

## ЭОЗИНОФИЛЫ И БРОНХИАЛЬНАЯ ОБСТРУКЦИЯ ПРИ ХОБЛ В СОЧЕТАНИИ С ХРОНИЧЕСКОЙ ИНВАЗИЕЙ *OPISTHORCHIS FELINEUS*

Черногорюк Г.Э.<sup>1</sup>, Рослякова Е.П.<sup>2</sup>, Шепелева Е.Г.<sup>1</sup>, Денисова О.А.<sup>1</sup>, Михайлова А.А.<sup>1</sup>, Тюкалова Л.И.<sup>1</sup>, Варвянская Н.В.<sup>1</sup>, Рачковский М.И.<sup>1</sup>, Калюжина Е.В.<sup>1</sup>, Гарганеева Н.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, e-mail: chernogoryuk@yandex.ru;

<sup>2</sup>Областное государственное автономное учреждение здравоохранения «Томский областной онкологический диспансер», Томск, e-mail: office@tomonco.ru

В исследовании показано, что при ХОБЛ, ассоциированной с хроническим описторхозом, ведущими клеточными маркерами воспаления, непосредственно инициирующими синдром бронхиальной обструкции, являются нейтрофилы и эозинофилы. При эозинофильной реакции на инвазию *O. felineus* количество эозинофилов в крови и индуцированной мокроте находится в прямом соотношении. Эозинофилия увеличивает в бронхах эозинофильный компонент воспаления, поддерживающий основной клинический синдром этой нозологии – бронхообструкцию. При хроническом описторхозе антигельминтная эозинофильная реакция сопровождается повышенной репликацией низкоплотной субпопуляции эозинофилов, для которых свойственна повышенная экспрессия мембранных рецепторов, вследствие чего они могут легко активизироваться. Активирование эозинофилов характеризуется выделением ими цитотоксических протеинов, обладающих протеолитической активностью не только в отношении инородных субстанций, но и нормальных тканей. При хроническом описторхозе эозинофилы крови реагируют на иммунодоминантные белки *O. felineus* дегрануляцией и цитолизом. Высвобождающиеся из эозинофилов биологически активные вещества могут повреждать эпителий бронхолегочной системы, действуя синергично с другими факторами, участвующими в патогенезе ХОБЛ.

Ключевые слова: эозинофилы, хроническая обструктивная болезнь легких, *opisthorchis felineus*.

## EOSINOPHILS AND BRONCHIAL OBSTRUCTION IN PATIENTS WITH COPD AND CHRONIC OPISTHORCHIS FELINEUS INFECTION

Chernogoryuk G.E.<sup>1</sup>, Roslyakova E.P.<sup>2</sup> Denisova OA,<sup>1</sup> Shepeleva E.G.<sup>1</sup>, Tyukalova L.I.<sup>1</sup>, Varvyanskaya N.V.<sup>1</sup>, Raczkowski M.I.<sup>1</sup>, Kalyuzhina E. B.<sup>1</sup> Garganeeva N.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian state medical university, Tomsk, e-mail: chernogoryuk@yandex.ru;

<sup>2</sup> Tomsk Regional Oncology Center, Tomsk, e-mail: office@tomonco.ru

The study shows that in patients with COPD associated with chronic opisthorchiasis leading cellular markers of inflammation directly trigger the syndrome of bronchial obstruction are neutrophils and eosinophils. In response to invasion of eosinophil *O. felineus* number of eosinophils in the blood and induced sputum are in direct proportion. Eosinophilia increases in bronchial eosinophilic inflammation component that supports the main clinical syndrome of nosology - bronchial obstruction. When *O. felineus* antihelminthic eosinophilic reaction is accompanied by an increased replication of low-density subpopulation of eosinophils, which characterized by increased expression of membrane receptors, so that they can easily be activated. Activation of eosinophils characterized isolation of cytotoxic proteins having proteolytic activity not only against foreign substances, but also normal tissues. In the presence of immunodominant proteins *O. felineus* eosinophils degranulate and lysed. Released from eosinophils biologically active substances can damage the epithelium of respiratory system, acting synergistically with other factors involved in the pathogenesis of COPD.

Keywords: eosinophils, chronic obstructive pulmonary disease, *opisthorchis felineus*.

