

ФЕНОТИП МАЛЫХ МАКРОФАГОВ В ИНДУЦИРОВАННОЙ МОКРОТЕ – МАРКЕР РАННЕЙ СТАДИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Черногорюк Г.Э.¹, Рослякова Е.П.², Михайлова А.А.¹, Рачковский М.И.¹, Варвянская Н.В.¹, Санжаровская М.С.¹, Антипов С.И.¹, Фисенко А.Ю.¹, Денисова О.А.¹, Шепелева Е.Г.¹

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

²ОГБУЗ Томский областной онкологический диспансер (634050, Томск, ул. Ленина, 115)

В сравнительном проспективном нерандомизированном когортном исследовании проведена сравнительная оценка морфометрических показателей макрофагов индуцированной мокроты. Группы сравнения: пациенты с ХОБЛ, длительно курящие без спирометрических показателей характерных для ХОБЛ, здоровые, никогда не курящих. Все обследованные – мужчины. Исследовались общая величина макрофагов, величина цитоплазмы и ядра в мкм². результаты представлены – M±SD. Средняя величина макрофагов у пациентов с ХОБЛ была наименьшей – 225 ± 81 мкм², у длительно курящих – 431 ± 101 мкм², у здоровых никогда не курящих – 477 ± 92 мкм² (p<0,0001). Из 60 пациентов с ХОБЛ средняя площадь макрофагов, составляющая, 225 ± 81 мкм² была в 52 случаях (86,7%). У курящих без ХОБЛ, средняя площадь макрофагов, соответствующая 225 ± 81 мкм² встретилась в 7 случаях (11%). У здоровых и никогда не курящих средняя величина макрофагов 225 ± 81 мкм² не была выявлена. Можно предположить, что 11% длительно курящих находятся на ранней стадии ХОБЛ и эволюционируют к клинически развернутой стадии. Диагностическая значимость теста ранней диагностики ХОБЛ путем определения средней величины макрофагов в индуцированной мокроте равной 225 ± 81 мкм² составила: чувствительность – 87%, специфичность – 89%, положительное и отрицательное прогностическое значение – 88%.

Ключевые слова: ХОБЛ, диагностика, индуцированная мокрота, макрофаги

PHENOTYPE SMALL MACROPHAGES IN INDUCED SPUTUM IS A MARKER EARLY STAGE OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Chernogoryuk G.E.¹, Roslyakova E.P.², Michailova A.A.¹, Rachkovskiy M.I.¹, Varvyanskaya N.V.¹, Sanzharovskaya M.S.¹, Antipov S.I.¹, Fisenko A.Y.¹, Denisova O.A.¹, Shepeleva E.G.¹

¹Siberian State Medical University (634050, Tomsk, Moskovsky tract, 2, e-mail:chernogoryuk@yandex.ru;

²Federal State-Funded Healthcare Institution Tomsk Regional Oncologic Dispensary (634050, Tomsk, Lenina, 115)

In a comparative, prospective, non-randomized cohort study, a comparative evaluation of morphometric parameters of macrophages induced sputum. Comparison groups: patients with COPD, the long-term smokers without spirometric indices characteristic of COPD, healthy never smokers. All subjects - men. We investigated the total amount of macrophages, the value of the cytoplasm and nucleus. Results are presented - M ± SD. The average value of macrophages in patients with COPD was the lowest - 225 ± 81 μm², in the long-term smokers - 431 ± 101 μm², healthy never smokers - 477 ± 92 μm² (p <0.0001). Of the 60 patients with COPD, the average area of macrophages was 225 ± 81 μm² was in 52 cases (86.7%). Smokers without COPD, the average area of macrophages, corresponding to 225 ± 81 μm² met in 7 cases (11%). In healthy never smokers the mean value of 225 ± 81 μm² macrophages was not identified. We can assume that 11% of long-term smokers are at an early stage of COPD and evolve to clinically advanced stage. Diagnostic value of early diagnosis of COPD test by determining the average value of macrophages in induced sputum equal to 225 ± 81 μm² was: sensitivity - 87%.

Keywords: COPD, diagnostics, induced sputum, macrophages

К большому сожалению, больные хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) обращаются за медицинской помощью уже на поздних стадиях заболевания, когда возможности терапии ограничены. Основным критерием диагностики ХОБЛ является констатация ограничения скорости воздушного потока в бронхах, определяемое при

спирографическом обследовании больного. Вместе с тем известно, что болезнь развивается задолго до проявления его в виде ограничения скорости воздушного потока. Существует субклинический период заболевания, который может продолжаться от 3-4 до 10 лет. В этот период пациент обычно не обращается за медицинской помощью и, как следствие, не предпринимаются активные меры по устранению (минимизации) действия внешних факторов риска [5,7].

