

Н.А.КУЗОВКОВА,  
А.В.ЖУКОЦКИЙ  
НИИ эпидемиологии  
и микробиологии МЗ РБ, Минск  
Российский государственный  
медицинский университет,  
г. Москва

УДК 577.27.003.12

## ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА НА СУБКЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ

Разработана информативная модель исследования клеток на субклеточном уровне для анализа морфофункциональной активности иммунокомпетентных и вспомогательных клеток по уровню экспрессии интерфазного хроматина. Представлены результаты количественной оценки активации клеток *in vivo* и *in vitro* по изменениям морфоденситометрических параметров гетеро- и эухроматина.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** *интерфазный хроматин, иммунокомпетентные клетки, видеокомпьютерные технологии.*

*Имунопатология, аллергология, инфектология 2001, 3: 31-37.*

## POTENTIALITIES FOR ASSESSMENT OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF IMMUNE SYSTEM CELLS ON SUBCELLULAR LEVEL

N.A.KUZOVKOVA, A.V.ZHUKOTSKY

*Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Minsk*

*Russian State Medical University, Moscow*

Informative model of studies on functional activity of immune cells on the level of interphase chromatin with the usage of video-computer technologies has been elaborated. The results of quantitative assesment of cells *in vivo* and *in vitro* as regards morphodensitometric parameters of hetero- and euchromatin are presented.

**KEY WORDS:** *image analises, interphase chromatin, immunocompetent cells.*

*Immunopathol., allergol., infectol. 2001, 3: 31-37.*

Исследования последних лет свидетельствуют о том, что возможности ранней диагностики развития патологических процессов определяются морфологическими изменениями клеток, в частности, аппаратом, вызывающим дерепрессию генома (надмолекулярная организация хроматина). Показана ведущая роль интерфазного хроматина ядер в регуляции процессов активации и пролиферации клеток [1, 2, 3]. Этот факт представляет особый интерес для изучения механизмов иммунопатологии на субклеточном уровне. В первую очередь это касается иммунокомпетентных клеток, так как ряд иммунологических классификаций строится по морфо-

логическим признакам. Но ограниченность и несовершенство методических приемов количественного морфологического анализа существенно сужает возможности изучения иммуногенеза, исходя из новых концептуальных схем, имеющих не только в общей, но и молекулярной биологии, где показана роль соотношения морфологических компонент в репрограммировании генома [4]. С другой стороны, современные количественно-морфологические исследования показали информативность количественной оценки компонент хроматина на основании четырехкомпонентной морфологической модели для объективизации степени активированно-

сти генома [5-8]. Эти результаты позволили привлечь новые методы для изучения функциональной активности иммунокомпетентных и вспомогательных клеток иммунной системы, так как известно, что все компоненты иммунной системы генетически детерминированы. Основой иммуноцитогенетических исследований являются, как известно, хромосомы первично делящихся в культуре лимфоцитов, что соответствует их состоянию в интерфазном ядре лимфоцита, циркулирующего в организме. Вместе с тем, активно функционирующий интерфазный хроматин (ИХ) является более информативной системой, чем метафазные хромосомы, и служит цитодиагностическим маркером ранних функциональных нарушений на субклеточном уровне, так как в нем реализуются начальные этапы регуляции функций клеток и их нарушения при различной патологии.

Хроматин интерфазного ядра, как и хромосом, неоднороден. Плотные участки представляют собой неактивный хроматин, в котором упакованы молекулы ДНК, функционально активен деконденсированный хроматин. Показано, что степень конденсации этих участков меняется в зависимости от физиологического и генетического состояния клетки, а также от воздействия на нее различных химических и физических факторов. В связи с этим представляет несомненный интерес изучение структурных параметров хроматина в разных популяциях и субпопуляциях иммунокомпетентных клеток, его изменение при активации клетки в норме и при различных патологических состояниях.

**Целью** работы явилось исследование различных функциональных состояний клеток иммунной системы на уровне интерфазного хроматина с применением видеокomпьютерных технологий.

