

## Цитотоксический потенциал эозинофильных гранулоцитов у больных с синдромом эозинофилии

*Литвинова Л.С.<sup>1</sup>, Колобовникова Ю.В.<sup>1</sup>, Кнутарева Е.Н.<sup>2</sup>, Григорьева Е.С.<sup>1</sup>, Суворова Е.В.<sup>1</sup>, Новицкий В.В.<sup>1</sup>, Рязанцева Н.В.<sup>1</sup>*

## Cytotoxic potential of eosinophiles' granulocytes in patients having eosinophilia syndrome

*Litvinova L.S., Kolobovnikova Yu.V., Knoutareva Ye.N., Grigoryeva Ye.S., Souvorova Ye.V., Novitsky V.V., Ryazantseva N.V.*

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

<sup>2</sup> Томская областная клиническая больница, г. Томск

© Литвинова Л.С., Колобовникова Ю.В., Кнутарева Е.Н. и др.

При злокачественных заболеваниях системы крови и описторхозе (остром и хроническом) значительное напряжение механизмов микробицидности лейкоцитов эозинофильного ряда обуславливает формирование их высокого цитотоксического потенциала, действие которого, вероятно, реализуется не только в отношении антигенных структур, но и клеток макроорганизма, что может приводить к повреждению тканей.

**Ключевые слова:** цитотоксический потенциал, эозинофилы, злокачественные заболевания системы крови, описторхоз.

In malignant diseases of blood system and opisthorchiasis (sharp and chronic), significant strain of microbicide mechanisms of eosinophilic row leukocytes causes forming their high cytotoxic potential action of which could be realized concerning not only antigenic structures but also macro-organism cells which can result in damaged tissues.

Key words: cytotoxic potential, eosinophiles, malignant diseases of blood system, opisthorchiasis.

УДК 616.155.35.35:616.155.394

### Введение

В современной литературе эозинофильный гранулоцит принято рассматривать не только в качестве активного участника развития аллергических заболеваний и противогельминтного иммунитета, но и как важный фактор поддержания тканевого и иммунологического гомеостаза [2, 4, 5]. Эозинофилы обладают способностью секретировать широкий спектр биологически активных веществ, экспрессировать на своей поверхности разнообразные рецепторы и адгезивные молекулы [1, 2, 4].

Увеличение числа эозинофильных лейкоцитов сопровождает заболевания, имеющие самые различные механизмы развития [2, 5, 12, 15, 19]. Эозинофилия наиболее часто встречается у больных с аллергическими и

паразитарными патологиями. Наряду с этим гематологи и онкологи нередко сталкиваются с проблемой трактовки причин возникновения синдрома эозинофилии у больных с неопластическими процессами системы крови, происходящими из клеток-предшественников как лимфо-, так и миелопоэза [1, 2, 4—6].

Исследованиями последних лет было показано, что эозинофил остается одной из наиболее агрессивных эффекторных клеток воспаления. Эозинофильные гранулы служат источником большого количества цитотоксических продуктов, повышенное содержание которых обуславливает формирование высокого микробицидного потенциала, действующего не только в отношении инородных субстанций, но и окружающих тканей [1, 2, 4, 6]. Так, при исследовании противопара-

зитарного иммунитета было показано, что эозинофилы обладают высокой цитотоксической активностью, тогда как представления об их участии в противоопухолевой защите по сравнению с другими клетками системы иммунитета существенно ограничены.

Целью настоящей работы явилось исследование особенностей цитотоксичности эозинофильных гранулоцитов при злокачественных заболеваниях системы крови и описторхозе, сопровождающихся синдромом эозинофилии.

## Материал и методы

В исследование были включены 115 пациентов (52 мужчины и 63 женщины) в возрасте от 18 до 55 лет (30 больных с лимфогранулематозом, из них 12 — со смешанно-клеточным вариантом заболевания во II или III стадии и 18 — с нодулярным склерозом II или III стадии, 20 пациентов с неходжкинскими лимфомами, 25 больных с множественной миеломой, 22 пациента с диагнозом «острая фаза описторхоза», 18 — с хроническим описторхозом (реинвазия)). Клинически и анамнестически у всех обследованных лиц были исключены обострение хронических воспалительных процессов, наследственные и психические болезни, а также злоупотребление алкоголем и наркотическая зависимость. Все пациенты были обследованы до назначения терапии. Группу контроля составили 22 практически здоровых донора с сопоставимыми по полу и возрасту характеристиками. Материалом исследования являлась венозная кровь обследованных лиц, взятая утром до приема пищи (кровь стабилизировали гепарином в дозе 25 ЕД/мл).

