

Ю. О. Матвієнко
МЕТОДОЛОГІЧНИЙ ПІДХІД ДО ВИВЧЕННЯ СТАНУ ЕОЗИНОФІЛІВ У ХВОРИХ
НА БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ

Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України

Перелік захворювань і патологічних станів людини, що супроводжуються збільшенням кількості еозинофілів (Еф) у крові, тканинах і секретах, досить великий. Приблизно в ньому можна виділити наступні групи: захворювання, супроводжувані IgE-опосередкованою підвищеною чутливістю; інфекції, викликані метазойними паразитами (зокрема гельмінтами); деякі медикаментозно обумовлені стани; захворювання сполучної тканини, а також злоякісні лімфопроліферативні і лімфоретикулярні хвороби [2, 6, 13].

Для еозинофільних захворювань легень характерна наявність рентгенологічних змін у легенях, еозинофілія легеневої тканини, еозинофілія крові [6, 9, 12, 14]. Серед них виділяють декілька нозологічних форм: проста еозинофілія, або синдром Леффлера; хронічна еозинофільна пневмонія; гостра еозинофільна пневмонія; тропічна легенева еозинофілія; синдром Черджа-Строс і вузликовий периартеріїт; синдром еозинофілії-міалгії; алергічний бронхолегочний аспергільоз. До алергічних захворювань, що супроводжуються еозинофілією, також відносять: алергічний риніт, алергічний ринокон'юнктивіт [8, 9, 13].

Підвищення числа еозинофілів до 5–15 % не патогномонічно для atopічних захворювань, але дозволяє припустити цей діагноз. У випадках, коли число ЕФ перевищує 15 % розрізняють помірну еозинофілію ((15–40 %) від загального числа лейкоцитів), що зустрічається не тільки при atopічних захворюваннях, але і при злоякісних новоутвореннях, наприклад при лімфогранулематозі, імунодефіцитах, уроджених вадах серця, цирозі печінки, вузликовому периартеріїті, герпетичному дерматиті, а також під час променевої терапії, при застосуванні деяких лікарських засобів і перитонеальному діалізі. І виражену еозинофілію ((50–90 %) від загального числа лейкоцитів), що звичайно спостерігається при гельмінтозах, наприклад при синдромі Larva migrans [8, 17, 18, 22].

В даний час представлені дані на користь значної ролі еозинофілів у патогенезі бронхіальної астми (БА). За сучасною концепцією бронхіальна астма — це хронічне запальне захворювання дихальних шляхів, яке характеризується варіабельною зворотною бронхообструкцією та гіперреактивністю бронхів — підвищеною чутливістю їх до різних подразнюючих стимулів. Основними клітинними елементами запалення виступають еозинофіли, базофіли, опасисті клітини, Т-лімфоцити і макрофаги. Кількість еозинофілів у крові співвідноситься зі ступенем порушення прохідності бронхів, а між кількістю еозинофілів і ступенем неспецифічної гіперреактивності бронхів виявляється зворотня кореляція. Існує також зв'язок між клінічним поліпшенням унаслідок застосування препаратів, що стабілізують гладкі клітини (кромоглікат натрію), і відсотком еозинофілів у трахеобронхіальних секретах і бронхоальвеолярній лаважній рідині. Визначена кількість еозинофілів і основного білку еозинофілів присутня у лаважній рідині з бронхів у хворих із подвійною

(ранньою і пізньою) реакцією після введення дози антигену (алергену), чого не спостерігається у хворих, що реагують на алерген тільки ранньою фазою. Збільшення вмісту еозинофілів у крові хворих відзначається протягом пізньої фази астматичної реакції і не виявляється в ранню фазу [1, 6, 12, 16, 19, 22].

