

ПАТОГЕНЕТИЧНА ОЦІНКА ЦИТОХІМІЧНОГО МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ЕОЗИНОФІЛІВ ПРИ ГОСТРОМУ ЗАПАЛЕННІ

©Н. А. Шутова

Харківський національний медичний університет, м. Харків

РЕЗЮМЕ. Відомо, що еозинофіли, в основному, залучаються у патогенез імунних реакцій. Разом з тим, активне вивільнення еозинофілами цитотоксичних ферментів може зумовлювати активну участь цих клітин у гострих неімунних запальних процесах. Наведені дані свідчать про причетність еозинофілів до патогенезу гострого неімунного запалення. За кількістю еозинофілів у вогнищі запалення, кістковому мозку та периферійній крові, була досліджена еозинофільна реакція гострого асептичного перитоніту. Функціональна активність еозинофілів була досліджена за показником активності маркерного ферменту еозинофілів – еозинофільної пероксидази.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: запалення, еозинофільна реакція, еозинофільна пероксидаза

Вступ. Важливим питанням у вивченні механізмів запалення вважається вивчення ролі клітин-ефекторів, їх ефекторно-регуляторної активності, а також ступеня міжклітинної взаємодії один з одним, що визначається ступенем активності медіаторів-модуляторів, джерелом якого є самі клітини-ефектори. Так, висока поліфункціональність ТК та спроможність їх медіаторів чинити різнонаправлену дію на різні процеси зумовлює взаємодію їх з клітинами-ефекторами запального процесу. Дослідження, виконані на кафедрі патофізіології ХНМУ, підтверджують регульовальний вплив лейкоцитів на ТК, взаємовідносини між ТК та ендотеліоцитами, фібробластами. Є дані про роль ТК в хронічному запаленні, де вони надають стриманий вплив на розвиток запального процесу [1–6]. Описані взаємодія нейтрофілів та моноцитів при запальних процесах різних видів, наприклад при гострому перитоніті, екземі, псоріазі [7].

Разом з тим, даних про роль еозинофілів та їх взаємодію з іншими клітинами-ефекторами в гострому неімунному запаленні, недостатньо. Достовірно відомо, що еозинофіли здійснюють позаклітинний цитоліз, беруть участь в антибактеріальному захисті [8, 9]; у патогенезі імунного запалення, за рахунок синтезу гістамінази, регулюють кінцевий рівень гістаміну, який продукується ТК та базофілами [10, 11]. Але активне вивільнення еозинофілами деяких цитотоксичних ферментів (еозинофільної пероксидази (ЕПО), головного основного білка та еозинофільного катіонного білка), активних форм кисню [12], передбачає активну участь цих клітин в гострому неімунному запаленні, також як і нейтрофілів, ТК та інших клітин.

Мета роботи: прослідкувати в динаміці активність еозинофілів у гострому неімунному запаленні.

Матеріал і методи дослідження: дослідження виконано на 157 щурах-самцях лінії Wistar масою 180–200 г.

Моделлю запалення був карагіненовий гострий асептичний перитоніт, викликаний внутріш-

ньочеревним введенням 5 мг л-карагінену в 1 мл NaCl. Дослідження проводили на 3, 6, 12 год, 1, 2, 3, 5, 7 і 10 добу [13].

Підрахунок загальної кількості лейкоцитів (ЗКЛ) в ексудаті та периферійній крові, каріоцитів (ЗКК) у кістковому мозку стегна, клітинного складу ексудату, лейкоцитарної формули та мієлограми здійснювали за стандартними методами. На підставі цих даних судили про лейкоцитарну реакцію вогнища запалення, кісткового мозку та периферійної крові [14].

Про функціональну активність еозинофілів вогнища запалення і периферійної крові судили за активністю маркерного ферменту еозинофілів – еозинофільної пероксидази (ЕПО), яку визначали цитохімічним методом [15]. Ступінь дегрануляції еозинофільних лейкоцитів обернено пропорційний ступеню їх забарвлення.

Статистичне оброблення результатів дослідження проводили з використанням t-критерію Стьюдента [16].

Результати й обговорення. В ході виконання роботи у вогнищі запалення в ранні терміни спостерігалася помітна тенденція до зниження кількості еозинофілів у порівнянні з таким в черевній порожнині інтактних щурів, мабуть, за рахунок альтерації з наступною дегрануляцією еозинофілів, та, можливо, зменшення міграції.