Подсчет отдельных морфологических форм лейкоцитов проводили по общепринятым гематологическим методам [9, 11]. Содержание неферментного катионного белка в эозинофилах периферической крови определяли по методу М.Г. Шубича с бромфеноловым синим. Мазки фиксировали в 0,5%-м растворе сульфосалициловой кислоты, окрашивали 0,1%-м раствором бромфенолового синего в боратном буфере, трижды промывали боратным буфером 0,05 моль, высушивали и докрашивали раствором основного фуксина. Катионный белок выявлялся в цитоплазме клеток в виде синих гранул. Содержание пероксидазы в эозинофильных гранулоцитах оценивали с использованием метода А.Ф. Grehem-Knoll. Мазки фиксировали в 4%-м

формалиново-спиртовом растворе, окрашивали реактивом на пероксидазу, высушивали и докрашивали по Романовскому—Гимзе. Пероксидаза выявлялась в цитоплазме клеток в виде коричневых гранул. Для количественного выражения результатов цитохимического исследования рассчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК), результаты выражали в условных единицах [9, 11].

Фагоцитарную активность эозинофилов периферической крови оценивали методом J.S. Steward и соавт. в модификации Б.С. Нагоева (НСТ-тест). Смешивали периферическую кровь с раствором нитросинего тетразолия и 0,9%-м NaCl, инкубировали смесь в термостате при температуре 37 °С в течение 30 мин, готовили мазки, высушивали, фиксировали метанолом, докрашивали метиловым зеленым и сафранином. Индуцированный НСТ-тест проводили аналогичным образом, стимулируя фагоцитарную активность эозинофилов пирогеналом (25 МПД). Для количественного выражения результатов просматривали 100 эозинофилов в мазке и вычисляли процентное содержание гранулоцитов с отложениями диформаза в виде гранул или сплошных комков [9].

Морфологическое исследование эозинофильных гранулоцитов выполняли после их инкубации с антигенами *O. felinus* по методу Е.С. Нишевой и соавт. [10]. Для этого использовали стандартные тестовые системы «Тиатоп-стрип» производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Цитратную кровь помещали в стрип, содержащий очищенные фиксированные иммунодоминантные фракции белков *O. felinus*, инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С, периодически встряхивая содержимое. После инкубации готовили мазки крови, фиксировали в метиловом спирте, окрашивали по May-Grunvald. Под иммерсионной системой просматривали не менее 25 эозинофилов в каждом препарате, подсчитывали их процентное содержание с измененными морфологическими свойствами. Для оценки полученных данных использовали методы статистического описания и проверки статистических гипотез [3].

Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Shapiro—Wilk's. При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием однофак-

торного дисперсионного анализа. Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали критерий Краскала—Уоллиса. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости  $p < 0,05$  [3].

### Результаты и обсуждение

При оценке количественных показателей белой крови у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и у больных с острым и хроническим описторхозом выявлялось существенное увеличение абсолютного и относительного количества эозинофилов периферической крови по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров (таблица).

Известно, что существующая между клетками иммунной системы и эозинофилами взаимонаправленность эффектов обусловлена, с одной стороны, иммунорегулирующим действием иммуноцитов, что определяет эозинофилы как эффекторное звено иммунных реакций, а с другой — способностью эозинофильных гранулоцитов синтезировать широкий спектр медиаторов, что указывает на их иммуномодулирующую функцию. Дизрегуляция данных эффектов может обуславливать нарушение процессов созревания, дифференцировки и активации эозинофилов, что приводит к длительному пребыванию

последних в периферической крови. Вместе с тем при состояниях, сопровождающихся эозинофилией, наблюдается укорочение клеточного цикла на ранних этапах созревания эозинофилов, обусловленное, по-видимому, увеличением митотического индекса и сокращением времени генерации эозинофильных лейкоцитов. Кроме того, эозинофилы способны возвращаться в кровотоки из тканей и длительно рециркулировать ( $T_{1/2}$  — 44 ч) [5].

Цитотоксический потенциал полиморфноядерных лейкоцитов, в частности, эозинофилов, направленный на элиминацию чужеродных антигенов, реализуется за счет различных механизмов микробицидности (кислороднезависимых и кислородзависимых) [8]. К числу кислороднезависимых факторов цитотоксичности, прежде всего, относят группу белков, имеющих различную внутриклеточную локализацию, но одинаково необходимых для реализации биоцидного потенциала клеток [7, 12, 13]. Важнейшими в функциональном отношении являются внутриклеточные катионные протеины.

