

Характеристика нейтрофилов и макрофагов индуцированной мокроты больных хронической обструктивной болезнью легких на фоне базисной терапии

Федосенко С.В., Черногорюк Г.Э., Кириллова Н.А., Фисенко А.Ю., Рослякова Е.П.

Characteristics of induced sputum neutrophils and macrophages in patients with chronic obstructive pulmonary disease on a basic therapy

Fedosenko S.V., Chernogoryuk G.E., Kirillova N.A., Fisenko A.Yu., Roslyakova Ye.P.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Федосенко С.В., Черногорюк Г.Э., Кириллова Н.А. и др.

Цель исследования — определить влияние тiotропия бромида на морфофункциональные свойства нейтрофилов и макрофагов бронхиального дерева при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). В результате применения тiotропиума в течение 3 мес существенно улучшены качественные характеристики ключевых эффекторных клеток. Выявленные изменения наблюдались во всех группах больных независимо от предшествующего режима лечения ХОБЛ.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, нейтрофилы, макрофаги, миелопероксидаза, катионный протеин.

Aim of the research — to define the tiotropium bromide influence on bronchial neutrophils and macrophages morphofunctional properties at stable of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The tiotropium using for 3 months has allowed to improve essentially qualitative characteristics of key effectors cells. The revealed changes were observed in all groups of patients irrespective of a previous mode of COPD treatment.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, neutrophils, macrophages, myeloperoxidase, cationic protein.

УДК 616.23-24-002.2-008.8:615.23:612.112.9

Введение

В сложной иерархии клеточных отношений при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) ключевым элементом является нейтрофил [2]. Зрелый нейтрофил выбрасывается в циркуляцию, где имеет короткий период жизни, на протяжении которого он либо привлекается в регион воспаления либо стареет и устраняется [4]. Известно, что у больных ХОБЛ размер нейтрофилов в индуцированной мокроте меньше, чем у здоровых лиц [8]. Процесс миграции связан с активацией нейтрофилов, проявляющейся мобилизацией азурофильных гранул и их экзоцитозом с выделением энзимного содержимого [13]. Это подтверждается обнаружением в супернатанте мокроты повы-

шенной концентрации миелопероксидазы (МПО) и катионных протеинов [1]. МПО — один из основных биомаркеров, отражающих активность нейтрофильного воспаления [3]. В целом содержание МПО в нейтрофилах индуцированной мокроты у пациентов с ХОБЛ выше, чем у здоровых некурящих добровольцев, что отражает высокий воспалительный потенциал фагоцитарной системы. Однако по мере прогрессирования болезни активность МПО в них снижается, одновременно с этим наблюдается увеличение внеклеточно расположенного фермента [14]. Обилие опустошенных мелких нейтрофилов, практически не содержащих миелопероксидазу и катионный протеин, — типичная картина в индуцированной мокроте при тяжелом (очень тяжелом) течении ХОБЛ. Последую-

шая судьба таких клеток — апоптоз или некроз. Апоптозные клетки редко обнаруживаются в здоровых легких человека [9]. Их количество возрастает при хронических воспалительных болезнях легких, в большей степени по причине уменьшения активности элиминации клеток (эффероцитоза) [12].

Основная активность по обеспечению эффероцитоза апоптозных нейтрофилов приходится на пул резидентных макрофагов легких.

При ХОБЛ эффероцитоз подвергшихся апоптозу нейтрофилов является дефектным [7]. В норме для резидентных макрофагов легких с ультраструктурными признаками выраженного фагоцитоза характерны наиболее крупные размеры и низкое ядерно-цитоплазматическое отношение. Однако именно этот пул фагоцитов страдает при ХОБЛ, несмотря на то что в целом количество макрофагов в индуцированной мокроте и лаважной жидкости у больных увеличивается. Клиническая группа «Воспалительные легочные болезни» под руководством М. Frankenberger идентифицировала особую популяцию макрофагов индуцированной мокроты больных ХОБЛ, обладающих меньшими размерами. У здоровых эта популяция малых макрофагов составляет только около 7% от всех макрофагов, в то время как у больных ХОБЛ она может повышаться до 90% во время острых эпизодов. В ответ на персистентное легочное воспаление на смену зрелым макрофагам приходят рекрутированные из периферической крови моноциты. Но их фагоцитарная активность оказывается значительно более низкой по сравнению с резидентными макрофагами [6]. Таким образом, процессы апоптоза нейтрофилов и своевременное удаление апоптозных клеток макрофагами определяют сохранность легочной структуры.

