

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ФАРМАЦИИ, ХИМИИ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭРИТРОЦИТАРНОЙ
И ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
БОЛЬНЫХ ЭКЗЕМОЙ**

Выпускная квалификационная работа
обучающейся по направлению подготовки 06.03.01 Биология
очной формы обучения, группы 11001519
Усковой Кристины Сергеевны

Научный руководитель:
доцент кафедры биохимии МИ
к.б.н. Сладкова Е.А.

БЕЛГОРОД 2019

Оглавление

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы.....	5
1.1. Современные представления о морфофункциональной организации клеток крови.....	5
1.1.1. Морфофункциональные особенности эритроцитов.....	5
1.1.2. Морфофункциональные свойства лейкоцитарной популяции периферической крови.....	6
1.1.3. Цитоскелет клеток крови.....	8
1.1.4. Цитоархитектоника поверхности клеток крови.....	9
1.2. Механизмы развития экземы.....	11
1.2.1. Общая характеристика заболевания.....	11
1.2.2. Этиология и патогенез.....	12
1.2.3. Участие системы крови в развитии заболевания.....	13
1.2.4. Изменение биохимического состава крови при экземе.....	18
1.3. Морфофункциональные свойства эритроцитарной и лейкоцитарной популяции периферической крови при развитии экземы.....	21
Глава 2. Материалы и методы исследования	26
Глава 3. Результаты исследования и их обсуждение.....	30
3.1. Морфофункциональные свойства эритроцитарной популяции в норме и при развитии экземы.....	30
3.2. Морфофункциональные особенности лейкоцитов здоровых людей и больных экземой.....	37
Выводы.....	40
Список использованных источников.....	41

Введение

Актуальность темы. Экзема занимает одно из ведущих мест в структуре заболеваний кожи, встречаясь в 40% случаев от общего числа дерматологических патологий [Охлопков, Правдина, Зубарева, 2013]. Эта болезнь имеет существенное социально-экономическое значение из-за широкой распространенности и медицинских последствий [Павлова, 2010; Viagini Myers, Khurana Hershey, 2010]. Количество пациентов с экзематозным процессом постоянно растет в связи с ухудшением экологической обстановки [Денисова, 2013], неправильным питанием (с присутствием в еде большого количества пищевых красителей, консервантов, стабилизаторов) [Galli et al., 2010], постоянно ускоряющимся ритмом жизни, приводящим к стрессам и хронической усталости [Холден, Остлер, 2009].

Экзема имеет тенденцию к тяжелому течению и значительному распространению патологического процесса на коже, рецидивированию, развитию толерантности к общепринятым методам лечения [Кубанова и др., 2011; Lawton, 2009]. Наблюдаются изменения клинического статуса пациентов, ведущие к длительной нетрудоспособности и ранней инвалидизации [Охлопков, Правдина, Зубарева, 2013]. Особенностью течения заболевания в настоящее время является склонность к хронизации [Fowler, 2008].

Изучение нарушений системы крови, их патогенетической роли при развитии экземы – актуальная и недостаточно изученная проблема. Этиологический и патогенетический аспекты развития экзематозного процесса, освещённые в современных научных изданиях, носят противоречивый характер [Соколова, Малярчук, 2011; Arrizabalaga et al., 2012; Lawton, 2009; Lin, 2008]. До сих пор окончательно не определены механизмы развития отклонений в организме в целом и нарушений функционирования эритроцитарной и лейкоцитарной популяции периферической крови.

Цель исследования – изучить морфофункциональные особенности эритроцитарной и лейкоцитарной популяции периферической крови больных экземой.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) оценить гематологические показатели крови здоровых людей и больных экземой;
- 2) провести морфометрический анализ периферического звена эритронов в норме и при развитии экземы;
- 3) изучить лейкоцитарную формулу здоровых людей и больных экземой.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Современные представления о морфофункциональной организации клеток крови

1.1.1. Морфофункциональные особенности эритроцитов

Эритроциты представляют собой высокоспециализированные клетки крови, обеспечивающие функции газообмена, транспорта, являются компонентами буферной системы. Функционирование представителей этой клеточной популяции зависит от таких свойств как вязкость, деформабельность, способность формировать агрегаты [Мороз и др., 2012].

Количество эритроцитов варьирует от $3,9 \cdot 10^{12} \text{л}^{-1}$ до $5,5 \cdot 10^{12} \text{л}^{-1}$ и зависит от половой принадлежности, возраста и других факторов. Средний диаметр эритроцитарных клеток составляет 7,2–7,7 мкм. Эритроциты человека не имеют ядра, в норме обладают дисковидной двояковогнутой формой (дискоциты). В периферической крови в небольших количествах встречаются также плоские клетки (паноциты), шаровидные с выростами в виде шипов (эхиноциты), куполообразные (стоматоциты), шаровидные гладкие (сфероциты). Форма эритроцитов зависит от поверхностного белкового каркаса. Липидные компоненты мембраны обеспечивают такие свойства как гибкость и текучесть плазмалеммы [Мороз и др., 2012].

Эритроциты главным образом участвуют в транспорте респираторных газов (кислорода и двуокиси углерода). Они обеспечивают регуляцию кислотно-основного состояния, водно-солевого обмена. Формируют микрореологический статус крови, участвуют в иммунных реакциях. Связывают и переносят на поверхности различные соединения (аминокислоты, липиды, гормоны, молекулы лекарственных средств) [Мороз и др., 2012].

1.1.2. Морфофункциональные свойства лейкоцитарной популяции периферической крови

Клетки лейкоцитарной популяции периферической крови участвуют в реализации защитных функций организма. В норме их концентрация варьирует в пределах 4000–9000 в 1 мкл крови. При этом лейкоциты подразделяются на две крупные группы по содержанию гранул в цитоплазме: гранулоциты (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) и агранулоциты (лимфоциты и моноциты) [Сладкова, 2015].

Параметры лейкоцитов различные. Диаметр нейтрофилов – 10–12 мкм, эозинофилов – 12–14 мкм, базофилов – 11–12 мкм, моноцитов – 8–22 мкм, лимфоцитов от 6–8 мкм до 11 мкм.

Каждая субпопуляция лейкоцитов имеет свои морфологические особенности. Нейтрофилам свойственно наличие сегментированного ядра, мелкой цитоплазматической оксифильной зернистости. Эозинофилы характеризуются присутствием в клетке ядра из двух сегментов, больших оксифильных гранул в цитоплазме, содержащих пероксидазу и кислую фосфатазу. Базофилам присуще крупное слабо сегментированное ядро, крупные гранулы с гликозаминогликанами. Лимфоциты имеют крупное круглое ядро, окруженное узким ободком цитоплазмы. Моноциты отличаются крупным бобовидным или подковообразным ядром и базофильной цитоплазмой [Кругликов и др., 2014].

На плазмалемме лейкоцитарных клеток наблюдаются многочисленные образования – глобулярные выступы и впадины. Так на поверхности лимфоцитов могут присутствовать шиповидные образования, а на моноцитах – узкие длинные выросты [Сладкова, 2015]. Мембраноассоциированные процессы, такие как транспорт ионов, зависят от липидно-белковых взаимодействий в плазмалемме.

Функциональная активность лейкоцитов связана с реализацией иммунного ответа. Первым звеном, участвующим в защите организма от

чужеродных антигенов, выступают нейтрофилы. Для этих клеток характерны фагоцитоз, хемотаксис, адгезия. Нейтрофилы способны к целенаправленному перемещению в места воспаления за счет наличия на мембране рецепторов для белков системы комплемента, протеаз, бактериальных пептидов. В миграции поверхностные молекулы гранулоцитов связываются с рецепторами эндотелиальных клеток [Сладкова, 2015].

Адгезивные свойства нейтрофилов обуславливают их сложные взаимодействия с другими клетками крови, стенками капилляров, микроорганизмами. За этот процесс отвечают молекулы адгезии.

Наличие на поверхности гранулоцитов сложных рецепторных комплексов позволяет нейтрофилам захватывать и поглощать антигены. Лейкоцитарные клетки осуществляют фагоцитоз патогенных микроорганизмов за счет деятельности гранул, процессов гликолиза и гликогенолиза. Формируются фагосомы, содержащие ферменты гранул (лизоцим, кислую и щелочную фосфатазу, эластазу, лактоферрин) [Леонова, Чантурия, Висмант, 2009].

Лимфоциты в процессе развития иммунного ответа отвечают за синтез антител и участвуют в контактных межклеточных взаимодействиях. Они обладают миграционной и адгезивной активностью. Тк-клетки (Т-киллеры) обуславливают противовирусную и противоопухолевую защиту, реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Th-лимфоциты (Т-хелперы) активируют В-клетки. Ts (Т-супрессоры) ингибируют секрецию антител. В1- и В2-лимфоциты отвечают за реализацию врожденного иммунитета. НК-клетки (натуральные киллеры) занимаются обнаружением и разрушением собственных поврежденных клеток [Morley, 2012].

При развитии воспалительных процессов лейкоциты мигрируют по кровеносному руслу и далее в ткани. По мере движения по сосудам клетки затормаживаются под действия селектинов и активируются. Направление миграции определяют хемокины и молекулы адгезии посредством воздействия на поверхностные рецепторы лейкоцитов. В конечном итоге

клетки перемещаются через базальную мембрану эндотелия, лизируя при этом его компоненты (коллаген) с помощью ферментов [Наумова и др., 2016].

1.1.3. Цитоскелет клеток крови

Важным внутриклеточным компонентом выступает цитоскелет, определяющий форму и двигательную активность клеток крови [Ломакин, 2009]. Элементы цитоскелета участвуют в регуляции работы ионных каналов, активности ферментов, экспрессии некоторых генов, в передаче внутриклеточных сигналов, транспорте мРНК, транскрипции. Эта структура состоит из белковых филаментов. Элементами цитоскелета являются тонкие актиновые микрофиламенты диаметром 6–7 нм, тубулиновые микротрубочки диаметром около 25 нм и промежуточные филаменты с диаметром 10 нм [Ito, Tokura, 2014].

