



УДК: 616–002–076:612.112.92

ЗНАЧЕНИЕ ЦИТОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЭОЗИНОФИЛОВ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

Н.А. ШУТОВА
М.А. КУЧЕРЯВЧЕНКО
И.А. СУЛХДОСТ

*Харьковский национальный
медицинский университет*

e-mail: md.shutova@mail.ru

В статье приведены данные о роли эозинофилов в остром неиммунном воспалении. Исследована эозинофильная реакция при карагиненовом остром асептическом воспалении – количество эозинофилов в экссудате, периферической крови, эозинопоэз и функциональная активность эозинофилов очага и крови. Основные функции эозинофилов изучены в основном в патогенезе иммунных реакций, где за счет синтеза гистаминазы они регулируют уровень гистамина в очаге и крови. Вместе с тем, активное высвобождение эозинофилами ряда цитотоксических ферментов предполагает активное участие этих клеток в острых неиммунных воспалительных процессах.

Ключевые слова: воспаление, эозинофилы, эозинофильная реакция, эозинофильная пероксидаза, клетки-эффекторы.

Важным вопросом в изучении механизмов воспаления считается изучение роли клеток-эффекторов при воспалении, где критерием оценки их эффекторно - регуляторной активности, а также степень межклеточного взаимодействия друг с другом, определяются степенью активности медиаторов-модуляторов, источником которых являются непосредственно клетки - эффекторы.

На сегодняшний день достаточно четко определено участие тучных клеток (ТК) в остром воспалительном процессе. Высокая полифункциональность ТК обуславливает взаимодействие их с нейтрофилами, моноцитами-макрофагами, эндотелиоцитами. Регулирующее взаимовлияние ТК с другими клетками-эффекторами воспалительного процесса, обусловлено способностью медиаторов самих ТК оказывать разнонаправленное действие на одни и те же процессы. Это подтверждается многочисленными исследованиями, выполненными на кафедре патологической физиологии ХНМУ: показана роль регулирующего влияния лейкоцитов на ТК, описаны взаимодействия между ТК и эндотелиоцитами, фибробластами. Получены данные о значении ТК в хроническом воспалении, где они оказывают сдерживающее влияние на развитие воспалительного процесса [1 – 6].

Имеются данные о взаимодействии нейтрофилов и моноцитов при воспалительных процессах различного вида: острый перитонит, экзема, псориаз [7].

Вместе с тем, сведений о роли эозинофилов и их взаимодействии с другими клетками-эффекторами в остром неиммунном воспалении недостаточно. Достоверно известно, что эозинофилы осуществляют противопаразитарный внеклеточный цитолиз, принимают участие в антибактериальной защите [8, 9]. Эозинофилы участвуют в патогенезе иммунного воспаления, где за счет синтеза гистаминазы регулируют конечный уровень гистамина, вырабатываемого ТК и базофилами в очаге и крови [10, 11]. Активное высвобождение эозинофилами ряда цитотоксических ферментов (эозинофильной пероксидазы (ЭПО), главного основного белка, эозинофильного катионного белка), активных форм кислорода [12], предполагает активное участие этих клеток в острых неиммунных воспалительных процессах, также как нейтрофилов, ТК и других клеток.

Цель работы. Изучить роль эозинофилов в патогенезе воспаления и определить эффекторно-регуляторную активности эозинофилов в остром неиммунном воспалении.

Материалы и методы. Работа выполнена на 157 крысах самцах линии Вистар массой 180-200 г, использованы патологические, гематологические, цитохимические и статистические методы исследования.

Модель карагиненового острого асептического перитонита воспроизводили путем внутривентрального введения 5 мг λ-карагинена в 1 мл изотонического раствора NaCl. Исследования проводили на 3, 6, 12 час, 1, 2, 3, 5, 7 и 10 суток. На каждый срок использовали 6 крыс [13].

О лейкоцитарной реакции очага воспаления судили на основании определения ОКЛ (общее количество лейкоцитов) в брюшной полости и клеточного состава экссудата (на основании определения количества нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов и лимфоцитов). О лейкоцитарной реакции периферической крови судили на основании определения ОКЛ и лейкоцитарной формулы [14].



