

УДК 616.24-002.5-003.2:616.24-002.54:612.014.1

©Коллектив авторов

## **АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТИРУЮЩИХ КЛЕТОК БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ИНФИЛЬТРАТИВНОМ И ФИБРОЗНОКАВЕРНОЗНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ**

*М.Е. Дьякова, О.Т. Титаренко, Д.С. Эсмедляева, А.В. Елькин,  
Н.П. Алексеева, Т.Л. Перова*

ФГУ “Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Росздрава”  
194064 г.Санкт-Петербург, ул.Политехническая, 32; тел.: (812)297-86-03;  
факс: (812) 297-16-26; эл. почта: spbniif\_all@mail.ru

У 33 больных с фиброзно-кавернозным и 16 - с инфильтративным туберкулезом лёгких (ФКТ и ИТЛ соответственно) оценивали функциональную активность фагоцитирующих клеток в бронхоальвеолярной жидкости (БАЛЖ). Результаты комплексного исследования БАЛЖ, альвеолярных макрофагов (АМ) и нейтрофилов ее клеточного осадка указывают на зависимость функционального состояния этих клеток от формы туберкулеза легких. Судя по более высокому содержанию в БАЛЖ неоптерина и эластазы, выделяемых преимущественно активированными АМ и нейтрофилами соответственно, ФКТ свойственна, по сравнению с ИТЛ, более высокая секреторная активность обоих типов фагоцитирующих клеток. При ФКТ это сочетается и с более выраженной бактерицидной активностью нейтрофилов, которая значимо коррелировала с активностью в них аденозиндезаминазы (АДА).

Сопоставление особенностей изменений в БАЛЖ изучавшихся биохимических показателей (неоптерина, эластазы, АДА и её изоферментов, 2-дезоксидАДА) и бактерицидной активности клеток осадка отражает различные стороны функционирования фагоцитирующих клеток БАЛЖ, что позволяет, с учетом современных представлений о механизмах их регуляции, предполагать существование различий в межклеточных взаимоотношениях при разных формах туберкулеза лёгких.

**Ключевые** слова: туберкулез, неоптерин, аденозиндезаминаза, НСТ-тест, нейтрофилы, макрофаги.

**ВВЕДЕНИЕ.** Согласно современным представлениям, адекватность оценки активности, клинических проявлений, характера эволюции, эффективности терапии и исходов туберкулезного процесса в значительной степени зависит от полноты исследования состояния системы защитных клеточных реакций в очаге поражения и в организме в целом [1]. Центральная роль в ней отводится мононуклеарам и нейтрофилам, их функциональному состоянию, в котором выделяют фазы мобилизации, реализации активности и последующего истощения [2]. Гетерогенность популяций клеточных элементов, различающихся по фагоцитирующим, бактерицидным и секреторным свойствам, динамичность их функционального состояния, определяющие степень и характер клеточного ответа на различного рода стимуляцию как экзогенную, так и эндогенную, диктует необходимость их комплексного изучения. Это убедительно подтверждается результатами экспериментальных исследований, согласно которым функциональное состояние клеточных элементов, соотношение и выраженность

---

\* - адресат для переписки

их различных функций зависят от фазы туберкулёзного процесса и сопряжено в конечном итоге с результативностью специфического лечения [3].

В свете сказанного, в современной фтизиатрии большое значение придается выбору оптимальных маркеров функционального состояния клеток крови и жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛЖ). В этом плане в последние годы обращается внимание на целесообразность определения в биологических жидкостях неоптерина – производного гуанозинтрифосфата, продукта секреции активированных моноцитов/макрофагов, содержание которого рассматривается в качестве критерия активности воспалительного процесса и косвенного показателя выраженности оксидативного стресса (кислородного взрыва), свойственного активации процесса перекисного окисления липидов [4-6]. С этим явлением связывается и активация пуринового катаболизма, одним из ключевых ферментов которого является фермент аденозиндезаминаза (АДА). Характер пуринового обмена определяет функциональное состояние фагоцитов [7]. Уровень эластазы сыворотки крови, используемый во фтизиатрии в качестве одного из критериев активности процесса, определяется степенью дегрануляционной активности нейтрофилов [8].