Популяція ЕФ периферичної крові гетерогенна. На поверхні цих клітин є рецептори до чужорідних еритроцитів (в т. ч. барана), завдяки яким їх можна поділити на субпопуляції за аналогією до лімфоцитів, тобто — активні, термостабільні, теофілін-чутливі, теофілін-резистентні тощо [10]. Більшість ЕФ практично здорових осіб мають найвищу питому щільність. На противагу цьому, велика частина ЕФ, отриманих від осіб з гіпереозинофілією, мають знижену щільність. В даний час відзначається зростаючий інтерес до популяції еозинофілів низької щільності — активованих клітин, що виявляються при багатьох станах, супроводжуваних еозинофілією. У ряді біологічних систем ці "легкі клітини" реагують значно активніше еозинофілів нормальної щільності. Визначено ряд речовин, які вибірково активують еозинофіли. Природа цих речовин дуже різноманітна; серед них можна відзначити фактори, пов'язані з дозріванням еозинофілів, різні продукти гладких клітин, а також речовини, що виділяються з тканин при запальних і алергічних реакціях [1, 12]. У процесі тканинного ушкодження активну участь приймають токсичні метаболіти кисню, що виділяються при активації ЕФ [3, 4]. Крім цього еозинофілам властиві функції, притаманні всім гранулоцитам, зокрема фагоцитарна, тобто вони здатні поглинати і нейтралізувати бактеріальні об'єкти [4, 7].

Знання про еозинофіли і події, у яких вони беруть участь, швидко зростають, що спричиняє постійні зміни наших уявлень про їх точну роль у запальних процесах. Для діагностики захворювань, що супроводжуються еозинофілією, необхідні лабораторні дослідження як кількісних, так і функціональних властивостей даних ефекторних клітин. З їхньою допомогою можна або підтвердити, або спростувати діагноз, заснований на даних анамнезу і фізикального дослідження, а також оцінити ефективність лікування і стежити за станом хворого. Зазначені дані послужили підставою для детального вивчення функціонального стану еозинофілів при бронхіальній астмі, що супроводжується еозинофілією. Тому метою дійсного дослідження було вивчення кількісного складу і функціональної активності ЕФ у крові і секретах хворих на бронхіальну астму.

Методи і матеріали

Для вирішення поставлених задач нами було обстежено 177 хворих бронхіальною астмою, у крові яких визначалося більш 5 % еозинофілів, і 30 здорових осіб-донорів крові.

Властивості ЕФ вивчалися за допомогою наступних методів:

1. Визначення кількості ЕФ у крові стандартним методом із наступним фарбуванням реактивом Пероришвили [4].

2. Субпопуляційний склад ЕФ гранулоцитів визначали в такий спосіб: клітини виділяли за допомогою методу L. E. Parillo [20] з концентрацією ЕФ меншою 20 % у периферичній крові. Відмиті ЕФ використовували для постановки реакції розеткоутворення за методом Н. М. Мазіної [10]. Суть методу полягає у поділі ЕФ на субпопуляції за допомогою еритроцитів барана, до яких на мембрані ЕФ є відповідні рецептори.

3. Вміст еозинофілів в дихальних шляхах визначався за їх кількістю в харкотинні методом I. Pin et al., (1992) [21]. Харкотиння розділяли загальноприйнятим методом, мазок фіксували сумішшю Никифорова і забарвлювали за Романовським-Гімза.

4. Фагоцитуючі властивості ЕФ оцінювали:

а) за визначенням поглинальних властивостей ЕФ, а саме підрахунком відсотку клітин, що поглинули латексні частинки (ПФ), та фагоцитарним числом (ФЧ) за методом О. Г. Потапової у модифікації В. М. Глейзера [4, 7];

б) за інтенсивністю кисеньзалежного метаболізму ЕФ цільної крові, що оцінювали за допомогою Нст-тесту за методом М. Е. Віксман у модифікації В. М. Глейзера [3, 4].

Обчислювали також цитохімічний коефіцієнт (ЦХК) за формулою:

$$\text{ЦХК} = (1a + 2b + 3c + 4d) / 100;$$

де а, б, с, д — процент еозинофілів з різним ступенем реакції.