В связи с этим, есть необходимость в достоверных и доступных тестах, позволяющих в донозологический период показать, что у конкретного курильщика с высокой степенью вероятности может развиться ХОБЛ (или болезнь уже сформировалась, но не достигла степени значимого ограничения скорости воздушного потока в бронхах).

Поиск биомаркеров воспаления в субклинический период заболевания, ассоциированных с риском формирования клинически развернутой стадии болезни, может исходить из того, что у части курящих, без основного клинического признака ХОБЛ – ограничения скорости воздушного потока в бронхах, характеристики воспаления в бронхиальном регионе, инициированные табачным дымом, могут быть идентичны таковым при клинически выраженной болезни [6]. Макрофаги играют центральную роль в патофизиологии ХОБЛ [3,9].

Замечено увеличение в 5-10 раз количества макрофагов в дыхательных путях, легочной паренхиме, жидкости БАЛ и мокроте у пациентов с ХОБЛ. Анализ количества макрофагов в паренхиме легких при ХОБЛ по сравнению со здоровыми курильщиками показал 25-кратное повышение количества макрофагов в тканях и альвеолярном пространстве. Более того, макрофаги локализовались в участках деструкции альвеолярной стенки у пациентов с эмфиземой. Существует корреляция между количеством макрофагов в дыхательных путях и тяжестью ХОБЛ [1,4].

Известно, что макрофаги у больных ХОБЛ по своим морфофункциональным свойствам отличаются от макрофагов здоровых и курящих. Так, макрофаги больных ХОБЛ имеют большую эластолитическую активность, чем у здоровых [10]. Цитопроточным методом было установлено, что при ХОБЛ в индуцированной мокроте 45,7% макрофагов имеют малую величину. У здоровых «малые» макрофаги составляют 6,9 % всех макрофагов. Фенотипы малых и больших макрофагов различались по CD и HLA-DR маркерам [8]. Макрофаги имеют способность изменять фенотип их поверхности и функциональные свойства в ответ на экзогенный стимул и/или патологический процесс в легочной паренхиме.

Диагностика на раннем этапе болезни позволит выявлять среди курильщиков субъектов, которые эволюционируют к клинически выраженной стадии заболевания, проявляющейся ограничением скорости воздушного потока. Своевременная медицинская

помощь этим лицам предотвратит формирование ХОБЛ или, по крайней мере, замедлит её прогрессирование. Исходя из этого, **цель исследования** состояла в изучении возможности использования морфометрических характеристик макрофагов индуцированной мокроты в качестве диагностических маркеров ХОБЛ на ранней стадии болезни – до появления вентиляционных нарушений.

Материалы и методы исследования

Индуцированную мокроту получали после ингаляций 3-5 % стерильного раствора натрия хлорида через небулайзер. Не позднее, чем через 2 часа после забора мокроты проводилось её исследование.

Затем проводилось диспергирование и гомогенизация мокроты, для этой цели применялась инкубация мокроты с 1% раствором трипсина в термостате и её механическая гомогенизация. Затем клеточную суспензию отмывают в 0,9 % растворе натрия хлорида и центрифугируют. Из полученного осадка готовились мазки в количестве 3-4 от одного больного. Мазки окрашивали модифицированным методом Е.В. Пигаревского.

Определение морфометрических характеристик макрофагов.

В световом микроскопе при увеличении $\times 1000$ цифровой фотокамерой Sony DSC-S70, с максимальным разрешением производят фотографирование макрофагов в мазках индуцированной мокроты и периферической крови. После чего сканограмму импортируют в программу Adobe Photoshop. С помощью пакета программ Photoshop SC производят следующие действия:

1. Функцией «лассо» выделяли макрофаг.
2. В функции «гистограмма» считывают показатель площади клеток в пикселях.
3. Функцией «волшебная палочка» выделяли и измеряли его ядро в пикселях, затем его «удаляли».
4. Измеряли площадь цитоплазмы клетки в пикселях.
5. Переводили показатели, выраженные в пикселях в метрическую систему – в $\mu\text{км}^2$.