Изучение АДА и ее изоферментов в клинической и экспериментальной фтизиатрии привело в последние годы к использованию показателей их активности в качестве маркера выраженности специфического воспалительного процесса в лёгких, степени притока в зону воспаления фагоцитующих клеток, индуцирующих протеолиз и разрушение структур легочной ткани.

Цель настоящего исследования – комплексное изучение зависимости функциональной активности фагоцитирующих клеток БАЛЖ от формы туберкулёзного процесса в легких.

**МЕТОДИКА.** Обследовано 49 больных: 33 с фиброзно-кавернозным (ФКТ) в возрасте  $34,4 \pm 1,21$  лет и 16 с инфильтративным туберкулезом легких (ИТЛ) в возрасте  $37,6 \pm 3,05$  лет. Диагноз ставился на основании принятых клинко-рентгенологических и бактериологических критериев. Микобактерии туберкулеза обнаружены у 100% больных ФКТ и у 46,7% - ИТЛ. При этом обильное выделение микобактерий выявлено соответственно в 89,0% и 27,8% случаев, полисегментарное поражение легочной ткани имело место у 74,1% больных ФКТ и 18,1% больных ИТЛ.

Исследованию подвергались БАЛЖ, ее нефракционированный клеточный осадок и выделенные из него нейтрофилы и альвеолярные макрофаги (АМ). Бронхоальвеолярный лаваж получали по методике Филиппова [9]. С учетом задач работы для исследования использовали образцы БАЛЖ из пораженного сегмента легкого. Клеточный осадок получали путем центрифугирования при 1300 g в течение 10 минут, после чего делили его на две части. В одной определяли процентное содержание нейтрофилов и макрофагов, из второй после ее повторного центрифугирования в градиенте плотности выделяли указанные клетки для биохимических исследований. Нейтрофильный и макрофагальный варианты БАЛЖ, определявшиеся по преобладанию (>50%) соответствующего типа клеток, исследовали отдельно.

Для оценки функциональной активности клеток в БАЛЖ определяли содержание неоптерина, эластазы и активности АДА и ее изоферментов (АДА-1 и АДА-2) и 2-дезоксидАДА, в клетках осадка – НСТ-тест, активность АДА и её изоферментов и 2-дезоксидАДА. При анализе результатов биохимических исследований в БАЛЖ полученные данные стандартизировали пересчетом на 1 мг ОБ. Для исследования неоптерина использовали иммуноферментный набор “MP Biomedicals Germany GmbH” (чувствительность метода выше 1,2 нмоль/л). Эластазоподобную активность определяли методом Visser и Blout в модификации Оглоблиной О.Г. [10, 11]. Активность АДА и 2-дезоксидАДА в БАЛЖ и в лизатах клеток, получаемых путем повторного замораживания и оттаивания, определяли методом Giusti [12]. По результатам одновременного исследования рассчитывали

активность изоферментов АДА-1 и АДА-2. Бактерицидную активность оценивали по результатам НСТ-теста, включающего спонтанный исходный показатель (НСТ<sub>сп</sub>), характеризующий базальный уровень  $O_2^-$  зависимого метаболизма фагоцитов, сопоставляемый с уровнем, индуцированным зимозаном (НСТ<sub>ст</sub>). По их соотношению, т.н. индексу стимуляции (Индекс Ст/Сп), судили о функциональном резерве клеток [13].

Статистическую обработку данных, представленных в виде средней±ошибка средней проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Оценку достоверности различий величин показателей проводили с использованием непараметрического U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Проверку значимости результатов корреляционного анализа проводили по критерию Фишера.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Как следует из таблицы 1, суммирующей результаты исследования БАЛЖ, больные сопоставляемых групп различались по содержанию неоптерина: при ФКТ оно в среднем было в 4,5 раза выше, чем у больных ИТЛ. Это согласуется с представлением о прямой зависимости уровня неоптерина в БАЛЖ от тяжести специфического процесса в лёгких – степени деструктивных изменений в них, а также с тем, что величина ФНО- $\alpha$  в БАЛЖ, стимулирующего выработку макрофагального неоптерина, зависит от распространенности процесса [14, 15]. Таким образом, с учётом происхождения неоптерина (секрет активированных моноцитов/макрофагов) и его физиологического значения, полученные данные отражают различную степень иммунного ответа макрофагального звена при рассматриваемых формах туберкулеза лёгких.

