

6. Пулатова М.К., Рихирева Г.Т., Куроптева З.В. Электронный парамагнитный резонанс в молекулярной радиобиологии.— М., 1989.— 232 с.
7. Терещенко В.П., Колодяжная Т.А. Возрастная характеристика физико-химических свойств эритроцитарных мембран детей, проживающих в Эвенкии // Институт медицинских проблем Севера. Сиб. отд. РАМН. Науч. итоговая конф. за 1993 г.: Доклады.— Красноярск, 1995.— С.91—92.
8. Чучалин А.Г. Бронхиальная астма.— М.: Медицина, 1985.— 94 с.
9. Чучалин А.Г., Скачилова С.Я., Зуева Э.Ф. Поиск и создание селективных стимуляторов бета-2-адренергических рецепторов // Сальбутамол / Под ред. А.Г.Чучалина, И.Хамида.— М., 1992.— С.66—76.
10. Чучалин А.Г., Грובהва О.М., Байдер Л.М. и др. Выявление радиационно-индуцированных биохимических изменений в клетках крови и бронхоальвеолярного смыва у людей, подвергшихся облучению с малой интенсивностью дозы в результате аварии на Чернобыльской АЭС, с помощью метода электронного парамагнитного резонанса // Пульмонология.— 1993.— № 4.— С.32—50.
11. Jonson J. β -adrenoceptor agonist: optimal pharmacological profile // Eur. Respir. J.— 1992.— Vol.5, Suppl.15.— P.316.

Поступила 22.03.95.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1997

УДК616.233-002.2-092:612.017.1

О.А.Суховская, И.В.Походзей, Н.И.Александрова, А.Г.Булычев, Е.А.Леонтьева

ПОГЛОТИТЕЛЬНАЯ И ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТИРУЮЩИХ КЛЕТОК ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ОБСТРУКТИВНОМ БРОНХИТЕ

Государственный научный центр пульмонологии МЗ РФ, Институт цитологии РАМН,
Санкт-Петербург

THE ABSORBING AND FERMENTING ACTIVITY OF PHAGOCYtic CELLS IN CHRONIC OBSTRUCTIVE
BRONCHITIS

O.A.Sukhovskaya, I.V.Pokhodzei, N.I.Alexandrova, A.G.Bulychev, Ye.A.Leontieva

S u m m a r y

We studied the phagocytic activity of alveolar macrophages and neutrophils in the peripheric blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in 37 patients affected with chronic obstructive bronchitis (COB) and healthy persons to determine the activity of elastase and collagenase in BALF cells and their supernate.

The peripheric blood of COB patients revealed normal neutrophilic and monocytic phagocytosis, while the monocytes of complementary pulmonary emphysematous patients revealed an increased absorbing activity.

BALF demonstrated an acute depression of alveolar macrophagal phagocytosis, which a remission of the inflammatory process raised close to normal only with persons not affected with pulmonary emphysema. COB patients revealed increased activities of elastase and collagenase both in an acute inflammatory process and during remissions. COB patients not affected with pulmonary emphysema displayed the greatest activity increase of elastase.

Р е з ю м е

Исследовалась фагоцитарная активность альвеолярных макрофагов и нейтрофилов периферической крови и жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ) у 37 больных хроническим обструктивным бронхитом (ХОБ) и здоровых лиц. Определялась активность эластазы и коллагеназы как в клетках ЖБАЛ, так и в супернатанте клеток ЖБАЛ.

Показано, что у больных ХОБ в периферической крови фагоцитоз нейтрофилов и моноцитов был в норме, однако у больных со вторичной эмфиземой легких отмечалось повышение поглотительной активности моноцитов.

В ЖБАЛ наблюдалось резкое угнетение фагоцитоза альвеолярных макрофагов, который повышался почти до нормы в ремиссии воспалительного процесса только у лиц без эмфиземы легких. У больных ХОБ как в обострении, так и ремиссии воспалительного процесса усилена активность эластазы и коллагеназы. Наиболее выраженное увеличение активности эластазы наблюдалось у больных ХОБ без эмфиземы легких.

Хронический обструктивный бронхит (ХОБ) характеризуется обструкцией мелких бронхов с последующим неизбежным развитием эмфиземы легких (ЭЛ) со свойственной ей деструкцией альвеол и нарастающей дыхательной недостаточностью.

