С.И.Арифханова, К.М.Убайдуллаева

Клеточные реакции в бронхолегочной системе при обострении хронической обструктивной болезни легких с кумуляцией пестицидов в организме

НИИ фтизиатрии и пульмонологии МЗ РУз, г. Ташкент

S.I.Arifkhanova, K.M.Ubaydullaeva

Cell bronchopulmonary reactions in patients with pesticide accumulation and exacerbation of COPD

Summary

Cell reactions of bronchopulmonary system in COPD exacerbation were investigated in BALF from 182 patients. Patients were divided into 2 groups: with or without pesticide accumulation. Smoking habit was also taken into consideration. We estimated biocide potential of AM using spontaneous and induced NST-test in 4 groups, calculated the stimulation index that revealed several patterns of cell reactions. Chronic excessive activation of AM by smoking, pesticides and/or other risk factors provided hyperresponsiveness of biocide systems of mononuclear monocytes.

Резюме

На материале бронхоальвеолярного лаважа (БАЛЖ) 182 больных изучены клеточные реакции в бронхолегочной системе при обострении хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). При этом больные были разделены на 2 большие группы без и с наличием кумуляции пестицидов в организме, а также учитывался фактор курения. Определение биоцидного потенциала АМ в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте в сравниваемых 4 подгруппах больных, а также вычисление индекса стимуляции выявили ряд закономерностей в клеточных реакциях. Хроническая гиперактивация альвеолярных макрофагов курением, наличием пестицидов в организме и других факторов риска способствуют гиперреактивности биоцидных систем мононуклеарных моноцитов.

Резистентность легких к действию повреждающих факторов представлена механизмами неспецифической защиты и иммунологической реактивности, которые определяются общими и местными гуморальными и клеточными реакциями [1–3]. Система неспецифической защиты органов дыхания включает механические (фильтрация, кашель, мукоцилиарный клиренс) и фагоцитарные (макрофаги и лейкоциты) реакции. Иммунная защита специфична по отношению к антигенам и лежит в основе развития иммунного ответа, направленного на нейтрализацию чужеродного материала в органах дыхания [4].

В патогенезе ХОБЛ большое значение имеет нарушение функции местной защиты в респираторном тракте. Важную роль в развитии заболевания играют нарушение эскалаторной функции мукоцилиарного аппарата и общепризнанные факторы риска: курение, загрязнение и запыленность окружающей среды, профессиональная вредность, гиперреактивность бронхов, острые респираторные вирусные инфекции, генетические факторы (наследственность, α_1 -антитрипсин), особенности климата [5].

В условиях Узбекистана, кроме вышеперечисленных общепризнанных факторов риска, есть факторы, обуславливающие краевые особенности патоморфоза ХОБЛ: высокий процент кумуляции хлорорганических пестицидов в организме населения и запыленность хлопковой и табачной пылью в сельскохозяйственных регионах. Представляется важным провести сравнительный анализ клеточных реакций в бронхо-

легочной системе при обострении ХОБЛ у больных с кумуляцией пестицидов в организме и без нее.

Материалы и методы

Обследованы 182 больных ХОБЛ: 89 мужчин и 93 женщины в возрасте 40–73 лет. Все они были разделены на 2 группы в зависимости от содержания в крови хлорорганических пестицидов: 1-я группа — больные ХОБЛ без пестицидов в крови, 2-я группа — больные с кумуляцией пестицидов в крови (87 и 95 больных соответственно). Каждая группа включала 2 подгруппы: курящие и некурящие (в 1-й группе 47 и 40, во 2-й группе 58 и 37 больных соответственно).

Проводился комплекс стационарных клинических, лабораторных и инструментальных исследований. Системы внешнего дыхания оценивали методом компьютерной пневмотахометрии на аппаратах *Pneumoscop* и *Flowscrean* (Jaeger, Германия), обеспечивающих автоматический анализ показателей структуры легочных объемов (жизненная емкость легких (ЖЕЛ) и форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ)), мгновенных максимальных объемных скоростей при выдохе 25, 50, 75 % ФЖЕЛ ($МОС_{25}$, $МОС_{50}$, $МОС_{75}$), выраженных в %_{долж.}.