Актин-сократительная система участвует в изменении формы эритроцитарных клеток с нормального (дискоциты) на патологические варианты [Большакова и др., 2009]. В эритроцитах имеется хорошо развитый цитоскелет, представленный эластичной белковой сетью в подмембранном пространстве. Взаимодействие элементов цитоскелета между собой и с плазмолеммой обеспечивают такие функциональные особенности эритроцитарных клеток, как стабильность мембраны и ее деформабельность [Heng, Koh, 2010].

Микрофиламенты образуют в цитоплазме пучки, формируют кортикальный слой. Эти структуры за счет способности к сокращениям участвуют в процессах хемотаксиса и фагоцитоза лейкоцитов. Микротрубочки обеспечивают нормальное протекание митоза, жизнедеятельность интерфазных клеток. Промежуточные филаменты в виде пучков находятся в клетке около ядра [Ito, Tokura, 2014].

Полимеризация и деполимеризация актиновых компонентов цитоскелета обеспечивает движение лейкоцитов, их миграцию. В этом

процессе задействованы также разнообразные актин-связывающие белки (формин, леомодин, кофилин, гельзолин, тропомиозин, филамин, α -актинин) [Воробьев, Малый, 2008].

Во время миграционного движения на переднем крае лейкоцита формируются ламеллоподии, на заднем крае – широкая уропода. Псевдоподии взаимодействуют с субстратом с участием молекул адгезии и осуществляют перемещение тела клетки. Образование ламеллоподий находится под контролем миозиновых белков, обеспечивающих присоединение актиновых микрофиламентов цитоскелета к интегринам плазмалеммы. Таким образом, лейкоциты способны на амебоидное движение по поверхности сосудов и ткани [Fletcher, Mullins, 2010].

1.1.4. Цитоархитектоника поверхности клеток крови

Функциональная активность клеток эритроцитарной и лейкоцитарной популяции периферической крови тесно связана с особенностями строения и организации их мембран. На поверхности разных типов клеток формируются специфические морфологические образования, определяющие топографию плазмалеммы [Сладкова, 2015].

Изменение рельефа клеточной поверхности находится в тесной связи с перестройками цитоскелета. Так α -актинин способствует формированию выпячиваний на мембране. Перестройка элементов цитоскелета в подмембранном слое цитоплазмы эритроцитов и лейкоцитов обуславливает изгибы и деформируемость плазмалеммы. Актин-связывающие белки влияют на радиус кривизны [Saarikangas, Zhao, Lappalainen, 2011].

На поверхности клеток могут встречаться образования трех типов: фибриллярные, ламилярные и бульбарные. К фибриллярным выростам относятся реснички, жгутики, микроворсинки и филлоподии. Микроворсинки представляют собой резервные структуры мембраны, формирующиеся при участии эзрина, которые в случае каких-либо

отклонений от нормы оказываются задействованными в усилении транспорта питательных веществ, выбросе метаболитов. Поверхность данных образований используется при изменении формы клетки, ее распластывании на субстрате [Кругликов и др., 2012].

Ламелярные образования включают ламеллоподии, складки, рафлы. Рафлы – это выросты в форме пластинок на мембране лимфоцитов, участвующие в процессах метаболизма. Ламелярные образования формируются при участии белков из семейства малых ГТФаз [Кругликов и др., 2012].

Бульбарные образования выглядят в виде выступов сферической формы на поверхности эритроцитов и лейкоцитов. Они также являются резервными структурами, появляющимися при воздействии на клетки неблагоприятных факторов, например, гипотонической среды, механических нагрузок [Кругликов и др., 2012].

Нейтрофилы несут на своей поверхности множество хребтов и складок. Мембрана лимфоцитов характеризуется наличием более округлых и симметричных образований. Активированные клетки (лимфоциты и макрофаги) отличаются гетерогенностью поверхности [Кругликов и др., 2012].

В некоторых случаях (при апоптозе, цитокинезе) может наблюдаться такое явление, как «вскипание» мембраны. При этом на поверхности клеток образуются многочисленные пузырьки, формирующиеся за счет локальных нарушений между кортикальным цитоскелетом и плазмалеммой. Точечные разрушения участков цитоскелета провоцируют запуск специфических внеклеточных сигналов [Fletcher, Mullins, 2010].

На поверхности клеток крови могут наблюдаться подосомы и инвадоподии – выступы плазмалеммы, богатые актином, способствующие межклеточной адгезии. Эти образования играют важную роль в деградации экстрацеллюлярного матрикса. Они формируются при участии соединений семейства ГТФаз, динамина, актин-зародышевых белков (Arp 2/3, форминов), актин-сшивающих и адгезивных протеинов (актинина, винкулина, заксина). Подосомы часто наблюдаются у представителей

лейкоцитарной популяции периферической крови. Инвадоподии формируются на мембране трансформированных клеток при развитии патологических процессов [Chesarone, Goode, 2009].

1.2. Механизмы развития экземы

1.2.1. Общая характеристика заболевания

Экзема – это аллергическое заболевание кожных покровов острого или хронического рецидивирующего характера. Болезнь возникает и развивается под действием экзогенных (средовых), эндогенных провоцирующих факторов. Характеризуется появлением полиморфной сыпи, острой воспалительной реакцией из-за серозного воспаления кожных покровов, зудом. В основе патологии лежат такие физиологические процессы как апоптоз, пролиферация, инвазия, дисбаланс системы окислительного гомеостаза [Скрипкина, Бутова, 2009].

Заболеваемость экземой является актуальной медико-социальной проблемой. Болезнь широко распространена среди жителей промышленных городов, урбанизированных регионов с экологически неблагоприятной обстановкой. Экзема значительно ухудшает качество жизни людей, у больных может отмечаться социальная дезадаптация [Скрипкина, Бутова, 2009].

К сложностям в изучении, диагностировании, лечении, прогнозировании развития этой патологии относятся:

- полиэтиологичность – возникновение болезни под действием одной из нескольких возможных причин или их комбинации;
- низкая эффективность лечения, резистентность к лекарственной терапии;
- высокий уровень заболеваемости;
- увеличение числа триггерных факторов;
- наличие хронического варианта течения заболевания с рецидивами [Котрехова, 2010].

1.2.2. Этиология и патогенез

Патологический процесс при экземе возникает и развивается вследствие взаимодействия комплекса факторов: обменных, эндокринных, нейроаллергических; экзогенных и наследственных. Среди внешних раздражителей выделяют химические, биологические, физические агенты, бактериальные аллергены, лекарственные препараты, пищевые продукты, косметические средства [Скрипкина, Бутова, 2009].

На данный момент разработана иммуноаллергическая концепция развития экзематозного процесса [Абдрахимова и др., 2014]. Эта модель включает в себя несколько этапов протекания болезни, в основе которой лежат патогенетические механизмы. При развитии экзематозного процесса происходит кооперация регуляторных подсистем гомеостатических механизмов системы крови, направленная на обеспечение оптимальных условий функционирования клеток и тканей.

На первом этапе развития заболевания при внедрении аллергена через кожные покровы происходит аллергизация. При этом нарушается кислотно-основное равновесие в коже и периферической крови. Это связано с накоплением в межклеточном пространстве специфических кислот, увеличением парциального давления двуокиси углерода, снижением насыщаемости тканей кислородом. Изменение рН внутренней среды организма стимулирует высвобождение из связанного состояния биогенных аминов, развитие нейрогуморальных перестроек. В результате барьерно-защитные свойства кожи нарушаются [Каракаева, Утц, 2014].

Далее следует скрытая фаза иммунного воспаления кожных покровов – сенсibilизация. На следующем этапе возникают клинические проявления – очаги заболевания в зонах контакта с аллергеном и за их пределами. Данная патологическая реакция закрепляется в иммунной памяти организма. При повторном взаимодействии с аллергеном воспалительная реакция усиливается. Кожные покровы больных становятся более чувствительными к

воздействию неспецифических факторов: соприкосновению с одеждой, трению, мытью мочалкой, потоотделению. В ходе формирования патологического процесса в кровеносном русле появляются аутоантитела, которые затем вызывают прогрессирование очагов заболевания [Каракаева, Утц, 2014].

Ведущую роль в развитии экземы играют иммунные нарушения. При формировании патологии наблюдается перестройка иммунного ответа. Изменяется реактивность организма. Возникают вторичные иммунодефицитные состояния, что способствует развитию более слабого иммунного ответа при внедрении в клетки микробных или химических аллергенов. Вследствие этого условно-патогенные микроорганизмы циркулируют в межклеточном пространстве и негативно действуют на организм на системном уровне. Резкий и значительный выброс биологически активных веществ в ответ провоцирует воспалительные и аллергические реакции в тканях, проявляющихся гиперемией, отеком, зудом [Денисова, 2013].

1.2.3. Участие системы крови в развитии заболевания

Механизмы защиты организма от антигенных факторов функционируют на основе многокомпонентной системы, включающей в себя врожденный (неспецифический) и адаптивный (специфический) иммунитет. В норме клеточные (нейтрофилы, В-лимфоциты, НК-клетки, макрофаги, дендритные клетки) и гуморальные (антитела, система комплемента, лизоцим, белки острой фазы, цитокины) факторы неспецифического иммунитета полностью подавляют и разрушают патогены. При этом специфические реакции не формируются [Денисова, 2013].

В организме здорового человека элементы клеточной стенки бактерий (мурамилпептиды) активируют клетки моноцитарно-макрофагальной системы. Результатом активации данных компонентов иммунной системы является фагоцитоз и разрушение патогенных микроорганизмов, выделение активных свободных радикалов. Иммунная реакция сопровождается

синтезом про- и противовоспалительных цитокинов, активацией гранулоцитов, НК-клеток. Пептидогликаны микроорганизмов стимулируют выработку макрофагами ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ФНО- α [Охлопков, Правдина, Зубарева, 2013].

Цитокины принимают участие регуляции взаимодействий между различными клеточными популяциями. Они являются важными компонентами иммунного ответа, способствуют формированию воспалительных реакций. Функциональная активность этих соединений регулируется нейроэндокринной системой [Мордвинов, Фурман, 2009].