Результати та їх обговорення

Згідно отриманих нами даних у хворих БА до лікування і навіть після закінчення терапії в крові визначалися у великій кількості еозинофіли. У зв'язку з цим нас цікавило питання про вихідний функціональний стан цих клітин. До початку лікування у хворих на БА відзначався високий вміст еозинофілів у периферичній крові ($10,3 \pm 0,9$) при нормі ($0,7 \pm 0,2$) (рис. 1).

Спостерігалися також зміни субпопуляційного складу цих клітин, що проявлялося зниженням числа спонтанних розеткоутворюючих ЕФ (СП Е-РУК ЕФ) до ($32,4 \pm 2,4$) % при нормі ($57,0 \pm 0,8$) %, їх активної фракції (АК Е-РУК ЕФ) до ($29,6 \pm 2,5$) %, при нормі ($42,3 \pm 0,7$) %, зменшенням відсотку теофілінрезистентних (ТР Е-РУК ЕФ) до

($28,4 \pm 1,4$) % при нормі ($37,1 \pm 2,8$) % і теофілінчутливих (ТЧ Е-РУК ЕФ) до ($7,5 \pm 2,4$) % при нормі ($11,5 \pm 0,8$) % розеткоутворюючих ЕФ і різким підвищенням числа термостабільних розеток (СТ Е-РУК ЕФ) до ($38,6 \pm 3,2$) % при нормі ($27,3 \pm 1,2$) % ($p < 0,05$), що є характерним для активного запального процесу при БА (табл. 1). Слід зазначити, що у пацієнтів із НБА перераховані вище зміни мали більш виразний характер, ніж у хворих на АБА.

Щодо функціональної активності еозинофілів, то було встановлено, що при надходженні в клініку у хворих на БА всі досліджувані показники, які характеризують функціональну активність еозинофілів, вірогідно відрізнялися від норми. Так, зміни досліджуваних показників еозинофілів, оцінювані за відсотком фагоцитозу (ВФ), складали при БА — ($36,6 \pm 1,3$), норма — ($50,5 \pm 0,7$) %, ($p < 0,05$), а Нст-тест (НСТт) відповідно — ($74,2 \pm 1,8$) %, норма — ($53,9 \pm 0,8$) %, ($p < 0,05$), та вказували на різке зниження поглинальних здібностей клітин і на посилення їх метаболічного профілю, що свідчило про виражений антигенний вплив на клітину (табл. 2).

Таким чином, виявлені порушення стану еозинофільних гранулоцитів у хворих на БА характеризуються підвищенням їх вмісту в периферичній крові, зниженням поглинальної активності з одночасним посиленням кисеньзалежного метаболізму цих клітин, а також зміною їх здатності до розеткоутворення (зменшення відсотку спонтанних та активних і підвищення числа термостабільних Е-РУК ЕФ).

Особливості клітинного складу харкотиння при БА вивчалися у 60 хворих на БА та у 10 здорових людей. У останніх під впливом інгаляцій з гіпертонічним розчином NaCl, еозинофілів в харкотинні виявлено було мало — ($3,0 \pm 0,5$) %, спостерігалась невелика кількість нейтрофільних гранулоцитів (НГ) — ($1,8 \pm 0,5$) % та лімфоцитів (Лм) — ($12,4 \pm 1,5$) %, а основну масу клітин складали альвеолярні макрофаги (АМ) — ($85,8 \pm 3,0$) %.

У хворих на БА в харкотинні визначалась велика кількість еозинофілів ($65,6 \pm 2,5$) %. Крім того, у хворих на БА спостерігався достовірно вищий, в порівнянні із нормою — ($1,8 \pm 0,5$) %, вміст НГ ($28,2 \pm 2,0$) % і дуже низький рівень лімфоцитів ($3,0 \pm 0,6$) %, норма — ($12,4 \pm 1,5$) %, ($p < 0,05$), та АМ — ($2,8 \pm 0,1$) %, норма — ($85,8 \pm 3,0$) %, ($p < 0,05$) (табл. 3).

Таким чином, при БА спостерігаються значні кількісні зміни ефекторних клітин — еозинофілів у харкотинні хворих, які відіграють важливу роль у розвитку запального процесу при згаданому захворюванні.