На 6 год кількість еозинофілів мала виражену тенденцію до збільшення – в 1,7 раза, що збіглося з піком ЗКЛ. На 1 добу спостерігалась мінімальна кількість еозинофілів у вогнищі запалення – більш ніж в 4 рази нижче контролю, надалі зростала відносно 1 доби та до 10 доби коливалася в близьких межах з незначними піками на 3 та 7 доби. Ця динаміка не збігалася із такою динамікою ЗКЛ та нейтрофілів.

ЗКЛ в черевній порожнині знижувалася на 1 добу, порівняно з 6 год, однак, залишалась вищою контрольних показників в 1,8 раза. Надалі ЗКЛ підтримувалася приблизно на тому ж рівні з дея-

ким зниженням на 3 та 7 доби, а на 10 добу знову була достовірно більша контролю.

У кістковому мозку кількість еозинофілів помітно зростала з 3 год до 10 доби з піками на 2 та особливо на 7 доби. При цьому на 2 добу вона збігалася з піками ЗКК та окремих клітинних форм, що свідчило про активацію гемопоезу, а на 7 добу – повторне збільшення ЗКК, мабуть, пов'язане з розвитком гіперплазії кісткового мозку, яка є характерною для запалення у цей час [3]. Це підтверджується значним збільшенням вмісту власних клітин у кістковому мозку на 7 добу.

Динаміка кількості еозинофілів у кістковому мозку не збігалася із такою ЗКК до 1 доби. Протягом 3 год спостерігалось зниження ЗКК та кількості нейтрофілів, з 6 по 12 год – збільшення з піком на 12 год, що, мабуть, було пов'язано з початком вивільнення кістково-мозкових клітин із постмітотичного резервного пулу, а далі – з активацією гемопоезу. В той же час кількість еозинофілів на 3 год мала тенденцію до збільшення, а на 6 та 12 год достовірно збільшувалась, але незначно, з деяким піком на 6 год.

У периферійній крові кількість еозинофілів мала тенденцію до збільшення у перші 3 год, до зменшення – на 6 і 12 год, та до повторного

збільшення – на 1, 3 і 5 доби із достовірним збільшенням на 7 добу. Збільшення кількості еозинофілів на 3 год та 1 добу збігалось з піком ЗКЛ та окремих лейкоцитарних форм, на 3 та 7 доби – з повторним збільшенням ЗКЛ та кількості інших клітин. Дані зміни ЗКЛ та еозинофілів мабуть, пов'язані з надходженням на 3 добу розвитку запалення лейкоцитів із кістково-мозкового резервного пулу, на 1 та 3 доби – з активацією кровотворення, на 7 – 10 доби – з розвитком гіперплазії кісткового мозку.

Активність ЕПО еозинофілів ексудату помітно зростала на 5–30 хв. На 12 год спостерігалась достовірно максимальна активність ЕПО відносно такої у інтактних щурів, вона була нижчою за контроль на 3 год, та особливо на 2 доби.

Достовірно збільшення активності ЕПО на 12 год супроводжувалося зменшенням кількості еозинофілів у вогнищі запалення та у кістковому мозку. Повторне збільшення активності ЕПО спостерігалось з 3 по 10 добу, з незначним зменшенням на 5 добу, і супроводжувалося збільшенням кількості еозинофілів в ЧКМ, що може бути пов'язано зі зменшення їх кількості у вогнищі запалення та паралельним еозинопоезом в кістковому мозку (рис. 1).

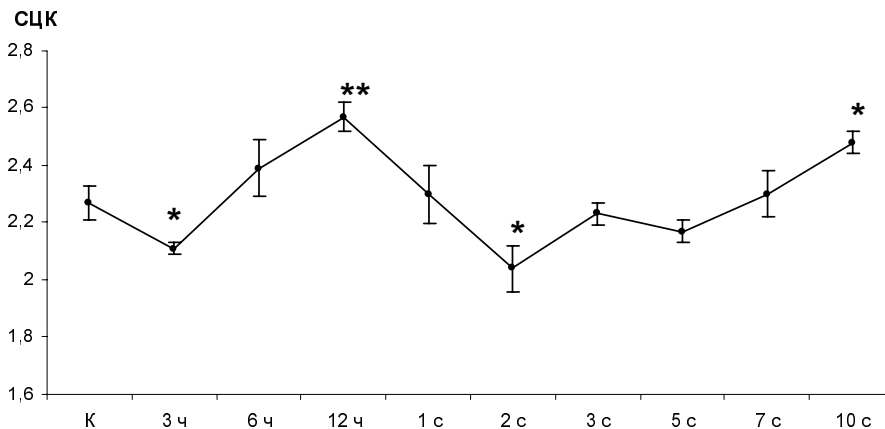


Рис. 1. Активність ЕПО в еозинофілах черевної порожнини в динаміці гострого асептичного перитоніту у щурів. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ в порівнянні з контролем.