Особую роль при этом играют нейтрофилы и альвеолярные макрофаги (АМ). Активированные антигенами и медиаторами Т-лимфоцитов АМ вырабатывают хемотоксические факторы для нейтрофилов, обеспечивая приток нейтрофилов из кровяного русла и их активацию [9].

Показано, что при ХОБ наблюдается агрегация нейтрофилов в сосудах легких, что сопровождается освобождением метаболитов активированного кислорода, медиаторов воспаления и протеолитических ферментов [1]. Важная роль в деструкции альвеол принадлежит протеолитическим ферментам АМ и нейтрофилов: эластазе и коллагеназе, точкой приложения которых являются белки соединительной ткани легких [7,11]. Таким образом, в патогенезе ХОБ важное значение имеют межклеточные взаимодействия в очаге воспаления, которые во многом и обеспечивают развитие ЭЛ.

В настоящей работе исследовалась функциональная активность фагоцитов в бронхоальвеолярном лаваже и периферической крови у больных ХОБ.

Всего было обследовано 37 больных ХОБ в возрасте от 42 до 67 лет, из них 33 мужчины и 4 женщины, лечившиеся в отделении терапии неспецифических заболеваний легких. Больные были обследованы при вялотекущем обострении. У 18 больных диагностировали ЭЛ. Контрольную группу составили 100 здоровых лиц и 12 волонтеров, которым было выполнено исследование жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ).

Для характеристики АМ, моноцитов и нейтрофилов определяли поглотительную активность клеток с частицами латекса [4]. Исследования проводились в стерильных пенициллиновых флаконах с покровными стеклами. Время инкубации лейкоцези или ЖБАЛ

с частицами латекса (1,1 мкм в расчете 100 частиц на клетку) составляло 1,5 часа при 37,0°C. Затем покровные стекла вынимали, отмывали от избытка латекса, фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому. Подсчитывали число клеток, поглотивших частицы латекса (фагоцитарное число, ФЧ), и количество частиц, поглощенных в среднем одной клеткой (фагоцитарный индекс, ФИ). Протеолитические ферменты (эластаза и коллагеназа) определяли в супернатанте клеток ЖБАЛ и непосредственно в клетках ЖБАЛ. Клетки разрушали с помощью гомогенизатора "Доже" в среде, содержащей 0,1 КСl и 0,1 % раствора Трилон-х-100 (0°C), под контролем фазово-контрастного микроскопа. Активность коллагеназы определяли с помощью меченного ³H-коллагена по методу *J. Cawston et al.* [8]. Результаты выражали в импульсах на 1 миллион клеток в минуту. Нативный мономерный коллаген готовили из хвостового сухожилия крыс (*Chandracan I. et al., 1976*). Активность эластазы в ЖБАЛ, клетках ЖБАЛ оценивали спектрофотометрически с использованием синтетического субстрата п-нитрофенил-N-тербутилоксикарбонил-L-аланината по методу *L. Visser et al.* [12].

Больные были обследованы при вялотекущем воспалении в бронхах и ремиссии заболевания. Ведущими жалобами у больных были одышка и кашель. Кашель, постоянный или периодический, беспокоил больных на протяжении многих (от 5 до 20) лет и сопровождался выделением трудноотделяемой мокроты слизистого характера (как правило, до 50 мл в сутки). При обострении заболевания отмечались слабость, потливость, часто субфебрильная температура тела. У 18 больных рентгенологически выявлялась сетчатость легочного рисунка, преимущественно в нижних отделах легких, обеднение рисунка и повышенная прозрачность легочной ткани, что в совокупности с клиническими признаками свидетельствовало об ЭЛ.

В крови больных при вялотекущем обострении воспалительного процесса количество лимфоцитов,

Т а б л и ц а 1

Показатели фагоцитарной активности клеток ЖБАЛ при вялотекущем обострении воспалительного процесса

Показатель	Группы больных ХОБ		Здоровые n=12
	1-я группа n=19	2-я группа n=18	
Фагоцитарная активность АМ			
ФЧ, %	45,0±3,7	41,0±4,0	50,3±3,5
ФИ, усл. ед.	3,2±0,2*	3,0±0,4*	5,4±0,5
Фагоцитарная активность нейтрофилов			
ФЧ, %	56,40±4,91**	49,00±3,70	—
ФИ, усл. ед.	6,6±0,8**	4,0±0,5	—
Эластаза, нмоль·10 ⁶ кл/мин	0,94±0,11*,**	0,64±0,06*,**	0,05±0,004
Коллагеназа, имп·10 ⁶ кл/мин	2,85±0,27*	2,07±0,3*	1,29±0,12

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл.2. * — различия достоверны (p<0,05) по сравнению с группой здоровых, ** — различия достоверны (p<0,05) между группами больных ХОБ (1-й и 2-й).