О функциональной активности эозинофилов очага и периферической крови судили на основании активности маркерного фермента эозинофилов – эозинофильной пероксидазы, которую определяли цитохимическим методом. В растворе, содержащем этанол (30%), ацетат натрия (1%) и сульфат цинка (0,038% при pH=6±0,5), фиксировали мазок экссудата или крови 10 мин. В фиксирующий раствор добавляли 3,3'-диаминобензидин (DAB) до концентрации 0,5 мг/мл, а также H₂O₂ до 0,02 % (добавляется непосредственно перед началом реакции). Окрашивали около 10 мин (время реакции калибровали для оптимизации интенсивности окрашивания). Докрашивали 0,5-1% раствором метилового зеленого или неразведенным гемоломом, что позволило повысить контрастность реакции и увидеть даже слабо окрашенные клетки. Стекла промывали дистиллированной водой, высушивали, и подсчитывали количество окрашенных клеток под световым микроскопом при увеличении x 900. Степень дегрануляции эозинофильных лейкоцитов обратно пропорциональна степени их окрашивания [15].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью методов вариационной статистики t-критерия Стьюдента, оценивая вероятность полученных результатов на уровне значимости не менее, чем 95 % (p ≤ 0,05) [16].

Результаты. В ходе выполнения работы в очаге в ранние сроки воспаления наблюдалась заметная тенденция к снижению количества эозинофилов по сравнению с таковым в брюшной полости интактных крыс, по-видимому, за счет альтерации с последующей дегрануляцией эозинофилов, и, возможно, уменьшения миграции (рис. 1).

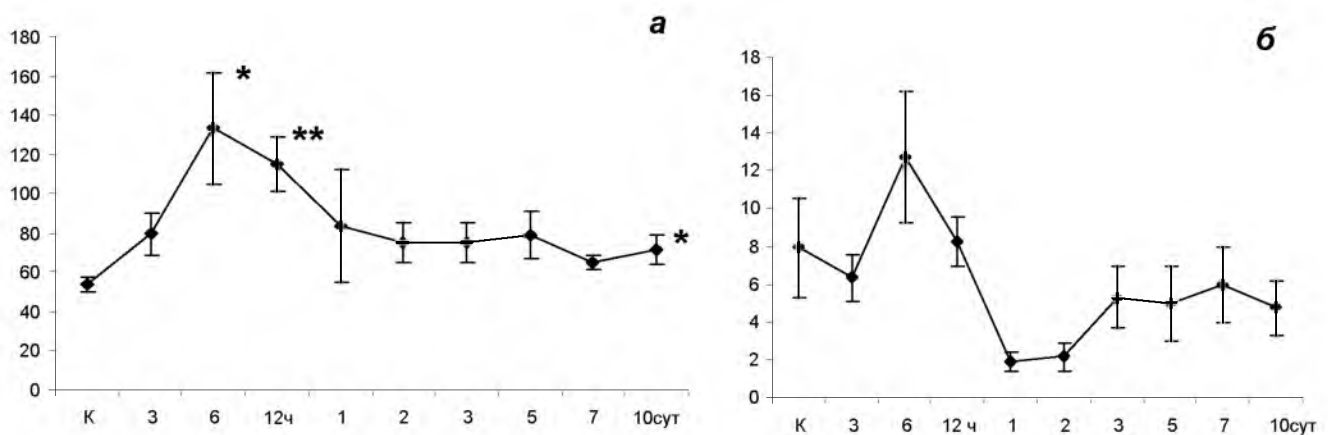


Рис. 1. Лейкоциты брюшной полости крыс ($\times 10^6$ /брюшную полость) в динамике острого асептического перитонита; **а** – ОКЛ, **б** – эозинофилы

К 6-му ч количество эозинофилов имело выраженную тенденцию к увеличению – в 1,7 раза, что соответствовало пику ОКЛ.

На 1-е сут наблюдалось минимальное количество эозинофилов в очаге – более чем в 4 раза ниже контроля, в последующем оно возрастало относительно 1-х сут и до 10-х сут колебалось в близких пределах с незначительными пиками на 3-и и 7-е сут. Эта динамика количества эозинофилов не совпадала с таковой динамикой ОКЛ и нейтрофилов.