Показатели цитотоксичности эозинофилов у пациентов с описторхозом и злокачественными заболеваниями системы крови, сопровождающихся синдромом эозинофилии ( $X \pm m$ )

Характеристика обследованных	Эозинофилы		Внутриклеточные катионные белки (СЦК), усл. ед.	Пероксидаза (СЦК), усл. ед.	Содержание активных эозинофилов (НСТ-тест), %		Количество морфологически измененных эозинофилов в условиях инкубации с антигенами <i>O. felineus</i> , %
	Относительное содержание, %	Абсолютное содержание, г/л			Базальный	Стимулированный пирогеналом	
Здоровые доноры	2,18 ± 0,06	0,10 ± 0,01	2,17 ± 0,07	2,53 ± 0,07	6,06 ± 0,01	13,21 ± 0,9	4,07 ± 0,09
Пациенты с острым описторхозом	35,43 ± 6,39 $p_1 < 0,001$	2,36 ± 0,03 $p_1 < 0,001$	2,96 ± 0,02 $p_1 < 0,001$	2,93 ± 0,02 $p_1 < 0,05$	14,50 ± 2,34 $p_1 < 0,001$	32,82 ± 3,35 $p_1 < 0,05$	21,11 ± 3,44 $p_1 < 0,01$
Пациенты с хроническим описторхозом	15,49 ± 1,49 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$	0,57 ± 0,02 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$	2,48 ± 0,04 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	2,78 ± 0,06 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$	12,54 ± 2,11 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	29,33 ± 4,98 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$	15,35 ± 2,01 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$
Пациенты с лимфогранулематозом	25,79 ± 4,29 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	1,95 ± 0,01 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$	2,93 ± 0,02 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$	2,93 ± 0,03 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	15,09 ± 3,59 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	18,04 ± 2,92 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	14,63 ± 2,13 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$
Пациенты с неходжкинскими лимфомами	15,18 ± 2,66 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 < 0,05$	0,69 ± 0,02 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 < 0,05$	2,42 ± 0,08 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 < 0,05$	2,69 ± 0,07 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 < 0,05$	18,22 ± 4,37 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 > 0,05$	20,22 ± 4,34 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 > 0,05$	19,08 ± 4,13 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 < 0,05$
Пациенты с множест-	16,86 ± 2,63	0,74 ± 0,01	2,95 ± 0,06	2,79 ± 0,07	19,65 ± 3,49	23,67 ± 4,44	20,93 ± 3,26

венной миеломой	$p_1 < 0,001$	$p_1 < 0,001$	$p_1 < 0,001$	$p_1 < 0,05$	$p_1 < 0,001$	$p_1 < 0,05$	$p_1 < 0,05$
	$p_2 < 0,05$	$p_2 < 0,05$	$p_2 > 0,05$	$p_2 > 0,05$	$p_2 > 0,05$	$p_2 < 0,05$	$p_2 > 0,05$
	$p_3 > 0,05$	$p_3 > 0,05$	$p_3 < 0,05$	$p_3 > 0,05$	$p_3 < 0,05$	$p_3 > 0,05$	$p_3 > 0,05$
	$p_4 < 0,05$	$p_4 < 0,05$	$p_4 > 0,05$	$p_4 > 0,05$	$p_4 > 0,05$	$p_4 > 0,05$	$p_4 > 0,05$
	$p_5 > 0,05$	$p_5 > 0,05$	$p_5 < 0,05$	$p_5 > 0,05$	$p_5 > 0,05$	$p_5 > 0,05$	$p_5 > 0,05$

Примечание.  $X$  – среднее арифметическое значение;  $m$  – ошибка среднего;  $p_1$  — уровень статистической значимости по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров;  $p_2$  — у пациентов с острым описторхозом;  $p_3$  — у пациентов с хроническим описторхозом;  $p_4$  — у пациентов с лимфогранулематозом;  $p_5$  — у пациентов с неходжкинскими лимфомами.

Большой основной протеин реализует свое цитотоксическое действие в комплексе с другими белками — эозинофильным катионным протеином и пероксидазой. В свою очередь, эозинофильная пероксидаза потенцирует цитотоксичность лизосомальных катионных белков, которые, обладая широким спектром действия, обеспечивают реализацию многих защитно-приспособительных реакций (клеточную проницаемость, хемотаксис, опсонизацию, фагоцитоз, воспаление) [2, 6].

