

А. А.Татур¹, М. М. Зафранская², В. А. Стахивич³, А. В. Пландовский¹

ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ЗАЩИТЫ В БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ У ПАЦИЕНТОВ СО СПОНТАННЫМ ПНЕВМОТОРАКСОМ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,
Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова²,
10-я ГКБ г. Минска³

Изучены показатели иммуноглобулинов, цитокинов и лизоцима в бронхоальвеолярной жидкости у пациентов со спонтанным пневмотораксом.

Ключевые слова: спонтанный пневмоторакс, буллезная эмфизема легких, бронхоальвеолярная лаважная жидкость, иммуноглобулины, цитокины, лизоцим

A.A.Tatur, M.M. Zafranskaya, V.A. Stachievich, A.V. Plandovsky

HUMORAL IMMUNE RESPONSE FACTORS IN BRONCHOALVEOLAR FLUID LAVAGEON PATIENTS WITH SPONTANEOUS PNEUMOTHORAX

Cytokines, immunoglobulins and lysozyme levels in bronchoalveolar fluid lavage are presented in patients with spontaneous pneumothorax.

Key words: spontaneous pneumothorax, bullous emphysema of lungs, bronchoalveolar fluid lavage, immunoglobulins, cytokines, lysozyme

Диагностика и дифференциальная диагностика легочной патологии при спонтанном пневмотораксе (СПТ), профилактика послеоперационных плевропульмональных осложнений, несмотря на имеющиеся достижения, продолжает оставаться актуальной проблемой торакальной хирургии. У 72-92% пациентов морфологической причиной СПТ являются дегенеративно-дистрофические изменения в легочной паренхиме, сопровождающиеся ее буллёзной трансформацией. Растяжение при кашле дегенеративно-измененных стенок альвеол приводят к развитию их субплевральной перфорации и расслоению висцерального листка плевры с образованием булл, при разрыве ко-

торых развивается пневмоторакс [2, 6, 11]. В возникновении СПТ значительную роль играет инфекция дыхательных путей, при которой создаются условия для нарушения проходимости мелких бронхов и бронхиол [7, 8]. Важную информацию о клетках дыхательных путей и их секретах, вовлеченных в патогенез, можно получить при цитологическом, иммунологическом, электронно-микроскопическом и цитохимическом исследованиях бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ). Сегодня достаточно хорошо изучен состав клеточных и неклеточных компонентов БАЛЖ в норме и при отдельной легочной патологии. Считается, что продукция цитокинов при интерстициальных заболеваниях легких

запускает механизмы тканевого повреждения и может быть использована в качестве критерия прогноза развития и исхода заболевания [1, 8, 9, 11, 13].

Основным методом радикального хирургического лечения СПТ является видеоторакоскопическая степлерная резекция буллезно-трансформированных участков легких, при которых частота развития гнойно-воспалительных легочно-плевральных послеоперационных осложнений достигает 8,0-12,2%, а развития рецидива пневмоторакса – 4,0-5,0% [2, 10]. Изучение показателей местного иммунного ответа в легких позволяет не только подтвердить или опровергнуть наличие инфекционного процесса, но и обосновать необходимость проведения адекватной антибактериальной и иммуномодулирующей терапии. Работ, посвященных изучению таких факторов местного иммунитета, как лизоцим, цитокины (IL-4, IL-1Ra), иммуноглобулины (А, G) в БАЛЖ у пациентов с буллезной эмфиземой легких, осложненной СПТ, в доступной литературе нам не встретилось.

Материал и методы

Материалом для исследования послужила БАЛЖ у девяти пациентов с верифицированной при рентгенографии и компьютерной томографии органов грудной клетки, а также видеоторакоскопии БЭЛ, осложненной развитием СПТ. Все пациенты находились на лечении в Минском городском Центре торакальной хирургии на базе УЗ «10-я городская клиническая больница» г. Минска. Аспирация БАЛЖ проводилась при фибробронхоскопии аппаратом «OLYMPUS» BF-P30 с телесистемой ОТV-F3 из участков предполагаемого поражения, как правило, верхней доли легкого на стороне СПТ. Через инструментальный канал фибробронхоскопа в один из субсегментарных бронхов верхней доли легкого вводили 50-60 мл изотонического раствора натрия хлорида. Поступающую из просвета бронха жидкость аспирировали в полиэтиленовый стаканчик. Введение и аспирацию повторяли 2-3 раза. Аспирированную жидкость в количестве 100 мл в течение 2-х часов доставляли в иммунологическую лабораторию. Для отделения осадка БАЛЖ в течение 10 мин. центрифугировали при 1500 об/мин. с последующим отбором светлого супернатанта в диализный мешок (SERVA, США), который помещали в 8%-ый раствор полиэтиленгликоля 40 000 (FLUKA, Германия). После 9-ти часовой инкубации содержимое диализного мешка разводили в 10 мл физиологического раствора, разливали по 1,5 мл в эпипендорфы и хранили при -20°C до проведения иммунологических исследований.