ОКЛ в брюшной полости снижалось к 1-м сут по сравнению с 6-м ч, однако, оставалось выше контрольного значения в 1,8 раза. В последующем ОКЛ поддерживалось примерно на том же уровне с некоторым снижением на 3-и и 7-е сут, а на 10-е сут вновь было достоверно больше контроля. Количество палочкоядерных нейтрофилов на 1-е сут оставалось достоверно больше контроля, на 3-и сут наблюдался повторный выраженный пик, на 5-е и 10-е сут практически не отличалось от контроля, а на 7-е сут отмечалось не столь выраженное, но достоверное увеличение.

В костном мозге количество эозинофилов заметно возрастало с 3-го часа по 10-е сут с пиками на 2-е и особенно на 7-е (рис. 2). При этом на 2-е сут оно соответствовало пику ОКК (общее количество кариоцитов) и отдельных клеточных форм, свидетельствующим об активации гемопоэза, а на 7-е сут – повторному увеличению ОКК, по-видимому, связанному с развитием гиперплазии костного мозга, характерной для воспаления в это время [3]. Это подтверждается значительным увеличением содержания бластных клеток в костном мозге на 7-е сут.

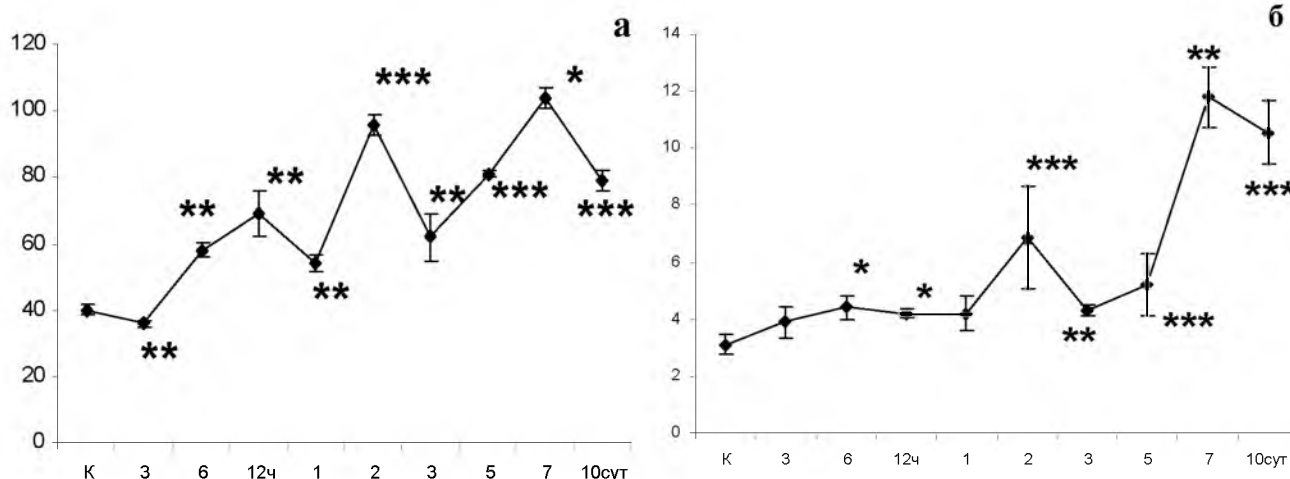


Рис. 2. Лейкоциты красного костного мозга ($\times 10^6/\text{бедро}$) в динамике острого асептического перитонита; * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$ в сравнении с контролем: **а** – ОКК, **б** – эозинофилы

Динамика количества эозинофилов не совпадала с таковой ОКК и нейтрофилов до 1-х сут. К 3-му ч прослеживалось снижение ОКК и числа нейтрофилов, с 6-го по 12-й ч – увеличение с пиком на 12-й ч, что, видимо, было связано сначала с выходом костномозговых клеток из постмитотического резервного пула, а затем – с активацией гемопоэза. В то же время количество эозинофилов на 3-й ч имело тенденцию к увеличению, а на 6-й и 12-й ч возрастало достоверно, но не столь значительно, с некоторым пиком на 6-й ч.