Заключение о морфометрических параметрах макрофагов представляли в виде средней величины и ошибки средней величины ($M \pm SD$), которые получали на основании морфометрии не менее 40 макрофагов. В обследование было включено 60 пациентов с диагнозом ХОБЛ. Диагноз ХОБЛ устанавливался согласно критериям GOLD (2003,2006). Контингент здоровых, в зависимости от ирритативного фактора представлен тремя группами обследуемых: здоровые, никогда некурящие мужчины ($n=20$, возраст 39–57 лет, средний возраст – $48,6 \pm 1,4$ лет), практически здоровые курящие с относительно коротким анамнезом курения 5-15 пачка/лет ($n=41$, возраст 20,0 – 53 года, средний возраст – $33,4 \pm 1,1$ лет), практически здоровые курящие с длительным анамнезом курения более 25 пачка/лет ($n=23$,

возраст 40 – 56 лет, средний возраст $47,2 \pm 0,6$ лет). Длительное курение у части пациентов последней группы инициировало развитие необструктивного хронического бронхита, проявляющегося непостоянным утренним кашлем с выделением слизистой мокроты в небольшом количестве (20 пациентов).

Условиям для включения в группу здоровых никогда не курящих были: отсутствие кашлевого анамнеза, бронхиальной астмы, бронхита, патологических изменений при обзорной рентгенографии легких, нормальные показатели функции внешнего дыхания по данным спирографии, отсутствие острых респираторных заболеваний в течение последних трех месяцев.

Условия включения в группы здоровых курящих были: анамнез курения, отсутствие бронхиальной астмы, других атопических заболеваний, отсутствие острых респираторных заболеваний в течение последних трех месяцев нормальные показатели функции внешнего дыхания по данным спирографии. Интенсивность курения оценивалась анамнезом курящего человека (пачка/лет: число выкуриваемых сигарет в сутки \times стаж курения (годы)/ 20).

В группу больных были включены 60 человек с диагнозом ХОБЛ вне обострения в возрасте от 41 до 70 лет, средний возраст $57,1 \pm 1,7$ года. Диагноз основывался на данных анамнеза, клинической картины заболевания (кашель, продукция мокроты, одышка, сухие хрипы, клинические признаки эмфиземы), показателях функции внешнего дыхания (ОФВ₁, индекс Тиффно). Средняя длительность заболевания составила $22,5 \pm 8,2$ года. По стадиям ХОБЛ согласно GOLD 2008, больные распределились следующим образом: II-я стадия – 8 человек, III-я стадия – 25, IV-я стадия – 27. Среднее значение ОФВ₁ для всех больных составило $37,1 \pm 4,8$ % к должным величинам. Среднее значение ОФВ₁ для больных со 2-ой стадией – $66,2 \pm 2,0$, с 3-ей стадией – $39,3 \pm 4,2$, с 4-ой стадией – $18,2 \pm 3,2$. Все пациенты с ХОБЛ либо продолжающие курить, либо бывшие курильщики. Интенсивность курения составляла от 20 до 100 пачек/лет. Средний индекс – $38,8 \pm 2,1$ пачек/лет, что позволяет отнести обследованных больных к категории злостных курильщиков. Весь контингент представлен мужчинами. На выполнение всех процедур было получено письменное согласие всех больных ХОБЛ и всех здоровых добровольцев.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета программ STATISTICA 8.0. Для сравнения групп показателей применялись непараметрические методы. Критическое значение уровня значимости принималось равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Средняя величина макрофагов в индуцированной мокроте при ХОБЛ, а также площадь цитоплазмы и ядра статистически значимо меньше по сравнению с группой здоровых некурящих и с группами курящих без ХОБЛ (табл. 1). Статистически значимых

различий по этим показателям между группами здоровых, никогда не курящих и курящих с различным стажем курения без ХОБЛ выявлено не было.

Таблица 1

Морфометрические показатели макрофагов индуцированной мокроты (M±SD)

Морфометрический показатель макрофагов (мкм ²)	Здоровые, никогда не курящие n=20	Здоровые курящие, 5-15, анамнез курения п /лет n=41	Здоровые курящие, анамнез курения более 25 п/лет n= 23	ХОБЛ n=60	p
	1	2	3	4	
Площадь клетки	477 ± 92	422 ± 91	435 ± 114	225 ± 81	p _{1,2,3-4} <0,0001 p _{1-2,3} > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05
Площадь цитоплазмы	375 ± 77	334 ± 62	335 ± 96	171 ± 63	p _{1,2,3-4} <0,0001 p _{1-2,3} > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05
Площадь ядра	102 ± 15	89 ± 14	100 ± 19	54 ± 18	p _{1,2,3-4} <0,0001 p _{1-2,3} > 0,05 p ₂₋₃ > 0,05

Из 60 пациентов с ХОБЛ средняя площадь макрофагов – 225 ± 81 мкм² встретилась в 52 случаях, что составило 86,7% от общего числа людей, включенных в исследование. У 20 здоровых обследованных никогда не курящих средняя величина этих клеток 225 ± 81 мкм² не была выявлена. У курящих, средняя площадь макрофага, соответствующая 225 ± 81 мкм² встретилась в 7 случаях, что составило 10,9% от общего числа обследуемых.