моноцитов и нейтрофилов было в норме, при этом поглотительная активность нейтрофилов и моноцитов также не отличалась от значений, определяемых у здоровых (ФЧ нейтрофилов $70,55 \pm 4,06\%$, ФИ $8,04 \pm 0,66$ усл. ед. при норме ФЧ $76,67 \pm 2,89\%$, ФИ $7,62 \pm 0,36$ усл. ед. $p > 0,05$, ФЧ моноцитов $40,33 \pm 3,86\%$, ФИ $3,38 \pm 0,29$ усл. ед. при норме ФЧ $35,86 \pm 3,55\%$, ФИ $2,87 \pm 0,47$ усл. ед. $p > 0,05$). Однако у больных с выраженной ЭЛ фагоцитоз моноцитов был повышен (ФЧ $51,06 \pm 2,18\%$, ФИ $4,71 \pm 0,33$ усл. ед. при норме ФЧ $35,86 \pm 3,55\%$, ФИ $2,87 \pm 0,47$ усл. ед., $p < 0,05$). Эти данные позволяют предположить, что повышение поглотительной активности моноцитов связано, вероятно, с повышенным содержанием различных метаболитов и ферментов, выделяемых нейтрофилами и АМ при ЭЛ. Так как развитие ЭЛ во многом зависит от межклеточных взаимодействий в очаге воспаления, была изучена фагоцитарная и ферментативная активность клеток в ЖБАЛ.

В ЖБАЛ резко увеличивалось содержание нейтрофилов при вялотекущем обострении и в ремиссии заболевания ($1,06 \pm 0,2 \cdot 10^6$ кл/мл). Причем у больных с рентгенологически выраженной ЭЛ (1-я группа) количество нейтрофилов было несколько ниже ($6,64 \pm 0,81 \cdot 10^6$ кл/мл при норме $0,20 \pm 0,02 \cdot 10^6$ кл/мл, $p < 0,001$), чем у тех больных, у которых ЭЛ рентгенологически еще не выявлялась ($6,64 \pm 0,8 \cdot 10^6$ кл/мл). Фагоцитоз нейтрофилов также был выше у больных ХОБ 1-й группы по сравнению с больными, страдающими выраженной ЭЛ, как по фагоцитарному числу (ФЧ $56,40 \pm 4,91\%$ и $49,00 \pm 3,70\%$ соответственно), так и по фагоцитарному индексу ($6,6 \pm 0,8$ и $4,0 \pm 0,5$ усл. ед. соответственно, табл.1). К сожалению, не представляется возможным оценить фагоцитоз нейтрофилов у здоровых, так как их содержание в ЖБАЛ очень мало ($0,2 \pm 0,05 \cdot 10^6$ кл/мл). Фагоцитоз АМ можно сравнивать не только между группами больных ХОБ, но и с группой здоровых. Так, по сравнению с нормой наблюдается значительное угнетение поглотительной способности АМ у больных ХОБ как с выраженной ЭЛ, так и без нее (см. табл.1).

Угнетение фагоцитоза АМ в ЖБАЛ может быть связано с большим антигенным воздействием на клетку и поглощением АМ микроорганизмов, при котором клетка теряет способность поглощать частицы латекса. Косвенно эту гипотезу подтверждают и данные ряда авторов, показывающих большой процент незавершенного фагоцитоза АМ при ХОБ, высокую антигеносемию [3,5,6].

Для характеристики нейтрофилов и АМ было проведено исследование активности эластазы и коллагеназы. При вялотекущем обострении воспалительного процесса уровень активности этих ферментов в ЖБАЛ был повышен. Активность эластазы у больных ХОБ 1-й группы составила $0,94 \pm 0,11$ нмоль $\cdot 10^6$ кл/мин при норме $0,05 \pm 0,004$ нмоль $\cdot 10^6$ кл/мин, $p < 0,001$, а коллагеназы $2,85 \pm 0,27$ имп $\cdot 10^6$ кл/мин, при норме $1,29 \pm 0,12$ имп $\cdot 10^6$ кл/мин ($p < 0,05$, см. табл.1). У больных с ЭЛ активность эластазы была ниже ($0,64 \pm 0,06$ нмоль $\cdot 10^6$ кл/мин), чем у больных без ЭЛ (см. табл.1), однако была также значительно выше ($p < 0,001$), чем у здоровых. Различия в содержании эластазы у больных ХОБ могут быть связаны с более высокой ферментативной активностью нейтрофилов на ранних этапах формирования ЭЛ. В дальнейшем при наличии очагов деструкции для поддержания патологического процесса становится достаточным гораздо меньшей выработки протеолитического фермента. Кроме того, у больных с ЭЛ с течением времени формируется недостаточность ингибиторов протеаз, особенно α_1 -антитрипсина [2], поэтому, несмотря на снижение выработки эластазы, она, по-видимому, продолжает доминировать над ингибиторами протеиназ.

При исследовании содержания эластазы не в клетке, а в супернатанте клеток ЖБАЛ, то есть при определении суммарной эластазы нейтрофилов, АМ и микроорганизмов, ее активность, как и следовало ожидать, наиболее высокой была у больных ХОБ с выраженной ЭЛ ($2,80 \pm 0,11$ нмоль $\cdot 10^6$ кл/мин в 1-й группе и $0,94 \pm 0,07$ нмоль $\cdot 10^6$ кл/мин у больных ХОБ 2-й группы, $p < 0,05$), что связано как с недостаточностью ингибиторов протеиназ [2], так и с большим

Таблица 2

Показатели фагоцитарной активности клеток ЖБАЛ в ремиссии заболевания

Показатель	Группы больных ХОБ		Здоровые n=12
	1-я группа n=19	2-я группа n=18	
Фагоцитарная активность АМ			
ФЧ, %	$47,5 \pm 4,3$	$42,4 \pm 4,5$	$50,3 \pm 3,5$
ФИ, усл. ед.	$4,7 \pm 0,35^{**}$	$3,7 \pm 0,3^*$	$5,4 \pm 0,5$
Фагоцитарная активность нейтрофилов			
ФЧ, %	$54,0 \pm 5,2$	$51,0 \pm 4,9$	—
ФИ, усл. ед.	$6,2 \pm 0,5^{**}$	$4,2 \pm 0,3^{**}$	—
Эластаза, нмоль $\cdot 10^6$ кл/мин	$0,32 \pm 0,04^{*,**}$	$0,49 \pm 0,05^{*,**}$	$0,05 \pm 0,004$
Коллагеназа, имп $\cdot 10^6$ кл/мин	$2,00 \pm 0,18^*$	$1,64 \pm 0,19$	$1,29 \pm 0,12$

вирусо- и бактерионосительством у этой группы пациентов.

В ремиссии воспалительного процесса в периферической крови больных ХОБ снижался фагоцитоз нейтрофилов: у лиц 1-й группы по фагоцитарному числу, а у больных 2-й группы как по фагоцитарному числу, так и по фагоцитарному индексу (табл.2). У больных ХОБ с рентгенологически выраженной ЭЛ, также как и при обострении заболевания, поглотительная способность моноцитов была выше, чем у здоровых и больных ХОБ без ЭЛ (см.табл.2).

В ЖБАЛ в ремиссии заболевания также уменьшалось общее содержание нейтрофилов и их активность, но число их превышало норму примерно в 5 раз в 1-й группе больных и в 9 раз у лиц 2-й группы. При этом у больных 1-й группы повышалась поглотительная способность АМ почти до нормы, оставаясь практически без изменений на низком уровне у лиц с ЭЛ (см.табл.2).

Восстановление фагоцитоза АМ у лиц 1-й группы можно объяснить значительным по сравнению с больными с выраженной ЭЛ снижением выявления вирусных и микробных антигенов в ремиссии заболевания, а следовательно, уменьшением их токсического воздействия на клетку и восстановлением способности АМ к поглощению частиц латекса.

Несмотря на отсутствие клинических проявлений болезни и снижение выявления вирусов и бактерий, активность эластазы была очень высокой ($0,32 \pm 0,04$ нмоль· 10^6 кл/мин без рентгенологически определяемой ЭЛ и $0,49 \pm 0,05$ нмоль· 10^6 кл/мин у больных с ЭЛ), причем ее повышенные значения регистрируются не только в клетках ЖБАЛ, но и непосредственно в супернатанте клеток ЖБАЛ, что свидетельствует о низкой ее утилизации и согласуется с клиническими представлениями о прогрессировании и необратимости обструктивных изменений в бронхах при ХОБ.

Таким образом, у больных ХОБ повышена ферментативная активность нейтрофилов и АМ в ЖБАЛ как в обострении воспалительного процесса, так и в ремиссии, что создает в легких условия для самоподдерживающего процесса. По-видимому, под влиянием антигенных воздействий в организме активируются АМ, которые вырабатывают хемотаксический фактор для нейтрофилов. Приток нейтрофилов в легкие, усиление их ферментативной активности приводят к разрушению поверхностного защитного слоя эластичных волокон, а затем деструкция последних осуществляется эластазой макрофагов [13]. Повышение ферментативной активности нейтрофилов и АМ необратимо приводит к развитию ЭЛ, так как установлено, что у больных ХОБ как в обострении, так и в ремиссии

заболевания падает содержание α_1 -антитрипсина в сыворотке крови [2]. В свою очередь, продукты распада коллагена стимулируют увеличение синтеза коллагена, при этом происходит изменение соотношения III/I его типов [10], что стимулирует активность коллагеназы. Данные о более высоком уровне эластазы и коллагеназы у больных с ХОБ по сравнению с результатами, полученными у больных со вторичной ЭЛ, свидетельствуют о том, что формирование ЭЛ начинается гораздо раньше проявлений клинических симптомов заболевания, и лечение больных ХОБ должно способствовать снижению ферментативной активности фагоцитов.

Выводы

1. В периферической крови больных хроническим обструктивным бронхитом с выраженной эмфиземой легких отмечалась повышенная поглотительная активность моноцитов, как в обострении, так и в ремиссии болезни, на фоне угнетения фагоцитоза альвеолярных макрофагов.
2. У больных хроническим обструктивным бронхитом повышена ферментативная активность нейтрофилов и альвеолярных макрофагов.
3. Наиболее выраженное усиление активности эластазы и коллагеназы наблюдается у больных хроническим обструктивным бронхитом, не имеющим клинических и рентгенологических признаков эмфиземы легких.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ермаков Е.В., Новожилов В.Т., Коломоец Н.М. и др. // Тер. арх.— 1986.— № 4.— С.102—105.
2. Дрожженников С.Ф., Лутошкин С.Ф., Резников Ю.П., Сильвестров В.П. // Клин. мед.— 1989.— № 5.— С.56—59.
3. Трубиных Г.В., Кижеватова О.К. // Тер. арх.— 1987.— № 3.— С.66—70.
4. Шмелев Е.И., Бумагин Т.К., Митерев Ю.Г. // Иммунология.— 1981.— № 3.— С.61—63.
5. Яковлева Н.В., Походзей И.В., Товт-Коршинская М.И. и др. // Тер. арх.— 1987.— № 7.— С.41—50.
6. Bercea O., Diaconescu C., Martinas O. // Pneumoftiziologia.— 1984.— Vol.33, № 4.— P.335—340.
7. Campbell R.W., Welgus H.S. // J. Clin. Invest.— 1982.— Vol.70.— P.806—822.
8. Cawston I.E., Nurphy G. // Meth. Enzymol.— 1981.— Vol.80.— P.711—722.
9. Yemsa D., Debatin K.M., Krama W. // J. Immunol.— 1983.— Vol.131, № 2.— P.833.
10. Lang M.R., Tiaux G.W., Gillooly M. et al. // Thorax.— 1994.— Vol.49.— P.319—326.
11. Lauryen C.L. // Ibid.— 1986.— Vol.41, № 6.— P.418—428.
12. Visser L., Blout E.K. // The Use of P-Nitrophenyl-N-Tertbutyloxycarbonyl L-Alanine as Substrate for Elastase.— New York, 1972.— P.919—923.
13. Wood-Ward S.C. // Hum. Pathol.— 1989.— Vol.20, № 7.— P.613—614.

Поступила 23.01.95