Определение лизоцима проводили методом диффузии в бифталатовом агаре (Sigma, США), основанного на образовании зон лизиса взвешенного в агаре тест-микроба. В ходе определения использовались раствор бифталата калия pH6,2, ацетоновый порошок M. Lesodeticus и кристаллический лизоцим. Иммуноглобулины определяли методом радиальной иммунодиффузии (РИД) в геле. В основу РИД положена методика Манчини, разработанная для количественной оценки белковых фракций в сыворотках крови по способности образовывать кольца преципитации с диагностическими моноспецифическими сыворотками против IgG (H+L), IgG (H) и IgA (H) человека («ИмБИО» Новгород, РФ). Количественное определение цитокинов проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа. Для определения рецепторного антагониста интерлейкина 1 (IL-1Ra) и интер-

лейкина 4 (IL-4) в БАЛЖ использовали наборы реактивов для иммуноферментного «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа (ООО «Цитокин», (СПб, РФ) в соответствии с инструкцией производителя.

Для сравнительного анализа полученных результатов пациенты с первичным СПТ, т.е. без наличия какого-либо «респираторного» анамнеза, были разделены на две группы. 1-ю группу составили 3 пациента с неосложненным послеоперационным течением, во 2-ю-6 больных с клинико-рентгенологическими признаками развития экссудативного плеврита. Сравнимые группы были сопоставимы по полу, возрасту, длительности СПТ до операции. Стандартная обработка вариационных рядов включала подсчет средних арифметических величин (M) и ошибок средних (m). Сравнение вариационных рядов осуществлялось с помощью непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни [5].

Результаты и обсуждение

Лизоцим, иммуноглобулины классов А и G, противовоспалительный цитокин IL-4 и регулятор воспаления IL-1Ra являются одними из основных компонентов местного иммунного ответа, которые опосредуют противомикробную защиту [3, 4, 9, 12, 13]. Показатели этих гуморальных факторов местного иммунитета в БАЛЖ в зависимости от характера клинического течения СПТ представлены в таблице 1.

Одним из важнейших факторов местной неспецифической защиты легких является лизоцим-низкомолекулярный белок-фермент (мурамидаза MM 13-18 кDa), который катализирует гидролиз гликозидной связи между N-ацетилмурановой кислотой и N-ацетилглюкозамином в пептидогликанклеточной стенке бактерий, в результате чего происходит их лизис. Наиболее чувствительны к нему грамположительные бактерии. Важно, что лизоцим обеспечивает общебиологическую функцию естественной толерантности организма и усиливает действие в организме антибиотиков. Лизоцим находится во всех тканях и биологических жидкостях человека: в плазме крови, макрофагах, слезной жидкости, слюне, мокроте, причем установлено, что его концентрация в БАЛЖ выше, чем в других органах. Источниками лизоцима в бронхиальной слизи являются моноциты и нейтрофилы крови, альвеолярные макрофаги и серозные клетки бронхиальных желез [3, 4]. Нами установлено снижение в 1,6 раза концентрации лизоцима в БАЛЖ при СПТ, осложненном плевральным выпотом, по сравнению с его неосложненным течением (P<0,01). Считается, что нарушение динамического равновесия организма с окружающей средой, к которым можно отнести и внезапное развитие бронхоплевральной коммуникации, характеризуется снижением выработки эндогенного лизоцима. В условиях его дефицита антигенная нагрузка приводит к избыточному накоплению повреждающих факторов иммунного ответа и токсических метаболитов, что, в свою очередь, определяет угрозу развития инфекционно-воспалительного ответа. Немаловажно, что при отсутствии или резком снижении уровня лизоцима не может реализовать в полной мере свои функции IgA, что может также способствовать развитию инфекционных осложнений [4, 12].

Антимикробные и противовирусные свойства слизистой оболочки бронхов во многом зависят от секреторного IgA, концентрация которого в бронхиальной слизи в 10 раз выше, чем в плазме крови. Он синтезируется лимфоидными клетками БАЛЖ и плазматическими клетками подслизистого слоя бронхов в ответ на попадание антигена в их просвет. Синтезируемый местно мономер IgA с помощью гликопротеида, преобразуется в димер. Последний соединяется с пептидным фрагментом, синтезируемым эпителиальными клетками слизистой оболочки бронхов, и обозначается, как секреторный компонент. Этот компо-