В ходе проведенного исследования было отмечено повышение процента активных эозинофилов в отношении обнаружения гранул лизосомальных катионных белков и эозинофильной пероксидазы при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови и описторхозной инвазии (см. таблицу). Выявленные изменения носили однонаправленный характер как при злокачественных заболеваниях системы крови, так и при описторхозе. Однако при хроническом течении описторхозной инвазии и неходжкинских лимфомах увеличение среднего цитохимического коэффициента (СЦК), отражающего содержание внутриклеточных катионных протеинов и гранул пероксидазы, было менее выражено по сравнению с аналогичными параметрами у пациентов с лимфогранулематозом, множественной миеломой и острым описторхозом. Также было показано, что при хроническом описторхозе превалирует субпопуляция низкоплотных эозинофилов, для которых характерна усиленная экспрессия мембранных рецепторов. Последнее обстоятельство обуславливает повышенную активацию эозинофильных гранулоцитов и увеличение секреции катионных протеинов, обладающих протеолитическим действием в отношении как инородных структур, так и собственных тканей [12]. Вместе с тем рост содержания лизосомальных катионных протеинов эозинофильных лейкоцитов при описторхозе можно рассматривать как компенсаторную реакцию макроорганизма, направленную на выживание в системе паразит — хозяин [12, 13].

Следует отметить, что повышенное содержание цитотоксических компонентов цитоплазмы эозинофи-

лов у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями крови и описторхозной инвазией может быть обусловлено влиянием различных хемотаксических факторов. Среди них особую роль играют цитокины (интерлейкин-3, -5, -4, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), секретируемые как мононуклеарными клетками, так и самими эозинофилами, потенцируя тем самым функциональную активность последних [1, 2, 4, 14, 16, 17].

Известно, что процесс фагоцитоза сопровождается образованием активных форм кислорода, идентификация которых представляет собой важное звено в оценке функциональной активности фагоцитирующих клеток [8]. Так, исследование биоцидной активности эозинофилов периферической крови у больных описторхозом в тесте восстановления нитросинего тетразолия, отражающего активацию гексозомонофосфатного шунта и степень функционального раздражения эозинофильных клеток *in vivo*, позволило установить статистически значимое увеличение спонтанной и стимулированной пирогеналом кислородзависимой микробицидности эозинофилов по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров (см. таблицу). Вероятно, усиление кислородзависимых механизмов киллинга в эозинофилах периферической крови может быть связано с их повышенной функциональной активностью, направленной на элиминацию антигенов *O. felineus* из организма [12, 15]. Вместе с тем у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови независимо от нозологии показатели базального НСТ-теста в эозинофильных гранулоцитах достоверно превышали аналогичные характеристики у здоровых доноров. При этом значения НСТ-теста, стимулированного пирогеналом, существенно не отличались от спонтанного, что может свидетельствовать об угнетении потенциального резерва цитотоксичности лейкоцитов эозинофильного ряда в условиях стимулирования их внутриклеточного метаболизма при злокачественных заболеваниях системы крови (см. таблицу).

В то же время фактором, обуславливающим значительное усиление цитотоксичности эозинофилов, может быть повышение их дегрануляции и цитолиза. Так, исследование морфологических особенностей эозинофильных лейкоцитов в условиях инкубации с очищенными фиксированными иммунодоминантными фракциями белков *O. felineus* позволило констатировать достоверное увеличение содержания эозинофилов с измененными морфологическими свойствами у больных с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и пациентов с описторхозом (см. таблицу). Изменения морфологии лейкоцитов эозинофильного ряда носили преимущественно характер цитолиза: разбухшие клетки в 2 и более раз превышали размеры нейтрофилов, оболочка разорвана, рядом — гранулы, в некоторых препаратах отмечался распад ядра на хроматиновые нити. Кроме того, была зарегистрирована повышенная вакуолизация ядра и цитоплазмы эозинофильных гранулоцитов. Следует отметить, что аналогичные изменения — цитолиз и дегрануляцию в тканевых эозинофилах — при хронических гельминтозах (трихинеллез, шистосомоз, лямблиоз) наблюдал J.S. Frjefelt (1998), придавая им важное патогенетическое значение в реализации повреждения и фиброобразования окружающих тканей [20].