**Материалы и методы.** Работа проведена на аппаратно-программном комплексе "ДиаМорф" (Россия), наиболее полно реализующем метод компьютерной телевизионной морфоденситометрии [2].

Основными составляющими этого комплекса являются: световой микроскоп, стандартная телевизионная камера IBM PC/AT, устройство ввода и оцифровки телеизображений, лазерный принтер, системный монитор с возможностью подключения выполняемых модулей. Обработку изображений проводили на основе программной среды ДиаМорф – СИТО [6].

Объектом исследования являлись лимфоциты периферической крови больных пневмонией (Пн), острым и хроническим обструктивным бронхитом (ОБ и ХОБ гнойный и негнойный), бронхиальной астмой (БА), а также здоровых доноров. Клетки окрашивали по специальной методике [5], позволяющей удалить РНК и проводить измерение структур ДНК.

Исследования ядер лимфоцитов проводили по следующим этапам: ввод объекта изображения в компьютер с помощью телевизионной камеры, улучшение качества изображения, архивирование изображений в памяти компьютера, выделение участков эухроматина и гетерохроматина, измерение морфометрических и денситометрических параметров различных структур интерфазного хроматина.

Первичной информацией о цитологическом объекте является линия сканирования. Набор таких телевизионных линий дает возможность построить распределение оптических плотностей в виде трехмерной матрицы, состоящей из отдельных элементов-пикселей, в которых и определяется оптическая плотность.

**Таблица 1**

**Основные параметры морфоденситометрического исследования различных структур интерфазного хроматина лимфоидных клеток**

Параметры	Определение	Функциональная сущность
Area	Площадь	Степень транскрипционной активности
Perimetr	Периметр	Размеры мембраны ядра и структур ИХ
OD	Средняя оптическая плотность	Плотность упаковки ИХ
StdOD	Среднеквадратическое отклонение средней оптической плотности	Гетерогенность интерфазного хроматина
IOD	Интегральная оптическая плотность	Плотность упаковки ДНК, уровень активации генома
FF	Фактор формы	Форма упаковки ИХ, степень транскрипции
Quota q 1-4	Доля компоненты в интегральной оптической плотности ядра	Информация о деконденсации ИХ

По максимумам оптических плотностей создается сеть, которая отражает топологию распределения хроматина для каждого ядра и является основой для морфоденситометрических (МДМ) измерений. Совмещением морфологических и денситометрических методов достигается визуализация и выделение ядерного скелетона хроматина из исходного изображения и его измерение (анализ). Скелетон хроматина является супрамолекулярным отражением функционального состояния генома.

Расчет интегральных МДМ-показателей проводили по следующим формулам:

Доля компоненты в интегральной оптической плотности ядра (quota):

$$(q1, q2, q4) = IODq \times Nq / IOD_{\text{ядра}} \times N \text{ ядра.}$$

Исследовали такие структуры, как ребра и ячейки, свободные (висячие) ребра сети интерфазного хроматина, ядро, компоненты q1 и q2 гетерохроматина, q4 (эухроматин).

### Результаты и обсуждение

Создан видеокомпьютерный архив иммунокомпетентных клеток здоровых доноров и больных неспецифическими заболеваниями легких.

Для усиления дифференциальных признаков нормы и патологии применяли принцип рецепторной активации клеток, используя феномен розеткообразования Т- и В-лимфоцитами (соответственно эритроцитами барана и мыши). Оценивали морфоденситометрические (МДМ) параметры исследованных клеток.