Содержание хлорорганических пестицидов в крови больных ХОБЛ определяли методом газожидкостной хроматографии. Методика определения заключалась в извлечении хлорорганических пестицидов органическими растворителями, очистке экстрактов

путем распределения между двумя несмешивающимися жидкостями, с дальнейшей очисткой в колонке из окиси алюминия и безводного сернокислого натрия. Определение проводилось на хроматографе с детектором по захвату электронов. Данное исследование было проведено в лаборатории гигиены пестицидов НИИ санитарии и гигиены и профессиональной патологии МЗРУз.

Материалом для изучения клеточных реакций в бронхолегочной системе служила жидкость бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ), который получали по общепринятой методике после введения в субсегментарный бронх фракционно 100–300 мл подогретого (до 37 °С) стерильного физиологического раствора с последующей его незамедлительной аспирацией. Полученную после объединения всех порций ЖБАЛ фильтровали через 2 слоя марли и центрифугировали при 2,5 тыс. об/мин при 2–4 °С в течение 15 мин. К осадку из клеток добавляли 2 мл среды 199 с 20 % телячьей сыворотки и осторожно ресуспендировали. Количество клеточных элементов подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток оценивали по поглощению трипанового синего. Из полученного клеточного осадка изготавливали мазки, которые окрашивали гематоксилином и эозином и по Романовскому–Гимза. В оставшейся его части проводили разделение альвеолярных макрофагов (АМ) от других клеточных элементов путем инкубации на предметных стеклах во влажной камере в течение 1 ч при комнатной температуре. В выделенных АМ изучали биоцидный потенциал с помощью восстановления нитросинего тетразолия в спонтанном (с-НСТ) и индуцированном (и-НСТ) вариантах по методу А.Н.Шишкиной [6]. В качестве стимулятора использовали липополисахарид *S. marcescens*-продигиозан ("Мосхимфармпрепарат", г. Москва). В мазках посредством с-НСТ и и-НСТ-тестов подсчитывали долю (%) НСТ-положительных АМ, по которому судили о степени активации внутриклеточных биоцидных систем. Индекс стимуляции определяли по соотношению показателей с-НСТ и и-НСТ-тестов.

Статистическую обработку результатов исследования и корреляционный анализ проводили с помощью программы Excel.

Результаты и обсуждение

По результатам исследований при обострении ХОБЛ концентрация клеток в ЖБАЛ колебалась в относительно широких пределах в зависимости от принадлежности больного к группе сравнения от 2 тыс. до 6 млн клеток в 1 мл. В группе пациентов некурящих и без кумуляции пестицидов в крови АМ составляли в среднем до 86 %. На долю АМ у курящих больных без наличия пестицидов в крови приходились до 50 %, а у остальных больных с кумуляцией пестицидов в крови и курящих на долю АМ — до 28 % клеток.

Доля нейтрофильных лейкоцитов (Нф) у пациентов без наличия пестицидов и некурящих составила

в среднем до 20 %, тогда как у больных курящих и без пестицидов в крови обнаруживалось до 56 % Нф. В группе с наличием пестицидов в крови и у курящих количество Нф составляло в среднем до 80 %.

Почти у всех больных без кумуляции пестицидов в крови и некурящих проявлялась умеренная способность АМ продуцировать высоко реактивные метаболиты кислорода в с-НСТ-тесте. Показатели с-НСТ-теста у них варьировали от 6 % до 22 % и в среднем не превышали норму (19 %). За "норму" принимались показатели с-НСТ-теста для здоровых лиц, приведенные в работе Е.Ф.Чернушенко [7]. В основном, у всех больных этой группы АМ были чувствительны к дополнительной нагрузке и под действием продигиозана активнее восстанавливали НСТ.