Вполне понятен механизм патологии органов дыхания вследствие легочной эозинофилии, при тканевых гельминтозах, при которых либо личинки, либо зрелые паразиты проникают в легочную ткань, инициируя тем самым местную антигельминтную

эозинофильную реакцию. В этих случаях агрессивные свойства эозинофилов реализуются в отношении не только гельминтов, но и нормальных структур легкого, сочетаясь со способностью вызывать в бронхах бронхоспазм, гиперсекрецию слизи, отек, микротромбозы сосудов и пр. [4]. Вместе с тем при кишечных гельминтозах также возможна миграция эозинофилов в легкие под воздействием гельминтных антигенов [2]. Эозинофилия утвердилась как весьма значимый маркер в характеристике ХОБЛ, определяющий фенотип и выбор лечения [1]. С этих позиций изучение влияния гельминтной эозинофилии на бронхообструкцию при ХОБЛ представляется нам актуальной задачей.

### **Цель исследования**

Изучение влияния эозинофилии при хроническом описторхозе (ХО) на бронхиальную обструкцию у пациентов с ХОБЛ.

### **Материалы и методы исследования**

Обследовано 46 пациентов – с хронической обструктивной болезнью легких в сочетании с хроническим описторхозом. Эозинофилией крови считали количество клеток, равное или превышающее  $0,350 \times 10^9/\text{л}$ , или 5% и более в лейкоцитарной формуле. Отвергали или подтверждали наличие эозинофилии после 2-8-кратного исследования крови в течение 2–6 недель. Диагноз ХО подтверждался обнаружением яиц гельминтов в кале. Диагноз описторхоза отвергался после трехкратной отрицательной копроовоскопии, при отрицательных серодиагностических пробах. Диагноз ХОБЛ основывался на клинической картине заболевания. Синдром бронхообструкции подтверждался данными спирографии.

Объекты исследования. Цитологические мазки индуцированной мокроты от 46 больных ХОБЛ в сочетании с хроническим описторхозом и от 18 пациентов с описторхозом без сопутствующих бронхолегочных заболеваний. Гепаринизированная венозная кровь от 60 пациентов с хроническим описторхозом и от 16 практически здоровых лиц для выделения эозинофилов на ступенчатых градиентах плотности перколла с последующей количественной оценкой плотностных фракций, а также компьютерным морфометрическим изучением эозинофилов, выделенных на различных градиентах плотности. Капиллярная кровь 49 пациентов с хроническим описторхозом для определения показателя повреждения эозинофилов в среде, содержащей антигены *O. felinus*.

Для оценки морфофункциональных характеристик эозинофилов использовали метод выделения эозинофилов на градиенте плотности перколла. Морфометрическое изучение эозинофилов крови, мокроты, а также оценку относительного количества катионных протеинов в цитоплазме эозинофилов, окрашенных прочным зеленым, проводили методом компьютерного анализа цифровых скенограмм. Реакцию эозинофилов на антигены описторхисов исследовали по показателю повреждения эозинофилов в среде с антигенами. В

качестве антигенов использовали стандартные «Гиатоп-стрип» тестовые системы для иммуноферментной диагностики описторхоза (производства ЗАО «Вектор-бест», г. Новосибирск), содержащие очищенные фиксированные иммунодоминантные фракции белков *O. felineus*. Статистическая обработка результатов исследования проводилась непараметрическими методами. Нулевые гипотезы отвергались при достижении уровня значимости соответствующего статистического критерия  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

Для оценки характера воспаления в бронхах при ХОБЛ в сочетании с ХО исследовался клеточный состав индуцированной мокроты (таблица 1). При ХОБЛ преобладающим клеточным компонентом являются нейтрофилы. Описторхозная инвазия инициирует появление в бронхиальном регионе значительного количества эозинофилов. Эти же соотношения клеточного состава мокроты наблюдались и при сравнении абсолютного количества эозинофилов на единицу объема индуцированной мокроты. При эозинофильной реакции на инвазию *O. felineus* количество эозинофилов в крови и в индуцированной мокроте положительно связаны между собой: показатели корреляционного анализа по Спирмену:  $r = 0,52$ ;  $p < 0,05$ .

