхности микробов. ИМ. Окраска: антимолат. Фиксация в парах формалина. Растровая микроскопия. Увеличение: 4010.

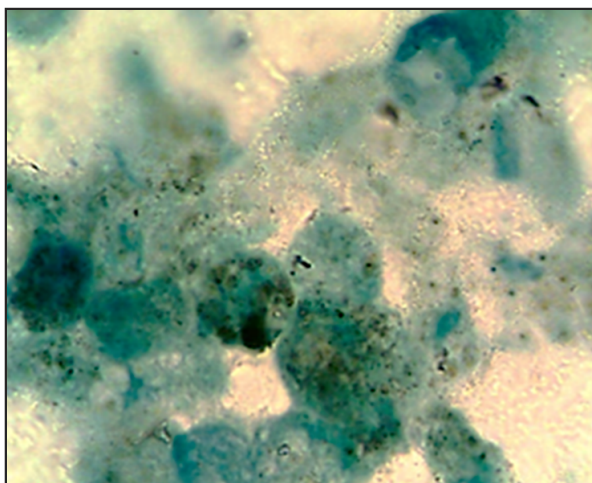


Рис. 5. Отложение антимолат в цитоплазме макрофагов. ИМ. Окраска антимолатом по Сиина, Амакава, Мудзихира, Футэсаку. Фиксация в парах формалина. Увеличение: 1250.

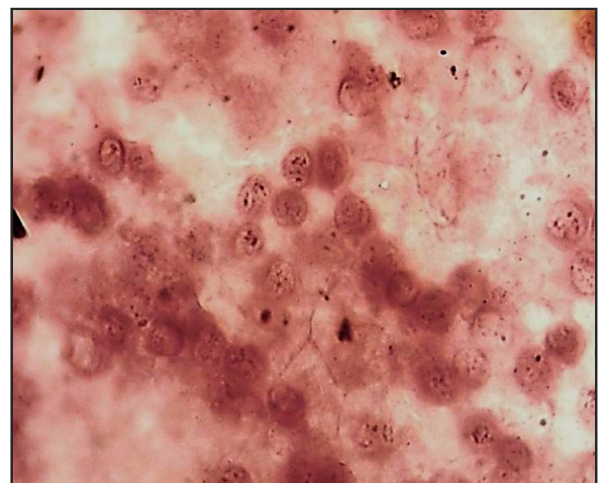


Рис. 6. Гипертрофия ядрышек в клетках легких. БАЛЖ. Окраска спиртовой р-р ализарин красный С. Увеличение: 1250.

Мы обнаружили, что в зимний период года у пациентов с БА в цитологических мазках определяются скопления эозинофильных лейкоцитов от 3 до 50 клеток в одном поле зрения. Ализарин интенсивно окрашивает гранулы эозинофильных лейкоцитов (рис. 1). Ядро эозинофильных лейкоцитов состоит из двух лопастей, или оно имеет округлую форму. Хроматин ядра эозинофильных лейкоцитов ализарином не окрашивается. Слабо окрашивается ализарином цитоплазма нейтрофильных лейкоцитов, лимфоцитов. Ядерный хроматин этих клеток, напротив, окрашивается интенсивно. У пациентов с БА отделяется скудное количество мокроты и бронхиального секрета. При введении 10 мл изотонического раствора в легкие во время сегментарного БАЛ, из легких возвращается $3,14 \pm 0,24$ мл БАЛЖ, содержащей $0,8 \pm 0,07 \times 10^6$ клеток в 1 мл. У больных БА отделяется 2-3 мл ИМ слизистого или слизисто-гнойного характера, при этом цитоз составляет $0,5-17,0 \times 10^6$ клеток в 1 мл. При БА отмечается выраженная кристаллизация бронхиального секрета на цитологических препаратах, размер кристаллов до 200 мкм. В мазках ИМ после фиксации в парах формалина присутствуют кристаллы натрия хлорида, которые прочно фиксируются к неклеточной части ИМ, так как не отмываются в случае длительного ополаскивания водой. При этом отмечается участие натрия хлорида в образовании кристаллов древовидной формы в случае дегидратации мокроты на цитологических мазках. В данном исследовании нами обнаружено окрашивание ализарином продуктов кристаллизации биологических жидкостей на цитологических мазках. При электронной микроскопии ультратонких срезов БАЛЖ у пациентов с ХОБЛ и БА установлено, что в цитоплазме макрофагов присутствуют включения липидов, липидогенных пигментов третичных лизосом [3]. В связи с этим обращает на себя внимание, тот факт, что между клеточными элементами БАЛЖ обнаруживаются свободно лежащие капли липидов (рис. 3), которые характерны для деструктивных процессов в легких. При выявлении в мазках БАЛЖ и ИМ локализации катионов натрия, в полях зрения обнаруживаются крупные скопления микроорганизмов, на поверхности которых отмечается отложение гранул антимоноата (рис. 4). Складывается впечатление, что микроорганизмы адгезируются на поверхности капель липидов, которые окрашиваются антимоноатом осмия в коричневый цвет. При этом в случае гистохимического исследования макрофагов отмечается, что антимоноат осмия дополнительно докрашивает цитоплазматические пигменты (рис. 5). Скопления клеток в толстых участках мазков ИМ и БАЛ (от 3 до 70 клеток в поле зрения) представлены макрофагами, эозинофильными лейкоцитами, голыми ядрами, а так же метаплазированными клетками многорядного цилиндрического эпителия и др. При этом в мазках обнаруживается высокий процент индекса деструкции клеток равный $0,5 \pm 0,1$. Голые ядра лейкоцитов и макрофагов появляются путем кариорексиса, который происходит во время разрушения цитоплазмы клеток. В случае цитолиза эозинофильных лейкоцитов отмечается появление безъядерных фраг-

