

УДК 616.24-002.2-07:612.112.3

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ФАГОЦИТАРНОГО ЗВЕНА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

Э.Э. Поплавская¹, аспирант; М.А. Лис¹, д.м.н., профессор; Н.Е. Торяник²;
Р.А. Анисим²

1 - УО «Гродненский государственный медицинский университет»

2 - УОЗ «Гродненская областная клиническая больница»

С целью определения наиболее простых и информативных способов оценки фагоцитарной функции нейтрофилов у больных хронической обструктивной болезнью легких в статье представлены основные методы, используемые для изучения фагоцитоза, описаны их преимущества и недостатки.

Ключевые слова: методы оценки фагоцитоза, хроническая обструктивная болезнь легких.

The aim of this review was to determine less complex and more informative assessment methods of phagocytic function of neutrophils in patients with chronic obstructive pulmonary disease. The basic methods which are used to study phagocytosis are presented and their advantages and drawbacks are described.

Key words: phagocytosis assessment methods, chronic obstructive pulmonary disease.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является одним из самых распространенных заболеваний в современном мире. Так, согласно данным ВОЗ, частота встречаемости ее среди мужчин составляет 9,34:1000, среди женщин – 7,33:1000.

В последние годы большой интерес представляют сведения о роли иммунной системы в развитии многих патологических процессов, в том числе локализующихся в легочной ткани человека. Поэтому актуальной является проблема разработки подходов к объективной оценке иммунного статуса здорового и больного человека [2].

В основе патогенеза ХОБЛ лежит ряд иммунологических нарушений, в том числе фагоцитарной активности нейтрофилов и альвеолярных макрофагов [11]. Наиболее значимая роль в определении иммунного статуса при данной патологии отводится нейтрофилам. С одной стороны, эти клетки обеспечивают неспецифический иммунный ответ и способствуют элиминации чужеродных антигенов путем фагоцитоза с дальнейшим саморазрушением [1,5]. С другой стороны, при завершеном фагоцитозе происходит массивный выброс ферментов, в том числе эластазы и коллагеназы, активных форм кислорода, которые обладают разрушающим воздействием на легочную ткань и способствующих формированию эмфиземы легких, особенно при недостаточной активности системы антиоксидантов и антипротеаз [2].

Установлено, что при ХОБЛ приток нейтрофилов в легкие повышен [4, 13]. Некоторые авторы указывают на более высокую их фагоцитарную активность при ремиссии ХОБЛ и снижение – при обострении. В большинстве случаев развивается так называемая «дисфункция фагоцитоза», которая проявляется снижением числа нейтрофилов и макрофагов, участвующих в фагоцитозе, уменьшением их поглотительной способности и метаболической активности [3, 10, 12]. Определенное значение имеет угнетающее воздействие на них гнойного воспаления, что обусловлено наличием феномена антигенспецифичной депрессии фагоцитов, т.е. способности бактерий и продуктов их жизнедеятельности подавлять активность фагоцитов. Наибольшая депрессия наблюдается в случаях, когда этиологическим фактором воспаления являются стрептококки, синегнойная палочка, ассоциация бактерий, что чаще всего и наблюдается при ХОБЛ [2, 10].

Учитывая, что в бронхиальном дереве больных ХОБЛ находятся преимущественно именно нейтрофилы, как

при обострении, так и при ремиссии заболевания, от их нормального функционирования зависит течение обострения и частота рецидивов заболевания [3]. Однако в доступной нам литературе мы не нашли публикаций, посвященных полному изучению фагоцитоза и различных его этапов у больных ХОБЛ. В большинстве случаев авторы исследуют только какую-либо его сторону (например, НСТ-тест). Существуют разные методы оценки фагоцитарного звена иммунной системы. В повседневной практике чаще всего используются наиболее простые, доступные методы, но недостаточно информативные для оценки фагоцитарной функции у больных ХОБЛ. Материалом для иммунологических исследований чаще всего служат сыворотка и клетки периферической крови больного. Но в случаях инфекционно-воспалительных и аллергических заболеваний бронхолегочной системы оценка иммунного статуса, основанная только на определении параметров крови, дает лишь косвенную информацию о течении процесса, тогда как этиопатогенетически более значимые изменения выявляются при изучении лаважной жидкости [1].