В периферической крови количество эозинофилов имело тенденцию к увеличению в первые 3 ч, по-видимому, в связи со снижением их выхода в брюшную полость, к уменьшению – на 6-й и 12-й ч, связанное по-видимому с усиленной их дегрануляцией в этот период; к повторному увеличению – на 1-е, 3-и и 5-е сут и достоверно увеличивалось на 7-е сут.

Увеличение количества эозинофилов к 3-му часу и 1-м сут совпадало с пиком ОКЛ и количества отдельных лейкоцитарных форм, на 3-и и 7-е сут – с повторным увеличением ОКЛ и числа других клеток. Данные изменения ОКЛ и эозинофилов в частности, по-видимому, связано с поступлением к 3-м сут воспаления лейкоцитов из костномозгового резервного пула, на 1-е и 3-и сут – с активацией кроветворения, на 7-е – 10-е сут – с развитием гиперплазии костного мозга (рис. 3).

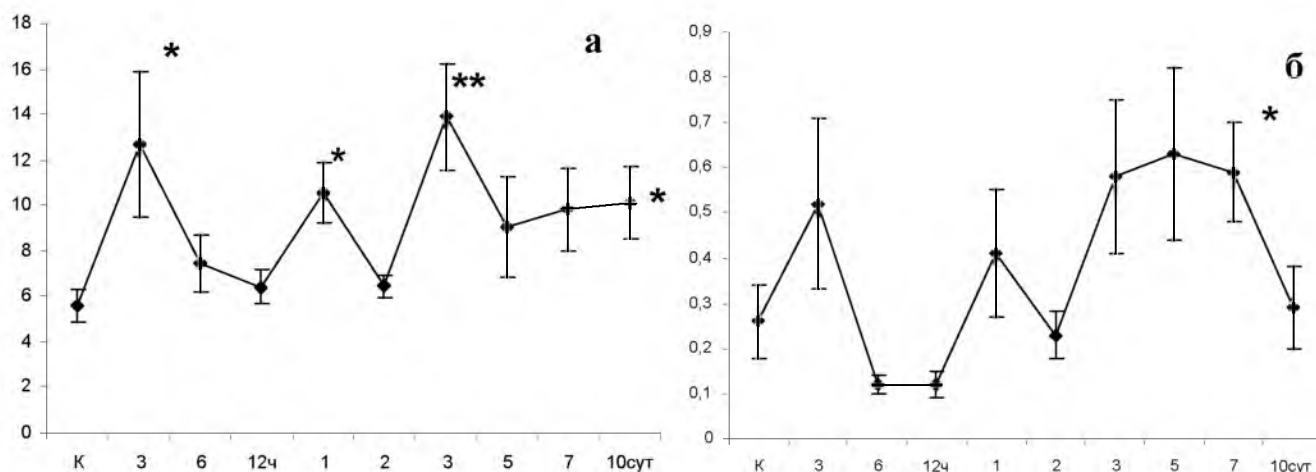


Рис. 3. Лейкоциты периферической крови ($\times 10^9/\text{л}$) в динамике острого асептического перитонита; * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ в сравнении с контролем: **а** – ОКЛ, **б** – эозинофилы

Активность ЭПО в эозинофилах экссудата заметно возрастала на 5–30-ю мин. К 12-му ч наблюдалась достоверно максимальная активность ЭПО относительно таковой у интактных



крыс, которая снижалась к 3-у ч, и особенно ко 2-м сут, где была ниже контроля.

Достоверное повышение активности ЭПО к 12-му ч сопровождалось уменьшением количества эозинофильных гранулоцитов в очаге и ККМ. Повторное увеличение активности ЭПО, наблюдаемое с 3-х по 10-е сутки, с незначительным уменьшением на 5-е сут, сопровождалось увеличением количества эозинофилов в ККМ, что может быть связано с уменьшением их количества в очаге и параллельным эозинопозом в ККМ в этот период (рис. 4).