Таблица 1

Клеточный состав (%) индуцированной мокроты у больных хронической обструктивной болезнью легких в сочетании с хроническим описторхозом ( $M \pm m$ )

Клетки индуцированной мокроты	Группы пациентов			P
	ХОБЛ, ХО, эозинофилия n=25	ХОБЛ, ХО, количество эозинофилов в крови не увеличено n=21	ХО, эозинофилия n=18	
	1	2	3	
Нейтрофилы	42,5 ± 5,8	63,9 ± 4,4	38,5 ± 2,7	P <sub>1-2</sub> = 0,004 P <sub>1-3</sub> > 0,05 P <sub>2-3</sub> = 0,005
Эозинофилы	25,4 ± 4,9	9,8 ± 2,9	8,4 ± 1,4	P <sub>1-2</sub> = 0,049 P <sub>1-3</sub> = 0,009 P <sub>2-3</sub> > 0,05
Макрофаги	17,8 ± 3,24	14,7 ± 3,6	39,9 ± 2,8	P <sub>1-2</sub> > 0,05 P <sub>1-3</sub> = 0,002 P <sub>2-3</sub> = 0,014
Лимфоциты	14,3 ± 3,9	11,6 ± 1,6	13,2 ± 1,7	P > 0,05
Эозинофилы крови (%)	11,7 ± 1,1	3,4 ± 0,55	7,3 ± 0,9	P <sub>1-2</sub> = 0,0001 P <sub>1-3</sub> = 0,009 P <sub>2-3</sub> = 0,001

Таблица 2 демонстрирует обратную зависимость спирометрических показателей бронхиальной обструкции с количеством нейтрофилов и эозинофилов в индуцированной мокроте при ХОБЛ в сочетании с инвазией описторхисами. То есть большему количеству

этих клеток в мокроте соответствует меньший спирометрический показатель по отношению к должному. При ХОБЛ без сочетания с глистной инвазией показатели бронхиальной обструкции коррелировали только с количеством нейтрофилов в индуцированной мокроте.

Таблица 2

Соотношение спирометрических показателей, характеризующих бронхообструкцию с клеточным составом индуцированной мокроты при ХОБЛ в сочетании с хроническим описторхозом (n= 46)

Сопоставляемые показатели		Результат корреляционного анализа	
		г	р
Нейтрофилы ИМ	ОФВ <sub>1</sub> /ФЖЕЛ	- 0,94	0,0001
	МОС-25	- 0,71	0,006
	МОС-50	- 0,6	0,028
	МОС-75	- 0,66	0,014
	ОФВ <sub>1</sub>	- 0,6	0,012
Эозинофилы ИМ	ОФВ <sub>1</sub> /ФЖЕЛ	- 0,72	0,002
	ОФВ <sub>1</sub>	-0, 48	0,01

Отражением морфологических изменений, происходящих в активированных эозинофилах, является плотностная характеристика клеток, получаемая путем деления клеточной взвеси на градиенте плотности перколлы. К низкоплотной фракции отнесли клетки, выделяющиеся на градиентах плотности перколлы 1,070–1,081, к нормоплотной – 1,090–1,105. В группе здоровых лиц низкоплотная фракция эозинофилов была в пределах известной нормы –  $3,8 \pm 0,21\%$ . У инвазированных с эозинофилией крови более трети эозинофилов концентрировались на низких градиентах плотности перколлы –  $34,6 \pm 1,24\%$  ( $P = 0,0001$ ). При хронической инвазии *O. felineus*, но без гемической эозинофилии процент низкоплотной фракции эозинофилов крови превышает таковой у здоровых субъектов –  $12,1 \pm 0,31\%$  ( $P = 0,012$ ). В крови пациентов с ХО и эозинофилией крови процентное содержание этих клеток на градиентах – 1,070, 1,081, соответственно  $17,1 \pm 1,36\%$  и  $19,8 \pm 1,1\%$ . У инвазированных лиц, но без эозинофильной реакции на гельминт – на градиенте 1,070 –  $3,09 \pm 0,38\%$  ( $P < 0,001$ ), на градиенте 1,081 –  $3,9 \pm 0,85\%$  ( $P < 0,01$ ). Количество низкоплотных эозинофилов в крови лиц, инвазированных описторхисами, но без эозинофилии, сопоставимо с величиной этой фракции у здоровых лиц, у которых на градиенте 1,070 концентрируется в среднем весьма небольшое количество клеток  $2,6 \pm 0,5\%$ , а на 1,081 –  $1,2 \pm 0,32\%$ .

Методом компьютерного анализа цифровых скенограмм эозинофилов, полученных на различных градиентах плотности, нами были исследованы некоторые морфометрические характеристики этих клеток (табл. 3). Низкоплотная фракция эозинофилов отличалась от нормоплотных эозинофилов большей величиной клетки, соответственно и большей

площадью цитоплазмы. Светопроницаемость цитоплазмы в зеленом спектре была значительно выше в клетках, относящихся к низкоплотной фракции. Этот показатель позволяет косвенно оценивать количество гранул в цитоплазме эозинофилов и свидетельствует о появлении большего количества вакуолей и, следовательно, интенсивной дегрануляции эозинофилов.

