

# НЕЙТРОФИЛЫ И ДИСБАЛАНС ПРОТЕАЗЫ / АНТИПРОТЕАЗЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ БРОНХИОЛИТЕ У ДЕТЕЙ

Мурыгина Г.Л., Суркова Е.А., Бойцова Е.В., Сесь Т.П.,  
Богданова А.В., Платонова И.С.

Лаборатория молекулярной пульмонологии, Научно-исследовательский институт пульмонологии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

**Резюме.** Содержание нейтрофилов, активность эластазы и уровень  $\alpha_1$ -ингибитора протеиназ (основного ингибитора нейтрофильной эластазы) исследовали в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ) детей с хроническим бронхиолитом. У всех обследованных детей отмечен высокий уровень нейтрофилов в ЖБАЛ (30-80% от общего числа клеток). Эластазная активность выявлена у всех пациентов как при обострении заболевания, так и в период клинической ремиссии. У детей с тяжелым и среднетяжелым течением заболевания активность эластазы была значительно выше, чем у детей с легким течением болезни и у здоровых лиц, что коррелировало с частотой случаев выявления эмфиземы. Уровень  $\alpha_1$ -ингибитора протеиназ у детей с хроническим бронхиолитом был выше по сравнению с нормальными показателями преимущественно в период клинической ремиссии. Полученные результаты свидетельствуют о наличии дисбаланса в системе протеазы / антипротеазы у детей с хроническим бронхиолитом, особенно при тяжелом течении заболевания, что является важной характеристикой деструктивных процессов, протекающих в легочной ткани и одним из основных патогенетических звеньев развития хронического бронхиолита.

**Ключевые слова:** хронический бронхиолит, альфа-1-ингибитор протеиназ, активность эластазы, нейтрофилы.

Muryghina G.L., Surkova E.A., Boitsova E.V., Ses T.P., Bogdanova A.V., Platonova I.S.

## NEUTROPHILS AND PROTEASE / ANTIPROTEASE IMBALANCE IN CHILDREN WITH CHRONIC BRONCHIOLITIS

**Abstract.** The percentage of neutrophils, elastase activity and level of  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor (the main inhibitor of neutrophils elastase) were investigated in bronchoalveolar lavage (BALF) of children with severe, moderate and mild variants of chronic bronchiolitis. All children with chronic bronchiolitis had a high neutrophil count in BALF (30-80% of cell compound). The elastase activity was determined in BALF of all patients both in exacerbation and remission of the disease. In children with severe and moderate variants of the disease the elastase activity was higher than in children with mild variant of chronic bronchiolitis and healthy people, that correlated with the occurrence of emphysema. The level of  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor was higher in children with chronic bronchiolitis, especially in remission, when compared to normal parameters. We conclude that protease/antiprotease imbalance in BALF takes place in all children with chronic bronchiolitis, especially in children with severe disease course. This imbalance may be a main characteristic of destructive processes in lungs and may play a major role in pathogenesis of chronic bronchiolitis. (*Med.Immunol.*, 2002, vol.4, N 1, pp 81-85)

## Введение

В последние годы одним из приоритетных направлений в пульмонологии детского возраста является изучение хронических обструктивных заболеваний дыхательных путей, к которым относится хронический бронхиолит (с облитерацией).

### Адрес для переписки:

Мурыгина Галина Леонидовна, научный сотрудник  
лаборатории молекулярной пульмонологии НИИ  
пульмонологии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова,  
197089, ул. Рентгена, 12, Санкт-Петербург, Россия  
Тел.: (812) 24-19-24  
E-mail: galmur@mail.ru

Патогенез хронического бронхиолита (ХБ) неясен и малоизучен, внимание исследователей, в основном, сосредоточено на изучении клинической картины заболевания и уточнении критериев диагностики. Морфологической основой ХБ является пролиферация фиброзной ткани в стенке или просвете мелких бронхов и бронхиол, приводящая к необратимой обструкции периферических дыхательных путей, нарушению легочного кровотока и развитию эмфиземы. Подобные изменения с хроническим диффузным воспалением бронхов и локализацией максимального повреждения в мелких бронхах и бронхиолах, определяющим прогрессирующие нарушения вентиляции, выявляются при хронической

