

УДК 616.23/.24-002.2-056.83-02:613.84

ФАКТОРЫ УСТОЙЧИВОСТИ ЧАСТИ «ЗЛОСТНЫХ» КУРИЛЬЩИКОВ К РАЗВИТИЮ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Черногорюк Г. Э.¹, Михайлова А. А.², Санжаровская М. С.¹, Ямкина Н. С.¹, Акбашева О. Е.¹, Варвянская Н. В.¹, Климентьева Т. К.¹, Рослякова Е. П.³, Фисенко А. Ю.¹

¹ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России (634050, Томск, Московский тракт, 2) e-mail:chernogoryuk@yandex.ru

²ФГБУЗ Сибирский клинический центр ФМБА России (660037, Красноярск, ул. Коломенская, 26)

³ОГБУЗ Томский областной онкологический диспансер (634050, Томск, ул. Ленина, 115).

На сегодняшний день в достаточной степени не изучены механизмы, препятствующие формированию ХОБЛ у части длительно курящих субъектов. В исследовании выявлялись возможные факторы толерантности практически здоровых «злостных» курильщиков к формированию ХОБЛ. Объектом исследования была индуцированная мокрота, забор которой проводился по стандартной методике. В супернатанте индуцированной мокроты цитобиохимическими и биохимическими методами исследовалось содержание показателей протеиназ/антипротеиназной, оксидант/антиоксидантной, калликреин-кининовой систем, оценивались бицидные свойства нейтрофилов по внутриклеточной концентрации катионных протеинов, миелопероксидазы. Толерантность к формированию ХОБЛ у здоровых «злостных» курильщиков может поддерживаться уровнем ответной реакции на действие факторов табачного дыма, реализующейся в количественных значениях биомаркеров воспаления и морфофункциональных свойствах нейтрофилов, которые по сравнению с пациентами с ХОБЛ характеризуются: более высокой активностью в индуцированной мокроте протеолитических ингибиторов – α_1 -протеиназного ингибитора, α_2 -макроглобулина, кислотостабильных ингибиторов и меньшей активностью протеиназ – эластазы и трипсиноподобных протеиназ; более низкими значениями активности показателей калликреин-кининовой системы в индуцированной мокроте; меньшим содержанием малонового диальдегида и более высокой активностью каталазы в индуцированной мокроте; высоким содержанием в цитоплазме нейтрофилов индуцированной мокроты миелопероксидазы и катионных протеинов, меньшим содержанием малонового диальдегида и более высокой активностью каталазы в индуцированной мокроте; высоким содержанием в цитоплазме нейтрофилов индуцированной мокроты миелопероксидазы и катионных протеинов.

Ключевые слова: ХОБЛ, «злостные курильщики», механизмы толерантности.

RESISTANCE FACTORS IN HEAVY SMOKERS TO THE COPD DEVELOPMENT

Chernogoryuk G. E.¹, Michailova A. A.², Sanzharovskaya M. S.¹, Yamkina N. S.¹, Akbasheva O. E.¹, Varvyanskaya N. V.¹, Klimentieva T. K.¹, Roslyakova E. P.³, Fisenko A. Y.¹

¹Federal State-Funded Educational Institution of Higher Vocational Education Siberian State Medical University of Ministry of Health of Russian Federation (634050, Tomsk, Moskovsky tract, 2) e-mail:chernogoryuk@yandex.ru

²Federal State-Funded Healthcare Institution Siberian Clinic Center of Russian Federal Bio-Medical Agency (660037, Krasnoyarsk, ul. Kolomenskaya, 26)

³Federal State-Funded Healthcare Institution Tomsk Regional Oncologic Dispensary (634050, Tomsk, ul. Lenina, 115)

Nowadays limited data are available about mechanisms of the resistance to COPD in part of heavy smokers. Components of the proteinase/antiproteinase, oxidant/antioxidant and kallikrein-kinin systems were identified in induced sputum by biochemical methods, biocidal properties of neutrophils were evaluated on the basis of the intracellular cation protein and myeloperoxidase concentration. In non-COPD heavy smokers higher levels of proteolysis inhibitors (α_1 -proteinase inhibitor and α_2 -macroglobulin, acid-fast inhibitors) and lower levels of proteinases (elastase, trypsin-like proteinase) were detected. In these subjects the kallikrein-kinin system in induced sputum was less active, catalase was more active and the malondialdehyde concentration was lower. In the cytoplasm of neutrophils there were more inclusion granules with cation protein and myeloperoxidase in non-COPD subjects.