Досить часто бронхіальна астма супроводжується алергічним ринітом. Для визначення функціонального стану ЕФ у назальному змиві нами був запропонований спосіб одержання слизу з носа шляхом промивання порожнини гіпертонічним розчином NaCl, з наступним відмиванням клітин і визначенням інтенсивності Нст-тесту і фагоцитарної здатності за описаними вище методи-

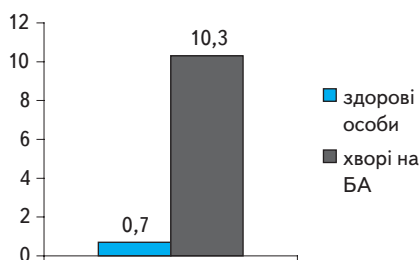


Рис. Кількість еозинофілів в крові у хворих на БА у порівнянні з здоровими особами

Субпопуляційний склад еозинофілів периферичної крові у хворих на БА

Групи	n	Досліджувані показники, %					
		Е-РУКСП	Е-РУКАК	Е-РУКСТ	Е-РУКТр	Е-РУКТч	Е-РУКТр\Тч
Здорові особи	30	$57,0 \pm 0,8$	$42,3 \pm 0,7$	$27,3 \pm 1,2$	$37,1 \pm 2,8$	$11,5 \pm 0,8$	$3,2 \pm 0,3$
Хворі на БА	177	$32,4 \pm 2,4^*$	$29,6 \pm 2,5^*$	$38,6 \pm 3,2^*$	$28,4 \pm 1,4$	$7,5 \pm 2,4^*$	$3,7 \pm 1,3$

Примітка: * — різниця в порівнянні з групою здорових осіб вірогідна ($p < 0,05$).

Таблиця 1

Таблиця 2

Функціональний стан еозинофілів периферичної крові у хворих на БА

Групи	n	Досліджувані показники, %		
		ПФ (%)	ФЧ (у. о.)	НСТ _т (%)
Здорові особи	30	50,5 ± 0,7	10,2 ± 0,3	53,9 ± 0,8
Хворі на БА	177	36,6 ± 1,3*	14,6 ± 0,7*	74,2 ± 1,8*

Примітка: * — різниця в порівнянні з групою здорових осіб вірогідна (p<0,05).

Таблиця 3

Клітинний кількісний склад харкотиння у хворих на БА

Групи	n	Досліджувані показники, %			
		ЕФ	НГ	Лм	АМ
Здорові особи	10	3,0 ± 0,5	1,8 ± 0,5	12,4 ± 1,5	85,8 ± 3,0
Хворі на БА	60	65,6 ± 2,5*	28,2 ± 2,0*	3,0 ± 0,6*	2,8 ± 0,1*

Примітка: * — різниця в порівнянні з групою здорових осіб вірогідна (p<0,05).

Таблиця 4

Функціональний стан еозинофілів у назальному змиві у хворих цілорічним алергічним ринітом, що сполучається з бронхіальною астмою

Групи	n	Досліджувані показники, %				
		ЕФ (%)	ПФ (%)	ФЧ (у.о.)	НСТ _т (%)	ЦХК(у.о.)
Здорові особи	10	1,1 ± 0,1	49,0 ± 2,5	13,9 ± 0,4	45,5 ± 2,5	0,76 ± 0,08
Хворі на БА	40	71,3 ± 3,7*	69,5 ± 1,9*	13,9 ± 0,4*	69,3 ± 2,4*	0,99 ± 0,03*

Примітка: * — різниця в порівнянні з групою здорових осіб вірогідна (p<0,05).

ками. Аналіз даних, представлений у табл. 4, дозволив визначити, що у здорових людей у назальному змиві відзначався дуже низький вміст ЕФ (1,06 ± 0,13) %, функціональна активність яких знаходилася на рівні норми. Середні величини поглинальної здатності Еф — (39,0 ± 2,5) % і кисеньзалежного метаболізму — (45,5 ± 2,5) % були достовірно нижчими, ніж у крові (ПФ — (50,5 ± 0,7) %, НСТ_т — (53,9 ± 0,8) %, p<0,05) (табл. 2).