Интерлейкин ИЛ-1 стимулирует выброс гистамина базофилами. ИЛ-2 ингибирует ИЛ-4-зависимую выработку IgE. ИЛ-4 влияет на синтез IgE, модифицирует воспалительную реакцию. ИЛ-6 активизирует секрецию ИЛ-2 мононуклеарами, направляет дифференцировку Т-хелперов в Th1- и Th2-клетки. ИЛ-8 активизирует нейтрофилы, макрофаги. ИЛ-10 блокирует функционирование макрофагов, дендритных и тучных клеток, отвечает за противовоспалительные эффекты. ИЛ-17 индуцирует синтез ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, фактора некроза опухоли- α (ФНО- α). Интерферон- γ (ИФН- γ) ингибирует ИЛ-4-обусловленную выработку IgE, секрецию лейкотриенов. Интерферон- α (ИФН- α) снижает продуцирование Ig E. ФНО- α стимулирует выброс белков острой фазы, провоцирует повреждение стенок кровеносных сосудов [Мордвинов, Фурман, 2009].

При дисфункции врожденного компонента иммунитета условно-патогенные микроорганизмы, контактирующие с кожными покровами и слизистыми оболочками человека, беспрепятственно поступают в кровь и ткани, способствуя развитию экзематозного процесса [Кубанова, 2010].

На начальных стадиях экземы формируется иммунодефицитное состояние Т-клеточной системы. Уменьшается число Т-лимфоцитов, при этом количество Т-хелперов увеличивается, а Т-супрессоров значительно снижается [Luckheeram et al, 2012]. У больных экземой подавляется секреция ИЛ-12, нарушается синтез ИФН- γ , дифференцировка Th0-лимфоцитов в Th1. При

этом синтез ИЛ-2 CD4-клетками при экзематозном процессе усиливается. Т-хелперы 2-го типа секретируют ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-25 и отвечают за развитие гуморального иммунитета [McPherson et al, 2010].

В развитии экзематозного процесса в первую очередь участвуют Т-хелперы 1-го типа, реализующие синтез ИЛ-2 и интерферона- γ (ИФН- γ) [Arrizabalaga et al, 2012]. Одновременно наблюдается подавление активности В-лимфоцитов. При экземе ИЛ-12 является хемокином для CD4⁺-Т-клеток. ИЛ-12 – цитокин, усиливающий клеточно-опосредованный иммунный ответ и отвечающий за противомикробную защиту. При этом иммунный ответ в эпидермисе инициируют Т-хелперы 1-го типа, далее активируются CD8⁺-Т-супрессоры. Экзематозный процесс сопровождается выделением Т-клетками различных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН- γ и ФНО- α), вызывающих разнонаправленные реакции [Лысенко, Лукьянчикова, 2015].

При экзематозном процессе уменьшение концентрации ИЛ-2 провоцирует возникновение вторичного иммунодефицита. Подъем уровня ИЛ-4 свидетельствует о развитии Th2-обусловленного иммунного ответа. ИЛ-4, синтезируемый в больших количествах, поддерживает воспалительный процесс. Увеличение уровня ИЛ-6 связано с его противовоспалительными свойствами, способствует секреции АКТГ, кортизола, снижению содержания ИЛ-1 β [Белова, Арион, Сергиенко, 2008].

Экзема сопровождается положительной ассоциацией антигенов системы гистосовместимости (HLA) B22 и CW1. Фенотип HLA оказывает существенное влияние на функцию супрессии Т-лимфоцитов и концентрацию этих клеток. Так при экзематозном процессе при наличии маркеров патологии B22 и CW1 супрессорные реакции Т-хелперов снижаются, падает их количество [Lan et al, 2011].

В кожных покровах развивается иммунное воспаление, вызывающее накопление пула Т-клеток иммунологической памяти. Они мигрируют в кожные покровы и там вырабатывают медиаторы воспаления, цитокины,

хемокины. Под их воздействием в реакции включаются другие иммунокомпетентные клетки [Соколова, Малярчук, 2011].

Для реализации иммунного ответа в эпидермисе в очаг воспаления должны мигрировать лимфоциты в несколько этапов: этап трансудации (проникновение через эндотелиальные клетки сосудов в ткань), передвижение по соединительной ткани дермы и собственно миграция. Цитокины, хемокины способствуют протеканию данных процессов, а молекулы адгезии участвуют в регуляции взаимодействий клеток между собой и с субстратом. В очагах воспаления накапливается клеточный инфильтрат, включающий в себя нейтрофилы, эозинофилы, макрофаги. Это стимулирует формирование аллергических воспалительных реакций [Патрушев и др., 2015].

Активированные макрофаги регулируют иммунные реакции, вызывают синтез интерлейкинов (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-6), ФНО- α . Эти цитокины способствуют усилению нарушений воспалительного процесса в эпидермальном слое [de Jongh et al, 2008].

Клетки эндотелия под действием ИЛ-1 и ФНО- α экспрессируют молекулы адгезии (E-селектины и другие), что усиливает миграцию CD4⁺-лейкоцитов, Т-клеток памяти, которые в свою очередь секретируют в очагах воспаления в коже интегрин CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen – кожный лимфоцитосвязанный антиген). Далее следует этап процессинга, клетки Лангерганса принимают участие в презентации антигенов Т-лимфоцитам. При экземе количество эпидермальных клеток Лангерганса может значительно увеличиваться, вызывая нарушение межклеточной коммуникации в кожных покровах и гиперпролиферацию [Патрушев и др., 2015].

Важную роль в формировании экзематозной патологии играет сенсibilизация к аллергенам. Этот процесс приводит к увеличению частоты и выраженности проявления гиперергической реакции немедленного типа (ГНТ) и уменьшению показателей гиперергической реакции замедленного

типа (ГЗТ). Т-лимфоциты с фенотипом CD45RO+ и CD45RA играют главную роль в реализации аллергического воспаления по типу ГЗТ [Павлова, 2010].

При экзематозном процессе снижается опсонизирующая активность сыворотки крови, что вызывает повышение восприимчивости организма к бактериальным инфекциям. Патологические изменения затрагивают такие сывороточные опсоины как систему комплемента и иммуноглобулины. Антитела, участвуя в процессах нейтрализации, опсонизации и активации системы комплемента, способствуют фагоцитозу чужеродных антигенов иммунными клетками. Патогенные микроорганизмы окружаются антителами, затем Fc-фрагменты иммуноглобулинов контактируют с поверхностными Fc-рецепторами фагоцитирующих клеток (нейтрофилов, В-лимфоцитов, ЕК-клеток, моноцитов, макрофагов). Ig G-антитела принимают участие в опсонизации, обуславливая антителозависимую клеточную цитотоксичность. Кроме того, осевшие на поверхности бактерий антитела активируют белки системы комплемента, запуская иммунологические реакции. Эти белковые соединения в качестве опсоинов усиливают фагоцитоз патогенов иммунными клетками, а также выполняют функцию хемокинов. Белки системы комплемента способны лизировать часть бактериальных антигенов, формируя в бактериальной клеточной стенке поры. При экзематозном процессе уровень опсоинов в крови значительно снижается [Дедкова, Юсупова, Валеева, 2012].

При развитии экземы в крови уменьшается концентрация С3- и С4-фракций белков системы комплемента, нарушаются механизмы хемотаксиса. Снижается афинность антител, что приводит к подавлению резистентности организма к действию бактериальных антигенов. Это вызывает развитие очагов и появление рецидивов гнойно-воспалительных процессов [Дедкова, Юсупова, Валеева, 2012].

При экзематозном процессе повышается концентрация IgG, IgE и ЦИК, параллельно падает уровень IgA и IgM. Данное явление называется дисгаммаглобулинемией. В крови больных экземой отмечается повышение

концентрации биогенных аминов, активных агентов калликреин-кининовой системы [Белова, Арион, Сергиенко, 2008].

При экземе формируется аллергическая реакция 1-го типа, вызывающая впоследствии хроническое воспаление [Холден, Остлер, 2009]. Здесь можно дополнительно выделить продукцию таких соединений, как ИЛ-18, трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). Хемокины способствуют проникновению в очаги воспаления моноцитов, базофилов CCL2, CCL11 (Eotaxin), эозинофилов CCL5 (RANTES).

1.2.4. Изменение биохимического состава крови при экземе

При развитии экземы модифицируется состояние простагландинов и циклических нуклеотидов, что сказывается на функционировании механизмов регуляции внутриклеточных процессов. Нарушается трансформация нейроэндокринных сигналов в специфический иммунный ответ. Простагландины E1 (ПГЕ1) и F2a (ПГФ2a), циклические аденозинмонофосфат (цАМФ) и гуанозинмонофосфат (цГМФ) участвуют в реализации аллергических и воспалительных реакций. ПГЕ1 экспрессирует выработку цАМФ, что ведет к ингибированию секреции медиаторов аллергического ответа (гистамина, серотонина, лейкотриенов). ПГФ2a усиливает продукцию цГМФ, способствующего синтезу медиаторов аллергии, увеличению проницаемости сосудистой стенки [Lan et al, 2011].

При экзематозном процессе в крови повышается концентрация ПГЕ1 и ПГФ2a. Установлено отклонение от нормы соотношения ПГЕ1/ПГФ2a (уровень ПГФ2a сильно завышен, ПГЕ1 находится в дефиците). В соотношении цАМФ к цГМФ начинает преобладать второе соединение, что усугубляет течение болезни. Это способствует нарушению иммунологической реактивности, глубоким перестройкам иммунной системы [Song, Yoo, Ying, 2011].

Дополнительный эффект на синтез цАМФ оказывает тиреокальцитонин. Этот гормон усиливает функциональную активность аденилатциклазы. При экзематозном процессе защитно-компенсаторным механизмом выступает увеличение уровня тиреокальцитонина в крови [Song, Yoo, Ying, 2011].

При высвобождении кровяных пластинок отмечается повышение выработки серотонина в кровотоке. Данное явление находится под контролем простагландинов. ПГЕ1 оказывает на эти реакции ингибирующий эффект, а ПГФ2а – активирующий. При экзематозном процессе наблюдается тенденция к гиперкоагуляции крови [Treadivell, 2008].

Среди патогенетических механизмов развития экземы важную роль играют нарушения липидного обмена, усиление процесса их окисления с образованием свободных радикалов, активация ферментов лизосом (гидролаз) [Treadivell, 2008].