### Заключение

Таким образом, при злокачественных заболеваниях системы крови и описторхозе (остром и хроническом) значительное напряжение механизмов микроцидности лейкоцитов эозинофильного ряда обуславливает формирование их высокого цитотоксического потенциала, действие которого может реализоваться не только в отношении антигенных структур, но и клеток макроорганизма. В свою очередь, это может приводить к повреждению тканей. Вместе с тем повышение дегрануляции и цитолиза эозинофилов при вышеуказанных патологиях является фактором, способствующим усилению цитотоксичности эозинофильных лейкоцитов, и обуславливает негативное влияние длительной эозинофилии крови.

Исследование выполнено в рамках федеральной целевой научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2002—2006 годы» (государственные контракты № 02.442.11.7056 и 02.445.11.7110), а также при финансовой поддержке Совета по грантам

при Президенте Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ Российской Федерации (№ НШ-1051.2003.4).

### Литература

1. Бережная Н.М. Интерлейкины и формирование иммунологического ответа при злокачественном росте // Аллергология и иммунология. 2000. Т. 1. № 1. С. 45—61.
2. Бережная Н.М., Чехун В.Ф., Сепиавили Р.И. Эозинофилы, базофилы и иммуноглобулин Е в противоопухолевой защите // Аллергология и иммунология. 2005. Т. 6. № 1. С. 38—49.
3. Боровиков В. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере. СПб.; М.; Харьков; Минск, 2001. 306 с.

4. Воробьев А.И. Руководство по гематологии. Т. 1. М., 2002. 280 с.
5. Воробьев А.И., Кременецкая А.М., Лорие Ю.Ю. и др. «Старые» и «новые» опухоли лимфатической системы // Терапевт. арх. 2000. № 7. С. 9—13.
6. Гриншпун Г.Д., Виноградова Ю.Е. Эозинофилы и эозинофилии // Терапевт. арх. 1983. № 10. С. 87—90.
7. Комарова Л.С., Зуева Е.Е., Михайлова Н.Б. Опыт определения триптазы эозинофильного катионного белка у пациентов с эозинофилией различного происхождения // Мед. иммунология. 2004. Т. 6. № 3—5. С. 353.
8. Маянский Д.Н., Урсов И.Г. Лекции по клинической патологии. Новосибирск, 1997. 249 с.
9. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987. 367 с.
10. Нишева Е.С., Потихонова Н.А., Попова Р.Д. Способ диагностики аллергии с помощью изучения морфологии эозинофилов // Клинико-лаб. диагностика. 1995. № 2. С. 29—32.
11. Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М.: Москва, 1983. 230 с.
12. Черногорюк Г.Э. Эозинофилия при хроническом описторхозе как фактор риска эрозивно-язвенной патологии желудка и воспалительных заболеваний бронхолегочной системы (клинико-морфологические аспекты): Дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 2002. 215 с.
13. Яковлева В.В., Степанова Т.Ф., Андросова Е.В. и др. Рост содержания лизосомальных катионных белков полиморфно-ядерных лейкоцитов как ответ организма на описторхозную инвазию // Мед. паразитология. 2003. № 3. С. 7—10.
14. Newcom S.R., Ansari A.A., Gu L. Interleukin-4 is an autocrine growth factor secreted by the L-428 Reed-Sternberg cell // Blood. 1992. V. 79, № 1. P. 191—197.
15. Ozeretskovskaya N.N., Out T.A, Poletaeva O.G. et al. Organ pathology in chronic tissue-dwelling helminthic infections: role of blood and tissue eosinophilia, immunoglobulinemia E, G4, and immune response-inducing factors // X International Helminthological Symposium: Kosice, Helminthologia. 1999. V. 36. № 2. P. 20—21.
16. Lampinen M., Carlson M., Hakansson L.D. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease // Allergy. 2004. V. 8. № 12. P. 425—430.
17. Nagase H., Miyamasu M., Yamaguchi M. et al. Regulation of chemokine receptor expression in eosinophils // Int. Arch. Allergy Immunol. 2001. V. 1. № 3. P. 29—32.
18. Finkelman F.D., Madden K.B., Cheever A.W. et al. Effects of Interleukin 12 on immune responses and host protection in mice infected with intestinal nematode parasites // J. Exp. Med. 1994. V. 156. № 11. P. 1463—1471.
19. Foster P.S., Mould A.W., Yang M. et al. Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung // Immunol. Rev. 2001. V. 6. № 8. P. 179—181.
20. Frjefelt J.S. Specific eosinophils in patients with intestinal parasitic diseases // J. Exp. Med. 1998. V. 172. № 5. P. 1563—1572.

Поступила в редакцию 10.03.2006 г.