В группе больных с пестицидами в крови и курящих реактивность АМ в с-НСТ-тесте оказалась самой высокой, почти вдвое выше (от 18 % до 40 %), чем в предыдущей группе (без наличия пестицидов в крови и некурящих). У пациентов с пестицидами в крови и некурящих показатель с-НСТ-теста в АМ был средним по сравнению с показателями предыдущих двух групп и варьировал от 10 % до 30 %.

Примечательно то, что реактивность АМ в и-НСТ-тесте определялась исходным состоянием этих клеток (таблица), так как между показателями с-НСТ и и-НСТ-тестов отмечалась высокая положительная корреляционная взаимосвязь ($r = 0,86$, $p < 0,01$). При этом процент активных клеток в популяции АМ не зависел от ее численности. Однако содержание Нф в БАЛЖ больных с обострением ХОБЛ в изучаемых подгруппах напрямую зависело от исходной биоцидной активности популяции АМ и ее способности отвечать на дополнительный стимул (продигиозан). Между абсолютными показателями активности АМ в с-НСТ-тесте и абсолютным содержанием Нф в БАЛЖ была выявлена высокая положительная корреляция ($r = 0,77$, $p < 0,01$).

Существуют противоположные мнения разных исследователей о присутствии и роли в бронхолегочной системе функционально активных макрофагов. Так, по А.Г.Чучалину [8], функционально активные макрофаги в бронхоальвеолярном пространстве способствуют эффективной элиминации полиморфно-ядерных лейкоцитов (Нф) и репарации поврежденной ткани легких. По мнению других авторов [3, 9–11], активация макрофагов приводит к постоянному выделению медиаторов воспаления, усилению притока Нф в легкие, способствующим лизису ими эластического каркаса органа. Известно, что АМ под влиянием микробных и немикробных стимулов синтезируют разные хемоаттрактанты для Нф, среди которых встречаются специфичные (IL-8) и неспецифичные (лейкотриен В4, с5а-фрагмент комплемента, тромбоцитарноактивирующий фактор) [12]. При этом образование IL-8 может усиливаться активацией эндогенных механизмов синтеза высокореактивных радикалов кислорода [13].

Таким образом, особенности клеточных реакций в воздухоносных путях больных ХОБЛ зависят от

Показатели НСТ-теста до и после стимуляции продигоизаном АМ *in vitro* у больных при обострении ХОБЛ

Группа обследованных больных	n	α -ГХЦГ, мкг/л	γ -ГХЦГ, мкг/л	ДДТ, мкг/л	с-НСТ, %	и-НСТ, %	Индекс стимуляции
Больные ХОБЛ без наличия пестицидов в крови и некурящие	47	–	–	–	12,8 ± 2,3	22,9 ± 1,9	1,86 ± 0,22
Больные ХОБЛ без наличия пестицидов в крови и курящие	40	–	–	–	15,9 ± 1,8	31,6 ± 3,8	1,98 ± 0,31
Больные ХОБЛ с кумуляцией пестицидов в организме и некурящие	58	0,0029 ± 0,01	0,0022 ± 0,01	0,0032 ± 0,03	17,6 ± 1,4	35,3 ± 4,2	2,00 ± 0,18
Больные ХОБЛ с кумуляцией пестицидов в организме и курящие	37	0,0031 ± 0,02	0,0024 ± 0,01	0,0031 ± 0,02	19,3 ± 2,3	42,8 ± 4,6	2,22 ± 0,24

функционального состояния мононуклеарных фагоцитов (АМ-клеток), которые можно в клинических условиях определить посредством с-НСТ и и-НСТ-тестов. Наши данные свидетельствуют, что факторы длительной активизации макрофагов (в частности длительное курение, кумуляция пестицидов в организме) превращают последние в постоянный источник медиаторов воспаления и приводят к усилению притока полиморфноядерных лейкоцитов (Нф) в легкие. Это способствует поддержанию хронического воспаления, со временем ведущего к лизису их эластического каркаса и развитию эмфиземы легких.