Key words: COPD, heavy smokers, mechanisms of the resistance.

Введение

Курение сигарет является ведущим этиологическим фактором риска развития хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). У курильщиков наблюдается повышенная распространенность респираторных симптомов и расстройств легочной функции, ускоренное годовое снижение ОФВ₁ и максимальные показатели смертности от ХОБЛ по сравнению с некурящими лицами [4]. Многие компоненты табачного дыма оказывают непосредственное повреждающее действие на бронхолегочную ткань, инициируют воспалительный процесс с активацией нейтрофилов и макрофагов, влияют на баланс протеолитических ферментов и антипротеиназ, приводят к развитию оксидативного стресса [2, 4, 5, 6]. В настоящее время известно, что только у 15–20 % курильщиков развивается ХОБЛ. До конца неясным остается вопрос о причинах такой избирательности развития болезни [2, 8]. Исходя из этого, **цель исследования** состояла в выявлении факторов толерантности части «злостных курильщиков» к формированию ХОБЛ.

Материалы и методы исследования

Дизайн исследования для решения поставленной нами цели заключался в сравнительном анализе значений биомаркеров воспаления бронхолегочного региона у лиц, длительный «стаж» курения которых мог бы привести к развитию клинически выраженной ХОБЛ. При планировании данной работы мы исходили из того факта, что активация воспалительных процессов при ХОБЛ, как локальных, так и системных, является доказанным фактом.

В программу исследования было включено 115 пациентов с ХОБЛ в фазе обострения, все мужчины. Согласно критериям GOLD I стадия заболевания констатирована у 7 пациентов, II стадия – у 20, III стадия – у 40, IV стадия – у 48 больных. Средний возраст пациентов с ХОБЛ составил $58,2 \pm 1,03$ лет. Выбор периода обострения был обусловлен тем, что в этот период, являющийся кульминационной фазой болезни, наиболее значимо проявляются ее патогенетические механизмы. В исследование не включались пациенты с наличием аллергических болезней, заболеваний воспалительного характера (пневмония и т.д.), с болезнями системы кровообращения, выраженной сердечной недостаточностью (III–IV ФК по NYHA), другими тяжелыми сопутствующими заболеваниями. Контингент здоровых лиц состоял из 108 здоровых добровольцев. В зависимости от фактора курения они были разделены на 2 группы: здоровые, никогда не курившие мужчины ($n=28$, средний возраст – $48,6 \pm 1,4$ лет), практически здоровые, курящие ($n=80$, средний возраст – $47,2 \pm 0,6$ лет). Анамнез курения составил от 25 до 54 пачек/лет, среднее значение – $34,9 \pm 1,4$ пачек/лет, что позволило отнести обследованную группу курящих лиц к категории «злостных» курильщиков. Условиями для включения в группу здоровых лиц были: отсутствие кашлевого анамнеза (здоровые некурящие), бронхиальной астмы, бронхита (здоровые некурящие), аллергических заболеваний, острых респираторных заболеваний в течение последних трех месяцев до исследования,

отсутствие патологических изменений приборной рентгенографии органов грудной клетки, нормальные показатели функции внешнего дыхания, длительный анамнез курения – более 25 пачек/лет (у здоровых курящих), отсутствие клинических критериев, позволяющих диагностировать ХОБЛ. У 64 человек группы «злостные» курильщики длительное курение инициировало развитие необструктивного хронического бронхита, проявляющегося непостоянным утренним кашлем с выделением слизистой мокроты в небольшом количестве.