Известно, что тиотропия бромид (ТБ) воздействует на основные патофизиологические вентиляционные механизмы, развивающиеся при ХОБЛ: обладает длительным бронхорасширяющим действием, уменьшает гиперинфляцию. Вместе с тем есть все основания полагать, что постоянная терапия больных ХОБЛ тиотропия бромидом сопровождается уменьшением воспаления в бронхах. Предположение о наличии у М-холинолитика ТБ противовоспалительных свойств возникло в связи с получением результатов клинических плацебоконтролируемых исследований, в которых было показано, что применение этого препарата способствовало увеличению продолжительности пе-

риода до первого обострения, снижению выраженности симптомов обострений и частоты госпитализаций по поводу обострений [11]. Впоследствии эти данные были подтверждены результатами исследования UPLIFT [5, 15]. Механизмы противовоспалительного эффекта ТБ раскрыты не полностью.

Цель исследования — определить влияние тиотропия бромида на морфофункциональные свойства нейтрофилов и макрофагов бронхиального дерева при хронической обструктивной болезни легких.

Материал и методы

Проведено стратифицированное открытое контролируемое проспективное сравнительное исследование с курсом терапии тиотропия бромидом длительностью 3 мес в параллельных группах.

Методом случайной выборки в исследование были включены 78 пациентов обоего пола (15 женщин и 63 мужчины), страдающих стабильной ХОБЛ II—IV стадий. Из них 21 человек с ХОБЛ II стадии, ранее не получавший поддерживающей терапии (группа 1), 30 больных ХОБЛ III—IV стадий, также ранее не получавших поддерживающей терапии (группа 2), и 27 пациентов с III—IV стадиями ХОБЛ, применявших ранее фиксированную комбинацию флутиказона пропионат/салметерол (ФП/САЛ) на протяжении не менее 6 мес (группа 3). Пациентам всех групп назначался тиотропия бромид сроком на 3 мес в стандартной суточной дозе — 18 мкг ингаляционно 1 раз в сутки. Пациентам группы 3 ТБ был назначен в дополнение к комбинации ФП/САЛ.

У всех пациентов до и после курса лечения ТБ по стандартной методике проводился забор индуцированной мокроты для приготовления мазков. Окраска мазков на МПО осуществлялась бензидином по методу Грэхема—Кнолля. Для определения катионного протеина мазки окрашивались прочным зеленым по модифицированному методу В.Е. Пигаревского. Определение содержания цитоферментов, измерение размеров нейтрофилов и макрофагов, площади цитоплазмы и ядра в них проводилось методом компьютерной цитоморфометрии в программе Adobe Photoshop. В рамках цитохимического исследования нейтрофилов индуцированной мокроты содержание МПО и катионного протеина (КП) определялось дважды: до и после терапии ТБ. Содержание МПО и КП в клетке оценивались по результатам цитохими-

ческой реакции исследуемого вещества с реагентами в единицах оптической плотности — большому значению показателя соответствовала меньшая концентрация фермента.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ Statistica 6.0 for Windows (StatSoft, США). Для сравнения групп показателей использовались непараметрические методы (критерии Манна—Уитни и Вилкоксона). Пороговый уровень статистической значимости принимался при значении критерия $p < 0,05$.

Результаты

Результатом лечения тиотропия бромидом были морфологические изменения нейтрофилов бронхиального дерева. После 3-месячного лечения ТБ произошло увеличение средних размеров нейтрофилов индуцированной мокроты у больных ХОБЛ II стадии, ранее не получавших поддерживающей терапии, и в группе больных с III—IV стадиями ХОБЛ, которым ТБ был добавлен к ранее начатому лечению ФП/САЛ (табл. 1).

Возрастание средних размеров нейтрофилов произошло вследствие увеличения площади цитоплазмы. Различные условия терапии ТБ, такие как степень тяжести болезни, предшествующая терапия ФП/САЛ и по-

следующая сочетанная терапия ТБ с ФП/САЛ, не влияли на направленность изменений морфометрических показателей нейтрофилов: во всех группах в результате лечения ТБ произошло увеличение средних размеров цитоплазмы этих клеток и, соответственно, уменьшение ядерно-цитоплазматического соотношения.