Таблица 1. Биохимические характеристики бронхоальвеолярной жидкости в зависимости от формы туберкулёза.

Показатели	Группы больных	
	ФКТ	ИТЛ
Неоптерин, нмоль/г	26,8±3,4*	5,8±0,53
Эластаза, мБ/мг	18,7±2,0	10,0±1,36
АДА ед/л	6,74±2,07*	2,93±0,5
2-дезоксАДА ед/л	4,23±1,1*	1,72±0,43
АДА-1 ед/л	4,96±1,18*	1,86±0,5
АДА-2 ед/л	1,79±0,9	0,89±0,19

Примечание: \*-различие между группами достоверно,  $p < 0,05$ .

Судя по данным исследования активности эластазы в БАЛЖ, при ФКТ и ИТЛ степень активации нейтрофилов в очаге поражения также различна. При ФКТ активность эластазы в БАЛЖ превышает таковую у здоровых лиц, равную  $2,22 \pm 1,63$  мЕ/мг [11], в 8,4 раза, а при ИТЛ - в 4,5 раза. Наряду с этим известно, что активность эластазы отражает различную выраженность воспалительной реакции и высокую дегрануляционную активность нейтрофилов [8, 16]. Выявленные различия могут быть связаны как с преобладанием в БАЛЖ больных ФКТ нейтрофилов, так и с большей степенью их активации/разрушения. В пользу этого свидетельствуют данные цитограмм, согласно которым при ФКТ нейтрофилы в клеточном осадке БАЛЖ составляют  $75,8 \pm 3,0\%$ , а при ИТЛ -  $39,9 \pm 3,3\%$  ( $p < 0,05$ ). Однако при сопоставляемых формах туберкулеза лёгких нельзя исключить и значение относительной недостаточности ингибиторов протеаз в очаге воспаления [17].

Критерием большей степени активации при ФКТ нейтрофилов БАЛЖ наряду с АМ служит и выявленная значимая прямая связь между уровнями неоптерина и эластазы ( $r = 0,32$ ,  $p < 0,04$ ), не отмеченная при ИТЛ. Обнаруженные различия в соотношении этих показателей, отражающие преимущественную активность разных клеток, обладающих фагоцитирующей способностью, могут рассматриваться с позиций особенностей межклеточных взаимодействий [18]. Последние при ФКТ, по сравнению с ИТЛ, согласно приведенным данным, отличает большая степень скоординированности секреторной активности клеток, что подтверждают, на наш взгляд, и приводимые ниже результаты исследования активности АДА и 2-дезоксидАДА.

Согласно полученным данным, БАЛЖ больных ФКТ отличает большая, чем при ИТЛ, активность АДА и 2-дезоксидАДА в 2,3 и 2,5 раза соответственно ( $p < 0,05$ ). В обоих случаях активность АДА определялась преобладанием активности АДА-1, доля которой при ФКТ составляла 73,6%, а при ИТЛ – 63,5% при соотношениях АДА-1/АДА-2, равных соответственно 2,77 и 2,08. Повышение в БАЛЖ активности АДА за счет изофермента АДА-1, продуцентами которого являются преимущественно нейтрофилы, может объясняться преобладанием последних в цитограммах клеточного осадка БАЛЖ. При пересчёте значений активности на 1 г белка различия сохраняются только для изофермента АДА-1.

Таким образом, секреторная активность фагоцитирующих клеток, определяющая степень активности воспалительного процесса, судя по активности неоптерина, эластазы и АДА в БАЛЖ, больше выражена при ФКТ, что подтверждает и значимая положительная связь неоптерина с уровнем АДА ( $r = 0,36$ ,  $p < 0,02$ ) и АДА-1 ( $r = 0,36$ ,  $p < 0,44$ ). Это также согласуется и с клинко-рентгенологической характеристикой процесса у этих больных: полисегментарное поражение легочной ткани имело место у 74,1% больных ФКТ и у 18,1% больных ИТЛ.