Таблица 3

Морфологическая характеристика фракций эозинофилов крови, выделенных на градиентах плотности перколла при хроническом описторхозе ( $M \pm m$ )

Морфометрические показатели эозинофилограммы	Фракции эозинофилов		p
	Нормоплотностная (n = 34)	Низкоплотностная (n = 26)	
Площадь клетки ( $\text{мкм}^2$ )	$70,02 \pm 1,51$	$88,4 \pm 3,4$	0,001
Площадь ядра ( $\text{мкм}^2$ )	$38,7 \pm 1,34$	$42,5 \pm 2,06$	> 0,05
Площадь цитоплазмы ( $\text{мкм}^2$ )	$31,5 \pm 1,26$	$45,9 \pm 1,7$	0,005
Светопроницаемость цитоплазмы эозинофилов (зеленый спектр)			
- мода	$162,4 \pm 2,4$	$189,0 \pm 2,1$	0,001
- медиана	$123,0 \pm 4,1$	$190,4 \pm 4,8$	0,015

Сопоставлены морфометрические показатели эозинофилов низкоплотной фракции эозинофилов крови и индуцированной мокроты (табл. 4).

Таблица 4

Сопоставление морфометрических показателей низкоплотной фракции эозинофилов крови и эозинофилов индуцированной мокроты у пациентов с ХОБЛ в сочетании с хроническим описторхозом ( $M \pm m$ )

Показатели	Низкоплотностная фракция эозинофилов крови (n = 26)	Эозинофилы мокроты (n = 25)	p
Площадь клетки ( $\text{мкм}^2$ )	$88,4 \pm 3,4$	$96,4 \pm 4,8$	0,048
Площадь ядра ( $\text{мкм}^2$ )	$42,5 \pm 2,06$	$48,0 \pm 2,42$	> 0,05
Площадь цитоплазмы ( $\text{мкм}^2$ )	$45,9 \pm 1,7$	$48,4 \pm 2,28$	> 0,05
Светопроницаемость цитоплазмы эозинофилов (зеленый спектр)			
- мода	$189,0 \pm 2,1$	$178,06 \pm 2,07$	0,045
- медиана	$190,4 \pm 4,8$	$159,04 \pm 10,17$	0,004

Была выявлена большая величина эозинофилов мокроты. Замечено, что яркость свечения цитоплазмы эозинофилов ИМ меньше, чем низкоплотных эозинофилов крови (мода, соответственно,  $178,06 \pm 2,07$  и  $189,0 \pm 2,1$ ;  $p = 0,045$ ), но в то же время значительно

интенсивнее по сравнению с нормоплотными эозинофилами (мода, соответственно,  $178,06 \pm 2,07$  и  $162,4 \pm 2,4$ ;  $p = 0,013$ ). То есть процессы дегрануляции эозинофилов в бронхолегочном регионе идут интенсивно и, вероятно, вследствие свойств этих клеток, инициируют патофизиологические эффекты, результатом которых является синдром бронхиальной обструкции.

В отношении гетерогенности эозинофилов в настоящее время нет единой гипотезы, которая бы адекватно объясняла генерацию низкоплотных эозинофилов. Возможно, это мультифакторный процесс, который может быть сведен к нижеследующим положениям [3]:

- низкоплотными нормоплотные эозинофилы становятся только когда входят в экстравааскулярное пространство, где активизируются;
- эозинофилы становятся гиподенсными в период циркуляции в кровяном русле, после чего мигрируют в ткани;
- низкоплотные эозинофилы отражают число молодых клеток, поступающих в кровяное русло из костного мозга;
- низкоплотные эозинофилы появляются исключительно при тяжелых заболеваниях, и их характеризует определенное функциональное состояние этой клетки.

Механизм антигельминтного действия эозинофилов реализуется через их сенсibilизацию к антигенам паразитов, при контакте с которыми происходит высвобождение основного и катионного протеинов, пероксидазы, нейротоксина и пр. То есть веществ, способных разрушать кутикулу паразита. При рекрутировании эозинофилов в ткани повреждающее действие этих клеток на окружающие биоструктуры связано не только с появлением активных (гиподенсных) эозинофилов, но и способностью этих клеток в присутствии специфического и неспецифического IgE отвечать дегрануляцией на гельминтные антигены. Необходимо заметить, что антигены способны проникать в слизистые оболочки как желудочно-кишечного тракта, так и бронхолегочной системы [5; 6].