После трехмесячного лечения тиотропия бромидом больных ХОБЛ наряду с морфометрическими изменениями нейтрофилов произошло увеличение содержания миелопероксидазы в цитоплазме этих клеток, о чем свидетельствует снижение показателей оптической плотности цитоплазмы после окрашивания цитохимическими реактивами на МПО. Подобные изменения наблюдались и в отношении катионного протеина — увеличилось внутриклеточное содержание катионных протеинов (табл. 2).

В результате лечения ТБ в индуцированной мокроте стал преобладать пул нейтрофилов с высокой внутриклеточной концентрацией МПО и катионных протеинов. В целом можно констатировать, что после проведенного лечения в бронхолегочном регионе сформировалась среда, свойства которой не инициируют экзоцитоз нейтрофильными лейкоцитами таких цитотоксических субстанций, как миелопероксидаза и катионные протеины.

Таблица 1

Морфометрические показатели нейтрофилов индуцированной мокроты в стабильный период ХОБЛ до и после лечения тиотропия бромидом в течение 3 мес ($M \pm m$)

Показатель		Группа			$p_{1-2,3; 2-3}$
		1 (21 человек)	2 (28 человек)	3 (22 человека)	
Площадь клетки, мкм^2	до терапии ТБ	$59,5 \pm 3,4$	$58,9 \pm 3,6$	$53,1 \pm 2,1$	$>0,05$
	после терапии ТБ	$68,2 \pm 3,6^*$	$61,6 \pm 3,0$	$64,6 \pm 2,4^*$	$>0,05$
Площадь цитоплазмы, мкм^2	до терапии ТБ	$29,9 \pm 2,0$	$29,3 \pm 1,9$	$25,2 \pm 1,7$	$>0,05$
	после терапии ТБ	$43,4 \pm 2,5^{**}$	$37,8 \pm 2,1^*$	$41,9 \pm 2,2^{**}$	$>0,05$
Площадь ядра, мкм^2	до терапии ТБ	$29,6 \pm 2,1$	$29,6 \pm 2,1$	$27,9 \pm 1,3$	$>0,05$
	после терапии ТБ	$24,7 \pm 1,9$	$24,3 \pm 1,8$	$23,1 \pm 1,3$	$>0,05$
Ядерно-цитоплазматический индекс	до терапии ТБ	$1,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$>0,05$
	после терапии ТБ	$0,6 \pm 0,1^*$	$0,7 \pm 0,1^*$	$0,6 \pm 0,1^*$	$>0,05$

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 статистически значимые различия морфометрических показателей до и после лечения пациентов тиотропия бромидом: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$.

Таблица 2

Содержание миелопероксидазы и катионного протеина в нейтрофилах индуцированной мокроты больных ХОБЛ до и после терапии тиотропия бромидом ($M \pm m$), ед. опт. плотности

Показатель		Группа			$p_{1-2,3; 2-3}$
		1 (21 человек)	2 (27 человек)	3 (27 человек)	
Миелопероксидаза	до терапии ТБ	$121,6 \pm 7,4$	$126,40 \pm 5,10$	$129,9 \pm 6,01$	$>0,05$
	после терапии ТБ	$92,3 \pm 5,6^{**}$	$94,23 \pm 6,90^{**}$	$84,7 \pm 6,7^{**}$	$>0,05$
Динамика активности миелопероксидазы		$-29,3 \pm 5,7$	$-30,80 \pm 7,20$	$-45,2 \pm 4,1$	$>0,05$

Катионный протеин	до терапии ТБ	82,6 ± 3,5	89,20 ± 2,70	86,3 ± 4,3	>0,05
	после терапии ТБ	61,2 ± 2,3**	71,20 ± 2,90*	65,7 ± 3,4**	>0,05
Динамика активности катионного протеина		-18,7 ± 1,7**	-17,90 ± 3,03*	-20,9 ± 4,1**	>0,05

Таблица 3

Морфометрические показатели макрофагов индуцированной мокроты в стабильный период ХОБЛ до и после лечения титропнием бромидом в течение 3 мес (M ± m)