При патологии обменные процессы интенсифицируются, что вызывает увеличение показателей перекисного окисления липидов (ПОЛ). Функционирование антиоксидантных защитных механизмов при этом подавляется. Все это ведет к увеличению в мембранах уровня первичных (диеновых конъюгатов жирных кислот – ДК ЖК) и вторичных (малонового диальдегида – МДА) метаболитов ПОЛ. Данные соединения вступают в реакцию с белками и нуклеиновыми кислотами, формируя межмолекулярные сшивки. Образовавшиеся альдегиды и гидроксиалкены вызывают перестройки в структуре поверхностных рецепторов, ионных каналов, цитоскелета, ферментативных систем клеток крови. Снижается синтез вторичных мессенджеров, нарушаются молекулы ДНК и РНК. У здоровых людей деструктивным гидропероксидным процессам препятствуют ферментативные и неферментативные компоненты антиоксидантной системы (АОС). При развитии экзематозного процесса функционирование АОС угнетается, накапливаются продукты ПОЛ [Нагоев, Нальчикова, 2012].

Интенсификация ПОЛ у больных экземой вызывает дестабилизацию клеточных мембран. На начальных этапах развития патологии вырабатываются ДК ЖК, из которых под действием гидроксильных радикалов синтезируются гидроперекиси липидов. Метаболиты ПОЛ провоцируют конформационные перестройки фосфолипидов и фосфолипидного комплекса, вызывая нарушения функционирования внутриклеточных органоидов, органов, целостного организма. В участках контакта с перекисными радикалами жирные кислоты фрагментируются, образуя высокореакционные участки с альдегидными группами на концах. Таким образом формируются молекулы МДА, которые взаимодействуют с белковыми SH- и СНЗ-группами. МДА угнетает ферментативную активность цитохромоксидаз, гидроксилаз. Происходят глубокие изменения физико-химических свойств поверхности клеток, проницаемости клеточных мембран. Отмечаются перестройки в регуляторных механизмах, контролирующих метаболизм липидов плазмалеммы [Lawton, 2009].

При развитии экзематозного процесса истощаются резервные возможности ферментативного звена АОС, включающего в себя такие ферменты как супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза (ГП), глутатионредуктаза (ГР), каталаза, глутатион-S-трансфераза, церулоплазмин. При экземе нарушается соотношение показателей ПОЛ/АОС в клетках, что обусловлено подавлением активности СОД, каталазы, усилением функционирования глутатион-зависимых ферментов. Интенсивность ПОЛ при этом повышается, в плазме крови увеличивается уровень молекул ДК ЖК и МДА [Molin et al, 2011].

Значимую роль в развитии экземы играет нарушение метаболизма оксида азота (NO). Этот биологический медиатор участвует в возникновении артериальной и венозной гиперемии, способствует повышению проницаемости сосудов микроциркуляторного русла, обуславливает усиление повреждающего эффекта метаболитов ПОЛ. NO активирует растворимую гуанилатциклазу, стимулирует секрецию цГМФ [Bonamonte et al, 2012].

Действие NO на клетки опосредует вазодилататорный эффект других медиаторов (ацетилхолина, серотонина, кининов, катехоламинов, полипептидных гормонов апудоцитарного происхождения). NO оказывает механическое воздействие на сосудистые стенки [Bonamonte et al, 2012].

Развитие экземы могут провоцировать генетически модифицированные варианты химазы тучных клеток (ХТК) и катепсин-G-подобного протеина (CGL1) [Brown, McLean, 2009]. ХТК – это фермент (протеаза), обладающий химотрипсиноподобным действием, секретируемый тучными клетками кожи и дыхательных путей. ХТК совместно с гистамином активирует каскад воспалительных реакций. Этот фермент способствует повышению проницаемости сосудистых стенок, разрушению экстрацеллюлярного матрикса, контролирует функционирование активных пептидов [Оспанова, 2008; Biagini, Khurana, 2010].

1.3. Морфофункциональные свойства клеток крови при развитии экземы

Анализ состояния эритроцитарного компонента периферической крови позволяет выявлять патологические процессы в организме. Морфофункциональное состояние эритроцитов определяет степень напряженности и кислородообеспечения тканей. Форма эритроцитов при развитии патологии подвергается изменениям. Соотношение уровня дискоцитов (нормальных форм) и их патологических вариантов может служить диагностическим и прогностическим критерием [Лукьяненко и др., 2013].

При экземе происходят перестройки липидного компонента плазмалеммы эритроцитов, сказывающиеся на функциональных свойствах клеточной мембраны. Из-за образования метаболитов ПОЛ структура бислоя эритроцитарных клеток нарушается. В мембранах эритроцитов образуются аномальные зоны. Поверхностные липиды в норме принимают участие в работе мембранных белков. Это обеспечивает нормальное функционирование эритроцитарных клеток. Изменение степени

ненасыщенности липидов и уровня антиоксидантной защиты, подавляющей реакции окисления полиненасыщенных жирных кислот, влияет на выработку простагландинов и лейкотриенов [Лукьяненко и др., 2013]. Отмечается перераспределение фосфолипидных фракций в системе ЛФХ-ФХ, снижается ФЭА, увеличивается отношение ОХС/ОФЛ [Нагоев, Нальчикова, 2012].

Кроме того, при развитии окислительного стресса у больных экземой активные формы кислорода атакуют белковые компоненты плазмалеммы. Наблюдается окислительная модификация белков и выброс окисленных метаболитов. Это приводит к нарушению процессов транспорта веществ через мембрану, функционирования поверхностных рецепторов и ферментов, снижаются защитные функции. Образуются протеиновые радикалы с высоким химическим потенциалом, вступающие в реакции окисления других биологических молекул [Нагоев, Нальчикова, 2012].

По данным авторов [Arrizabalaga et al, 2012] при развитии экземы увеличивается активность эритроцитарной фосфолипазы А. Это связано с интенсификацией процессов распада фосфолипидов мембраны.

От состояния структурных компонентов плазмалеммы зависит сорбционная способность поверхности эритроцитарных клеток. У больных экземой наблюдается снижение сорбционной емкости эритроцитов (СЕЭ). Это указывает на загруженность клеточной поверхности при патологическом процессе, что приводит к нарушению механизмов транспортировки метаболитов по кровотоку. Накопление в плазме крови продуктов метаболизма при экземе провоцирует возникновение конформационных перестроек в активных центрах мембранно-связанных ферментов, что также влияет на изменение структуры и свойств белков рецепторов. Это приводит к нарушению процессов связывания и транспортировки соединений (например, молекул лекарственных средств) эритроцитами [Molin et al, 2011].

Патологический процесс затрагивает агрегационную способность эритроцитов, оказывая влияние на микроциркуляцию. При экземе усиливается агрегация клеток, приводя к появлению в кровеносном русле

шаровидных и древовидных агрегатов, включающих в себя большое количество эритроцитов. При этом мембраны красных клеток становятся более шероховатыми, появляются глобулярные выступы в форме шипов. В агрегатах между эритроцитами формируются плазматические мостики в агрегатах. Повышается проницаемость клеточной плазмалеммы для ионов калия и молекул воды [Molin et al, 2011].

Оценка иммунологического статуса у больных экземой указывает на развитие негативных сдвигов в клеточном звене иммунитета. В целом в большинстве случаев при патологии отмечается лимфоцитопения. Наблюдается уменьшение количества Т- и В-лимфоцитов. Снижается концентрация розеткообразующих лимфоцитов (ЕАС-РОК) и ТФЧ клеток. Понижается функциональная активность и уровень популяции Т-лимфоцитов (Т-супрессоров и Т-хелперов) периферической крови. Это приводит к развитию осложнений, вторичному инфицированию, усилению сенсибилизации организма [Кубанова и др., 2011].

При хронической экземе в крови повышается содержание популяций CD14+CD25+, CD14+ DR+, CD4, CD45RA, CD19-клеток. Снижается уровень CD3, CD4, CD8, CD16, CD95, CD71, CD25-лимфоцитов. Данные изменения вызываются подавлением деятельности иммунной системы, усиленной миграцией лимфоцитарных клеток в очаги воспаления, снижением показателя их рециркуляции [Bartlett, 2010].

При экземе в кровотоке появляется большое количество CLA+лимфоцитов – эффекторных клеток со специфическим аппаратом, отвечающих за иммунные реакции, воспалительные явления в кожных покровах. В норме эти клетки быстро разрушаются, подвергаясь активационно-индуцированному апоптозу [Bartlett, 2010].

Патологический процесс затрагивает механизмы функционирования нейтрофильных полиморфно-ядерных фагоцитов в периферической крови. В итоге развивается дефицит функционально-метаболической активности клеток фагоцитарного звена иммунной системы [Кубанова, 2010].

Нарушение функционирования нейтрофилов, механизмов фагоцитоза при экземе ведет к развитию рецидивирующего варианта патологии, возникновению резистентности к лечению. Наблюдается снижение уровня комплементарных (Nc-РОК) и увеличение концентрации спонтанных (Ns-РОК) нейтрофилов. Повышается уровень «нулевых» клеток (Lo). Изменяется процентный и абсолютный показатель фагоцитоза, фагоцитарное число, процессы спонтанного и комплементарного розеткообразования гранулоцитарных клеток [Кубанова, 2010].

По данным литературы [Fletcher, Mullins, 2010] при развитии экзематозного процесса в хроническом варианте протекания нейтрофилы приобретают амебоидную форму. Их мембрана покрывается большим количеством пластинчатых выступов, единичными инвагинациями, формируются псевдоподии. При этом в цитоплазме трансформированных клеток снижается уровень гранул, что приводит к дисфункции фагоцитарной активности нейтрофилов, развитию осложнений при экземе и усилению сенсibilизации организма [Кубанова, 2010].

На изменение количественного и качественного состава популяции лейкоцитов при патологическом процессе существенное влияние оказывают перестройки механизмов апоптоза, как активного процесса, идущего с затратами энергии, определяемого энергетическими показателями клеточных элементов, функционированием митохондрий [Леонова, Чантурия, Висмант, 2009]. Это обуславливает дисбаланс субпопуляций лейкоцитарных клеток.

При экземе увеличивается активность митохондриальных ферментов СДГ и α -ГФДГ. Это связано с активацией клеток и последующим спонтанным апоптозом. Данный феномен в рамках экзематозного процесса является защитным механизмом, подавляющим агрессию активированных цитотоксических лимфоцитов по отношению к собственным кератиноцитам [Lin, 2008].