Зміни активності ЕПО не збігалися зі змінами припливу еозинофілів в осередок запалення.

Активність ЕПО в еозинофілах периферійної крові мала тенденцію до збільшення на 3, 12 год та 1 добу, знижувалась на 3 добу та достовірно була вищою на 7 добу, що не збігалось з припливом еозинофілів із кісткового мозку в кров (рис. 2).

Обговорення результатів. Встановлено, що в осередку гострого запалення в ранні терміни простежувалась тенденція до зниження кількості еозинофілів порівняно з контролем, мабуть, за рахунок дегрануляції та альтерації еозинофілів. Це відбувалось на фоні транзиторного зниження ЗКЛ.

Ця динаміка кількості еозинофілів не збігалась з динамікою ЗКЛ.

У кістковому мозку динаміка кількості еозинофілів також не збігалась зі змінами клітинного складу ЗКК, що може бути пов'язано з припливом лейкоцитів із кістково-мозкового резервного пулу в периферійну кров у ранні строки запалення, а також з активацією гемопоезу та посиленням гіперплазії кісткового мозку, що дуже характерно для останнього у більш пізні строки запалення. В периферійній крові збільшення кількості еозинофілів пов'язано з надходженням лейкоцитів із кістково-мозкового резервного пулу.

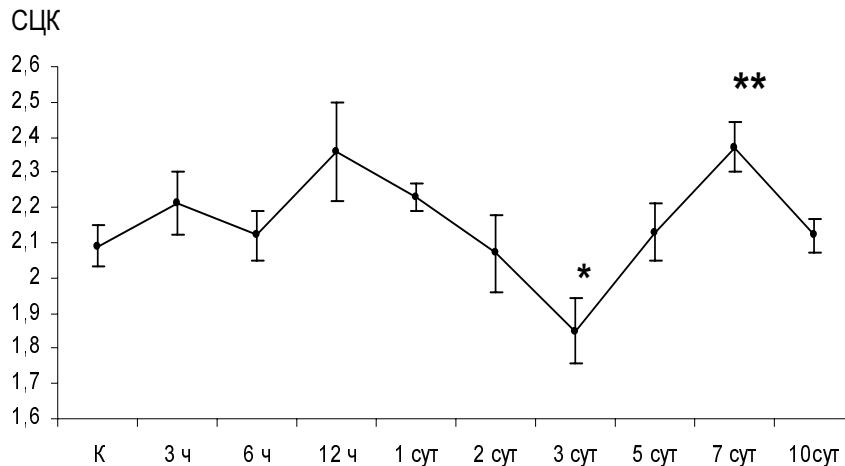


Рис. 2. Активність ЕПО в еозинофілах периферійної крові в динаміці гострого асептичного перитоніту у щурів. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ у порівнянні з контролем.

Перший пік активності ЕПО еозинофілів, який спостерігався на фоні зменшення кількості самих еозинофілів в осередку запалення, мабуть, пов'язаний з активацією цих клітин. Далі зміни активності ЕПО еозинофілів ексудату не збігалися зі змінами припливу еозинофілів у вогнище запалення, та були залежні від здатності еозинофілів синтезувати та накопичувати гранули та вивільняти ферменти навіть в період перебування їх в осередку запалення [17], на відміну від інших гранулоцитів [18]. Активність ЕПО еозинофілів крові також не збігалася із припливом еозинофілів із кісткового мозку в кров.

Отже, активність ЕПО еозинофілів осередку запалення та периферійної крові не збігається з динамікою кількості цих клітин при природному перебігу запалення, що свідчить про посилення дегрануляції еозинофілів у ранні строки запалення, а також посилення синтезу гранул еозинофілів у більш пізні терміни. Посилення дегрануляції еозинофілів на ранніх термінах запалення може свідчити про активну їх участь в елімінації флогогену, а значить і про самостійну їх роль у вторинній альтерації. Подальше залучення еозинофілів в осередок здійснюється, насамперед, хемотаксичними факторами ТК, можливо, і є поясненням ефекторної функції еозинофілів в пізні строки запалення. Активність ЕПО та інших цитотоксичних ферментів, які входять до складу гранул еозинофілів, на більш пізніх строках розвитку запаль-

ної реакції, вказує на здатність еозинофілів до нейтралізації або взаємної регуляції синтезу та секреції ряду медіаторів запалення, які продукуються ТК, що призводить, наприкінці, до зниження тяжкості запального процесу в цілому.