ментов цитоплазмы, которые содержат эозинофильные гранулы. У 70% больных БА в цитограмме БАЛЖ парциальный вес цилиндрического бронхиального эпителия составляет $22,75 \pm 4,53\%$. В мазках ИМ парциальный вес клеток бронхиального цилиндрического эпителия в цитограмме выявляется от 0-4%. При этом наблюдается незначительное количество эритроцитов (0-5 в 1 поле зрения), которые окрашиваются оксифильно или слабо базофильно. В случае интенсивной деструкции в толстых участках мазка между лейкоцитами наблюдаются «голые ядра» клеток бронхиального эпителия, содержащие несколько ядрышек (от 2 до 5). При выраженной десквамации эпителия спирт-ализарин интенсивно окрашивает ядра и апикальную часть клеток цилиндрического бронхиального эпителия в красно-коричневый цвет. У небольшой части клеток цилиндрического эпителия ализарином окрашиваются ядрышки, от 2 до 5. Ранее при исследовании периферической крови мы обнаружили, что формалин блокирует окрашивание клеток ализарином [4]. В то же время, если миновать этап фиксации, при окрашивании в спиртовом растворе ализарина клетки окрашены хорошо. В связи с чем возникает предположение, что реакция Борнтрегера способствует формированию лака ализарина с кальцием. При этом при $pH < 4$ окрашивается цитоплазма лейкоцитов, а при $pH \geq 4,1-4,3$ окрашивается ядро клеток (спирт-ализарин забуферен аммиаком). В данном исследовании подтверждается факт того, что ализарин избирательно окрашивает оксифильный материал гранул эозинофильных лейкоцитов, а так же ядра клеток. Результаты настоящего исследования подтверждают наличие кальций-зависимых механизмов в ядерном аппарате клеток легких. Ранее мы обнаружили, что азотнокислое серебро в препаратах БАЛЖ пациентов с ХОБЛ окрашивает ядрышковые организаторы клеток, а также диффузно окрашивает цитоплазму и ядро клеток цилиндрического эпителия, макрофагов [3]. При изучении толстых участков мазка БАЛЖ, при активном цитолизе появляются голые ядра клеток овальной формы и размером более 6-8 мкм, в которых ализарин выявляет от 2 до 5 ядрышек (рис. 6). Умеренная реакция ядрышек (от 2 до 4) на ализарин выявляется в маленьких полиморфных клетках диаметром 4-6 мкм, с диффузным окрашиванием ализарином узкого ободка цитоплазмы. В цитологических мазках ИМ и БАЛЖ, окрашенных по Романовскому-Гимза, так же обнаруживаются маленькие полиморфные клетки размером 4-6 мкм, имеющие отростки с базофильной цитоплазмой, маленькими ядрышками, с прозрачной структурой хроматина.