Исследование активности АДА, 2-дезоксидАДА и их изоферментов в нефракционированном клеточном осадке БАЛЖ и выделенных из него АМ не обнаружило значимых различий этих показателей при рассматриваемых формах туберкулеза легких (табл. 2), хотя при анализе индивидуальных значений установлено, что у больных ФКТ амплитуда показателей активности АДА, 2-дезоксидАДА и АДА-1 сдвинута в сторону наиболее высоких значений. В то же время в нейтрофилах БАЛЖ больных ФКТ активность как АДА и АДА-1, так и 2-дезоксидАДА оказалась большей, чем при ИТЛ в 3,7; 4,17 и 4,2 раза соответственно. У больных обеих групп в общей активности АДА нейтрофилов достоверно преобладала доля АДА-1: при ФКТ – 97,2%, при ИТЛ – 86,5%. Полученные данные отражают более выраженную синтезирующую функцию фагоцитирующих клеток при ФКТ.

Таблица 2. Показатели окислительного метаболизма, активности аденозиндеаминазы и её изоферментов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа.

Группы больных	Показатели					
	НСТ-тест (ед. опт. пл./10')		АД			
	Спонтанный	Стимулиров.	Индекс Ст/Сп	АД	2-дезоксАД	АД-1
				Ед/10'	Ед/10'	Ед/10'
	Нефракционированный клеточный осадок					
ФКТ	248,6±33,0	326,1±74,0	1,39±0,21	3,85±0,45	3,01±0,4	3,53±0,45
ИТП	158,0±28,6	179,3±27,7	1,27±0,06	2,57±0,78	1,93±0,7	1,93±0,79
	Альвеолярные макрофаги					
ФКТ	141,2±23,4	177,3±21,6	1,3±0,15	4,95±1,94	2,85±1,19	3,23±1,46
ИТП	154,4±50,05	176,1±48,5	1,24±0,1	3,1±2,32	1,6±1,3	1,69±1,44
	Нейтрофилы					
ФКТ	270,7±36,3	363,6±82,3*	1,47±0,24	3,6±0,49*	3,0±0,45*	3,5±0,49*
ИТП	166,1±32,5	179,3±30,6	1,29±0,09	0,97±0,24	0,71±0,15	0,84±0,18

Примечание. \* - звёздочка показывает достоверную значимость различий -  $p < 0,05$ .



По исходной бактерицидной активности ( $\text{НСТ}_{\text{сп}}$ ) клеток нефракционированного осадка БАЛЖ сопоставляемые группы больных оказались сходны ( $p=0,08$ ), а интенсивность окислительного метаболизма у больных ФКТ была выше, чем при ИТЛ, что документировалось гораздо более высокими значениями индуцированного НСТ-теста. У больных ФКТ амплитуда показателей  $\text{НСТ}_{\text{ст}}$  сдвинута в сторону наиболее высоких значений. При этом между значениями  $\text{НСТ}_{\text{сп}}$  и  $\text{НСТ}_{\text{ст}}$  выявлена положительная зависимость, наиболее четко прослеживаемая при ИТЛ:  $r=0,99$  против  $0,68$  при ФКТ. Судя по величине Индекса Ст/Сп резервные возможности клеток при этом не отличались (табл. 2). Степень прироста показателя базального кислородзависимого метаболизма в условиях стимуляции зимозаном при ФКТ составила  $45,83 \pm 16,55\%$ , а при ИТЛ –  $21,6 \pm 7,1\%$  ( $p>0,05$ ). При этом, если при ФКТ связь степени прироста с исходным значением  $\text{НСТ}_{\text{сп}}$  была незначительной ( $r=-0,15$ ), то при ИТЛ эта отрицательная зависимость оказалась существенной ( $r=-0,533$ ;  $p=0,04$ ).

Что касается бактерицидного потенциала АМ осадка БАЛЖ, то в обеих группах получены близкие значения как исходных его показателей, так и после стимуляции зимозаном. АМ только больных ФКТ отличает тесная отрицательная зависимость между базальным уровнем кислородзависимого метаболизма и степенью его прироста при стимуляции зимозаном ( $r=-0,82$ ,  $p=0,02$ ). Это может рассматриваться как свидетельство снижения резервного бактерицидного потенциала АМ осадка БАЛЖ.