В таблицах 2, 3 представлены наиболее информативные МДМ-параметры, которые позволяют выявить различия в ИХ ядер лимфоцитов, выделенных из периферической крови больных исследуемых нозоформ. Так, заметны изменения морфометрических параметров ИХ ядра лимфоцитов при Пн (увеличение агеа, и снижение FF) и ХОБ гн (снижение FF), что свидетельствует о снижении транскрипционной активности в ядре в целом (табл. 2). Денситометрические параметры ИХ ядра (IOD, OD, StdOD) при Пн и ОБ существенно снижены (конденсация хроматина), что подтверждает низкую активность генома. При ХОБ повышена StdOD (гетерогенность ИХ), при БА - IOD (ДНК). МДМ-характеристика компонентов гетеро- и эухроматина дает представление о различиях в механизме процессов

активации при различных НЗЛ. Так, при пневмонии резко снижена транскрипция в компоненте q1 гетерохроматина, существенно повышена в компоненте q2 и в меньшей степени в q4 (эухроматин). FF компонент гетеро- (q1, q2) и эухроматина (q4) при Пн достоверно меняется, при ОБ - только q1. IOD при Пн имеет характерные изменения: этот показатель резко снижается для q1, многократно повышается для q2 и незначительно - для q4. При ОБ снижены IOD q1 и q2. Для остальных нозоформ изменения денситометрических параметров недостоверны.

Для В-лимфоцитов изменения МДМ-параметров ИХ и его компонент при исследованных нозоформах носят такой же характер, как и для Т-лимфоцитов: наиболее выражены особенности IOD ядра и компонент ИХ при Пн, в меньшей степени - при остальных нозоформах (табл. 3).

Особый интерес представляет распределение интегральных денситометрических показателей гетеро- и эухроматина при активации Т- и В-лимфоцитов. Так, доля (Quota) компоненты q1 в интегральной оптической плотности ядра Т-лимфоцитов при пневмонии заметно снижается, q2 и q4 - резко и атипично увеличивается (рис.1). Аналогичные изменения Quota компонент ИХ выявлены и для В-лимфоцитов (рис.2).

Таким образом, показана информативность МДМ-параметров для оценки функционального состояния Т- и В-лимфоцитов, определяемого спокойной нормой и патологией (НЗЛ).

В настоящее время для оценки иммунной системы имеется довольно большой набор тестов, позволяющих выявить дефект любого компонента. Тем не менее остается актуальной задача создания нового подхода к диагностике иммунопатологии на новом методическом уровне. Наибольший интерес представляют исследования иммунокомпетентных клеток на субклеточном уровне по изменениям, происходящим в геноме клетки, адекватно отражая их функциональную активность. Известно, что функционирование иммунной системы обеспечивается благодаря ее морфологическому субстрату, причем взаимосвязь элементов иммунной системы определяется как внутрисистемными, так и генетическими и нейроэндокринными механизмами регуляции. Морфологические изменения предшествуют функциональным, что может быть использовано в качестве прогностического критерия иммунопатологии или развития заболевания. С этой целью используют комплекс морфологических, цитохими-

**Морфоденситометрические параметры ядра и компонент интерфазного хроматина (q1, q2, q4) Т-лимфоцитов здоровых доноров и больных неспецифическими заболеваниями легких**

Группа		ЯДРО					q1		q2		q4	
		Area	FF	Iod	OD	StdOD	FF	Iod	FF	Iod	FF	Iod
Контроль	n	56	56	56	56	56	197	197	94	94	445	445
	M±m	873± 97	0,8± 0,009	35402± 1318	44± 2,6	26,3± 2,3	0,7± 0,0034	8023± 1288	1,0± 0,002	208± 27,2	1,0± 0,00	35,5± 1,5
Пневмония	n	29	29	29	29	29	69	69	59	59	146	146
	M±m	456± 25,6***	0,93± 0,014***	7651± 473***	11,9± 0,9***	3,8± 0,27***	0,83± 0,04**	925,3± 278**	0,7± 0,06**	1568± 390**	0,91± 0,02***	48,9± 48
Острый бронхит	n	13	13	13	13	13	55	55	44	44	251	251
	M±m	870± 77,5	0,8± 0,02	21173± 1724	25,4± 2,3***	13,8± 2,7**	0,8± 0,04	2820± 601	1,0± 0,008	155± 11,9	1,0± 0,00	26,0± 1,1****
ХОБ гнойный	n	83	83	83	83	83	196	196	88	88	614	614
	M±m	794± 58,4	0,9± 0,013***	37231± 2053***	46,3± 2,8	35,1± 2,4**	0,7± 0,041	11210± 1743	1,0± 0,088	227± 27,3	1,0± 0,002	36,8± 2,1
ХОБ негнойн.	n	69	69	69	69	69	159	159	69	69	335	335
	M±m	765± 36,5	0,8± 0,012	34171± 1219	47,7± 1,7	35,6± 1,35**	0,65± 0,038	11265± 1322	1,0± 0,004	193,5± 15,7	1,0± 0,00	38,3± 2,4
Бронх. астма	n	61	61	61	61	61	261	261	188	188	502	502
	M±m	1125± 46,0	0,8± 0,014	44051± 1096**	41,4± 2,8	27,1± 1,85	0,7± 0,031	6956± 1053	1,0± 0,006	234± 17,1	1,0± 0,02	35,5± 5,0