Кроме того, при экзематозном процессе нарушается целостность и функционирование мембран клеток из-за накопления на их поверхности

больших концентраций веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНСММ). Это снижает доступность рецепторов для молекул лекарственных препаратов [Molin et al, 2011].

Глава 2. Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования выполнены на базе лаборатории «Физиология адаптационных процессов» кафедры биологии Института фармации, химии и биологии НИУ «БелГУ». Работа проводилась в рамках развития нового подхода в цитофизиологии – изучения закономерностей распределения эритроцитов по размерам и корреляции среднего объема клеток в зависимости от функционального состояния организма человека, в норме и при развитии заболеваний. Данный метод может быть положен в основу диагностических подходов и мониторинга заболеваний.

В экспериментальной части работы использовали периферическую кровь больных экземой (20 человек), находящихся на диспансеризации в областном кожно-венерологическом диспансере. Обследование пациентов проводили с помощью специализированного медперсонала. Использовали кровь лиц с хроническим течением экземы, характеризующимся различной клинической картиной, в период ремиссии болезни (после весеннего рецидива). В качестве контроля выступала кровь практически здоровых людей (20 человек).

Морфофункциональное состояние клеток крови изучали, используя следующие методы:

1. Подсчет количества эритроцитов в камере Горяева.
2. Определение концентрации гемоглобина гемиглобинцианидным методом.
3. Определение гематокритной величины крови по нормограммам.
4. Измерение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) по методу Панченкова;
5. Приготовление мазков крови и их окраска по Романовскому-Гимзе.
6. Подсчет на окрашенных мазках крови общего количества лейкоцитов по двухпольному методу (Филиппченко) и посередине мазка с использованием линии меандра.

7. Определение морфометрических параметров эритроцитов на мазках крови с помощью комплекса аппаратно-программной визуализации морфологических препаратов, анализа и регистрации оптических и морфологических показателей «ВидеоТест» (регистрационное удостоверение №29/20010702/6102-04 от 16.02.2004). Используя программу «ВидеоТест-МастерМорфология», получали изображения, на которых проводили анализ геометрических характеристик эритроцитов, измеряли средний габаритный размер 1000 клеток с каждого мазка.

На основе промеров средних габаритов клеток строили эритроцитометрические кривые Прайс-Джонса, представляющие собой графики распределения эритроцитов по диаметрам. По форме кривых судили о степени выраженности патологического процесса, затрагивающего систему кроветворения.

Средний объем эритроцитов рассчитывали по Велькеру, по отношению гематокрита к количеству эритроцитов в единице объема крови по формуле (2.1):

$$V = \frac{Ht}{RBC}, \quad (2.1)$$

где V – средний объем эритроцита, мкм³;

Ht – гематокрит (объемная масса эритроцитов в 1 мм³ крови), отн. ед.;

RBC – количество эритроцитов в 1 мм³ крови.

Среднюю толщину эритроцитов вычисляли по формуле Бороса, приняв при этом геометрию эритроцита за цилиндрическое тело (2.2):

$$T = \frac{V}{\pi R^2}, \quad (2.2)$$

где T – средняя толщина эритроцита, мкм;

V – объем эритроцита, мкм³;

R – средний радиус эритроцита, мкм.

Сферический индекс определяли по формуле (2.3):

$$\frac{T}{D}, (2.3)$$

где T – средняя толщина эритроцита, мкм;

D – диаметр эритроцита, мкм.

Площадь поверхности эритроцитов рассчитывали по формуле А. Хуртадо (2.4):

$$S = \frac{2V}{T} + 2\pi TR, (2.4)$$

где S – площадь поверхности эритроцита, мкм²;

V – объём эритроцита, мкм³;

T – средняя толщина эритроцита, мкм;

R – средний радиус эритроцита, мкм.

Функциональные свойства эритроцитов оценивали по результатам эритроцитометрии и по гематологическим параметрам. В ходе исследования рассчитывали:

– общую дыхательную поверхность эритроцитов по формуле (2.5):

$$S_{\text{дых}} = S \cdot RBC, (2.5)$$

где $S_{\text{дых}}$ – общая дыхательная поверхность эритроцитов, мкм²;

S – площадь поверхности эритроцита, мкм²;

RBC – количество эритроцитов в 1 мкл крови;

– содержание гемоглобина в одном эритроците по формуле (2.6):

$$CGЭ = \frac{Hb}{RBC}, (2.6)$$

где $CGЭ$ – содержание гемоглобина в эритроцитах, пг;

Hb – концентрация гемоглобина, г/л;

RBC – количество эритроцитов в 1 мкл крови;

– количество гемоглобина на единицу объема по формуле (2.7):

$$KGЭ = \frac{Hb}{Ht}, (2.7)$$

где $KGЭ$ – концентрация гемоглобина в эритроците, г/л;

Hb – концентрация гемоглобина, г/л;

Ht – гематокрит, отн. ед.;

–кислородную емкость крови, исходя из того, что 1 мл крови связывает 1,34 мл кислорода (2.8):

$$KEK = 1,34 \cdot Hb, (2.8)$$

где KEK – кислородная емкость крови, %;

Hb – концентрация гемоглобина, г/л.

Результаты исследования обрабатывали с помощью персонального компьютера с использованием электронных таблиц «Microsoft Excel 7.0». Достоверность полученных данных оценивали с использованием t-критерия Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Глава 3. Результаты исследования и их обсуждение

3.1. Морфофункциональные свойства эритроцитарной популяции в норме и при развитии экземы

Клетки эритроцитарной популяции периферической крови выступают первым звеном, затрагиваемым патологическим процессом. В результате проведенного исследования установлена повышенная реактивность системы красной крови, отражающаяся на количественном составе циркулирующих эритроцитов (табл. 1).

Таблица 1

Гематологические показатели экзематозных больных

Показатели	Здоровые доноры, n=20	Больные экземой, n=20
Количество эритроцитов, 10^{12} л^{-1}	$3,99 \pm 0,09$	$4,100 \pm 0,11$
Концентрация гемоглобина, г/л	$130,27 \pm 3,11$	$134,73 \pm 3,99$
Гематокрит, %	$38,53 \pm 0,89$	$39,87 \pm 1,14$
Коэффициент гемоконцентрации, 10^{13} л^{-1}	$1,56 \pm 0,06$	$1,49 \pm 0,08^*$
СОЭ, мм/ч	$5,73 \pm 0,66$	$7,07 \pm 0,95^*$

* – достоверность различий по сравнению с результатами измерений в контрольных пробах по критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Согласно полученным данным при экземе такие показатели, как количество эритроцитов, концентрация гемоглобина и гематокрит повышаются на 2,76% ($p < 0,05$), 3,42% ($p < 0,05$) и 3,48% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с контролем. Коэффициент гемоконцентрации при патологии снижен на 3,91% ($p < 0,05$) по сравнению с группой здоровых доноров. Резкое повышение СОЭ у больных людей на 23,49% ($p < 0,05$) по сравнению с нормой является показателем иммунологических сдвигов в организме.

Хроническое течение экземы характеризуется наличием в крови на стенках сосудов воспалительных иммунных комплексов. Эритроцитарные клетки активно связывают их на своей поверхности и транспортируют по кровотоку. В результате снижается объем плазмы отдельных эритроцитов, что указывает на развитие перераспределительной тактики реагирования в системе крови. Это вызывает выброс резервных пулов эритроцитарных клеток в циркуляторное русло, увеличение их содержания [Холден, Остлер, 2009].

Так как в кровотоке поступают депонированные, более зрелые формы эритроцитов с измененным геометрическим профилем, повышается гематокрит. Эти формы клеток характеризуются ограниченным жизненным циклом и меньшим числом оксигенаций, поэтому не могут в полной мере обеспечить кислородный баланс.

Морфофункциональные параметры клеток обследованных представлены в таблице 2.

Таблица 2

Морфометрический анализ периферического звена эритрона
экзематозных больных

Показатели	Практически здоровые доноры (n=20)	Экзематозные больные (n=20)
Средний габаритный размер эритроцита, мкм	9,16 ± 0,37	8,53 ± 0,35*
Толщина эритроцита, мкм	6,56 ± 0,15	6,81 ± 0,14*
Средний объем эритроцита, мкм ³	96,62 ± 0,69	97,29 ± 0,70
Площадь поверхности клетки, мкм ²	207,82 ± 2,64	203,66 ± 2,77
Сферичность, отн. ед.	1,42 ± 0,09	1,27 ± 0,08*
Содержание гемоглобина в эритроците, пг	32,66 ± 0,22	32,86 ± 0,22
Концентрация гемоглобина в эритроците, г/л	337,99 ± 0,41	337,807 ± 1,38
Общая дыхательная поверхность крови, мкм ²	830,36 ± 25,24	835,47 ± 27,23
Кислородная емкость крови, %	17,46 ± 0,42	18,46 ± 0,55*
Цветной показатель крови, отн. ед.	0,96 ± 0,01	0,96 ± 0,01

* – достоверность различий по сравнению с результатами измерений в контрольных пробах по критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Из представленных в таблице данных можно сделать вывод, что эритроидное звено периферического русла больных экземой стремится обеспечить кислородную емкость крови за счет функционально изношенных депонированных или дегенеративных продуцированных костным мозгом форм. Выдвинутое предположение основывается на следующих полученных данных:

- 1) средние габаритные размеры клеток, их толщина и сферичность при патологии снижены на 3,81% ($p < 0,05$), 6,88% ($p < 0,05$) и 10,56% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с контролем;

- 2) кислородная емкость крови в группе больных лиц повышена на 5,72% ($p < 0,05$) по сравнению с нормой;
- 3) достоверные различия других показателей в контрольных и опытных пробах не выявлены.

Таким образом, обеспечение оптимальной кислородной емкости крови осуществляется за счет динамических сдвигов в системе эритрона и количественного перераспределения пулов. При этом глубина и направленность компенсаторно-приспособительных реакций системы крови будут зависеть от физиологического состояния костного мозга и наличия у него функциональных резервов.

По результатам эритроцитометрии были построены и проанализированы кривые Прайс-Джонса, отражающие процентное соотношение субпопуляций эритроцитарной системы (рис. 1).