Результаты настоящего исследования уточняют сезонные особенности клеточного профиля БАЛЖ и ИМ у пациентов с БА. Мы обнаружили, что в зимний период времени у 80% обследованных пациентов в цитологических мазках обнаруживаются скопления эозинофильных лейкоцитов от 3 до 50 клеток. Во всех исследованных нами случаях отмечается низкое содержание бокаловидных клеток в цитологических мазках, их отношение к клеткам цилиндрического эпителия составляет 1:20. Поэтому, учитывая данные литературы

[7], обращает на себя внимание способность антимононота к окрашиванию специфических пигментов в цитоплазме макрофагов а так же липидов и экзоматрикса микроорганизмов в цитологических препаратах ИМ и БАЛЖ, что указывает на актуальность данных о том, что антимононат способен стимулировать ионные каналы микробов и клеток человека [8].

Выводы

1. В зимний период времени в БАЛЖ и ИМ больных БА увеличивается содержание эозинофильных лейкоцитов, имеющих в цитоплазме окрашенные спирт-ализарином гранулы.

2. Способ цитохимического окрашивания спирт-ализарином клеток в БАЛЖ и ИМ пациентов с БА объективизирует патологическую экспрессию ядрышковых генов, для которых характерна аргирофилия ядрышковых организаторов и увеличение количества ядрышек от 2 до 5 в клетке.

3. При окрашивании антимононатом осмия мазков БАЛЖ и ИМ отмечается локализация катионов натрия в области контактов микроорганизмов с липидами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеев С.Н., Анаев Э.Х., Чучалин А.Г. Применение метода индуцированной мокроты для оценки интенсивности воспаления дыхательных путей // Пульмонология. 1998. №2. С.81–87.

2. Гайер Г. Электронная гистохимия. М.: Мир, 1974. 488 с.

3. Зиновьев С.В., Козлова В.С. Цитологическая характеристика парциального состава клеток бронхоальвеолярного лаважа // Вестн. новых мед. технологий. 2010. Т.17, №2. С.194–195.

4. Зиновьев С.В. Гистохимическая характеристика клеток периферической крови при коррекции дигидрокверцетином общего переохлаждения организма в течение 10 дней // Материалы V Съезда врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока / под ред. В.П.Колосова. Благовещенск, 2013. С.160–163.

5. Гистохимическая характеристика локализации

ионов натрия в органах дыхания экспериментальных животных при общем охлаждении организма на фоне введения цитопротектора дигидрокверцетина / С.В.Зиновьев [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2013. Вып.48. С.70–75.

6. Приходько А.Г., Перельман Ю.М., Колосов В.П. Гиперреактивность дыхательных путей. Владивосток: Дальнаука, 2011. 204 с.

7. Цитоморфологическая характеристика секрета верхних дыхательных путей при воздействии низкой температуры окружающей среды на организм человека на фоне приема дигидрокверцетина / С.С.Целуйко [и др.] // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2011. Вып.42. С.50–54.

8. Zangi R., Filella M. Transport routes of metalloids into and out of the cell: a review of the current knowledge // Hem. Biol. Interact. 2012. Vol.197, №1. P.47–57.

REFERENCES

1. Avdeev S.N., Anaev E.Kh., Chuchalin A.G. *Pul'monologiya* 1998; 2:81–87.

2. Geyier G. *Elektronnaya gistokhimiya* [Electronic histochemistry]. Moscow: Mir, 1974.

3. Zinov'ev S.V., Kozlova V.S. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy* 2010; 17(2):194–195.

4. Zinov'ev S.V. *Materialy V S"ezda vrachey-pul'monologov Sibiri i Dal'nego Vostoka* (The materials of V meeting of pulmonologists of Siberia and Far East). Blagoveshchensk; 2013: 160–163.

5. Zinov'ev S.V., Tseluyko S.S., Zhou X.D., Li Q. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2013; 48:70–75.

6. Prikhodko A.G., Perelman J.M., Kolosov V.P. *Giperreaktivnost' dykhatel'nykh putey* [Airway hyperresponsiveness]. Vladivostok: Dal'nauka; 2011: 204 с.

7. Tseluyko S.S., Zinov'ev S.V., Kondrakhina A.P., Semenov D.A. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2011; 42:50–54.

8. Zangi R., Filella M. Transport routes of metalloids into and out of the cell: a review of the current knowledge. *Hem. Biol. Interact.* 2012; 197(1):47–57.

Поступила 21.02.2014

Контактная информация

Сергей Викторович Зиновьев,

кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник

Центральной научно-исследовательской лаборатории,

Амурская государственная медицинская академия,

675000, г. Благовещенск, ул. Ленина, 124.

E-mail: sinowev@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Sergey V. Zinov'ev,

MD, PhD, Senior staff scientist of Central Research Laboratory,

Amur State Medical Academy,

124 Lenina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: sinowev@mail.ru