Таблица 1 – Показатели гуморальных факторов местного иммунитета в БАЛЖ

Характер течения СПТ	n	Показатели иммунитета				
		IL-4 пг/мл	IL-1Ra пг/мл	IgA мг/мл	IgG мг/мл	Лизоцим, мкг/мл
1 группа	6	20,21±7,56*	646,97±250,6	0,037±0,0012*	0,06±0,004*	29,83±7,6**
2 группа	3	12,02±5,01*	1144,17±480,32	0,005±0,001*	0,021±0,003*	46,67±5,7**
P		<0,05	=0,059	<0,05	<0,05	<0,01

Примечание: n-количество пациентов в группе; *-различия достоверны при p<0,05; **-различия достоверны при p<0,01

нент способствует проникновению димеров IgA в респирон и защищает молекулу IgA от разрушения протеолитическими ферментами. Важной особенностью IgA, является то, что при взаимодействии с антигеном, он не активирует систему комплемента. IgA уменьшает адгезивную способность широкого спектра микроорганизмов к слизистой оболочке и усиливает антибактериальную активность альвеолярных макрофагов. Эффект секреторного IgA в значительной степени зависит от состояния нормальной микрофлоры, колонизирующей поверхность слизистой оболочки бронхов, и концентрации лизоцима. IgA потенцирует антимикробное действие лизоцима и опосредует развитие антителозависимой клеточной цитотоксичности [3, 4, 7, 9]. Нами установлено, что у пациентов с осложненным течением концентрация IgA в БАЛЖ была в 7,4 раза выше его концентрации у больных без плеврального выпота ($P < 0,05$). Можно предположить, что повышение концентрации IgA в БАЛЖ на стороне развития пневмоторакса является следствием индукции местного гуморального иммунного ответа, в ходе которого наблюдается миграция клеток-предшественников продуцентов IgA. В результате хоуминга и рецепторного взаимодействия клеток – селектинов и интегринов лимфоциты «находят свое место» в слизистой бронхов, где и дифференцируются в клетки-продуценты IgA.

Немаловажную роль в местной антимикробной защите слизистой оболочки бронхов играет IgG, который, как и IgA, связываясь с бактериями, усиливает их адгезию к мембране альвеолярного макрофага, способствуя процессу фагоцитоза. В группе пациентов с осложненным течением СПТ концентрация IgG в БАЛЖ была в 2,9 раза выше, чем у пациентов без развития плеврального выпота ($P < 0,05$). Этот феномен может быть объяснен тем, что вследствие внезапного разрыва буллы, выхождения воздуха в плевральную полость и коллабирования легкого нарушается гомеостаз слизистой оболочки бронхов, способствующий, как массивному выходу IgG из кровеносного русла, так и образованию плазматических клеток, синтезирующих их местно. IgG непосредственно участвует в развитии воспалительного процесса, образуют иммунные комплексы с активацией системы комплемента, способствуют проникновению нейтрофилов с образованием воспалительного инфильтрата [3, 4, 7, 12].

При сравнительной оценке концентрации в БАЛЖ противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-1 Ra нами выявлено увеличение в 1,7 раза концентрации IL-4 ($P < 0,05$) при осложненном течении СПТ на фоне выраженной тенденции к снижению в 1,8 раза концентрации рецепторного антагониста IL-1. Основная функция IL-4 заключается в контроле пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов с последующим синтезом антител в ответ на травму или антигенное воздействие. Кроме этого IL-4 обуславливает переключение дифференцировки Т-лимфоцитов в сторону Т-хелперов 2 типа, тем самым, определяя развитие гуморального иммунного ответа. Важно, что IL-4 блокирует, как спонтанную, так и индуцированную продукцию моноцитами и макрофагами ряда провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8, ФНО α) [3, 4, 7, 8, 12].

Основная функция рецепторного антагониста IL-1 заключается в блокаде провоспалительных эффектов IL-1. IL-1 Ra запускает комплекс местных защитных реакций, вовлекающий практически все типы клеток-эффекторов воспаления в элиминацию патогена и восстановление целостности поврежденной ткани. В случае проникновения патогена через дыхательные пути в роли основного продуцента IL-1 Ra выступают альвеолярные макрофаги, активация которых сопровождается также продукцией интермедиатов кислорода, лизосомальных протеолитических ферментов и провоспалительных цитокинов [4, 12]. Выявленное нами снижение IL-1Ra при осложненном течении СПТ может способствовать гиперпродукции альвеолярными макрофагами активных форм кислорода, которые снижают активность сур-

фактанта, повреждают фибробласты, повышают проницаемость эндотелия, ухудшают функцию бронхоальвеолярного эпителия и мукоцилиарного клиренса. В результате снижения в БАЛЖ IL-1Ra возрастает риск вторичного повреждения легочных структур за счет макрофагальной гиперпродукции IL-1 с избыточной генерацией активных форм кислорода [1].