Объектом исследования была индуцированная мокрота, забор которой проводился по стандартной методике. В нейтрофилах индуцированной мокроты гистохимическими и биохимическими методами определялось содержание веществ, относящихся к протеиназ/антипротеиназному, оксидант/антиоксидантному, калликреин-кининовому кластерам воспаления. Цитохимический статус нейтрофильных гранулоцитов в индуцированной мокроте оценивался по активности миелопероксидазы (МПО) и катионных протеинов (КП). Окраска нейтрофилов индуцированной мокроты на МПО проводилась бензидином по методу Грэхема – Кнолля. Для определения КП мазки окрашивались прочным зеленым по модифицированному методу В. Е. Пигаревского. Содержание МПО и КП в клетке оценивалось методом компьютерной морфометрии. В индуцированной мокроте биохимическими методами исследовалась активность компонентов протеиназ/антипротеиназной системы: эластазы, трипсиноподобных протеиназ (ТПП), α_1 -протеиназного ингибитора (α_1 -ПИ), α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ)кислотостабильных ингибиторов (КСИ); показателей каллекреин-кининовой системы, оксидант/антиоксидантной системы: малонового диальдегида, каталазы, супероксиддисмутазы [Оглоблина О. Г., Платонова Л. В., Пасхина Т. С., 1984; Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С., 1979; Камышников В. С., 2005; Королюк М. А., 1988; Брусов О. С., 1976]. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета программ STATISTICA 6.0. Для сравнения групп показателей применялись непараметрические методы. Критическое значение уровня значимости принималось равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Цитоплазма нейтрофильных гранулоцитов индуцированной мокроты здоровых курильщиков содержала такое же количество гранул КП, что и клетки некурящих лиц (табл. 1). Активность катионных протеинов при всех стадиях ХОБЛ оказалась меньше по сравнению с группами здоровых некурящих и курильщиков примерно в 1,2 раза.

Таблица 1

Содержание катионных протеинов и миелопероксидазы (ед.опт. пл.) в нейтрофилах ИМ здоровых некурящих, здоровых курящих и при обострении ХОБЛ ($M \pm m$)

№	Группы пациентов	Содержание в нейтрофилах индуцированной мокроты	
		Катионные протеины	Миелопероксидаза

1	Здоровые	Некурящие(n=26)	54,66±0,1	28,27±2,82
2		Курящие(n=74)	57,91±2,44	58,76±4,93
3	Стадии ХОБЛ	I(n=7)	48,14±2,2	32,35±4,07
4		II(n=16)	47,92±3,6	30,93±2,77
5		III(n=32)	47,97±3,7	30,7±2,1
6		IV(n=39)	47,51±3,2	41,04±5,42
p			p _{1-3,4,5,6} <0,02; p _{2-3,4,5,6} <0,03-0,001	p ₁₋₂ <0,001 p _{2-3,4,5,6} <0,001

Компонентом кислородзависимого звена бактерицидной системы нейтрофилов является миелопероксидаза [3]. Было выявлено двукратное превышение МПО активности нейтрофилов бронхиального пространства здоровых курильщиков по сравнению с группой здоровых некурящих. Низкая активность МПО при ХОБЛ, возможно, связана с истощением механизмов кислородзависимого киллинга микроорганизмов. Рассматривая высокую концентрацию гранул КП и активность МПО в нейтрофилах индуцированной мокроты практически здоровых «злостных» курильщиков с позиций толерантности к развитию ХОБЛ, можно высказать суждение о способности нейтрофилов здоровых длительно курящих лиц в полной мере реализовать нейтрофильный биоцидный потенциал, сдерживая тем самым активность инфекции на фоне воспаления, инициируемого табачным дымом.

Известно, что свободные радикалы сигаретного дыма запускают перекисное окисление жирных кислот клеточных мембран. Результаты исследования показали, что интенсивность перекисного окисления липидов в ИМ, определяемая по степени активности малонового диальдегида, была в 4,8 раза больше в группе практически здоровых курильщиков по сравнению со здоровыми некурящими (табл. 2).