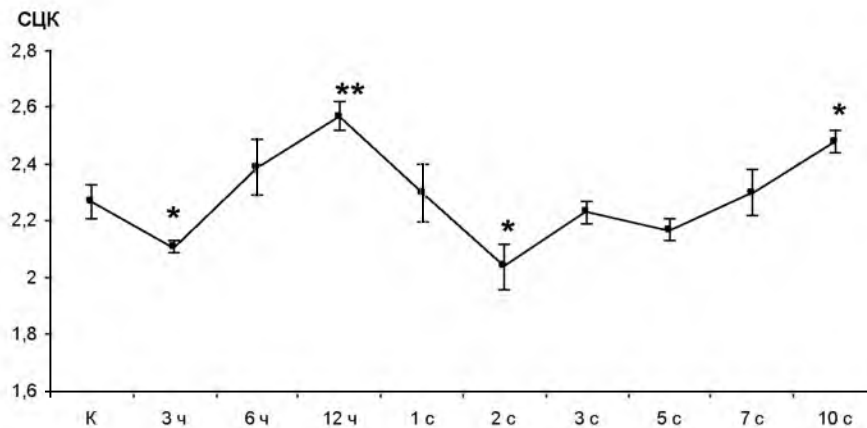


Рис. 4. Активность ЭПО в эозинофилах в брюшной полости в динамике острого асептического перитонита у крыс. * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ в сравнении с контролем

Изменения активности ЭПО не совпадали с изменениями притока эозинофилов в очаг.

Активность ЭПО в эозинофилах периферической крови имела тенденцию к повышению к 3-му, 12-му ч и 1-м сут, снижалась на 3-и сут и достоверно было увеличено на 7-е сут, что не совпадало с притоком эозинофилов из костного мозга в кровь (рис. 5).

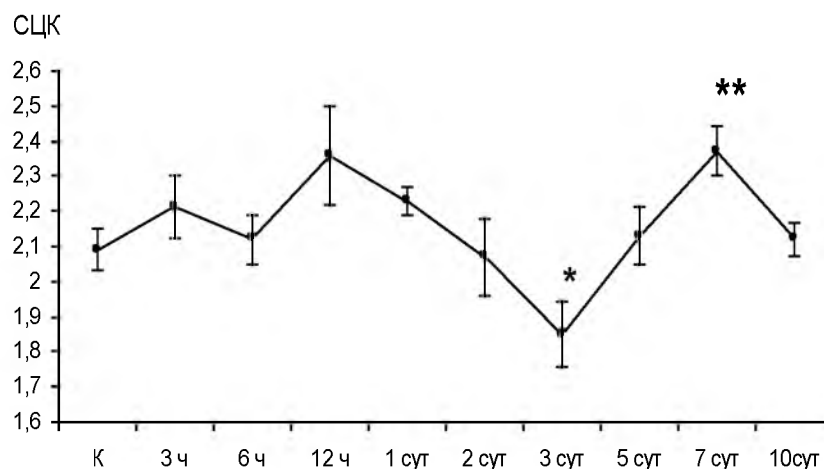


Рис. 5. Активность ЭПО в эозинофилах в периферической крови в динамике острого асептического перитонита у крыс. * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ в сравнении с контролем

Обсуждение результатов. Таким образом на модели карагиненового острого асептического перитонита была исследована эозинофильная реакция очага, костного мозга и периферической крови, а также активность ЭПО в эозинофилах экссудата и периферической крови. Установлено, что в очаге в ранние сроки воспаления прослеживалась тенденция к снижению количества эозинофилов по сравнению с контролем, по-видимому, за счет дегрануляции и алтерации эозинофилов. Это происходило на фоне транзиторного снижения ОКЛ (при явном увеличении содержания нейтрофилов). К 6-му ч наблюдалась тенденция к увеличению содержания эозинофилов, соответствующая пику ОКЛ. На 1-е сут количество эозинофилов снижалось до минимума, в последующем оно возрастало до 10-х сут и относительно колебалось в близких пределах. Эта динамика количества эозинофилов не совпадала с таковой ОКЛ и нейтрофилов.

В костном мозге динамика количества эозинофилов также не совпадала с изменением клеточного состава ОКК. Изменение ОКК, эозинофилов и отдельных клеточных форм в кост-



ном мозге могло быть связано с поступлением лейкоцитов из костномозгового резервного пула в периферическую кровь в более ранние сроки воспаления, а также с активацией гемопоэза и усилением гиперплазии ККМ, характерного для костного мозга в более поздние сроки воспаления.