В целом, анализ изученных показателей гуморального иммунитета в БАЛЖ позволяет нам трактовать их, как следствие развития СПТ на фоне бессимптомно протекающего обострения неспецифического дегенеративно-воспалительного легочного процесса с его переходом вследствие перфорации буллы на плевру с или без развития плеврального выпота. Развитие плеврита сопровождалось достоверным увеличением в бронхиальном секрете концентрации Ig A и G, а также IL-4. Напротив, при неосложненном течении СПТ отмечено достоверное увеличение в БАЛЖ концентрации лизоцима и стойкая тенденция к увеличению цитокина IL-1 Ra, блокирующего провоспалительные эффекты IL-1. С практической точки зрения, полученные нами данные о гуморальных факторах местного иммунитета, позволяют обосновать необходимость назначения пациентам со СПТ с целью профилактики развития в процессе паллиативного или радикального хирургического лечения интраплевральных инфекционно-воспалительных осложнений противовоспалительной и антибактериальной терапии. С целью ограничения чрезмерной активации продукции медиаторов воспаления целесообразно назначение нестероидных противовоспалительных препаратов и пентоксифиллина [7]. Эмпирическая антибактериальная терапия предусматривает применение в терапевтических дозах цефалоспоринов (цефодизим, цефотоксим) или фторхинолонов (ципрофлоксацин, офлоксацин), которые, что немаловажно, усиливают также пролиферацию клеток иммунитета, повышают фагоцитоз и бактерицидность [4]. Вместе с тем, при развитии СПТ в организме пациента развивается дисрегуляция иммунитета, требующая корректного назначения иммуномодуляторов, как местного, ингаляционного (ИРС 19), так и общего перорального (рибомунил, бронхомунал, полиоксидоний, липокрид и др.) или парентерального (тималин, иммунофан, беталейкин, ронколейкин и др.) способов применения.

Выводы

1. Иммунологическое исследование БАЛЖ у пациентов с БЭЛ, осложненной СПТ с развитием плеврита, выявило достоверно более высокую по сравнению с неосложненным течением концентрацию иммуноглобулинов класса A и G, цитокина IL-4 на фоне относительного уменьшения количества цитокина IL-1Ra и лизоцима.

2. При неосложненном течении СПТ установлены достоверно сравнительно более высокая концентрации в БАЛЖ лизоцима и стойкая тенденция увеличения количества противовоспалительного цитокина IL-1Ra.

3. Углубленное иммунологическое исследование БАЛЖ у пациентов с БЭЛ, осложненной СПТ, может позволить не только обосновать пути рациональной иммуномодуляции и профилактики развития легочно-плевральных гнойно-воспалительных осложнений, но и получить новые данные о патогенезе этих патологических процессов.

Литература

1. Влияние рецепторного антагониста IL-1 на развитие оксидативного стресса в легких // Л.Н. Данилов [и др.] / Цитокины и воспаление.- 2003.-№ 4.-С. 14-20
2. Высоцкий, А. Г. Буллезная эмфизема легких / А.Г. Высоцкий – Донецк: Східний вид. дім, 2007.-277 с.
3. Иммунология. Норма и патология // Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатъева, И. Г. Сидорович / М.: Медицина, 2010. – 752 с.
4. Новиков, Д. К. Клиническая иммунопатология. Рук-во / Д. К. Новиков, П. Д. Новиков. – М.: Мед. лит., 2009. – 464 с.

☆ Оригинальные научные публикации Лечебно-профилактические вопросы

5. Реброва, А. О. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / М.: МедиаСфера, 2002.-312с.

6. Татур, А. А. Неспецифический спонтанный пневмоторакс. Этиология, патогенез и диагностика / А. А. Татур, А. В. Пландовский // Хирург. – 2006.-№ 11. – С.29-32.

7. Федосеев, Г. Б. Механизмы воспаления бронхов и легких и противовоспалительная терапия // Г. Б. Федосеев / СПб.: Нордмед-Издат., 1998.-688 с.

8. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive Pulmonary disease and emphysema // S. Grumelli [et al] /PLoS Med-

icine.-2004. – Vol. 1 (1).-P. 75-83

9. Arnold L. W., McCray S. K., Tatu C. The immune system – Second of two parts //J. Immunol. 2000.-Vol.164.-P.2924-2930

10. General Thoracic Surgery / Ed.: T. W. Shields, J. LoCicero, R. B. Ponn, V. W. Rusch,7-th ed. – Lippincott, Williams & Wilkins.-2009.-P. 2672.

11. Mucosal immune system: A brief review // N. A. Montilla [et al]/ Immunologia.-2004.-Vol. 23 (2). – P. 207-216

12. Steven, M. Anti-Inflammatory Cytokines / / M. Steven, De Palo V. / CHEST.-2000.-Vol.117 (4). – P. 1162-1067

13. Wolff, H. Studies of cytokine levels in bronchoalveolar fluid lavage// H. Wolff, A. M. Teppom / Scand. J. Clin. Lab.Invest.-2003.-No. 63.-P.27-36