**ПРИМЕЧАНИЕ:** \* – P< 0,05; \*\* – P<0,01; \*\*\*-P<0,001 – достоверность различий по сравнению с контролем.

Таблица 3

**Морфоденситометрические параметры ядра и компонент интерфазного хроматина (q1, q2, q4) В-лимфоцитов здоровых доноров и больных неспецифическими заболеваниями легких**

Группа		ЯДРО					q1		q2		q4	
		Area	FF	Iod	OD	StdOD	FF	Iod	FF	Iod	FF	Iod
Контроль	n	32	32	32	32	32	100	100	6	6	251	251
	M±m	1047± 44,9	0,8± 0,008	83554± 4214	85,4± 6,0	84,1± 3,3	0,7± 0,035	21999± 3281	1,0± 0,00	126± 32,4	1,0± 0,001	31,1± 1,0
Пневмония	n	26	26	26	26	26	18	18	34	34	60	60
	M±m	1153± 126,2	0,85± 0,039	5102± 987 ***	9,1± 2,6***	3,4± 0,65***	0,90± 0,05**	611,5± 317**	0,9± 0,09**	779± 148,5***	0,9± 0,06	109,1± 22,1*
Острый бронхит	n	22	22	22	22	22	156	156	115	115	251	251
	M±m	1188 70,1	0,8± 0,017	23632± 1124	21,7± 1,9***	14,2± 1,4***	0,8± 0,021*	1781± 303**	1,0± 0,007	150± 9,8	1,0± 0,001	22,6± 1,4*
ХОБ гнойный	n	40	40	40	40	40	67	67	14	14	138	138
	M±m	662± 37,8***	0,9± 0,009*	35142± 1857***	54,4± 3,1***	43,6± 2,6***	0,7± 0,053	14887± 2303	1,0± 0,008	219± 57,6	1,0± 0,00	37,2± 2,4
ХОБ негнойн.	n	66	66	66	66	66	168	168	97	97	481	481
	M±m	903± 51,8	0,85± 0,015	38015± 1661	45,2± 1,8***	31,9± 1,4***	0,6± 0,036*	13061± 1443*	1,0± 0,003	267,5± 42,9*	1,0± 0,00	36,3± 1,35*
Бронх. астма	n	47	47	47	47	47	178	178	90	90	502	502
	M±m	1094± 46,9	0,8± 0,015	44423± 1694**	42,7± 2,5***	27,8± 2,3***	0,65± 0,037	9021± 1432*	1,0± 0,004	206± 17,7*	1,0± 0,00	36,7± 1,6*