В периферической крови увеличение количества эозинофилов совпадало с первым пиком ОКЛ, и связано с поступлением лейкоцитов из костномозгового резервного пула, в это время ОКК в костном мозге уменьшалось.

Первый пик увеличения активности ЭПО, наблюдавшийся на фоне уменьшения количества эозинофилов в очаге, по-видимому, связан с активацией самих клеток. Дальнейшие изменения активности ЭПО экссудата не совпадали с изменениями притока эозинофилов в очаг, и были зависимы, по-видимому, от способности эозинофилов синтезировать и высвобождать ферменты даже в период пребывания их в очаге, в отличие от нейтрофилов. Как известно, в нейтрофилах ферменты синтезируются при образовании клеток в костном мозге и затем высвобождаются при дегрануляции, в эозинофилах же и в период пребывания их в тканях происходит накопление гранул.

Активность ЭПО в эозинофилах крови также не совпадало с притоком эозинофилов из костного мозга в кровь.

Следовательно, активность ЭПО в эозинофилах очага и периферической крови не коррелирует с динамикой количества эозинофилов при естественном течении воспаления, что свидетельствует об усилении дегрануляции эозинофилов в ранние сроки воспаления, а также усилении синтеза гранул эозинофилов в более поздние сроки. Усиленная дегрануляция эозинофилов на ранних сроках воспаления может свидетельствовать об активном их участии в элиминации флогогена, т.е. самостоятельной роли эозинофилов во вторичной альтерации. Последующее привлечение эозинофилов в очаг, осуществляемое в первую очередь хемотаксическими факторами ТК, возможно, объясняет эффекторную функцию эозинофилов в поздние сроки воспаления. Активность ЭПО и других цитотоксических ферментов, входящих в состав гранул эозинофилов, на более поздних сроках развития воспалительной реакции указывает на способность эозинофилов к нейтрализации или взаимной регуляции синтеза и секреции ряда медиаторов воспаления продуцируемых ТК, что приводит, в конечном итоге, к снижению тяжести воспалительных явлений в целом.

Известно, что нейтрофилы обратно угнетают ферментативную активность ЭПО, а ЭПО повышает адгезивность нейтрофилов [17]. Известно также, что эозинофилы живут дольше, чем нейтрофилы [18]. Кроме того, зрелые эозинофилы, в отличие от нейтрофилов, способны к дальнейшему синтезу гранул [19]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что эозинофилы играют активную, самостоятельную по отношению к нейтрофилам, роль в остром неиммунном воспалении. В частности, одновременно с нейтрофилами они могут играть эффекторную роль в очаге воспаления.

Выводы.

1. При остром неиммунном воспалении происходят фазные изменения содержания эозинофилов в очаге, костном мозге и периферической крови, свидетельствующие об эмиграции эозинофилов в очаг воспаления в ранние сроки, и вероятно выхода из костного мозга в кровь в более поздние, а также изменения функциональной активности эозинофилов очага и крови, судя по активности их маркерного фермента – эозинофильной пероксидазы.

2. Не прослеживается полного параллелизма между клеточными реакциями ОКЛ (нейтрофилов в частности) и эозинофилов, активностью ЭПО и притоком эозинофилов.

3. Нет полного соответствия изменения динамики между активностью эозинофильной пероксидазы в эозинофилах экссудата и крови и притоком сюда эозинофилов, что указывает на усиление дегрануляции и синтетической активности эозинофилов, и свидетельствует об активной роли эозинофилов при неиммунном воспалении, подтверждая предположение об эффекторной роли этих клеток при воспалении.

4. Эозинофилы вовлекаются в патогенез не только иммунного, но и неиммунного воспаления и не просто выполняют сателлитную функцию по отношению к нейтрофилам, ТК, и другим клеткам-эффекторам, а играют самостоятельную, активную роль в патогенезе воспаления.

Литература

1. Mast cell-mediated airway remodelling / Y. Okayama, S. Okumura, N. Yamashita et al. // Clin. Exp. Allergy Rev. – 2006. – V. 6. – P. 80-84.
2. Клименко Н.А., Пыпшов Г.Ю. Модуляция воспаления биологически активными веществами тучных клеток и их антагонистами // Эксперим. і клін. мед. – 2001. – № 3. – С. 6-7.