Інший кількісний і функціональний стан ЕФ у назальному змиві відзначався у хворих на БА, що сполучається з алергічним ринітом. Так, у обстежених хворих при надходженні в клініку в порівнянні зі здоровими особами в назальному змиві був різко підвищений вміст ЕФ (71,3 ± 3,7) % (p<0,05), що супроводжувалося їхньою активацією. Це проявлялося в достовірному збільшенні їх поглинальних властивостей (ПФ — (69,5 ± 1,9) %, норма (49,0 ± 2,5) %, p<0,05), а також в активації кисеньзалежного метаболізму клітини (НСТ_т — (69,3 ± 2,4) %, норма (45,5 ± 2,5) %, p<0,05); ЦХК — (0,69 ± 0,06), норма (0,76 ± 0,08), p<0,05) (табл. 4).

На підсумок можна зробити наступні висновки:

1. Виявлені порушення стану еозинофільних гранулоцитів у хворих на БА характеризуються підвищенням їхнього числа в периферичній крові, зниженням поглинальної здатності і посиленням їх кисеньзалежного метаболізму, зміною розеткоутворюючої здатності основних клітинних субпопуляцій (зниження спонтанних і активних Е-РОК ЕФ і підвищення числа термостабільних).

2. При БА спостерігаються значні кількісні зміни еозинофілів у харкотинні хворих порівняно зі здоровими особами, які відіграють важливу роль у розвитку запального процесу при даній патології.

3. У хворих на БА, що сполучається з алергічним ринітом, в назальному змиві спостерігається різко збільшений вміст активованих еозинофілів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бронхіальна астма. / Под ред. А. Г. Чучалина. — Москва: "Агар", 1997.
2. Бронхиальная астма. Глобальная стратегия. Основные направления лечения и профилактики бронхиальной астмы. Современный

доклад Национального института сердца, легких и крови и Всемирной организации здравоохранения (март, 1993 г.) // Пульмонология (прил.). — 1996. — 134 с.

3. Виксман Н. А., Маянский Н. А. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия // Методические рекомендации. — Казань. — 1979. — 20 с.
4. Глейзер О. М. Клінічне значення реакцій еозинофілів крові у дітей, які перенесли бронхообструктивний синдром на фоні ГРАІ, в зоні екологічного неблагополуччя: Автореф. канд. дис. мед. наук: Київ. — 1993. — 22 с.
5. Грузинцева О. Е., Новиков В. Н. Значение цитологического исследования бронхиального и назального содержимого в диагностике и оценке Эффективности антибактериальной терапии при рецидивирующем бронхите у детей // Педиатрия. — 1990. — № 5. — С. 109—110.
6. Джальчинова В. Б., Чистяков Г. М. Эозинофилы и их роль в патогенезе аллергических заболеваний // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. — 1999. — № 5. — С. 42—44.
7. Изучение поглотительной способности нейтрофилов крови с использованием инертных частиц латекса / Потапова С. Г., Хрустиков В. С., Демидова В. Н., Козинец Р. И. // Пробл. гематологии. — 1974. — № 9. — С. 58—59.
8. Клиническая иммунология и аллергология / Под редакцией Г. Лолора-младшего, Т. Фишера, Д. Адельмана, пер. с англ. — Москва: "Практика", 2000. — 806 с.
9. Клиническая иммунология. /Под редакцией А. В. Караулова. — Москва: "МИА", 1999. — 608 с.
10. Мазова Н. А., Авдеева О. А. Исследование розеткообразующих свойств эозинофилов и использование их для диагностики дерматитов у детей // Вестник дерматологии и венерологии. — 1988. — С. 19—22.
11. Нишева Е. С., Потихонова М. А., Попова Р. Д. Способ диагностики аллергии с помощью изучения морфологии эозинофилов // Клин. лаб. диагностика. — 1995. — №2. — С. 29—32.
12. Фассахов Р. С., Бойчук С. В., Рахматуллин И. М. Роль эозинофилов при бронхиальной астме // Тер. Архив. — 1992. — Т. 64, № 1. — С. 147—151.
13. Феценко Ю. И. Алергические заболевания легких (экзогенный алергический альвеолит, эозинофильные заболевания лёгких, алергический бронхолегочный аспергиллез) // Астма та алергія. — 2002. — №1. — С. 675—71.
14. Феценко Ю. И. Бронхиальная астма — одна из главных проблем современной медицины // Укр. пульмонолог. журн. — 2000. — № 2 (додаток). — С. 13—15.
15. Феценко Ю. И. Бронхиальная астма // Лікування та діагностика. — 1997. — №1. — С. 12—17.
16. Холгейт С. Т. Новые клеточные механизмы бронхиальной астмы // Фармновости. — 1997. — №2. — С. 9—11.

17. *Eosinophils and basophils in allergic airway inflammation* / Busse W. W., Sedgwick J. B., Jarjour N. N., Calhoun W. J. // *Journal of Allergy & Clinical Immunology*. — 1994. — Vol. 94, № 6, Pt 2. — P. 1150–1154.
18. *Gleich G. The eosinophil and bronchial asthma* // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 1990. — Vol. — 85. — № 2. — P. 422–436.
19. *Makino S. Fukuda T. / Eosinophils and allergy in asthma.* / *Allergy Proceedings*. — 1995. — Vol. 16, № 1. — P. 13–21.
20. *Parillo J. E., Fauchi A. S. Human eosinophils, purification and cytotoxic capability of eosinophils from patients with the hypereosinophilic syndrome* // *Blood*. — 1978. — Vol. 51, № 3. — P. 457–473.
21. *Pin J., Gibson P. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma* // *Thorax*. — 1992. — Vol. — № 1. — P. 25–29.
22. *Ulrik C. S. / Eosinophil count in asthma. A marker of disease activity in intrinsic and extrinsic asthma.* / *Ugeskrift for Laeger*. — 1996. — Vol. 158, № 25. — P. 3612–3616.

МЕТОДОЛОГІЧНИЙ ПІДХІД ДО ВИВЧЕННЯ СТАНУ ЕОЗИНОФІЛІВ У ХВОРИХ НА БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ

Ю. О. Матвієнко

Резюме

Мета дослідження — вивчити число і функціональну активність еозинофілів (Еф) у крові та секреті хворих на бронхіальну астму (БА). Обстеження 177 хворих на БА продемонструвало збільшення числа цих клітин у периферичній крові, зниження їх поглинальної здатності, посилення кисеньзалежного метаболізму і зміну розеткоутворюючої здатності (зниження числа спонтанних і активних Е-ПОК Еф і підвищення кіль-

кості термостабільних). У мокротинні хворих на БА спостерігається значний ріст числа еозинофілів. У хворих цілорічним алергічним ринітом, що сполучається з БА, число активованих Еф у назальному змиві різко збільшується, що відображає ступінь алергічного запалення при даній патології. У такий спосіб оцінка функціонального стану еозинофілів дозволяє визначити характер і ступінь запалення при БА.

THE METHODOLOGICAL APPROACH TO THE EVALUATION OF EOSINOPHILS CONDITION IN BRONCHIAL ASTHMA PATIENTS

Yu. O. Matvienko

Summary

The purpose of the study was to estimate the number and functional activity of eosinophils (E) in blood and secretions in bronchial asthma (BA). The examination of 177 BA patients has demonstrated an increased number of these cells in a peripheral blood; decrease of their absorbing capacity, strengthening of an oxygen-dependent metabolism and the changes of their rosette formation ability (decrease of both spontaneous and active and increase of thermal-stable rosette formation E number). In BA patient's sputum the considerable increase of E number was observed. In patients with round-a-year allergic rhinitis combined with BA the number of activated E in nasal outwash was considerably increased, reflecting a degree of an allergic inflammation in this pathology. Thus, an estimation of the E functional activity is useful to determine the character and the degree of inflammation in BA patients.