Известно, что свободные радикалы сигаретного дыма запускают перекисное окисление жирных кислот клеточных мембран. Результаты исследования показали, что интенсивность перекисного окисления липидов в ИМ, определяемая по степени активности малонового диальдегида, была в 4,8 раза больше в группе практически здоровых курильщиков по сравнению со здоровыми некурящими (табл. 2).

Таблица 2

Содержание малонового диальдегида, каталазы и супероксиддисмутазы в индуцированной мокроте здоровых некурящих, здоровых курящих и при обострении ХОБЛ (M±m)

№	Группы пациентов		Малоновый диальдегид (ммоль/мл)	Каталаза (мккатал/л)	Супероксид-дисмутаза(Ед/мл)
1	Здоровые	Некурящие(n=24)	0,6±0,1	126,5±15,5	11,0±0,5
2		Курящие(n=67)	3,0±0,4	90,8±14,6	10,6±0,6
3		I(n=6)	3,6±0,5	56,7±6,5	9,8±0,7

4	II(n=18)	3,9±0,9	48,4±11,1	9,9±0,8
5	III(n=34)	4,9±0,6	39,6±5,7	9,8±0,9
6	IV(n=40)	5,7±0,6	40,7±5,3	7,6±0,5
p		p _{1-2,3,4,5,6} <0,03	p _{1-3,4,5,6} <0,05 p _{2-3,4,5,6} <0,05	p ₁₋₆ <0,05 p ₂₋₆ <0,05

Параллельно в бронхолегочном регионе здоровых курильщиков в ответ на повышение продуктов свободнорадикальных процессов отмечено значительное увеличение активности компонентов антиоксидантной системы, в частности, каталазы. Активность этого фермента у здоровых «злостных» курильщиков была выше примерно в 2 раза, чем у пациентов с ХОБЛ.

Таким образом, сравнительный анализ показателей оксидант/антиоксидантной системы бронхолегочного региона выявил меньшую концентрацию продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида и большую активность антиоксидантного фермента каталазы у здоровых курильщиков в сравнении с пациентами с верифицированной ХОБЛ. Увеличение антиоксидантной защиты усиливает резистентность к оксидативному стрессу. Этот механизм может быть одним из факторов толерантности курильщиков к формированию ХОБЛ.

В патогенезе ХОБЛ большую роль играет дисбаланс в системе протеиназы/антипротеиназы [1, 2, 4, 9, 10]. Проведенное исследование демонстрирует, что длительное курение инициирует рост активности протеиназ в биосредах бронхиального региона (табл. 3).

Таблица 3

Показатели протеиназной/антипротеиназной системы в индуцированной мокроте здоровых некурящих, здоровых курящих и при обострении ХОБЛ (M±m)

№	Группы пациентов	Эластаза (нмоль/мин мл)	ТПП (нмоль/мин мл)	α ₁ -ПИ (мИЕ/мл)	α ₂ -МГ (мИЕ/мл)	КСИ (мИЕ/мл)	
1	Здоровые	Некурящие (n=28)	0,56±0,01	0,41±0,1	148,4 ± 9,6	16,65±0,9	10,39±1,4
2		Курящие (n=76)	0,62±0,01	1,84±0,3	341,1 ± 41,7	76,81±6,9	25,32±2,2
3	Стадии ХОБЛ	I(n=7)	0,76±0,3	2,85±0,8	81,8 ± 2,7	13,50±0,5	12,90±0,9
4		II(n=20)	1,62±0,7	3,61±0,4	59,9± 7,4	11,6±0,4	14,32±1,3
5		III(n=36)	3,18±0,3	5,24±0,4	± 3,02	9,2±0,5	21,57±2,3
6		IV(n=42)	5,68±0,2	7,77±0,5	10,6±1,4	6,0±0,3	35,40±2,2
p		p _{1-2,3,4,5,6} <0,001; p _{2-3,4,5,6} <0,0001; p _{3-5,6} <0,02; p _{4-5,6} <0,001;	p _{1-2,3,4,5,6} =0,0001; p ₂₋₄ <0,002; p _{2-5,6} <0,0001; p _{3-5,6} <0,05; p _{4-5,6} <0,007;	P _{1-2,3,4,5,6} =0,01-0,0001; P _{2-3,4,5,6} =0,04-0,0001; P _{3-4,5,6} <0,02; P _{4-5,6} =0,001; P ₅₋₆ =0,0001	p _{1-2,4,5,6} <0,0001; p ₂₋₃ <0,05; p _{2-4,5,6} <0,0001; p _{3-5,6} <0,03; p _{4-5,6} <0,001; p ₅₋₆ <0,001	p _{1-2,5,6} <0,0001; p ₁₋₄ <0,02; p _{2-4,6} <0,002; p ₃₋₆ <0,02; p _{4-5,6} =0,04-0,0001;	