3. Клименко Н.А., Шевченко А.Н. Лейкоцитарная реакция периферической крови крыс в динамике карагиненового асептического воспаления // Медицина сьогодні і завтра. – 2003. – № 4. – С. 12 – 15.
4. Клименко Н.А. Медиаторы патологии // Эксперим. і клін. мед. – 2001. – № 1. – С. 6-10.
5. Peter A. Nigrovic, D.M. Lee Mast cells in inflammatory arthritis // Res. Ther. – 2005. – V. 7. – P. 1-11.
6. Н.А. Клименко, М.В. Лупырь Роль тканевых базофилов в клеточно-тканевых реакциях очага хронического воспаления // Патология, Том 5, № 2, 2008. – С.61.
7. Парахонский А.П., Цыганок С.С. Значение взаимодействия поли- и мононуклеарных фагоцитов при воспалительных заболеваниях // Фундаментальные исследования. – 2005. – № 9 – С. 63-64.
8. Accuracy of eosinophils and eosinophil cationic protein to predict steroid improvement in asthma / R.J. Meijer, D.S. Postma, H.F. Kauffman et al. // Clin. Exp. Allergy. – 2002. – V. 32, №. 7. – P. 1096-1013.
9. Weller P.F. The immunobiology of eosinophils // N. Engl. J. Med. – 1991. – V. 324. – P. 1110-1118.
10. Saito H. Editorial Overview: Allergy and hypersensitivity - airway inflammation and remodeling // Curr. Opin. Immunol. – 2007. – V. 19, № 6. P. 674-675.
11. Matsumoto K., Tamari M., Saito H. Involvement of eosinophils in the onset of asthma // J. Allergy Clin. Immunol. – 2007. – V. 121, № 1. – P. 26-27.
12. Costa J.J., Weller P.F., Galli S.J. The cells of the allergic response: mast cells, basophils, and eosinophils // JAMA. – 1997. – V. 278. – P. 1815-1822.
13. Клименко Н.А. Роль лейкоцитов в реакции тучных клеток очага воспаления // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1993. – Т. 116, № 9. – С. 249-253.
14. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшкова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
15. Eosinophil peroxidase deficiency: morphological and immunocytochemical studies of the eosinophil specific granules / G. Zabucchi, M.R. Soranzo, R. Menegazzi at al. // J. Blood. – 1992. – V. 80. – P. 2903-2910.
16. Саймон Д. Анализ данных в Excel: Наглядный курс создания отчетов, диаграмм и сводных таблиц; Пер. с англ. – С.Пб.: Диалектика. – 2004. – 516с.
17. Fulkerson P.C., Fischetti C.A., Rothenberg M.E. Eosinophils and CCR3 regulate interleukin-13 transgene-induced pulmonary remodeling // Am. J. Pathol. – 2006. – V. 169, № 6. – P. 2117-2126.
18. Gleich G.J., Adolphson C.R. The eosinophil leukocyte: structure and function // Adv. Immunol. – 1986. – V. 39. – P.177-210.
19. Adamko D., Lacy P., Moqbel R. Mechanisms of Eosinophil Recruitment and Activation // Curr. Allergy Asthma Rep. – 2002. – V. 2. – P. 107-116.

VALUE OF A CYTOCHEMICAL METHOD IN DEFINITION OF EOSINOPHILS` FUNCTIONAL ACTIVITY IN INFLAMMATION

**N.A. SHUTOVA
M.A. KUCHERYAVCHENKO
I.A. SULHDOST**

*Kharkiv National Medical
University*

e-mail: md.shutova@mail.ru

In the article data about the role of eosinophils in an acute non-immune inflammation are given. There has been investigated the eosinophilic reaction in a carrageen-induced acute aseptic inflammation, i.e. quantity of eosinophils in an exudate, a peripheral blood, eosinopoiesis and functional activity of eosinophils in the locus and blood. The main functions of eosinophils are studied, generally in pathogenesis of immune reactions where at the expense of histaminase synthesis they regulate histamine level in the locus and blood. At the same time, active release the series of cytotoxic enzymes by eosinophils assumes an active participation of these cells in acute non-immune inflammatory processes.

Keywords: inflammation, eosinophils, eosinophilic reaction, eosinophilic peroxidase, cells-effectors.