**ПРИМЕЧАНИЕ:** \* – P< 0,05; \*\* – P<0,01; \*\*\* –P<0,001 – достоверность различий по сравнению с контролем.

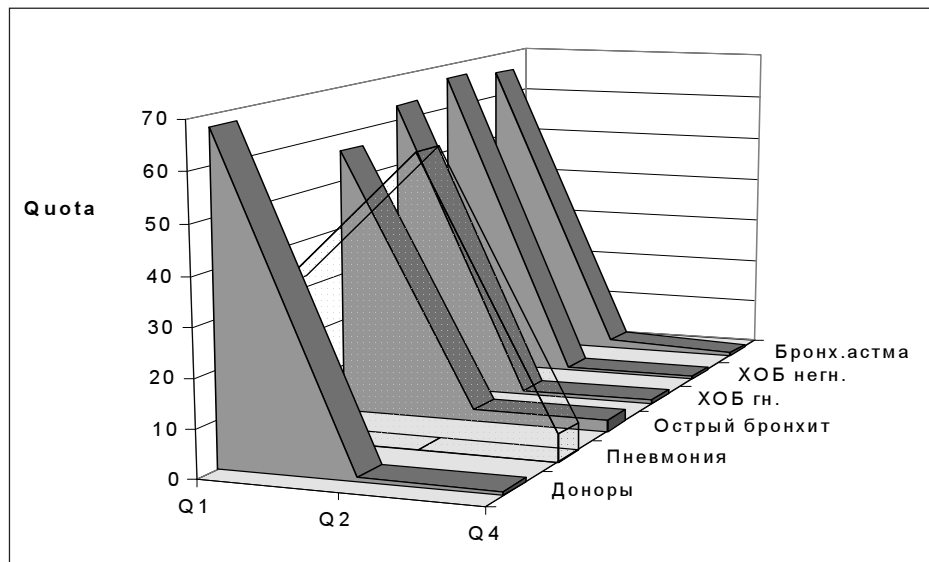
ческих и иммунологических методов. При этом объектом исследования является быстро реагирующий на любые изменения, доступный для изучения рециркулирующий лимфоцит крови, поскольку его характеристика дает возможность оценить функциональное состояние клетки и организма, прогнозировать физиологические и патологические состояния, тяжесть течения заболевания и эффективность лечения, изменения популяционного состава в иммунной системе.

Нами использован принцип активации Т- и В-лимфоцитов в изучении экспрессии генома как функции иммунокомпетентных клеток, которая может быть количественно оценена в интерфазе с применением световой микроскопии и видеокомпьютерной техники.

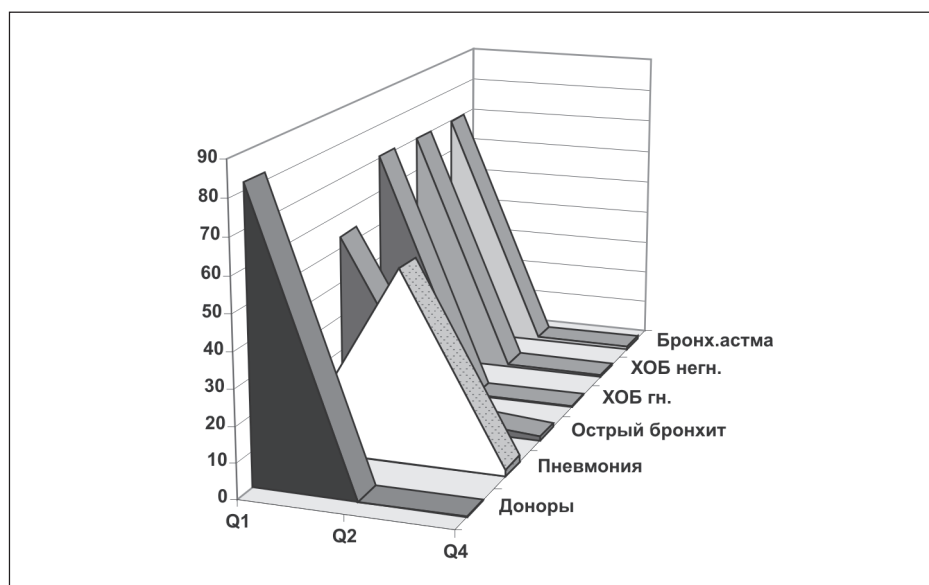
Изучение морфофункциональных особенностей Т- и В-клеток в норме и при остром или хроничес-

ком воспалении (НЗЛ) позволило выявить ряд интересных закономерностей и особенностей активации ИКК, которые могут быть использованы как дополнительные диагностические и прогностические критерии. При остром течении заболевания характер изменений интерфазного хроматина резко отличается от спокойной нормы, что свидетельствует о выраженной активизации генома в ответ на инфекцию, в то время как хроническая форма заболевания определяется менее выраженной перестройкой генома.