обструктивной болезни легких (ХОБЛ) у взрослых, что свидетельствует о сходстве этих состояний. Большое значение в патогенезе хронического воспаления при ХОБЛ придается повышению активности клеточных эффекторов деструкции легочной ткани – альвеолярных макрофагов и нейтрофилов в очаге воспаления и, как следствие, их протеолитической активности. Нейтрофилы играют критическую роль в развитии повреждения тканей и наиболее важным ферментом в механизме повреждения ткани, обусловленном действием нейтрофилов, является нейтрофильная эластаза [4]. Наряду с нейтрофильными протеиназой 3 и катепсином G этот фермент играет важную роль в разрушении ключевых компонентов тканевого матрикса, таких как эластин, коллаген III и IV типов, ламинин, фибронектин, протеогликаны, приводя, в конечном счете, к формированию эмфиземы легкого [7, 16].

Целью исследования было изучение содержания нейтрофилов, эластазной активности и  $\alpha_1$  – ингибитора протеиназ (alpha-1-proteinase inhibitor,  $\alpha_1$  – PI) в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ) у детей с ХБ в зависимости от фазы клинического течения и тяжести заболевания.

## Материалы и методы

Обследовано 57 больных (39 мальчиков и 18 девочек) с ХБ в возрасте от 7 до 15 лет (средний возраст  $10,8 \pm 0,4$  лет). Диагноз подтверждался данными компьютерной томографии легких (КТ) в случае выявления утолщения стенок и сужения просвета мелких бронхов, участков вздутия легочной ткани, эмфиземы и наличия симптома “воздушной ловушки”. Контрольную группу составили 10 здоровых волонтеров в возрасте 18 лет, которым было выполнено исследование ЖБАЛ. Все дети с ХБ в зависимости от течения заболевания были разделены на 3 группы. Первую группу (I,  $n=15$ ) составили больные, имеющие тяжелое течение ХБ, с резкими и значительными изменениями бронхиальной проходимости (ОФВ<sub>1</sub>, объем форсированного выдоха за 1 сек. по отношению к должному <61%), эмфизематозная перестройка легочной ткани по данным КТ была выявлена у 82% детей. Вторую группу (II,  $n=15$ ) – больные с среднетяжелым течением ХБ, имеющие умеренные и легкие нарушения бронхиальной проходимости (ОФВ<sub>1</sub> – 60–78%), эмфизема отмечалась у 67% больных. Третью группу (III,  $n=27$ ) – больные с легким течением болезни, имеющие нормальные показатели спирографии (ОФВ<sub>1</sub> >78%), эмфизема была обнаружена у 23% детей этой группы. Больные наблюдались в течение трех лет в периоды обострения заболевания и относительной клинической ремиссии.

Материалом для исследования служила жидкость бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ), взятая в динамике наблюдения с интервалом в 2–3 недели.

Полученную в процессе фибробронхоскопии ЖБАЛ центрифугировали 10 минут при 1500 об/мин (400g) при 4°C. Надосадочную жидкость разливали на аликвоты и хранили при –20°C для дальнейшего исследования.

Из осадка, полученного после центрифугирования ЖБАЛ, изготавливали мазки, которые фиксировали в смеси Никифорова, окрашивали по Романовскому-Гимзе и при иммерсионной микроскопии ( $\times 90$ ) подсчитывали 200 клеток. Соотношение клеточных элементов выражали в процентах.