Показатель		Группа			p _{1-2,3} ; p ₂₋₃
		1 (21 человек)	2 (28 человек)	3 (22 человек)	
Площадь клетки, мкм ²	до терапии ТБ	256,60 ± 27,80*	213,90 ± 13,00*	265,80 ± 17,30	p _{1-2,3} > 0,05; p ₂₋₃ = 0,03
	после терапии ТБ	339,50 ± 32,90**	283,90 ± 18,20**	338,40 ± 17,80*	p _{1-2,3} > 0,05; p ₂₋₃ = 0,026
Площадь цитоплазмы, мкм ²	до терапии ТБ	168,70 ± 24,30	131,10 ± 9,70**	166,60 ± 12,10	p _{1-2,3} > 0,05; p ₂₋₃ = 0,028
	после терапии ТБ	263,45 ± 29,90**	210,90 ± 13,90**	272,10 ± 13,60**	p _{1-2,3} > 0,05; p ₂₋₃ = 0,0029
Площадь ядра, мкм ²	до терапии ТБ	87,90 ± 6,04	82,80 ± 4,70	99,50 ± 6,20	p _{1-2,3} > 0,05; p ₂₋₃ = 0,015
	после терапии ТБ	75,45 ± 4,20	70,20 ± 4,10*	71,30 ± 3,40**	> 0,05
Ядерно-цитоплазматическое отношение	до терапии ТБ	0,62 ± 0,04	0,68 ± 0,04	0,65 ± 0,05	> 0,05
	после терапии ТБ	0,32 ± 0,02**	0,34 ± 0,02**	0,28 ± 0,01**	p _{1-2,3} > 0,05; p ₂₋₃ = 0,013

Ядерно-цитоплазматическое отношение является ключевым фактором, определяющим возможность и активность фагоцитоза бронхолегочными макрофагами. После курса лечения ТБ отмечено увеличение размера макрофагов в мокроте во всех группах пациентов ($p < 0,05$). Это объясняется прежде всего существенным увеличением площади их цитоплазмы во всех трех группах (табл. 3).

Исходно макрофаги индуцированной мокроты у всех пациентов не различались по значению ядерно-цитоплазматического отношения ($p > 0,05$). После лечения ТБ значение данного показателя уменьшилось во всех группах. Динамика ядерно-цитоплазматического отношения между группами в конце исследования статистически значимо не различалась ($p > 0,05$) (табл. 3).

Обсуждение

Применение ТБ в течение 3 мес позволило существенно изменить качественные характеристики ключевых эффекторных клеток.

Исчерпывая вследствие экзоцитоза свой ферментативный запас, нейтрофилы бронхиального дерева не только создают условия для воспалительного ответа в тканях, но и фактически теряют собственную функциональную активность. Увеличение содержания МПО и КП в цитоплазме нейтрофилов, а также объема цитоплазмы и размеров самих клеток может свидетельствовать о повышении функциональной активности и жизнеспособности нейтрофилов в связи с

уменьшением интенсивности экзоцитоза и преимущественным содержанием цитоферментов внутри клетки [16]. Эти процессы, происходящие на фоне оптимальной и длительной терапии ТБ, способствуют стабилизации состояния больного вследствие уменьшения деструктивного потенциала нейтрофилов и снижения интенсивности местного воспаления.

Полноценный дренаж вследствие адекватного расширения бронхов и нормализации качества и реологии мокроты позволяет улучшить санацию бронхиального дерева, следствием чего является снижение бактериальной нагрузки. В результате уменьшается активность нейтрофилов в легких, снижается интенсивность экзоцитоза биологически активных продуктов клетки, тем самым прерывается цепь деструктивных последствий персистирующего воспаления и, возможно, создаются условия для предотвращения дальнейшего прогрессирования болезни.

Следствием применения ТБ в течение 3 мес стало появление в бронхах популяции макрофагов большей величины. Данные изменения — важный фактор снижения активности воспаления в дыхательных путях. Снижение активности воспаления в бронхах, с одной стороны, уменьшает приток функционально не способных к эффективному фагоцитозу моноцитов, а с другой — создает условия для созревания и полноценной дифференцировки локального пула макрофагов, что обеспечивает заверченный эффероцитоз клеток (включая нейтрофилы) [10]. Ведь если макрофаги не способны удалять апоптозные нейтрофилы, последние

могут подвергаться вторичному (постапоптотическому) некрозу и высвободить большое количество нейтрофильных деструктивных протеиназ и оксидантов [17].

Важно отметить, что указанные качественные изменения в индуцированной мокроте на фоне лечения тиотропия бромидом наблюдались во всех группах пациентов с ХОБЛ II—IV стадий независимо от предшествующего лечения.