Следовательно, терапия больного ХОБЛ должна быть направлена не только на противомикробное воздействие, но и на дезинтоксикацию, на снятие всех возможных причин, приводящих к гиперреактивности АМ (в том числе курение, пестициды), на санационные мероприятия бронхиального дерева с механическим устранением гиперреактивных АМ и чрезмерного накопления Нф в воздухоносных путях.

Заключение

1. Особенности клеточных реакций в воздухоносных путях больных ХОБЛ определяются функциональным состоянием биоцидных систем мононуклеарных фагоцитов (АМ).
2. В клинических условиях можно прогнозировать течение и эффективность проводимого лечения болезни путем определения функционального состояния биоцидных систем АМ в БАЛЖ постановкой *in vitro* с-НСТ и и-НСТ-тестов и вычисления индекса стимуляции.
3. Хроническая гиперактивация АМ курением, пестицидами в организме и другими факторами риска способствует гиперреактивности биоцидных систем мононуклеарных моноцитов, что характеризуется индексом стимуляции выше 1,9 раза.
4. Следствием гиперактивации АМ и накопления нейтрофилов в бронхолегочной системе с выделением высоко реактивных радикалов и ферментов лизиса на фоне нарушения мукоцилиарного клиренса является хронизация воспаления и развитие эмфиземы.

Санация бронхиального дерева от гиперреактивных АМ и нейтрофилов, отказ от курения и защита от других факторов риска (энтеросорбцией,

гемосорбцией, плазмаферезом, дезинтоксикацией) могут явиться хорошей патогенетической терапией для больных ХОБЛ с кумуляцией пестицидов в организме.

Литература

1. Копьева Т.Н., Бармина Г.А., Грובהва О.М., Воронина Л.М. Местные механизмы защиты при хроническом воспалении в легких. Арх. пат. 1992; 9: 5–12.
2. Ерохин В.В., Романова Л.К. Клеточная биология легких в норме и при патологии. М.; 2000.
3. Макарова О.П., Шишкина Л.Н., Огиренко А.П. и др. Клеточные реакции в легких при обострении хронических заболеваний органов дыхания. Пульмонология 2001; 2: 63–68.
4. Романова Л.К. Структурные основы иммунной защиты легких здорового человека. В кн.: Клеточная биология легких в норме и при патологии. М.; 2000. 259–268.
5. Черняев А.Л. Хронические обструктивные болезни легких. Клеточная биология легких в норме и при патологии. М.; 2000. 357–377.
6. Шишкина Л.Н., Маянский Д.Н., Богомолова М.В. Реакция легочных макрофагов крыс на стимуляцию зимозаном. Бюл. эксперим. биологии 1985; 10: 454–457.
7. Чернушенко Е.Ф., Гавриленко Т.И. Функциональное состояние фагоцитирующих клеток бронхоальвеолярного смыва при заболеваниях легких. В кн.: Моделирование и клиническая характеристика фагоцитарных реакций. Горький; 1989. 228–237.
8. Чучалин А.Г. Иммунокоррекция в пульмонологии. М.: Медицина; 1989.
9. Маянский Д.Н. Хроническое воспаление. М.: Медицина; 1991.
10. Романова Л.К., Овчаренко С.И., Младковская Т.Б. и др. Особенности клеточных реакций в легких во время обострения бронхиальной астмы. Пульмонология 1992; 1: 20–26.
11. Chang J.C., Wysocki A., Tchou Wong K.M. et al. Effect of Mycobacterium tuberculosis and its components on macrophages and the release of matrix metalloproteinases. Thorax 1996; 51 (3): 306–311.
12. Wilkinson J.R., Howell C.S., Lee T.A. Effects monocyte and macrophage-derived products on granulocyte function in asthma. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 1989; 90: 64–69.
13. Wozniak A., Betts W.H., Murphy G.A. et al. Interleukin-8 primes human neutrophils superoxide anion production. Immunology 1993; 79: 608–615.

Поступила 28.06.06

© Арифханова С.И., Убайдуллаева К.М., 2007
УДК 616.24-036.12-06:[615.917:632.95]