Для нейтрофилов осадка БАЛЖ свойственны сходные в обеих группах больны значения  $\text{НСТ}_{\text{сп}}$  ( $p=0,2$ ). Функциональная готовность нейтрофилов к развитию кислородного взрыва выше при ФКТ ( $p=0,06$ ), при этом амплитуда индивидуальных величин кислородного взрыва почти вдвое выше, чем при ИТЛ. Зависимость между значениями  $\text{НСТ}_{\text{сп}}$  и  $\text{НСТ}_{\text{ст}}$  составила при ИТЛ  $r=0,99$ ; при ФКТ  $r=0,66$ . Степень прироста бактерицидной активности нейтрофилов в условиях стимуляции при ФКТ составила  $48,69 \pm 22,22\%$ , тогда как у больных ИТЛ только  $19,28 \pm 8,87\%$ . Как и в клетках нефракционированного осадка зависимость между значениями  $\text{НСТ}_{\text{сп}}$  и степенью его прироста оказалась значимой только для нейтрофилов больных ИТЛ ( $r=-0,518$ ,  $p=0,04$ ).

Усилению окислительного метаболизма фагоцитирующих клеток сопутствовала активация пуринового катаболизма. Различия больных ИТЛ и ФКТ по бактерицидному резерву фагоцитирующих клеток подтверждается и особенностями их корреляционных соотношений с изучавшимися биохимическими показателями. При ИТЛ для клеток нефракционированного осадка БАЛЖ обнаружена существенная связь между их исходной бактерицидной активностью и активностью в них АДА и АДА-1 ( $r=0,9$ ,  $p<0,035$ ). В то же время при ФКТ установлена значимая зависимость между бактерицидным резервом нейтрофилов БАЛЖ (Индекс Ст/Сп) и активностью в них АДА ( $r=0,41$ ,  $p=0,016$ ), АДА-1 ( $r=0,41$ ,  $p=0,016$ ) и 2-дезоксАДА ( $r=0,35$ ,  $p=0,035$ ) и обратная тесная связь между значениями  $\text{НСТ}_{\text{сп}}$  и активностью эластазы БАЛЖ ( $r=-0,4$ ,  $p=0,009$ ). Очевидно, что при ФКТ в бактерицидной активности фагоцитирующих клеток БАЛЖ преобладает вклад нейтрофилов, тогда как при ИТЛ вклад нейтрофилов и АМ сходен.

Таким образом, резервный потенциал нейтрофилов при ФКТ выше, чем при ИТЛ, при отсутствии связи между исходным уровнем базального НСТ и степенью его прироста в условиях стимуляции, свойственной ИТЛ. Это сочетается с усилением синтезирующей и секреторной функциями фагоцитирующих клеток при ФКТ. Неоднозначные изменения функциональной активности фагоцитирующих клеток при разных формах туберкулеза согласуются с ранее полученными экспериментальными данными [3].

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Результаты комплексного исследования БАЛЖ, альвеолярных макрофагов и нейтрофилов ее клеточного осадка указывают на существование зависимости между функциональным состоянием этих клеток и

формой туберкулеза лёгких. Судя по более высокому содержанию в БАЛЖ неоптерина и эластазы, выделяемых преимущественно активированными АМ и нейтрофилами соответственно, ФКТ свойственна, по сравнению с ИТЛ, более высокая секреторная активность обоих типов фагоцитирующих клеток. При ФКТ это сочетается и с более выраженной бактерицидной активностью нейтрофилов, которая значимо коррелировала с активностью в них АДА.