	$p_{5-6} < 0,001$	$p_{5-6} < 0,0001$			$p_{5-6} < 0,0001$
--	-------------------	--------------------	--	--	--------------------

Активность протеолитических ферментов (эластазы и ТПП) в индуцированной мокроте здоровых курильщиков превышала уровень анализируемых показателей группы здоровых некурящих в 1,2 и в 4,5 раза, соответственно. В индуцированной мокроте пациентов с ХОБЛ уже на ранних стадиях болезни была выявлена высокая активность эластазы и ТПП по сравнению со здоровыми некурящими и длительно курящими. Одновременно в индуцированной мокроте здоровых курящих лиц увеличивалась активность антипротеиназ: α_1 -ПИВ 2,3 раза, α_2 -МГ – в 4,6 раз, КСИ – в 2,4 раза по сравнению с аналогичными показателями здоровых некурящих. Модулирование активности антипротеиназ у пациентов с ХОБЛ происходило по-иному. Концентрация веществ с антипротеазной активностью в бронхолегочном регионе оказалась значительно меньшей, чем у здоровых курильщиков. При этом снижение протеолитической активности наблюдалось по мере прогрессирования болезни. Так, активность α_1 -ПИ при обострении ХОБЛ I стадии была ниже, чем у здоровых курящих, в 4 раза, а при IV стадии – в 32 раза, активность α_2 -МГ - в 6,5 раза и в 12 раз соответственно.

Таким образом, система протеиназы/антипротеиназы у длительно курящих здоровых лиц характеризовалась высокой активностью антипротеолитических ферментов – α_1 -ПИ и α_2 -МГ, что позволяет реализовать эффективную защиту тканей бронхолегочной системы от деструктивного воздействия протеиназ. У пациентов с ХОБЛ выявлен дисбаланс протеиназ и антипротеиназ, обусловленный увеличением содержания протеолитических ферментов и уменьшением компенсаторного нарастания их ингибиторов, необходимых для сдерживания прогрессирования хронического воспалительного процесса. Вероятно, активизация антипротеиназ при высокой концентрации протеолитических ферментов (инициируемой факторами табачного дыма), обнаруживаемая у субъектов группы высокого риска, является одним из механизмов, защищающих злостных курильщиков от развития ХОБЛ, и отчасти отвечает на вопрос о причинах развития ХОБЛ только у 15–20 % курящих.

Исследуя состояние калликреин-кининовой системы в бронхах у здоровых курильщиков, мы не обнаружили изменения их активности по сравнению со здоровыми. В то время как при ХОБЛ в обе фазы заболевания наблюдалось увеличение количества калликреина и калликреиногена по сравнению с группами контроля и высокого риска (табл. 4). Как известно, активность кининогена контролируется ингибиторами протеиназ [10], содержание которых снижалось при ХОБЛ, достигая минимума на поздних стадиях заболевания. Уменьшение количества ингибиторов ведет к неконтролируемой активации кининовой системы и, следовательно, способствует воспалительной реакции.