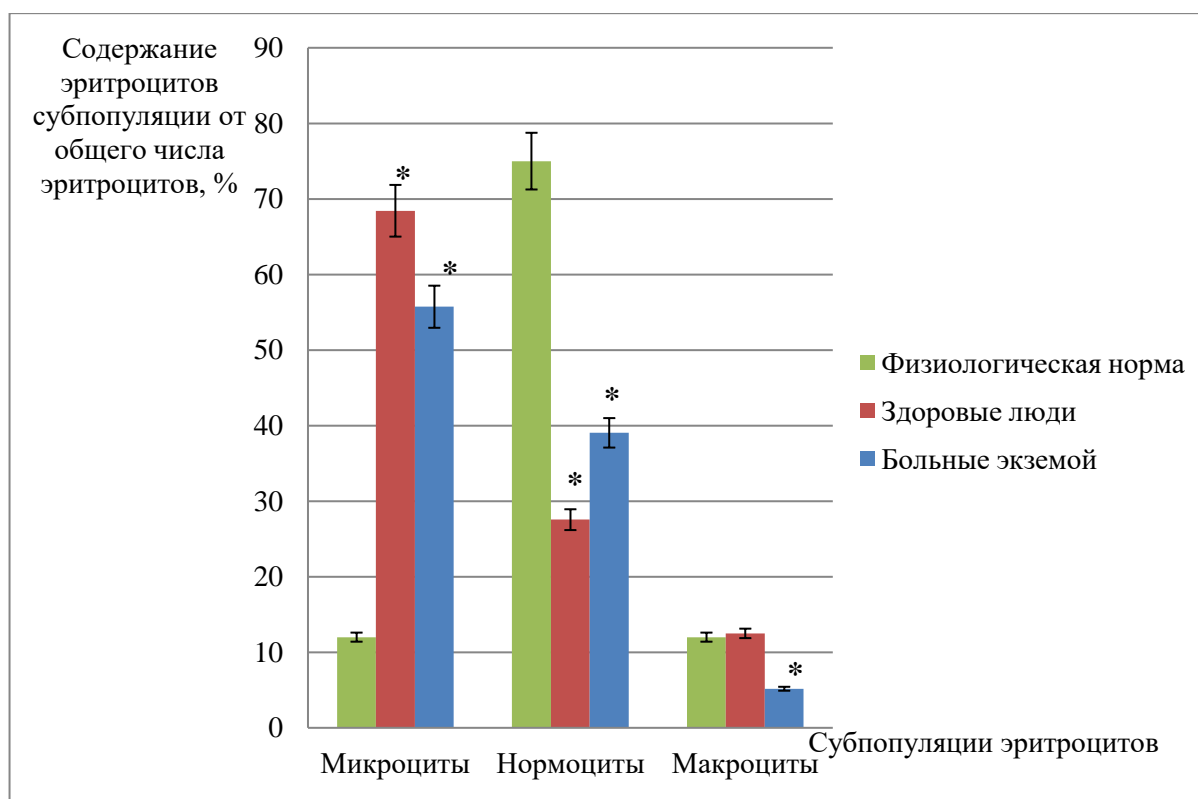


Рис. 1. Процентное содержание разных субпопуляций эритроцитов в крови здоровых людей и больных экземой.

*— достоверность различий по сравнению с физиологической нормой по критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

В группах здоровых людей и больных экземой выявлен сдвиг микроцитарных кривых. Содержание микроцитов при экзематозном процессе увеличено на 77,5% ($p < 0,05$) по сравнению с условной физиологической нормой, что свидетельствует о функциональной напряженности костномозгового кроветворения. Изменение микроцитарного профиля крови здоровых людей может быть связано с повышенным воздействием на организм экологических факторов, развитием других хронических заболеваний, стрессовым состоянием, обратимыми функциональными нарушениями.

Анализ диаметра эритроцитов в группе здоровых людей и больных экземой выявил тенденцию к увеличению размеров микроцитов (рис. 2).

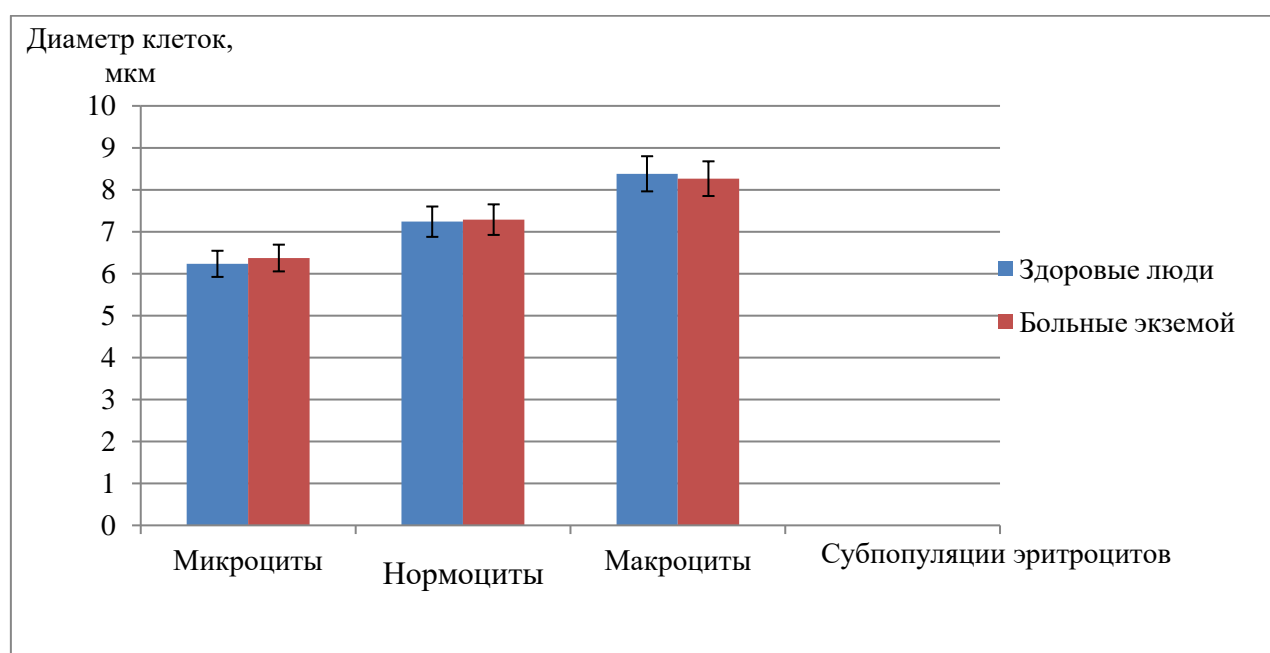


Рис. 2. Средние габаритные размеры эритроцитарных субпопуляций обследуемых групп.

Диаметр микроцитов у здоровых людей составил $6,234 \pm 0,07$ мкм, у больных экземой $6,373 \pm 0,05$ мкм. Параметры нормоцитов изменялись незначительно. Наблюдается снижение диаметра макроцитов у больных экземой: $8,265 \pm 0,02$ мкм при патологии против $8,384 \pm 0,05$ мкм у здоровых лиц.

Таким образом, микроциты служат мобильным звеном в системе эритрона экзематозных больных. Эта клеточная субпопуляция первой вовлекается в патологический процесс для оптимального обеспечения окислительно-восстановительного потенциала тканей. Более мелкие микроцитарные эритроциты с большей скоростью оксигенируют, легче проходят через сосуды микроциркуляторного русла.

На мазках крови больных экземой отмечается такое явление как анизоморфизм, обнаруживаются эхиноциты, микросфероциты, стоматоциты (рис. 3).

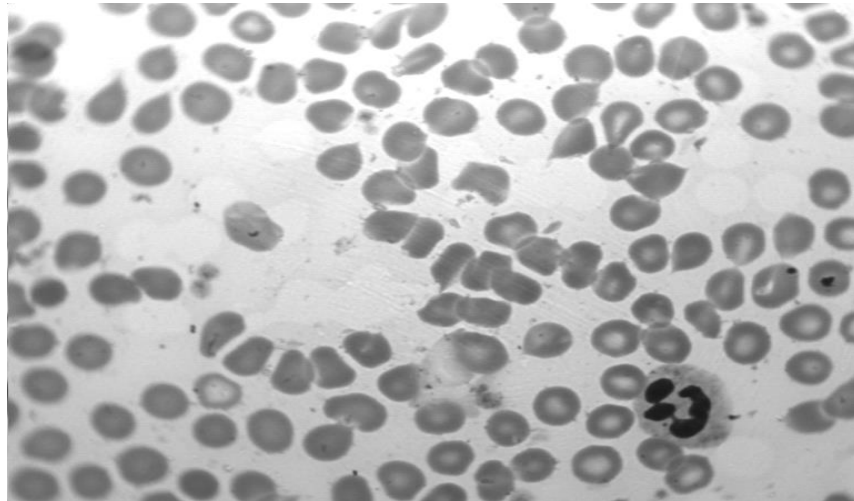


Рис. 3. Полиморфизм эритроцитов периферического русла больных экземой (увеличение X1000).

Появление дегенеративно измененных форм может быть обусловлено дисфункцией цитоскелета клетки. Сюда относятся анизоцитоз (наличие эритроцитов разного размера) и пойкилоцитоз (эритроциты разной формы). Это подтверждает предположение о развитии при патологическом процессе перераспределительных реакций [Chesarone, Goode, 2009].

На мазках пациентов с экземой выявлены обратимо измененные стареющие пойкилоциты, вышедшие в кровеносное русло из депо крови. Наблюдаются эхиноциты со спикулами на поверхности (от 30 до 50) (рис. 4а), стоматоциты, у которых пэллор (центральное просветление) имеет

округлую или прямоугольную форму, напоминающую рот (рис. 4б). Появление стоматоцитов может быть стимулировано повышением проницаемости плазмалеммы для ионов натрия и калия.