Сопоставление особенностей изменений в БАЛЖ изучавшихся биохимических показателей (неоптерина, эластазы, АДА и ее изоферментов, 2-дезоксАДА) и бактерицидной активности клеток осадка отражает различные стороны функционирования фагоцитирующих клеток БАЛЖ, что позволяет, с учётом современных представлений о механизмах их регуляции, предполагать существование различий в межклеточных взаимоотношениях при разных формах туберкулеза лёгких.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Ерохин В.В.* (2003) в: Туберкулёз. Проблемы диагностики, лечения и профилактики. Труды Всероссийской научно-практической конференции, Санкт-Петербург, 141-144.
2. *Каминская Г.О., Абдуллаев Р.Ю.* (2002) Пробл. туб., № 3, 38-43.
3. *Ерохин В.В.* (1998) Пробл. туб., № 3, 61-66.
4. *Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Werner E.R., Dierich M.P., Wachten H.* (1988) Immunol. Today, **9**, 150-155.
5. *Murr C., Fuith L.C., Widner B., Wirleitner B., Baier-Bitterlich G., Fuchs D.* (1999) Anticancer Res., **19**, 1721-1728.
6. *Насонов Е.Л.* (2001) Российские медицинские вести, **VI** (3), 20-26
7. *Потапова Г.И., Храмцова С.Н., Сухова Т.И., Мухоян И.А.* (1993) Вестник РАМН, №4, 3-7
8. *Макинский А.И., Доценко В.Л., Спирина А.Я.* (2000) Пробл. туб., № 4, 36-39.
9. *Филиппов В.П.* (1986) Диагностический бронхоальвеолярный лаваж, Москва.
10. *Visser L., Blout E.R.* (1972) Biochim. Biophys. Acta, **268**, 257-260.
11. *Оглоблина О.Г.* (1980) Вопросы мед. химии, № 3, 387-392.
12. *Giusti G.* (1974) in: Methods of enzymatic analysis (H. Bergmeyer ed.), **2**, New York, 1092.
13. *Фрейдлин И.С.* (1984) Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека, СПб, 32.
14. *Thomas C.Y., Tsao M.D., Ji-hong Hong M.D., Li-Fu Li* (2000) Chest, **117**, 103-109.
15. *Mohamed K.H., Mobasher A.A.M.T., Yousef A.-R.I., Salah A.* (2001) Chest, **119**, 776-780.
16. *Макинский А.И.* (2004) Пробл. туб., №9, 42-45.
17. *Суркова О.А., Походзей И.В., Александрова Н.И., Булычев А.Г., Леонтева Е.А.* (1997) Пульмонология, № 4, 55-59.
18. *Пальцев М.А., Иванов А.А.* (1995) Межклеточные взаимодействия, М., Медицина.

Поступила: 24. 11. 2006.

**FUNCTIONAL ACTIVITY OF PHAGOCYTES OF BRONCHOALVEOLAR  
LAVAGE IN PATIENTS WITH FIBRO-CAVERNOSIS AND INFILTRATIVE  
PULMONARY TUBERCULOSIS**

*M.E. Dyakova, O.T. Titarenko, D.S. Esmedlyaeva, A.V. Yelkin, N.P. Alexeyeva, T.L. Perova*

Federal Institution "Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Phtisiopulmonology of Federal Agency of Health and Social Development", Ligovsky pr., 2-4, Saint-Petersburg, 191036 Russia;  
tel.: (812) 297-86-03; e-mail: spbniif\_all@mail.ru

Functional activity of the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) phagocytes was studied in 33 and 16 patients with fibro-cavernosis (FC) and infiltrative (I) pulmonary tuberculosis (PT), respectively. Complex examination of BALF, alveolar macrophages (AM) and neutrophils (N) sedimented from BALF revealed interrelationship between functional activity of the cells and the form of PT. Higher activities in BALF of neopterin and elastase mainly secreted by activated AM and N respectively, reflect a higher secretory activity of both types of cells in FC – PT. These patients are also characterized by more pronounced bactericide activity of Ns, which significantly correlates with adenosine deaminase (ADA) activity. It is suggested that changes in BALF of various biochemical parameters examined (neopterin, elastase, ADA and its isoenzymes, 2-deoxyADA) and bactericide activity of the sedimented cells represent are the consequences of different sides of BALF phagocytes functioning. According to modern notions about the mechanisms of their regulation different intercellular relations are suggested in different form of PT.

**Key words:** tuberculosis, neopterin, adenosine deaminase, NST-test, macrophages, neutrophils.