Активность эластазы в жидкости бронхоальвеолярного лаважа определяли спектрофотометрическим методом [12] с использованием синтетического субстрата паранитрофенилового эфира N-бутил-L-аланил-L-аланил-L-аланина в ацетонитриле (BANPE, “Serva”, США). 3,1 мг субстрата растворяли в 1 мл ( $10^{-2}$  М р-р) ацетонитрила. К 2,5 мл 0,002 М Na-фосфатного буфера (рН 7,5) добавляли 50 мкл раствора субстрата и 100 мкл ЖБАЛ. Контролем служили пробы, в которых вместо исследуемых образцов использовали 0,002 М ФБР. Учет реакции производили немедленно на спектрофотометре “Spekol 220” (Германия) при длине волны 400 нм. Оптическую плотность учитывали трижды с интервалом в 1 минуту. Расчет активности эластазы производили исходя из соотношения прироста оптической плотности в исследуемых образцах за единицу времени (минута, секунда) и коэффициента молярной экстинкции  $8,800 \text{ L} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

Уровень  $\alpha_1$  – ингибитора протеиназ ( $\alpha_1$  – PI) в жидкости бронхоальвеолярного лаважа определяли методом ракетного иммуноэлектрофореза [1]. В качестве электродного буфера использовали веронал-медиановый буфер (рН 8,8). К 9,5 мл 2% раствора агарозы (“Sigma”, США) в электродном буфере при 56°C добавляли 0,5 мл поликлональных антител к  $\alpha_1$  – PI и этим раствором сразу заливали стекло размером 9×12 см. Исследуемые образцы ЖБАЛ исследовали без разведения. В качестве стандартного образца использовали стандартный белок  $\alpha_1$  – PI (IDP standart SEVAC, Чехия). Исследуемые и стандартные образцы в объеме 5 мкл вносили в лунки в агарозном геле при силе тока 10 мА. Длительность электрофореза составила 18 часов (сила тока 20 мА, напряжение 100 В). Затем стекла сушили под прессом при комнатной температуре и 3–5 минут при 56°C, затем окрашивали 0,1% раствором Кумасси R-250 в течение 10–15 минут, отмывали 10% уксусной кислотой. После измерения размеров пиков рассчитывали концентрацию  $\alpha_1$  – PI в исследуемых образцах по калибровочной кривой.

Статистическая обработка цифровых результатов осуществлялась на персональном компьютере IBM PC Pentium II с помощью прикладных программ “Statistica” (версия 5,5a) и “Биостатистика”. Достоверность различий оценивали по t – критерию Стьюдента и непараметрическому критерию Манна – Уитни.

Результаты и обсуждение

Цитологическое исследование ЖБАЛ детей с ХБ показало, что доминирующим типом клеток в группах с тяжелым, среднетяжелым и легким течением болезни были нейтрофилы, доля которых на протяжении всего периода исследования составляла от 30 до 80% от общего числа клеток, что превышало число нейтрофилов у здоровых лиц в 11-27 раз (рис.1). Следует отметить, что высокое содержание нейтрофилов в ЖБАЛ больных с ХБ выявлялось у 97% больных независимо от варианта течения и периода болезни. Столь выраженная миграция нейтрофилов в очаг воспаления может быть связана не только с действием различных хемотаксических факторов, синтезируемых макрофагами, эпителиальными клетками, фибробластами и другими клетками, но и способностью самих нейтрофилов продуцировать интерлейкин-8 (IL-8), лейкотриен В<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) и фактор активации тромбоцитов, которые способствуют дополнительному привлечению нейтрофилов в очаг воспаления и хронизации воспаления [15, 18]. Как правило, повышение числа нейтрофилов в очаге воспаления, в основном, связывают с бактериальной инфекцией, например, при хроническом бронхите и муковисцидозе у детей [2, 3]. Однако показана роль нейтрофилов в патогенезе обструктивных заболеваний легких у детей, в формировании которых, как известно, большое значение имеют респираторные вирусные инфекции [6]. Значительное повышение нейтрофилов в ЖБАЛ отмечалось у детей со свистящим дыханием, РС-вирусным бронхиолитом и бронхиальной астмой [5, 11]. Полученные нами данные о содержании нейтрофилов в ЖБАЛ детей с ХБ подтверждаются результатами других исследователей [8, 10].

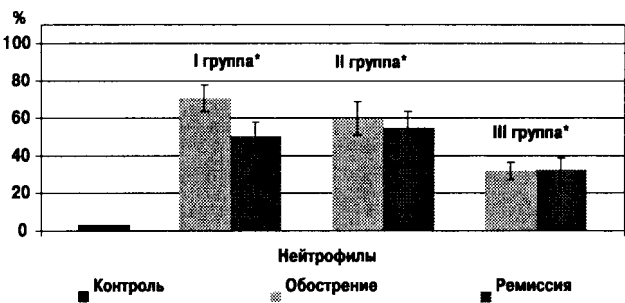


Рис. 1. Число нейтрофилов в ЖБАЛ детей с различным течением хронического бронхиолита: I\*, II\*, III\* – достоверность различий по сравнению с показателями здоровых лиц; \* р<0,001 достоверность различий по сравнению с периодом обострения; I,II-III р<0,001 достоверность различий в период обострения; I,II-III р<0,05 достоверность различий в период ремиссии

Показатели определения активности эластазы в ЖБАЛ больных с ХБ, а также ее основного ингибитора в легочной ткани α<sub>1</sub> – PI представлены в таблице 1. У здоровых лиц активность эластазы в ЖБАЛ в среднем составляет 0,09±0,02 нмоль/мл.сек. Как видно из таблицы, у больных с легким течением ХБ, среди которых лишь 23% детей, по данным КТ, имело эмфизематозную перестройку легочной ткани, в дистальных отделах респираторного тракта наблюдалось повышение эластазной активности по сравнению с контролем (р<0,05). По мере нарастания тяжести заболевания активность этого фермента повышалась и оставалась высокой как в период обострения заболевания, так и в период относительной клинической ремиссии. Причем у детей с тяжелым и среднетяжелым течением ХБ не наблюдалось различий в активности эластазы, что коррелировало с частотой случаев выявления эмфиземы у данных больных (82% и 63% соответственно).

Табл. 1. УРОВНИ α<sub>1</sub> – ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНАЗ И ЭЛАСТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ (M±m) В ЖБАЛ У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМ БРОНХИОЛИТОМ

| Фаза заболевания |                               | I группа<br>n=20 | II группа<br>n=18 | III группа<br>n=28 | Здоровые<br>n=10 |
|------------------|-------------------------------|------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| Обострение       | α <sub>1</sub> – PI<br>мкг/мл | 5,57±1,02 **     | 4,20±0,69 ***     | 2,66±0,66**        | 2,90±0,40        |
|                  | ЭА<br>нмоль/мл.мин            | 12,26±4,21 ***   | 9,03±2,51**       | 3,61±1,15*         |                  |
| Ремиссия         | α <sub>1</sub> – PI<br>мкг/мл | 9,24±1,10 ***    | 8,33±0,80***      | 5,80±0,81**        | 0,09±0,02        |
|                  | ЭА<br>нмоль/мл.мин            | 14,50±4,75 ***   | 10,28±1,91***     | 3,05±1,25*         |                  |

п – количество исследований  
\* р<0,05; \*\* р<0,005; \*\*\* р<0,001 достоверность различий по сравнению с показателями здоровых лиц;  
\* р<0,05; \*\*р<0,01; \*\*\* р<0,005 достоверность различий по сравнению с периодом ремиссии;  
ЭА (эластазная активность): I,II-III р<0,05 в периоды обострения и ремиссии;  
α<sub>1</sub> – PI: I,II-III р<0,05 в период ремиссии; I-III р<0,05 в период обострения

Табл.2. КОЭФФИЦИЕНТ СООТНОШЕНИЯ "АКТИВНОСТЬ ЭЛАСТАЗЫ /  $\alpha_1$  - PI" В ЖБАЛ ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМ БРОНХИОЛИТОМ

| Группы больных, период | I группа<br>n=20 | II группа<br>n=18 | III группа<br>n=28 | Контроль<br>n=10 |
|------------------------|------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| <b>Обострение</b>      | 2,2              | 2,2               | 1,4                | 0,03             |
| <b>Ремиссия</b>        | 1,6              | 1,2               | 0,5                |                  |

Уровни  $\alpha_1$  - PI в группах детей с легким и среднетяжелым течением ХБ были повышены по сравнению с показателями здоровых лиц ( $p < 0,005$ ) только в период относительной клинической ремиссии. У детей с тяжелым течением ХБ показатели  $\alpha_1$  - PI были повышены по сравнению с контролем на протяжении всего периода наблюдения, с достоверным возрастанием ( $p < 0,05$ ) в период относительной клинической ремиссии. При использовании коэффициента соотношения "активность эластазы /  $\alpha_1$  - PI", приведенного в таблице 2, было установлено, что в период обострения у больных с ХБ дисбаланс в системе протеазы / антипротеазы более выражен, чем в период относительной клинической ремиссии. Причем максимальный коэффициент был выявлен в группах с тяжелым и среднетяжелым течением ХБ, что свидетельствует о прямой связи между тяжестью заболевания, активностью воспалительного процесса и активностью эластазы, а, следовательно, и интенсивностью повреждения.

Выявление в ЖБАЛ эластазной активности при остром воспалительном процессе рассматривается и как результат адаптивной реакции на инфекцию, поскольку эластаза обладает антибактериальным эффектом, а также стимулирует бокаловидные клетки к продукции слизи, что способствует элиминации чужеродных патогенов [16]. Однако, при хроническом воспалительном процессе высвобождаемая нейтрофильная эластаза инактивируется протеиназами ингибиторами лишь частично и подвергается протеолитическому повреждению компоненты тканевого матрикса, а также эпителий респираторного тракта, способствуя метаплазии бокаловидных клеток, что, в свою очередь, приводит к восприимчивости бронхолегочного эпителия к вирусам и бактериям [9]. Эластаза стимулирует альвеолярные макрофаги к продукции  $LTB_4$ , который наряду с  $LTB_4$  и IL-8, синтезируемыми активированными нейтрофилами, привлекает дополнительно нейтрофилы в очаг воспаления. Таким образом, возникает порочный круг: нейтрофил – активация – эластаза – повреждение тканей – эластаза – макрофаг – нейтрофил, при котором происходит амплификация процессов деструкции легочной ткани [16], что приводит к формированию перибронхиального фиброза, как это показано у больных с ХОБЛ [13] и фиброзирующими процессами легких [17]. Помимо изучаемого нами  $\alpha_1$  - PI,

ингибиторами сериновых протеиназ также являются секреторный ингибитор лейкопротеиназ (SLPI) и специфический ингибитор эластазы (ESI), секретируемые эпителиальными клетками респираторного тракта, в том числе клетками Clara и альвеолярными клетками II типа. В условиях обширного повреждения эпителия в результате активного действия эластазы происходит подавление синтеза этих протеиназных ингибиторов, что способствует формированию эмфиземы легких [14]. Наряду с этим, в молекулярных механизмах патогенеза хронических обструктивных болезней легких ключевую роль играют активные формы кислорода, основными эндогенными источниками которых являются активированные нейтрофилы и альвеолярные макрофаги [3]. Показано, что многие компоненты перекисного окисления, например HOCl (гипохлорная кислота), помимо окислительного повреждения тканей инактивируют  $\alpha_1$  - PI посредством окисления молекулы  $\alpha_1$  - PI через взаимодействие с Met-358, что, при суммировании с другими факторами, также способствует локальному дефициту антипротеаз и неконтролируемому действию нейтрофильной эластазы [4].

Таким образом, характерной чертой воспалительного процесса при хроническом бронхите у детей является повышение протеолитической активности эластазы в результате значительного скопления нейтрофилов в дистальных отделах респираторного тракта и недостаточности протеиназных ингибиторов, что создает дисбаланс в системе протеазы / антипротеазы, и является не только важной характеристикой интенсивности деструктивных процессов, протекающих в легочной ткани у этих больных, но одним из патогенетических звеньев развития тяжелых форм хронического бронхита.

## Список литературы

1. Аксельсен Н., Крелль И., Вике Б. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. – М.: Мир, 1977. – С.1-120.
2. Armstrong D.S., Grimwood K., Carzino R., Carlin J.B., Olinsky A., Phelan P.D. Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis // Br. Med. J. – 1995. – Vol.310. – P.1571–1572.

3. Barnes P.J. Chronic Obstructive Pulmonary Disease // The New England Journal of Medicine. – 2000. – Vol.343. – P.269-280.
4. Dallergi F., Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation // Inflamm. Res. – 1997. – Vol.46. – P.382-391.
5. Everard M.L., Swarbrick A., Wright M., McIntyre J., Dunkley C., James P.D., Sewell H., Milner A.D. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection // Arch. Dis. Child. – 1994. – Vol.71. – P.428-432.
6. Hogg J.C. Childhood viral infection and pathogenesis of asthma and chronic obstructive lung disease // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 1999. – Vol.160. – P.26-28.
7. Janoff A. Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis // Am. Rev. Respir. Dis. – 1985. – Vol.132. – P.417-33.
8. Kindt G.C., Weiland J.E., Davis W.B., Gadek J.E., Dorinsky P.M. Bronchiolitis in adult. A reversible cause of airway obstruction associated with airway neutrophils and neutrophil products // Am. Rev. Respir. Dis. – 1989. – Vol.140, №2. – P.483-492.
9. Klotowski M.C., Bajolek-Laudinat O., Puchelle E. Cellular and molecular mechanisms of bacterial adhesion to respiratory mucosa // Eur. Respir. J. – 1993. – Vol.6. – P.903-916.
10. Lugo R.A., Nahata M.C. Pathogenesis and treatment of bronchiolitis // Clin. Pharm. – 1993. – Vol.12, N2. – P.95-116.
11. Marguet C., Jouen-Boedes F., Dean T.P., Warner J.O. Bronchoalveolar cell profiles in children with asthma, infantile wheeze, chronic cough, or cystic fibrosis // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 1999. – Vol.159. – P.1533-1540.
12. Meyer K.C., Lewandoski J.R., Zimmerman J.J., Nunley D., Calhoun W.J., Dopico G.A. Human neutrophil elastase and elastase /  $\alpha_1$  - antiprotease complex in cystic fibrosis // Am. Rev. Respir. Dis. – 1991. – Vol.144. – P.580-585.
13. Rennard S.I. Inflammation and repair processes in chronic obstructive pulmonary disease // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 1999. – Vol.160. – P.S12-S16.
14. Sallenave J.M., Shulmann J., Crossley J., Jordana M., Gauldie J.K. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase specific inhibitor (ESI-elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 1994. – Vol.11. – P.733-741.
15. Scapini P., Lapinet-Vera J.A., Gasperini S., Calzetti F., Bazzoni F., Cassatella M.A. The neutrophil as a cellular source of chemokines // Immunol. Rev. – 2000. – Vol.177. – P.195-203.
16. Stockley R.A. Neutrophil and protease / antiprotease imbalance // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 1999. – Vol. 160. – P.S49-S52.
17. Yamanouchi H., Fujita J., Hojo S., Yoshinouchi T., Kamei T., Yamadori I., Ohtsuki Y., Ueda N., Takahara J. Neutrophil elastase:  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor complex in serum and bronchoalveolar lavage fluid in patients with pulmonary fibrosis // Eur. Respir. J. – 1998. – Vol.11. – P.120-125.
18. Zimmerman G.A., Prescott S.M., McIntyre T.M. Platelet-activating factor. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, editors. Inflammation: basic principles and clinical correlates. New York: Raven Press. – 1992. – P.149-176.

поступила в редакцию 21.09.2001

отправлена на доработку 21.10.2001

принята к печати 25.10.2001