Бронхоальвеолярный лаваж заключается в катетеризации субсегментарного бронха, которая осуществляется при проведении диагностической бронхоскопии с использованием для лаважа стерильного изотонического раствора хлорида натрия в объеме 100-300 мл. Получаемые промывные воды подвергаются цитологическому, биохимическому, бактериологическому и иммунологическому исследованию [2].

Для ступенчатой, более глубокой оценки иммунного статуса в целом некоторые авторы рекомендуют 3-уровневый иммунологический контроль, но при условии возможностей лечебного учреждения [4]: 1 уровень – сокращенный иммунологический скрининг: определение абсолютного числа лимфоцитов крови, лейкоцитарного индекса интоксикации, реакции торможения миграции лимфоцитов, циркулирующих иммунных комплексов, титра изогемагглютининов, стандартной протеинограммы; 2 уровень – расширенный иммунологический скрининг: к вышеизложенным тестам добавляют определение содержания Т- и В- лимфоцитов крови, иммуноглобулинов, активности комплемента, содержания лизоцима плазмы крови, изучение функциональной активности лейкоцитов по уровню катионных белков и тесту с нитросиним тетразолам, способности полиморфноядер-

ных нейтрофилов к фагоцитозу (фагоцитарный индекс и число); 3 уровень – полный иммунологический контроль: к тестам 1 и 2 уровней добавляют определение отдельных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, количества и функциональной активности макрофагов крови.

В настоящее время обоснован и получил более широкое клиническое распространение двухэтапный принцип оценки иммунного статуса человека [9]. При этом на первом уровне оцениваются грубые дефекты иммунитета, а на 2-м – осуществляется более детальный подход к изучению выявленных нарушений [2]. К тестам 1-го уровня относят определение абсолютного и относительного числа нейтрофилов и моноцитов, интенсивности поглощения микробов нейтрофилами и моноцитами и способности фагоцитов убивать микробы. К тестам 2-го уровня относят исследование интенсивности хемотаксиса фагоцитов, определение экспрессии специфических рецепторов (CD- антигенов, Fc- рецепторов, молекул адгезии и др.). Тесты первого уровня, как правило, доступны, не трудоемки, не требуют большого количества дефицитных реактивов. Их постановка возможна в условиях лаборатории любой многопрофильной или специализированной больницы. Информативность достаточно высокая. Важно и то, что окончательный ответ дается быстро, в течение 1-2 суток. Но тесты 1-уровня позволяют выявить только достаточно грубые нарушения в иммунной системе и поэтому могут быть рекомендованы в качестве скринингового этапа в иммунодиагностике [2].

Существуют и другие рекомендации по иммунодиагностике, но главным принципом, положенным в основу каждого подхода, является ступенчатость и начало от более простых и менее информативных методов до более сложных и специфичных. Единого подхода к последовательности диагностики иммунных нарушений не разработано. Поэтому большинство авторов соглашались, что в качестве первоочередного исследования необходимо определить в крови количество лейкоцитов и соотношение их видов (нейтрофилы, моноциты, лимфоциты), а в лаважной жидкости широкое применение получил метод подсчета общего количества клеток и процентного содержания в ней альвеолярных макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов, лимфоцитов, жизнеспособности макрофагов [1, 5].

Фагоцитоз, как известно, – это биологически сложный процесс, состоящий из последовательно сменяющихся друг-друга стадий (хемотаксис, адгезия, поглощение, дегрануляция, киллинг и разрушение микроорганизма). Для оценки каждого этапа существуют свои методы.

При любой инфекции или воспалении возникает необходимость в гиперпродукции фагоцитирующих клеток, которые усиленно рекрутируются из кровяного русла в очаг. Такую компенсаторную гиперфункцию обеспечивают провоспалительные цитокины [8]. Исходя из этого, определяют их уровень, причем выявление, например, фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α) в периферической крови, скорее, говорит об общей активности воспалительного процесса, а его уровень в лаважной жидкости – об активности течения именно бронхолегочной патологии, так как в крови ФНО- α может быть повышен и при различных других патологиях.

Для более глубокого понимания патогенеза ХОБЛ важна оценка хемотаксиса (миграции нейтрофилов), так как при этом заболевании постоянно присутствуют хемоаттрактанты, привлекающие нейтрофилы в легочную ткань. Изучение миграции лейкоцитов может осуществляться при помощи камеры Бойдена и обычно снижает-

ся при приеме стероидов. Некоторые авторы указывают на снижение спонтанной миграции нейтрофилов, что ведет к накоплению фагоцитирующих клеток в очаге воспаления [8]. Кроме того, методы оценки миграции, основанные на феномене подавления миграции лейкоцитов, могут быть нацелены на определение активных лимфоцитов [7]. Одним из недостатков методов изучения миграции нейтрофилов является трудоемкость и длительность проведения теста. Так, например, при использовании в качестве хемотаксического агента *E. Coli* необходимо выращивать ее в течение 24 часов при определенных условиях, а время инкубации при измерении хемотаксиса в камерах или капиллярах может варьировать от 1 часа до 4-6. К тому же, эти методы являются скорее тестами 2-го уровня, и применяются при углубленном исследовании [7].

Некоторыми авторами выносятся в качестве исследований, необходимых при первичном обследовании, изучение рецепторного аппарата [7]. Наиболее значимыми являются рецепторы для Fc-фрагмента иммуноглобулина, комплемента, фактора, подавляющего миграцию, и для эритроцитов барана и мыши. Для этого используются методы иммунофлюоресценции для выявления иммуноглобулинов и различные тесты розеткообразования. Но тесты розеткообразования в настоящее время хотя и пользуются некоторой популярностью в связи с менее дорогими реагентами и оборудованием, в современных лабораториях уступили место методам моноклональных антител, проточной цитометрии. Они основаны на изучении экспрессии различных антигенов на поверхности клеток (CD11, CD18, HLA-DR и др.) и позволяют выявить дефекты рецепторного аппарата и зачастую объясняют многие процессы, связанные с миграцией, активацией, адгезией нейтрофилов. Так, при наличии большого количества чужеродных антигенов, логично предположить высокую фагоцитарную активность нейтрофилов, однако при отсутствии на поверхности клеток специфических рецепторов не произойдет их взаимодействие и, следовательно, активация.

Несмотря на высокую специфичность и информативность этой методики, основным ее недостатком является дороговизна как реактивов, необходимых для исследования, так и оборудования, что резко ограничивает применение данного метода в повседневной практике.

Учитывая, что главным показателем функционального состояния фагоцитоза является способность фагоцитов поглощать и убивать микробы [3], наиболее широкое распространение получила оценка фагоцитарной активности нейтрофилов, основанная на определении процента нейтрофилов, способных к фагоцитозу (ФИ) и среднего числа поглощенных частиц одним нейтрофилом (ФЧ). В качестве частиц, поглощаемых фагоцитами, используют латекс, крахмал, а также различные бактериальные культуры, например, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* [8]. Кроме того, этот метод достаточно прост в выполнении, информативен и не требует существенных материальных затрат. К тому же при ХОБЛ, учитывая повышенное содержание нейтрофилов в легких, возможно определение ФИ, ФЧ и в лаважной жидкости, что способствует выявлению дефектов фагоцитоза, а при необходимости – коррекции данного состояния. Правда, изучение ФИ и ФЧ макрофагов не всегда возможно, особенно в лаважной жидкости, так как их количество сравнительно мало. В этих случаях применяется метод определения их жизнеспособности по наличию макрофагов, не воспринявших окраску трипанового синего. К тому же при сравнительной оценке фагоцитарной активности

нейтрофилов, макрофагов и дендритных клеток – максимальной киллерной способностью обладают нейтрофилы [7].

Киллинг и разрушение микроорганизмов оценивают при использовании методов, позволяющих изучить как кислородзависимый, так и кислороднезависимый путь. Для этого применяют метод хемолуминесценции, оценки метаболической активности по окраске нитросиним тетразолием (НСТ- тест), цитохимические методы оценки ферментативной активности (определение миелопероксидазы, щелочной фосфатазы и др.). Принцип нитросинего тетразолиевого теста заключается в поглощении из среды фагоцитирующими клетками бесцветного нитросинего тетразолия и восстановлении его в темно-синий диформаза. Активность восстановления НСТ отражает состояние бактерицидных пероксидазных систем клетки и коррелирует с образованием супероксидных радикалов [10]. Однако этот метод требует наличия определенного количества клеток, что затрудняет проведение их в лаважной жидкости, например для НСТ- теста необходима концентрация нейтрофилов не менее $4\text{-}5 \cdot 10^6/\text{мл}$ [8].

Для оценки завершенности фагоцитоза также проводят тест, при котором в исследуемую среду вносят раствор антибиотиков, а затем в течение 3-х часов берут 4 пробы (0, 1, 2, 3 часа) и засевают на кровяной агар. Результаты оценивают по росту колоний микробов лишь на следующий день [5]. Этот метод трудоемкий, требует соблюдения определенных условий, достаточного количества клеток (для исследования в лаважной жидкости).

После определения основных показателей фагоцитарной активности иногда вычисляют интегральный фагоцитарный индекс (ИФИ) как $(\text{ФИ} \times \text{ФЧ})/100$ [8]. Есть и другие методы определения фагоцитарной активности, в частности, используют микробы, меченые изотопами [7].

Итак, фагоцитоз, в котором участвуют как нейтрофилы, так и моноциты, в меньшей степени эозинофилы, включает в себя ряд последовательных этапов, а для диагностики и полной его характеристики существует множество тестов. При ХОБЛ основная роль отводится нейтрофилам. Изучение их фагоцитарной активности рекомендуется проводить не только в периферической крови, но и в лаважной жидкости. Однако следует учитывать, что полноценная оценка фагоцитоза в лаважной жидкости четко зависит от объема получаемой жидкости и абсолютного числа нейтрофилов в ней.

В широкой практике здравоохранения в лаважной жидкости больных ХОБЛ необходимо в первую очередь определять общее количество клеток и соотношение в них нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов и эозино-

филов. Переходить к следующим методам исследования следует с учетом диагностических возможностей клиники. Поэтому наиболее простыми и достаточно информативными методами являются: определение функциональной способности нейтрофилов к фагоцитозу (ФИ, ФЧ, ИФИ), НСТ-тест [8]. Для определения фагоцитарной активности в качестве тестов, позволяющих судить о более грубых дефектах фагоцитарного звена, большинство исследователей используют определение фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа [8], дополняя их другими вышеуказанными методами в зависимости от поставленной задачи.

Литература

1. Змушко, Е.И. Клиническая иммунология : руководство для врачей // Е.И. Змушко, Е.С. Белозеров, Ю.А. Митин. – СПб: Питер, 2001. – 576 с.
2. Иммунокоррекция в пульмонологии / Под ред. А.Г. Чучалина. – М.: Медицина, 1989 – 256 с.
3. Кокосов, А.Н. Хронический бронхит и обструктивная болезнь легких / А.Н.Кокосов. – СПб.:Издательство «Лань», 2002. – 288 с.
4. Колобов, С.В. Основы регионарной иммунотерапии (иммуномодулирующая терапия заболеваний дыхания и пищеварения). / С.В. Колобов, И.В. Ярема, О.В. Затеишиков. – М., «ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ», 2001. – 182 с.
5. Новиков Д.К. Клиническая иммунология : учебное пособие //Д.К. Новиков, П.Д. Новиков. – Витебск: ВГМУ, 2006 – 392с.
6. Новиков Д.К., Оценка иммунного статуса // Д.К. Новиков, В.И. Новикова. – М., 1996. – 244 с.
7. Олиферук, Н.С. Оценка фагоцитарной и бактерицидной активности нейтрофилов, макрофагов и незрелых дендритных клеток. / Н.С. Олиферук, А.Н. Ильинская, Б.В. Пинегин // Иммунология – 2005 – Т26 – №1 – С. 10–12.
8. Основы клинической иммунологии и методологические подходы к оценке иммунного статуса: Практикум / А.Г. Гончаров; И.С. Фрейдлин; В.С. Смирнов и др.; Под общей редакцией М.Г. Романцова / Калинингр. ун-т. – Калининград, 1997. – 73 с.
9. Петров, Р.В. Иммунология / Р.В. Петров. – М.: Медицина., 1987. – 415 с.
10. Сунгоркина, Е.П. Характеристика иммунных дисфункций на системном и местном уровнях у больных хроническим бронхитом / Е.П. Сунгоркина. // Здравоохранение Чувашии. – 2006. – №2. – С. 9–12.
11. Черняев, А.Л. Хронический обструктивный бронхит /А.Л. Черняев, М.В. Самсонова // Хронические обструктивные болезни легких./ А.Г.Чучалин. – Москва, 2000. – Гл.23. – С.259–267.
12. Чучалин, А.Г. Хронические обструктивные болезни легких / А.Г. Чучалин. – Москва, 2000. – Гл.1. – С. 11–26.
13. Шмелев, Е.И. Патогенез воспаления при хронических обструктивных болезнях легких / Е.И. Шмелев // Хронические обструктивные болезни легких./ А.Г.Чучалин. – Москва, 2000. – Гл.6. – С. 82–92.

Поступила 08.09.2010