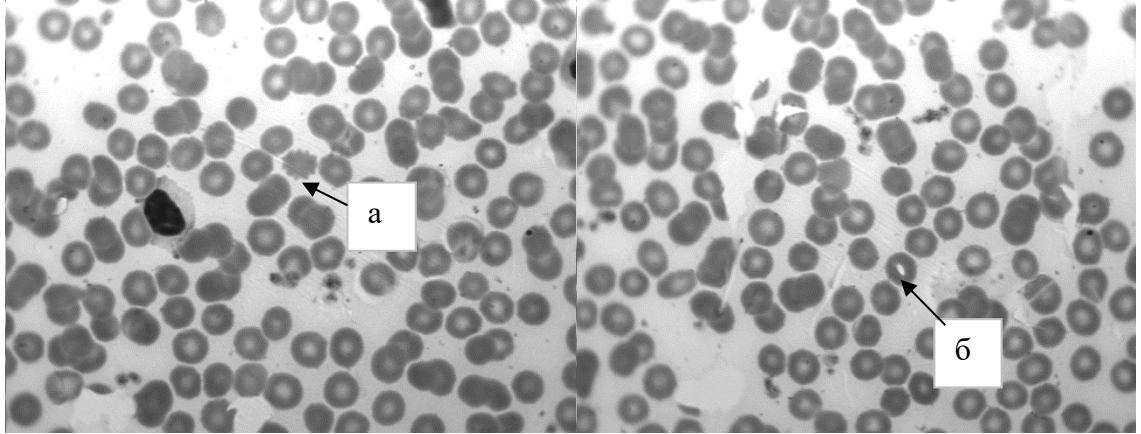


Рис. 4. Дегенеративно измененные, обратимые формы эритроцитов больных экземой: а) эхиноцит, б) стоматоцит (увеличение X1000)

При хроническом экзематозном процессе выявлено присутствие необратимо измененных эритроцитов. Сюда относятся акантоциты – шарообразные эритроциты без паллора с шипами на поверхности (3-12) разной величины и толщины, с булавовидным расширением на конце (рис. 5).

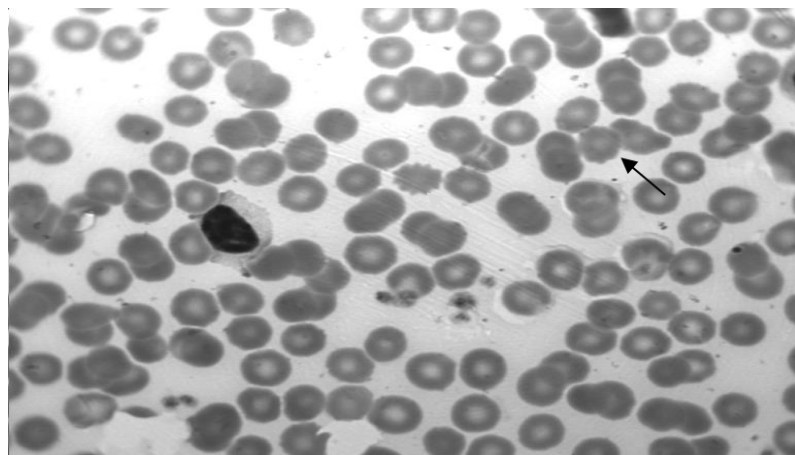


Рис. 5. Изоморфизм эритроцитов периферической крови больных экземой (увеличение X1000), стрелкой указан акантоцит

Эти клетки имеют нормальные параметры (объем и площадь поверхности, содержание гемоглобина). Изменение их формы вызывается первичными изменениями функций липидов компонента плазмалеммы. По данным литературы развитие экземы сопровождается гипохолистеринемией, снижением уровня эфиров холестерина, сдвигом показателей эстерификации.

На мазках больных экземой также обнаружены шизоциты и шлемовидные клетки – фрагменты разрушенных эритроцитов (рис. 6). Появление таких клеточных форм связано с запуском аутоиммунных механизмов при патологии. У эритроцитов изменяются антигенные свойства, в результате чего клетки подвергаются атаке макрофагами.

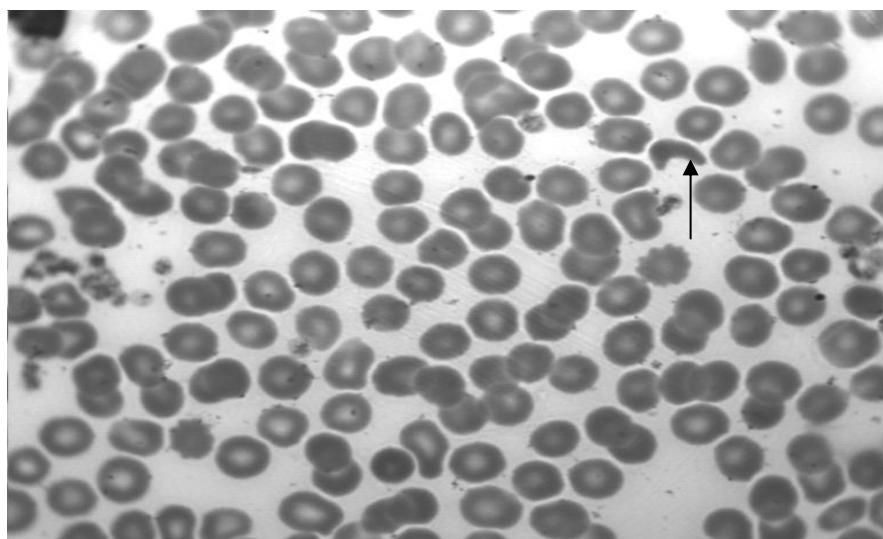


Рис. 6. Анизоморфизм эритроцитов экзематозных больных (увеличение X1000), стрелкой указана шлемовидная клетка.

Таким образом, в результате проведенного исследования выявлены молекулярно-метаболические адаптивные изменения системы крови, зависящие как от количественного и качественного состава клеток, так и от особенностей формирования расстройств гемодинамики.

3.2. Морфофункциональные особенности лейкоцитов здоровых людей и больных экземой

В ходе эксперимента в группе больных экземой установлено изменение количества лейкоцитов и процентного соотношения разных их субпопуляций по сравнению с нормой (табл. 3).

Таблица 3

Лейкоцитарная формула здоровых людей и больных экземой

Группа обследованных	Лейкоциты, 10^9л^{-1}	Эозинофилы, %	Нейтрофилы, %		Лимфоциты, %	Моноциты, %
			палочкоядерные	сегментноядерные		
Здоровые люди (n=20)	$5,44 \pm 0,30$	$3,66 \pm 0,11$	$2,80 \pm 0,64$	$53,53 \pm 3,39$	$35,33 \pm 2,62$	$7,46 \pm 1,14$
Больные экземой (n=20)	$6,55 \pm 0,32^*$	$1,80 \pm 0,26^*$	$3,73 \pm 0,77^*$	$52,40 \pm 3,02$	$35,60 \pm 2,50$	$8,13 \pm 1,13^*$

* – достоверность различий по сравнению с результатами измерений в контрольных пробах по критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Выявлено, что хроническое течение экземы сопровождается повышением количества лейкоцитов на 20,4% ($p < 0,05$) по сравнению с группой практически здоровых людей. В результате исследования в опытной группе установлено снижение количества эозинофилов на 50,8% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Количество палочкоядерных форм нейтрофилов и моноцитов у больных экземой было повышено на 33,2% ($p < 0,05$) и 9,0% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению со здоровыми людьми. Достоверных изменений соотношения сегментноядерных нейтрофилов и лимфоцитов при развитии болезни выявлено не было.

Анализ лейкоцитарной формулы больных экземой позволяет сделать вывод о напряженности неспецифического звена иммунитета при развитии патологии.

Развитие эозинопении может быть связано с изменением гормонального статуса при патологическом процессе (увеличением концентрации адреналина, кортикостероидов, трийодтиронина).

Наблюдаемое явление обусловлено дискортицизмом. При этом кортикостерон оказывает минералокортикоидное действие, что вызывает увеличение в клетках уровня ионов Na^+ , повышает воспалительный потенциал тканей [Song, Yoo, Ying, 2011].

Повышение относительного содержания в периферической крови функционально незрелых палочкоядерных форм нейтрофилов свидетельствует об увеличении скорости их поступления в кровотоки. Это явление наблюдается при нейтрофилии, развивающейся при перераспределительной тактике реагирования иммунной системы. В данном исследовании повышенные функциональные нагрузки на зрелые нейтрофилы и их дисфункция провоцировали выход доли клеток из маргинального пула в общий кровоток [Fowler, 2008].

В условиях развития экзематозного процесса увеличение процентного содержания молодых палочкоядерных нейтрофилов по сравнению с нормой при сохранении стабильного количества зрелых сегментоядерных форм указывает на дисфункцию зрелых форм нейтрофилов.

Моноцитоз, наблюдаемый у больных экземой, связан с наличием в организме воспалительных процессов. Повышение содержания моноцитов в периферической крови является защитной аутоиммунной реакцией, запускаемой усиленной выработкой IgG. По данным литературы в плазме больные хронической экземой отмечают высокий титр аутоантител, оседающих на мембране других клеток (эпителиоцитов, эндотелиоцитов). Развиваются аллергические реакции, гиперчувствительность немедленного типа [Galli et al, 2010].

Таким образом, экзематозный процесс хронического типа активизирует систему гипофиз-кора надпочечников, что отражается на морфофункциональном профиле лейкоцитов больных. В ходе проведенного исследования у пациентов с экземой выявлена повышенная реактивность неспецифических механизмов иммунной защиты, характеризующаяся увеличением общего количества лейкоцитов, содержания моноцитов и

палочкоядерных нейтрофилов на фоне снижения уровня эозинофилов и дисфункции фагоцитарной активности сегментоядерных нейтрофилов.

Выводы

1. При экземе количество эритроцитов, концентрация гемоглобина и гематокрит повышаются на 2,8%, 3,4% и 3,5% соответственно по сравнению с контролем. Коэффициент гемоконцентрации при патологии снижен на 4% по сравнению с группой здоровых доноров. СОЭ у больных людей повышается на 23% по сравнению с нормой.
2. Средние габаритные размеры эритроцитов, их толщина и сферичность при патологии снижены на 3,8%, 6,9% и 10,6% соответственно по сравнению с контролем. Кислородная емкость крови в группе больных лиц повышена на 5,7% по сравнению с нормой.
3. Содержание микроцитов при экзематозном процессе увеличено на 78% по сравнению с физиологической нормой. Диаметр микроцитов у здоровых людей составил $6,2 \pm 0,1$ мкм, у больных экземой $6,3 \pm 0,1$ мкм. Снижается диаметр макроцитов у больных экземой: $8,2 \pm 0,1$ мкм при патологии против $8,3 \pm 0,1$ мкм у здоровых лиц.
4. При хроническом течении экземы повышается количество лейкоцитов на 20% по сравнению с группой здоровых людей. В опытной группе снижается количество эозинофилов на 51% по сравнению с контролем. Количество палочкоядерных форм нейтрофилов и моноцитов у больных экземой повышено на 33% и 9% соответственно по сравнению со здоровыми людьми.