Висновки. Отримані результати свідчать про те, що при гострому неімунному запаленні відбуваються фазні зміни вмісту еозинофілів в осередку запалення, кістковому мозку та периферійній крові, не простежується паралельної залежності фазних змін еозинофілів та інших клітин, активністю ЕПО та змінами еозинофілів у вогнищі запалення та периферійній крові.

Підвищення активності ЕПО вказує на посилення дегрануляції та синтетичної активності еозинофілів, де головною метою еозинофілів є нейтралізація або взаємна регуляція медіаторів запалення, які продукуються ТК, що призводить, зрештою, до зниження тяжкості запального процесу в цілому.

Отже, доведено, що не тільки в імунному, а і в неімунному запальному процесі еозинофіли відіграють активну, ефекторну, самостійну по відношенню до інших гранулоцитів роль.

Дана робота є класичним фундаментальним патофізіологічним дослідженням, що розширює і поглиблює існуючі уявлення про перебіг гострого неімунного запалення, що, в свою чергу, важливо для удосконалення принципів та методів патогенетичної протизапальної терапії.

ЛІТЕРАТУРА

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

3. Клименко Н. А. Лейкоцитарная реакция периферической крови крыс в динамике карагигенового асептического воспаления / Н. А. Клименко, А. Н. Шевченко // Медицина сьогодні і завтра. – 2003. – № 4. – С. 12–15.
4. Клименко Н. А. Медиаторы патологии // Эксперим. і кліні. мед. – 2001. – № 1. – С. 6–10.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему

5. Peter A. Nigrovic, D.M. Lee Mast cells in inflammatory arthritis // *Res. Ther.* – 2005. – Vol. 7. – P. 1–11.
6. Клименко Н. А. Роль тканевых базофилов в клеточно-тканевых реакциях очага хронического воспаления / Н. А. Клименко, М. В. Лупырь // *Патология.* – Т. 5, № 2. – 2008. – С. 61.
7. Парахонский А. П. Значение взаимодействия поли- и мононуклеарных фагоцитов при воспалительных заболеваниях / А. П. Парахонский, С. С. Цыганок // *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. – Vol. 32, № 7. – P. 1096–1013.
9. Weller P.F. The immunobiology of eosinophils // *N. Engl. J. Med.* – 1991. – Vol. 324. – P. 1110–1118.
10. Saito H. Editorial Overview: Allergy and hypersensitivity – airway inflammation and remodeling // *Curr. Opin. Immunol.* – 2007. – Vol. 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. – Vol. 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. – Vol. 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 [et al.] // *J. Blood.* – 1992. – Vol. 80. – P. 2903–2910.
16. Саймон Д. Анализ данных в Excel: Наглядный курс создания отчетов, диаграмм и сводных таблиц : пер. с англ. – СПб. : Диалектика. – 2004. – 516 с.
17. Gleich G. J., Adolphson C. R. The eosinophil leukocyte: structure and function // *Adv. Immunol.* – 1986. – Vol. 39. – P. 177–210.
18. Adamko D., Lacy P., Moqbel R. Mechanisms of Eosinophil Recruitment and Activation // *Curr. Allergy Asthma Rep.* – 2002. – Vol. 2. – P. 107–116.
19. Fulkerson P. C., Fischetti C. A., Rothenberg M. E. Eosinophils and CCR3 regulate interleukin-13 transgene-induced pulmonary remodeling // *Am. J. Pathol.* – 2006. – Vol. 169, № 6. – P. 2117–2126.

PATHOGENETIC ASSESSMENT OF THE CYTOCHEMICAL METHOD OF DETERMINATION OF EOSINIPHILS' FUNCTIONAL ACTIVITY AT THE ACUTE INFLAMMATION

©N. A. Shutova

Kharkiv National Medical University

SUMMARY. In the article data about the role of eosinophils in an acute non-immune inflammation was given. There was 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 were 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.

KEY WORDS: inflammation, eosinophilic reaction, eosinophilic peroxidase.