Усиление функции ядер вследствие антигенной активации *in vivo* сопровождается различными изменениями ультраструктурной организации хроматина, что может отражать особенности процессов генной активации. В то же время иммунологические методы не дают столь информативных результатов. Так, сравнительный анализ функциональной



**РИС.1.**  
Доля (quota) компонент интерфазного хроматина ядер Т-лимфоцитов у больных НЗЛ



**РИС.2.**  
Доля (quota) компонент интерфазного хроматина ядер В-лимфоцитов у больных НЗЛ

активности клеток иммунной системы при туберкулезе, саркоидозе, пневмонии и у здоровых доноров общепринятыми иммунологическими методами и исследование интерфазного хроматина лимфоцитов с помощью МДМ-анализа свидетельствует в пользу последнего [9, 10].

Количественная характеристика генома популяций иммунокомпетентных клеток с помощью МДМ-параметров дает возможность оценить степень их активации при различной патологии. Выяв-

лена существенная активация генома лимфоцитов при пневмонии по сравнению со спокойной нормой и хроническими НЗЛ. Применение иммуноморфоденситометрических критериев в совокупности с достижениями молекулярной биологии, видеоконピューтерной технологией и математическими программами открывает принципиально новые возможности в иммунологии, в частности, для обеспечения высокого качества иммунодиагностики.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Збарский И.Б. Организация клеточного ядра. М.: Медицина: 1988.
2. Коган Э.М., Жукоцкий А.В., Копылов В.Ф. и др. Компьютерная морфоденситометрия и ее возможности в экспериментальных и клинических исследованиях. Вестник РАМН 1995; 3:33-40.
3. Эренпрейса Е.А. Организация хроматина в ядре интерфазной клетки. Рига, "Зинатне": 1990.
4. Мантейфель В.М., Андрейчук Т.Н., Кару Т.Й. Сравнительное исследование хроматина ядер лимфоцитов при активации транскрипции действием излучения He-Ne-лазера или фитогемагглютина. Молекулярная биология. 1996; Том 26. Выпуск 5:1054-62.
5. Жукоцкий А.В. Микрофотометрический анализ интерфазных ядер гепатоцитов в норме и при функциональных нагрузках. - Автореф. канд.биол.наук. М.: 1984.
6. Жукоцкий А.В., Щеголев А.И., Бутусова Н.Н. и др. Цитофотометрический анализ соответствия структуры интерфазного хроматина, выявляемого в УФ-свете и при окрашивании галлоцианином. - Бюлл.эксперим.биол. и мед. 1985; 6:726-7.
7. Erenpreise Je, Zhukotsky A. Interphase genome as the active space: chromatin dynamic during chick embryo chondrogenesis. Mechanizm of Adeing and Development. 1993; Vol.67:21-32.
8. Zhukotsky A., Erenpreise Je. The chromatin network: image processing and verification. Proc. of the Latvian Acad. of Science. В. 1992; 7(540):74-5.
9. Кузовкова Н.А., Жукоцкий А.В., Потапова С.М. и др. Иммунофункциональные исследования лимфоцитов периферической крови при бронхолегочной патологии. В сб.: Актуальные вопросы иммунологии и аллергологии. Материалы IV съезда Белорусского научного общества иммунологов и аллргологов 2000:192-203.
10. Кузовкова Н.А., Потапова С.М., Жукоцкий А.В., Якубова Н.И. Морфоденситометрические особенности интерфазного хроматина ядер гранулоцитов и моноцитов в норме и у больных пневмонией. В сб.: Актуальные вопросы иммунологии и аллергологии. Материалы IV съезда Белорусского научного общества иммунологов и аллргологов 2000:203-6.
11. Zhucotsky A., KopylovV., Marchenko O. et al. New Method Computerized TV Morphodensitometry of RBOs: Research on Low-Dose Radiation. Acta cytologica. 1994; vol.38; 4:644.