Заключение

Назначение тиотропия бромида в качестве длительной поддерживающей терапии при отсутствии противопоказаний патогенетически обоснованно для всех больных клинически значимой ХОБЛ, в том числе и для пациентов, получающих лечение фиксированной комбинацией флутиказона пропионата и салметерола.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007—2013 годы» (ГК № 16.512.11.2112 от 21.02.2011 г.).

Литература

1. Чучалин А.Г. Система оксиданты — антиоксиданты и пути медикаментозной коррекции // Пульмонология. 2004. № 4. С. 111—115.
2. Шмелев Е.И. Воспаление — ключевой элемент прогрессирования хронической обструктивной болезни легких // Consilium medicum. 2003. № 7 (4). С. 5—7.
3. Varczyk A. Decreased levels of MPO in induced sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease after treatment with oral glucocorticoids // Chest. 2005. 127. P. 407—415.
4. Barnes P.J. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: molecular and cellular mechanisms // Eur. Respir. J. 2003. 22. P. 672—688.
5. Decramer M., Celli B., Kesten S. et al. on behalf of the UPLIFT (Understanding Potential Long-term impacts on Function with Tiotropium) study investigators. Effect of tiotropium on outcomes in patients with moderate COPD (UPLIFT): a prespecified subgroup analysis of a randomized controlled trial // Lancet. 2009.
6. Frankenberger M., Betz R., Weber N. et al. Characterization of a population of small macrophages in induced sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy volunteers // Clinical & Experimental Immunology. 2004. 138 (3). P. 507—516.
7. Hodge S., Hodge G., Scicchitano R. et al. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells // Immunol. Cell. Biol. 2003. 8. P. 289—296.
8. Hogg J.C., Walker B.A. Polymorphonuclear leucocyte traffic in lung inflammation // Thorax. 1995. 50. P. 819—820.
9. Kasahara Y., Tuder R.M., Cool C.D. et al. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema // Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 2001. 163. P. 737—744.
10. Liu C.Y. Apoptotic neutrophils undergoing secondary necrosis induce human lung epithelial cell detachment // J. Biomed. Sci. 2003. 10. P. 746—756.
11. Niewoehner D.E., K. Rice, C. Cote et al. Prevention of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease with tiotropium, a once-daily inhaled anticholinergic bronchodilator: a randomized trial // Ann. Intern. Med. 2005. V. 143 (5). P. 317—326.
12. Odaka C., Mizuochi T., Yang J. et al. Murine macrophages produce secretory leukocyte protease inhibitor during clearance of apoptotic cells: implications for resolution of the inflammatory response // J. Immunol. 2003. 171. P. 1507—1514.
13. Owen C.A., Campbell M.A., Sannes P.L. et al. Cell-surface-bound elastase and cathepsin G in human neutrophils: a novel non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases // J. Cell. Biol. 1995. 131. P. 775—789.
14. Peleman R.A., Rytala P.H., Kips J.C. et al. The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease // Eur. Respir. J. 1999. 13. P. 839—843.
15. Tashkin D.P., Celli B., Senn S. et al. on behalf of the UPLIFT (Understanding Potential Long-term impacts on Function with Tiotropium) study investigators. A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease // N. Engl. J. Med. 2008. V. 359. P. 1543—1554.
16. Teder P., Vandivier R.W., Jiang D. et al. Resolution of lung inflammation by CD44 // Science. 2002. 296. P. 155—158.
17. Vandivier R.W., Henson P.M., Douglas I.S. Burying the dead. The impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease // Chest. 2006. 129. P. 1673—1682.

Поступила в редакцию 07.09.2011 г.

Утверждена к печати 26.09.2011 г.

Сведения об авторах

С.В. Федосенко — аспирант кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины СибГМУ (г. Томск).

Г.Э. Черногорюк — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины СибГМУ (г. Томск).

Экспериментальные и клинические исследования

Н.А. Кириллова — аспирант кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины СибГМУ (г. Томск).

А.Ю. Фисенко — аспирант кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины СибГМУ (г. Томск).

Е.П. Рослякова — канд. мед. наук, врач-цитолог (г. Томск).

Для корреспонденции

Федосенко Сергей Вячеславович, тел.: 8-923-415-00-05, 8 (3822) 56-06-38, e-mail: s-fedosenko@mail.ru