Реакцию эозинофилов на антигены описторхисов исследовали по показателю повреждения эозинофилов в среде с антигенами. Показатель повреждения эозинофилов при контакте с очищенными фиксированными иммунодоминантными фракциями белков *O. felineus* при хроническом описторхозе был наиболее высоким был у пациентов с ХОБЛ (табл. 5). Изменения эозинофилов при воздействии антигена гельминта носили преимущественно характер цитолиза: клетки, «разбухшие» в 2 и более раз, превышают размеры окружающих нейтрофилов, оболочка разорвана, рядом – гранулы; в некоторых препаратах наблюдался распад ядра на хроматиновые нити.

Показатель повреждения эозинофилов под влиянием антигенов *O. felinus* при хроническом описторхозе ( $M \pm m$ )

Группы пациентов	ППЭ	P
Хронический описторхоз, ХОБЛ (n = 19)	27,11 ± 2,5	P <sub>1-3</sub> = 0,004
Хронический описторхоз (n = 18)	11,43 ± 1,16	P <sub>1-2</sub> = 0,001
Контроль (n = 16)	5,61 ± 1,4	P <sub>2-3</sub> = 0,004

Изменения эозинофилов в тканях при ХО, возможно, обусловлены и действием антигенов гельминта. Многие авторы рассматривают эозинофильный цитолиз в тканях как большой активационный механизм, наблюдаемый вместе с дегрануляцией, который лежит в основе заболеваний, где клеткой-эффектором является эозинофил. Дегрануляция эозинофилов под влиянием антигенов гельминтов наблюдалась не у всех инвазированных. Возможно, это связано с различной способностью организма исследуемых реагировать в хронической стадии гельминтоза выработкой в достаточном количестве и IgG4, способного блокировать рецепторы Fc $\epsilon$ RII (возможно, Fc $\epsilon$ RI), в результате чего к этим рецепторам не присоединяется IgE, индуцирующий процесс дегрануляции эозинофилов.

### **Заключение**

Таким образом, при ХОБЛ, ассоциированной с хроническим описторхозом, ведущими клеточными маркерами воспаления, непосредственно инициирующими синдром бронхиальной обструкции, являются нейтрофилы и эозинофилы. При эозинофильной реакции на инвазию *O. felinus* количество эозинофилов в крови и индуцированной мокроте находятся в прямом соотношении. Эозинофилия увеличивает в бронхах эозинофильный компонент воспаления, поддерживающий основной клинический синдром этой нозологии – бронхообструкцию. При ХО антигельминтная эозинофильная реакция сопровождается повышенной репликацией низкоплотностной субпопуляции эозинофилов, для которых свойственна повышенная экспрессия мембранных рецепторов, вследствие чего они могут легко активизироваться. При ХО эозинофилы крови реагируют на иммунодоминантные белки *O. felinus* дегрануляцией и цитолизом. Активирование эозинофилов характеризуется выделением ими цитотоксических протеинов, обладающих протеолитической активностью не только в отношении инородных субстанций, но и нормальных тканей.

### **Список литературы**

1. Fernandes F.L. Eosinophils in COPD: why should I care? // J. Bras. Pneumol. - 2016. - Jul.- Aug. - Vol. 42 (4). - P. 237-238.

2. Gabor L.G. Differences in eosinophil migration into the lungs following inhaled antigen challenge of parasite-naïve guinea pigs genetically determined differences in responsiveness to a gastrointestinal nematode parasite / L.G. Gabor, T.L. Rothwell // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 1994. – 103 (4). - P. 391-395.
3. Giembycz M.A. Pharmacology of the eosinophil / M.A. Giembycz, M.A. Lindsay // *Pharmacological reviews.* – 1999. - Jun. - Vol. 51. - Issue 2. - P. 213-240.
4. Hall L.R. An essential role for interleukin -5 and eosinophils in helminth-induced airway hyperresponsiveness / L.R. Hall, R.K. Mehlotra, A.W. Higgins et al. // *Infect. Immunol.* – 1998. – Sep. - Vol. 66 (90). - P. 4425-4430.
5. Holgate S.T. The role of the eosinophil in asthma / S.T. Holgate, W.R. Roche, M.K. Church // *Am. Rev. Respir. Dis.* – 1991. - 143. - P. 66-70.
6. Kuwahara Y. Involvement of urban living environments in atopy and enhanced eosinophil activity: potential risk factors of airway allergic symptoms / Y. Kuwahara, J. Kondoh, K. Tatara et al. // *Allergy.* - 2001. - Mar. - Vol. 56 (3). - P. 224-230.