Список использованных источников

1. Абдрахимова Н. А., Надырченко Р. М., Мустафина Г. Р. и др. Иммунологическая концепция развития микробной экземы // Медицинский вестник Башкортостана. 2014. № 9 (1). С. 109–116.
2. Белова О. В., Арион В. Л., Сергиенко В. И. Роль цитокинов в иммунологической функции кожи // Иммунология, аллергология, инфекциология. 2008. № 1. С. 41–55.
3. Большакова А. В., Петухова О. А., Пинаев Г. П., Магнуссон К. Е. Сравнительный анализ способов субклеточного фракционирования для выявления α -актина 1 и α -актина 4 в клетках A431 // Цитология. 2009. Т. 51, № 2. С. 122–129.
4. Воробьев И. А., Малый И. В. Об отношении длины и динамики микротрубочек: краевой эффект и свойства протяженной радиальной сети // Цитология. 2008. Т. 50, № 16. С. 477–486.
5. Дедкова А. В., Юсупова Л. А., Валеева Ю. В. Изучение клинического значения функционального состояния моноцитов у больных инфекционной экземой и его коррекция // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 1. URL: <http://www.science-education.ru/101-5388> (дата обращения: 25.03.2012).
6. Денисова Я. Е. Современные представления о молекулярно-генетических механизмах возникновения истинной экземы // Научные ведомости белгородского государственного университета. Серия: медицина. Фармация. 2013. № 23 (18). С. 5–11.
7. Каракаева А. В., Утц С. Р. Диагностика поражения кожи при экземе с использованием трансрезонансной функциональной топографии // Практическая медицина. 2014. № 8 (84). С. 61–65.
8. Клиническая дерматовенерология / под ред. Ю. К. Скрипкина, Ю. С. Бутова. М.: ГОЭТАР-Медиа. 2009. Т. 2. С. 106–116.

9. Котрехова Л. П. Диагностика и рациональная терапия дерматозов сочетанной этиологии // *Consilium medicum*. 2010. № 3. С. 6–11.
10. Кругликов Г. Г., Суслов В. Б., Лихачева Л. М. и др. Особенности функциональной морфологии клеток на отпечатках органов, пленочных препаратах соединительной ткани и мазках крови // *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2014. № 4. С. 86–92.
11. Кубанова А. А. *Дерматовенерология: клинические рекомендации*. М.: ДЭКС-Пресс. 2010. 428 с.
12. Кубанова А. А., Скрипкин Ю. К., Акимов Г. В. и др. *Экзема*. М.: ДЭКС-Пресс. 2011. 661 с.
13. Леонова Е. В., Чантурия А. В., Висмант Ф. И. *Патофизиология системы крови*. Минск: БГМУ. 2009. 304 с.
14. Ломакин А. Ю. Роль динамики микротрубочек и структуры их сети в организации внутриклеточного транспорта: Автореф. дис... канд. биол. наук. Москва, 2009. 23 с.
15. Лукьяненко Л. М., Зубрицкая Г. П., Венская Е. И. и др. Влияние амилоидов на физико-химическое состояние липидного бислоя мембран эритроцитов // *Новости медикобиологических наук*. 2013. Т. 7, № 1. С. 9–13.
16. Лысенко О. В., Лукьянчикова Л. В. Особенности лечения больных микробной экземой с доказанной патологией иммунной системы // *Южно-уральский медицинский журнал*. 2015. № 1. С. 4–10.
17. Мордвинов В. А., Фурман Д. П. Цитокины: биологические свойства и регуляция экспрессии гена интерлейкина-5 человека // *Вестник ВОГиС*. 2009. Т. 13, № 1. С. 53–67.
18. Мороз В. В., Голубев А. М., Афанасьев А. В. и др. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях // *Общая реаниматология*. 2012. № 8 (1). С. 52.
19. Нагоев Б. С., Нальчикова М. Т. Особенности перекисного окисления липидов у больных экземой // *Кубанский научный медицинский вестник*. 2012. № 4. Р. 74–77.

20. Наумова Э. М., Борисова О. Н., Беляева Е. А. и др. Саногенез и фрактально-модульное строение гемоиммунной системы (обзор литературы) // Вестник новых медицинских технологий. 2016. Т. 10, № 2, С. 262–273.
21. Оспанова С. А. Совершенствование терапии экземы с учетом эндогенной интоксикации: Автореф. дис... канд. мед. наук. Алматы, 2008. 24 с.
22. Охлопков В. А., Правдина О. В., Зубарева Е. Ю. Федеральные рекомендации по ведению больных экземой. М. 2013 URL: http://www.cnikvi.ru/docs/clinic_recs/bolezni-kozhi-i-pridatkov-kozhi
23. Павлова О. В. Экзема: Этиология, патогенез, клиника, диагностика и лечение. М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ». 2010. 153 с.
24. Патрушев А. В., Сухарев А. В., Иванов А. М. и др. Роль очагов инфекции при различных кожных заболеваниях // Вестник дерматологии и венерологии. 2015. № 5. С. 34–41.
25. Сладкова Е. А. Цитоархитектоника и свойства поверхности лимфоцитов у здоровых людей (доноров) и при развитии лимфопролиферативных процессов: дис... канд. биол. наук. Белгород, 2015. 172 с.
26. Соколова Т. В., Малярчук А.П. Дерматология // Consilium medicum. 2011. № 2. С. 32–33.
27. Холден К., Остлер Л. Экзема и контактный дерматит. М.: МЕДпресс-информ. 2009. 111 с.
28. Arrizabalaga O., Lacerda H. M., Zubiaga A. M., et al. Rac1 protein regulates glycogen phosphorylase activation and controls interleukin (IL)-2-dependent T cell proliferation // J. Biol. Chem. 2012. V.287 (15).P. 11878–11890.
29. Bartlett A. Adult eczema // Nurs Stand. 2010. № 24 (43). P. 51.
30. Biagini Myers J. M., Khurana Hershey G. K. Eczema in early life: genetics, the skin barrier, and lessons learned from birth cohort studies // J. Pediatr. 2010. № 157 (5). P. 704–714.
31. Bonamonte D., Foti C., Vestita M., et al. Nummular eczema and contact allergy: a retrospective study // Dermatitis. 2012. № 23 (4). P. 153–157.

32. Brown S. J., McLean W. H. Eczema genetics: current state of knowledge and future goals // *J. Invest Dermatol.* 2009. № 129 (3). P. 543–552.
33. Chesarone M. A., Goode B. L. Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2009. V. 21. P. 28–37.
34. de Jongh C. M., John S. M., Bruynzeel D. P., et al. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to chronic irritant contact dermatitis // *Contact Dermatitis.* 2008. V. 58, № 5. P. 269–277.
35. Fletcher D. A., Mullins R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton // *Nature.* 2010. V. 469 (7280). P. 485–492.
36. Fowler J. Chronic hand eczema: a prevalent and challenging condition // *Cutis.* 2008. V. 82, № 4. P. 4–8.
37. Galli E., Ciucci A., Cersosimo S. et al. Eczema and food allergy in an Italian pediatric cohort: no association with TLR-2 and TLR-4 polymorphisms // *Int. J. Immunophatol Pharmacol.* 2010. № 23 (2). P. 671–675.
38. Heng Y. W., Koh C. G. Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle // *The international journal of biochemistry and cell biology.* 2010. V. 42. P. 1622–1633.
39. Ito T., Tokura Y. The role of cytokines and chemokines in the T-cell-mediated autoimmune process in alopecia areata // *Exp. Dermatol.* 2014. № 23 (11). P. 787–791.
40. Lan C. C., Tu H. P., Wu C. S., et al. Distinct SPINK5 and IL-31 polymorphisms are associated with atopic eczema and non-atopic hand dermatitis in Taiwanese nursing population // *Experimental dermatology.* 2011. V. 20, № 12. P. 975–979.
41. Lawton S. Assessing and treating adult patients with eczema // *Nurs Stand.* 2009. № 23 (43). P. 49–56.
42. Lin X. R. Discussion on integrative medical research of treatment of eczema // *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 2008. № 28 (8). P. 678–680.
43. Luckheeram R. V., Zhou R., Verna A. D., Xia B. CD4+T cells: differentiation and functions // *Clinical and developmental immunology.* 2012. V. 12. P. 1–10.

44. McPherson T., Sherman V. J., Aslam A. et al. Fillagrin null mutation associate with increased frequencies of allergen-specific CD 4+ T-helper 2 cells in patients with atopic eczema // *Br. J. Dermatol.* 2010. № 163 (3). P. 544–549.
45. Molin S., Vollmer S., Weiss E. H., et al. Deletion of the late cornified envelope genes LCE3B and LCE3C may promote chronic hand eczema with allergic contact dermatitis // *J. Investigating Allergol Clin Immunol.* 2011. № 21 (6). P. 472–479.
46. Morley S. C. The actin-bundling protein L-plastin: a critical regulator of immune cell function // *International journal of cell biology.* 2012. V. 8. P. 2–10.
47. Saarikangas J., Zhao H., Lappalainen P. Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides // *Physiol Rev.* 2011. V. 90. P. 259–289.
48. Song Y., Yoo X., Ying H. Thyroid hormone action in metabolic regulation // *Protein cell.* 2011. V. 2 (5). P. 358–368.
49. Treadwell P. A. Eczema and infection // *Dis. J. Pediatr. Infect.* 2008. № 27 (6). P. 551–552.
50. Vries C. J., Witt-de Jong A. W., Dirven-Meijer P. C., et al. The Dutch College of General Practitioners practice guideline Eczema // *Ned Tijdschr Geneesk.* 2014. № 158. P. A8009.