Таблица 4

Показатели кининогенеза в ИМ здоровых некурящих, здоровых курящих и при обострении ХОБЛ (M±m)

№	Группы пациентов		Калликреин (мЕ/мл)	Калликреиноген (мЕ/мл)
1	Здоровые	Некурящие(n=24)	9,9±0,9	34,5±4,9
2		Курящие(n=67)	8,0 ±0,4	32,7±0,2
3	Стадии ХОБЛ	I(n=6)	19,0±1,2	37,3±3,1
4		II(n=18)	26,1±1,2	43,9±4,0
5		III(n=35)	28,5±3,1	49,5±4,2
6		IV(n=41)	24,6±2,8	50,7±2,1
p			p _{1-3,4,5,6} =0,03-0,02 p _{2-3,4,5,6} =0,02-0,001	p _{1-4,5,6} =0,02 p _{2-4,5,6} =0,002-0,001

Таким образом, у здоровых «злостных» курильщиков при малой активности калликреин-кининовой системы не происходит инициация неконтролируемого воспаления в легочном регионе со всем каскадом последующих событий, приводящих в конечном итоге к деструктивным и фиброзным изменениям. Причинами низкой активности кининогенеза могут быть как генетически детерминированный слабый ответ этой системы на экзогенный патогенный фактор (табачный дым), так и инактивация компонентов калликреин-кининовой системы антипротеиназами, количество которых у здоровых курящих в бронхиальном регионе оказалось весьма высоким.

Заключение

Устойчивость к развитию ХОБЛ у части «злостных» курильщиков поддерживается определенным уровнем ответной реакции различных кластеров воспаления на действие факторов табачного дыма, реализующейся в количественных значениях показателей, которые по сравнению с пациентами с ХОБЛ характеризуются:

- высокой активностью в индуцированной мокроте протеолитических ингибиторов – α_1 -протеиназного ингибитора, α_2 -макроглобулина, кислотостабильных ингибиторов и меньшей активностью протеиназ – эластазы и трипсиноподобных протеиназ;
- меньшей активностью калликреин-кининовой системы в индуцированной мокроте;
- меньшим содержанием малонового диальдегида и более высокой активностью каталазы в индуцированной мокроте;
- большим содержанием в цитоплазме нейтрофилов индуцированной мокроты миелопероксидазы и катионных протеинов.

Список литературы

1. Аверьянов А. В. Дефицит α_1 -антитрипсина и хроническая обструктивная болезнь легких / А. В. Аверьянов, А. Э. Поливанова // Пульмонология. – 2007. – № 3. – С. 103-109.
2. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких (пересмотр 2011 г.) / Пер. с англ. под ред. А. С. Белевского. – М.: Российское респираторное общество, 2012. – 80 с.
3. Маянский А. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. / А. Н. Маянский, Д. Н. Маянский. – Новосибирск: Наука, 1983. – 264 с.
4. Хроническая обструктивная болезнь легких: Монография / Под редакцией А. Г. Чучалина. – М.: Издательский дом «Атмосфера», 2008. – 568 с.
5. Barnes P. J. Mediators of COPD / P. J. Barnes // Pharmacol. Rev. – 2004. – Vol. 56. – P. 515–548.
6. Barnes P. J. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms / P. J. Barnes, S. D. Shapiro, R. A. Pauwels // Eur. Respir. J. – 2003. – Vol. 22. – P. 672–688.
7. Doll R. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. / R. Doll, R. Peto, J. Boreham, I. Sutherland // BMJ. – 2004. – Vol. 328. – P. 1519.
8. Kaper J. Reimbursement for smoking cessation treatment may double the abstinence rate: results of a randomized trial. / J. Kaper, E. J. Wagena, M. C. Willemsen, C. P. van Schayck // Addiction. – 2005. – Vol. 100. – P. 1012–1020.
9. Petersen S. M. Alpha-2-macroglobulin and pregnancy zone protein. Serum level, alpha-2-macroglobulin receptors, cellular synthesis and aspects of function in relation to immunology / S. M. Petersen // Dan. Med. Bull. – 1993. – Vol. 40. – P. 409-446.
10. Shapiro S. D. Proteolysis in the lung / S. D. Shapiro // Eur. Respir. J. – 2003. – Vol. 22. – P. 30S-32S.

Рецензенты:

Белобородова Е. В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой терапии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск.

Тетенев Ф. Ф., д.м.н., профессор, зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск.