

ной провокационной пробы с растворами метахолина, составила 53,9% (16,5% — снижение $ОФВ_1$ до провокационной пробы и 37,4% — после нее), следовательно, нарушение бронхиальной проходимости отмечается более чем у половины ликвидаторов.

Таким образом, исследование ФВД позволило установить высокую частоту нарушения бронхиальной проходимости и гиперреактивности бронхиального дерева у участников ЛПА на ЧАЭС в сопоставлении с контрольной группой. Выявленная гиперреактивность бронхиального дерева, являющаяся потенциальным фактором риска развития в будущем у этих лиц хронических обструктивных заболеваний легких, требует динамического клинико-функционального наблюдения за этой группой участников ЛПА. Достоверно более частое нарушение бронхиальной проходимости у курящих в опытной группе в сравнении с контрольной указывает, что причиной бронхиальной обструкции, помимо курения, могут являться и другие факторы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грובהва О.М., Чучалин А.Г., Черников В.П. и др. Цитологическая, ультраструктурная характеристика и рентгеноспектральный микроанализ бронхоальвеолярных смывов ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской атомной электростанции в отдаленные сроки / первое сообщение // Пульмонология.— 1993.— № 4.— С.51—55.
2. Кирюхин А.В. Легочная патология у больных, участвовавших в ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС // Национальный конгресс по болезням органов дыхания, 4-й: Сборник резюме.— М., 1994.— № 1246.
3. Косенко М.М. Синдром поражения верхних дыхательных путей в первые месяцы после аварии на ЧАЭС // Там же.— № 1248.
4. Худина У.А., Якушин С.С. Исследование заболеваемости патологии органов дыхания у участников ликвидации аварии на ЧАЭС // Актуальные проблемы профессиональной и экологической патологии.— Курск, 1994.— С.345—347.
5. Чучалин А.Г., Грובהва О.М., Черников В.П. и др. Радионуклид в ткани легких у ликвидатора последствий аварии на Чернобыльской АЭС // Пульмонология.— 1993.— № 4.— С.27—31.

Поступила 03.10.95.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1997

УДК 616.248-07:616.155.35-07

А.Б.Берестецкий, И.В.Лещенко, И.А.Кардашина

ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ ЭОЗИНОФИЛОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ СЫВОРОТКИ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

АОЗТ МТФ "Авиценна", МО "Новая больница", Екатеринбург

CHANGES IN EOSINOPHILE PROPERTIES DUE TO THE INFLUENCE OF SERUM OF THE PATIENTS WITH
BRONCHIAL ASTHMA

A.B.Berestetsky, I.V.Leshchenko, I.A.Kardashina

Summary

A rosette-forming ability of the blood eosinophiles was studied for six patients with the bronchial asthma and four healthy donors. The number of low density eosinophiles was for certain higher for the sick people in contrast to the healthy ones. However the number of high density eosinophiles differed negligibly. Incubation of healthy people's eosinophiles with the beta-andrenoblocker obsidan almost doubled the number of rosettes with the sheep's erythrocytes. At the same time donors' eosinophile incubation with the blood serum of patients with the bronchial asthma, increased their rosette formation almost six times. Preliminary serum inactivation by heating completely deprived it of the ability to stimulate rosette formation for donors' eosinophiles.

Резюме

В данной работе была изучена розеткообразующая способность эозинофилов крови у 6 больных БА и 4 здоровых доноров. У больных количество эозинофилов низкой плотности было достоверно выше, чем у здоровых, но число эозинофилов высокой плотности существенно не различалось. Инкубация эозинофилов здоровых лиц с бета-адреноблокатором обзиданом увеличила число розеток с эритроцитами барана почти в два раза, в то время как инкубация эозинофилов доноров с сывороткой крови больных БА увеличила их розеткообразующую активность почти в 6 раз. Предварительная инактивация сыворотки нагреванием полностью лишала ее способности стимулировать розеткообразование эозинофилов доноров.

Начиная с 70-х годов появилось значительное число публикаций, в которых оформилась концепция роли эозинофилов в патогенезе бронхиальной астмы (БА) [2,4,7—9,14,16,17,21,22]. В 1985 г. *T.Fukuda et al.* обнаружили неоднородность популяции эозинофилов у больных БА, выражавшуюся в появлении эозинофилов низкой плотности (ЭНП) в градиенте плотности перколлы. Изучение свойств ЭНП показало, что эти клетки обладают уникальными морфологическими, биохимическими и иммунологическими свойствами, делающими их фактором аутоагрессии против тканей бронхов и легких больного. *G.S.Basran et al.* [1] в 1984 г. выявили блокирующую активность сыворотки больных БА на бета-адренергическую рецепцию клеток. *H.Meurs et al.* [15] пришли к заключению о снижении количества и активности бета-адренорецепторов лимфоцитов у больных БА после аллергенного раздражения, а *L.Hakansson et al.* [10,11] показали, что у больных с пылевой астмой в сезон пыления резко возрастает концентрация термолабильной фракции нейтрофильного и эозинофильного хемотаксических факторов в сыворотке крови. Установлено, что эти факторы разрушались при нагревании до 56°C в течение 30 минут. Однако природа субстанции, вызывающей эти процессы, остается неизвестной.

Цель исследования заключалась в выделении эозинофилов высокой (ЭВП) и низкой плотности больных БА и здоровых лиц и сравнительном изучении их рецепторной активности в реакции розеткообразования с эритроцитами барана.

Исследование проводилось у 6 больных атопической БА среднетяжелого течения (3 мужчины и 3 женщины), поступивших в клинику в фазе обострения заболевания. Средний возраст составил $37,7 \pm 3,5$ года в диапазоне от 26 до 49 лет. Продолжительность заболевания варьировала в широких пределах от нескольких месяцев до 15 лет. Один больной регулярно принимал преднизолон в поддерживающей дозе 10 мг/сут перорально, остальные системными стероидами не лечились. На момент исследования все больные получали стандартную терапию препаратами теофил-

Таблица 2

Количество эозинофилов низкой и высокой плотности в крови здоровых лиц (на 1000 клеток)

№	Донор	Возраст, лет	Градиент плотности (г/см ³)		Отношение ЭНП/ЭВП
			<1,115 (ЭНП)	>1,115 (ЭВП)	
1	З	26	6	101	0,06
2	П	25	18	69	0,26
3	Я	26	21	199	0,11
4	Т	21	0	100	0,00
		24,5±1,2	11,25±4,96*	117,25±28,24	0,11±0,06*

Примечание. * — различия достоверны по сравнению с группой больных, представленных в табл.1 ($p < 0,05$).

лина перорально и внутривенно и ингаляционными бета-агонистами. Контрольную группу составили 4 здоровых донора (2 мужчины и 2 женщины) в возрасте от 21 до 26 лет (в среднем 24,5±1,2 года).

Выделение эозинофилов производилось на трех градиентах плотности фикола (молекулярная масса 400000) и 35% раствора верографина [5]: 1,082, 1,092 и 1,115 г/см³. Кровь из вены набирали утром натощак в центрифужную пробирку объемом 20 мм³ с гепарином из расчета 0,1 мм³ на 10 мм³ крови и помещали в термостат при температуре 37°C на 30 мин. Отстоявшуюся лейкозвесь собирали в силиконированную центрифужную пробирку и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 мин. Осадок разводился 3 мл питательной среды 199 и осторожно ресуспендировался. Смесь инкубировалась 15 мин при 20°C. В центрифужную пробирку наслаивался градиент фикола-верографина плотностью 1,082, 1,092 и 1,115 г/см³. На градиент плотности осторожно наслаивалась лейкозвесь и центрифугировалась 35 мин при 1500 об/мин. Клетки над выбранными градиентами плотности собирались пипеткой. Все три фракции вносились в отдельные пробирки и отмывались средой 199 три раза.

Таблица 1

Количество эозинофилов низкой и высокой плотности в крови больных БА (на 1000 клеток)

№	Пациент	Возраст, лет	Градиент плотности (г/см ³)		Отношение ЭНП/ЭВП
			<1,115 (ЭНП)	>1,115 (ЭВП)	
1	Ч	32	25	58	0,43
2	Л*	49	24	62	0,39
3	Ц	42	101	435	0,23
4	Н	33	105	90	1,17
5	Л	26	28	130	0,22
6	В	44	238	287	0,83
		37,7±3,5	86,83±33,97	177±62,14	0,55±0,15

Примечание. * — стероидозависимость

Таблица 3

Количество розеткообразующих эозинофилов (РОЭ) низкой и высокой плотности у больных БА до и после инкубации с адреналином (РОЭа) в %

№	Пациент	РОЭ		РОЭа	
		ЭНП	ЭВП	ЭНП	ЭВП
1	Ч	20	14	10	0
2	Л	16	26	15	14
3	Ц	28	42	13	15
4	Н	0	6	0	4
5	Л	8	26	28	42
6	В	38	0	18	0
		18,38±5,57	19±6,28	14±3,77	12,5±6,49

Количество розеткообразующих эозинофилов (РОЭ) низкой и высокой плотности у здоровых лиц до и после инкубации с обзиданом (РОЭо), сывороткой больных БА (РОЭс) и инактивированной сывороткой больных БА (РОЭис) в %

№	Донор	РОЭ (1)		РОЭо (2)		РОЭс (3)		РОЭис (4)	
		ЭНП	ЭВП	ЭНП	ЭВП	ЭНП	ЭВП	ЭНП	ЭВП
1	З	0	8	0	25	0	60	0	10
2	П	0	8	0	20	0	31	0	7
3	Я	0	16	0	30	0	64	0	8
4	Т	0	8	0	20	0	76	0	8
<i>M±m</i>		0	10±2	0	23,75±2,39	0	57,75±9,54	0	8,25±0,63
<i>p</i>					$p_{1-2}<0,01$		$p_{1-3}<0,001$		$p_{1-4}>0,05$

Идентификация E-рецепторов эозинофилов производилась по общепринятой методике для лимфоцитов [12]. В центрифужные пробирки вносилось по 0,1 мм³ взвеси эозинофилов с градиентов плотности менее 1,115 г/см³ и более 1,115 г/см³ и по 0,1 мм³ 0,5% взвеси эритроцитов барана. У больных БА часть эозинофилов предварительно инкубировали с 1% раствором адреналина. У здоровых доноров эозинофилы дополнительно помещались в три пробирки: 1) с 0,05 мл 0,1% раствора бета-адренергического блокатора обзидана; 2) с нативной сывороткой больного БА; 3) с сывороткой того же больного БА, предварительно подвергнутой нагреванию при 56°C в течение 40 мин. Пробирки центрифугировались 3 мин при 1000 об./мин и инкубировались 15 мин при 22°C. Затем во все пробирки добавляли по 0,1 мл 3% глютаральдегида и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Клетки осторожно ресуспендировались и отмывались 0,9% раствором хлорида натрия. Надсадочная жидкость сливалась и готовились наливные мазки, окрашенные по методу Романовского-Гимзы. В реакции розеткообразования учитывались только эозинофилы, присоединявшие 3 и более эритроцитов барана.

У всех больных БА обнаружено появление значительного числа ЭНП на градиентах плотности фиколла-верографина менее 1,115 г/см³ (табл. 1). Среднее количество ЭНП составило 86,83±33,97 на 1000 клеток. Число ЭВП на градиенте более 1,115 г/см³ составило 177,00±62,14 на 1000 клеток. Соотношение фракций ЭНП к ЭВП колебалось от 0,22 до 0,93 (в среднем 0,55±0,15).

У здоровых доноров количество ЭНП было достоверно ниже, чем у больных (11,25±4,96 на 1000 клеток; $p<0,05$), преобладали ЭВП (117,25±28,24 на 1000 клеток), что проявилось низким соотношением фракций ЭНП/ЭВП (0,11±0,06; $p<0,05$) — табл.2.

Способность присоединять эозинофилы барана (наличие E-рецепторов) оказалась у больных БА сходной как для ЭНП (18,33±5,57% клеток), так и для ЭВП (19,00±6,28%; $p>0,05$). Только у одного пациента отмечена высокая розеткообразующая активность ЭНП при отсутствии розеткообразования у ЭВП (табл.3).

Предварительная инкубация с адреналином дала неоднозначный результат (см. табл.3). У четырех больных число розеткообразующих эозинофилов снизилось вдвое, у одной больной не изменилось и у одной возросло, причем количество розеток с ЭНП увеличилось в три раза. В целом после инкубации с адреналином просматривается тенденция к угнетению розеткообразующей способности эозинофилов.

ЭНП здоровых лиц оказались полностью лишены розеткообразующей способности, а ЭВП обнаружили более слабую активность по сравнению с ЭВП больных, хотя разница оказалась недостоверной (10±2%; $p>0,05$). Все розетки были неполные. Инкубация с бета-адреноблокатором обзиданом не влияла на свойства ЭНП, но увеличила число розеткообразующих ЭВП более чем в два раза по сравнению с исходным (23,75±2,39%; $p<0,01$) — табл.4.

Исследовалось влияние сыворотки больных бронхиальной астмой на розеткообразование нормальных эозинофилов. Предварительная инкубация эозинофилов здоровых доноров с сывороткой крови больных БА приводила к резкому увеличению розеткообразования ЭВП почти в шесть раз по сравнению с исходным уровнем (до 57,75±9,54%; $p<0,001$) (см. табл.4), причем появились морулы, отсутствовавшие в контрольном эксперименте. Вместе с тем сыворотка больных не оказывала никакого влияния на розеткообразующую активность ЭНП здоровых лиц.

Сыворотка больных БА, предварительно подвергнутая нагреванию до 56°C в течение 40 мин, инактивировалась и полностью лишалась свойства увеличивать способность эозинофилов здоровых доноров образовывать розетки.

Настоящее исследование продемонстрировало качественные функциональные различия свойств эозинофилов у больных БА и здоровых людей. Хорошо известно, что у больных с эозинофилиями различной этиологии появляются ЭНП, обладающие рядом уникальных особенностей. Подобные же ЭНП обнаруживаются у больных БА и играют важную роль в патогенезе этого заболевания [3,5,6,18—20,23]. В незначительном количестве ЭНП присутствуют и у здоро-

вых лиц [5], однако их природа, биологическая сущность, происхождение, свойства и механизмы регуляции изучены крайне мало.

В нашем исследовании не удалось выявить различия в функциональном состоянии E-рецепторов у ЭНП и ЭВП больных БА. По-видимому, это объясняется лечением адреностимуляторами и теофиллином, повышающими уровень внутриклеточного цАМФ и снижающими уровень цГМФ. Как известно, E-розеткообразующая способность клеток обратно пропорциональна величине внутриклеточного цАМФ и прямо пропорциональна содержанию цГМФ. [12]. Это подтверждается тем, что инкубация с адреналином у большей части больных существенно угнетала розеткообразование эозинофилов. Влиянием лечения адреностимуляторами можно объяснить парадоксальное увеличение числа розеткообразующих эозинофилов у одной больной. Извращенные ответы на адренергическую стимуляцию у больных БА известны. Можно предположить, что розеткообразование эозинофилов отражает такую характерную особенность БА, как адренергический дисбаланс. Предположение об участии адренергических рецепторов подтверждается более низкой розеткообразующей способностью эозинофилов у здоровых доноров и значительным ее увеличением после инкубации с бета-адренергическим блокатром обзиданом. Однако эта гипотеза не объясняет, почему адренергическая блокада стимулирует розеткообразование только у ЭВП и совершенно не влияет на состояние E-рецепторов у здоровых лиц. Кроме того, фармакологическая блокада адренергических рецепторов значительно уступает по своему активирующему влиянию на розеткообразование эозинофилов воздействию сыворотки больных БА. Вместе с тем сыворотка больных избирательно стимулирует розеткообразование только у ЭВП, не влияя на ЭНП доноров. Таким образом, гипотеза адренергической блокады лишь частично объясняет этот феномен. Очевидно, механизм воздействия сыворотки не объясняется исключительно состоянием системы циклических нуклеотидов. Вероятно, увеличение активности E-рецепторов эозинофилов происходит еще каким-то путем. Природа этой субстанции сыворотки крови больных БА неизвестна. Учитывая, что эта субстанция полностью инактивируется нагреванием до 56°C, можно предположить, что это протеин или группа протеинов, которые предстоит идентифицировать.

В результате проведенного исследования обнаружены существенные различия в розеткообразующей способности эозинофилов больных БА и здоровых. Сыворотка больных БА содержит неидентифицированную термолабильную субстанцию, стимулирующий эффект которой на розеткообразование эозинофилов значительно превышает эффект фармакологической блокады адренергических рецепторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Basran G.S., Ball A.J., Hanson J.M. et al.* Circulating beta-adrenoceptor blocking factors in asthma // *Eur. J. Respir. Dis.*— 1984.— Suppl.135.— P.226—230.
2. *Barnes P.J.* The changing face of asthma // *Quart. J. Med.*— 1987.— Vol.63.— P.359—365.
3. *Capron M., Jonault T.* IgE receptors of human eosinophils and eosinophil heterogeneity // *Ann. Immunol.*— 1986.— Vol.137.— P.371—374.
4. *Dahl R., Venge P.* Role of the eosinophils in bronchial asthma // *Eur. J. Respir. Dis.*— 1982.— Suppl.122.— P.23—28.
5. *Fukuda T., Dunnette S.L., Reed C.E. et al.* Increased number of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma // *Am. Rev. Respir. Dis.*— 1985.— Vol.132.— P.981—985.
6. *Fukuda T., Gleich G.J.* Heterogeneity of human eosinophils // *J. Allergy Clin. Immunol.*— 1989.— Vol.83.— P.369—373.
7. *Frigas E., Gleich G.J.* The eosinophil and the pathophysiology of asthma // *J. Allergy Clin. Immunol.*— 1986.— Vol.77.— P.527—537.
8. *Gleich G.J.* The functions of eosinophils // *Ann. Immunol.*— 1986.— Vol.137D.— P.136—141.
9. *Gleich G.J., Loegering D.A., Adolphson C.R.* Eosinophils and bronchial inflammation // *Chest.*— 1985.— Vol.87, № 1.— Suppl.— P.10S—13S.
10. *Hakansson L., Carlson M., Stalenheim G. et al.* Migratory responses of eosinophil and neutrophil granulocytes from patients with asthma // *J. Allergy Clin. Immunol.*— 1990.— Vol.85.— P.743.
11. *Hakansson L., Rak S., Dahl R. et al.* The formation of eosinophil and neutrophil chemotactic activity during a pollen season and after allergen challenge // *Ibid.*— 1989.— Vol.83.— P.933—938.
12. *Jondal M. (Джондал М.)* Использование теста розеткообразования с эритроцитами барана в качестве маркера человеческих Т-лимфоцитов // *Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика* / Под ред. Дж.Б.Натвига, П.Перлманна, Х.Вигзелля: Пер. с англ.— М.: Медицина, 1980.— С.57.
13. *Kay A.B.* Inflammatory cells in acute and chronic asthma // *Am. Rev. Respir. Dis.*— 1987.— Vol.135.— P.S63—S66.
14. *Kay A.B.* Eosinophils as effector cells in immunity and hypersensitivity disorders // *Clin. Exp. Immunol.*— 1985.— Vol.62.— P.1—12.
15. *Meurs H., Koeter G.H., de Vries K., Kauffman H.F.* Dynamics of lymphocyte beta-adrenoreceptor system in patients with allergic bronchial asthma // *Eur. J. Respir. Dis.*— 1984.— Suppl.135.— P.47—61.
16. *Sheller J.R.* Review: Asthma: emerging concepts and potential therapies // *Am. J. Med. Sci.*— 1987.— Vol.293.— P.298—303.
17. *Spry C.J.F.* New properties and roles for eosinophils in disease: discussion paper // *J. Roy. Soc. Med.*— 1985.— Vol.78.— P.844—848.
18. *Sedgwick J.B., Frick W.E., Soudel P.M. et al.* The appearance of hypodense eosinophils during interleukin-2 treatment // *J. Allergy Clin. Immunol.*— 1990.— Vol.85.— P.557—566.
19. *Sokol R.J., James N.T., Wales J. et al.* Morphometry of eosinophils in human blood // *Acta Anat.*— 1987.— Vol.129.— P.211—213.
20. *Sorice F., De Simone C.* Human eosinophil heterogeneity // *Ric. Clin. Lab.*— 1986.— Vol.16.— P.429—434.
21. *Wardlaw A.J., Kay A.B.* The role of the eosinophil in the pathogenesis of asthma // *Allergy.*— 1987.— Vol.42.— P.321—326.
22. *Weller P.F.* Eosinophilia // *J. Allergy Clin. Immunol.*— 1984.— Vol.73.— P.1—10.
23. *Weller P.F., Goetzl E.J.* The human eosinophil roles in host defense and tissue injury // *Am. J. Pathol.*— 1980.— Vol.100.— P.790—820.