Для предлагаемого способа ранней диагностики ХОБЛ проведен анализ диагностической значимости предлагаемого диагностического теста (табл. 2). Как у некурящих, так и у курящих этот способ ранней диагностики ХОБЛ демонстрирует высокие показатели чувствительности, специфичности и прогностической значимости.

Таблица 2

Показатели значимости теста ранней диагностики ХОБЛ методом определения в индуцированной мокроте макрофагов, средняя величина которых 225 ± 81 мкм²

Показатели	Значения
Чувствительность	87%
Специфичность	89%
Положительное прогностическое значение	88%
Отрицательное прогностическое значение	88%
Значимость теста	7,9

Заключение

Таким образом, предлагаемый способ ранней диагностики ХОБЛ у курящих заключается в определение средней площади макрофагов в индуцированной мокроте. При величине этого показателя 225 ± 81 мкм² вероятность ранней стадии ХОБЛ составляет 88%.

Список литературы

1. Варвянская Н.В. Эффективность терапии обострений хронической обструктивной болезни легких и биомаркеры воспаления / Варвянская Н.В., Санжаровская М.С., Ямкина Н.С., Печеркина И.Н., Акбашева О.Е., Смотровая А.А., Будкова А.А., Рослякова Е.П., Черногорюк Г.Э. // Уральский медицинский журнал. – 2007. – № 8. – С. 17-20.
2. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких (пересмотр 2007 г.) /Пер. с англ. под ред. Чучалина А.Г. - М.: Издательский дом «Атмосфера», 2008. – 100 с.
3. Федосенко С.В. Характеристика нейтрофилов и макрофагов индуцированной мокроты больных хронической обструктивной болезнью легких на фоне базисной терапии / Федосенко С.В., Черногорюк Г.Э., Кириллова Н.А., Фисенко А.Ю., Рослякова Е.П. // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – Т. 10, № 6. – С. 52-56.
4. Черногорюк Г.Э. Клиническая эффективность кларитромицина (клабакса) при обострении хронической обструктивной болезни легких и его влияние на цитобиохимические маркеры воспаления / Черногорюк Г.Э., Смотровая А.А., Фисенко А.Ю., Акбашева О.Е., Климентьева Т.К., Рослякова Е.П., Михайлова А.А., Варвянская Н.В., Санжаровская Н.С., Кириллова Н.А., Федосенко С.В. // Практическая медицина. –2011. – № 3 (51). – С. 92-97.
5. Черногорюк Г.Э. Способ прогнозирования риска развития хронической обструктивной болезни легких у длительно курящих лиц / Черногорюк Г.Э., Смотровая А.А., Ямкина Н.С., Акбашева О.Е., Санжаровская М.С., Михайлова А.А., Рослякова Е.П., Печеркина И.Н., Антипов С.И., Варвянская Н.В. // Патент на изобретение RUS 2359618 16.04.2008 1
6. Черногорюк Г.Э., Михайлова А.А., Санжаровская М.С., Ямкина Н.С., Акбашева О.Е., Варвянская Н. В., Климентьева Т. К., Рослякова Е. П., Фисенко А. Ю. Факторы устойчивости части «злостных» курильщиков к развитию хронической обструктивной болезни легких // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 1; URL: www.science-education.ru/107-8536 (дата обращения: 20.12.2014).
7. Шмелев Е.И. Воспаление - ключевой элемент прогрессирования хронической обструктивной болезни легких // Consilium medicum. – 2003. – Т.7, – № 4. – С.5-7.

8. Frankenberger M. Characterization of a population of small macrophages in induced sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy volunteers / M. Frankenberger, M. Menzel, R. Betz, G. Kassner, N. Weber, M.Kohlhäufel, K.Häussinger, L. Ziegler-Heitbrock // *Clin. Exp.Immunol.* – 2004. – Vol. Dec; 138(3): – P.507-516.
9. Ollivier F.J. Evaluation of various compounds to inhibit activity of matrix metalloproteinases in the tear film of horses with ulcerative keratitis / F.J. Ollivier, D.E. Brooks, M.E. Kallberg, A.M. Komaromy, M.E. Lassaline // *Am. J. Vet. Res.* – 2003. – Vol. 64(9). – P.1081-1087.
10. Rubin B.K. Immunomodulatory activity and effectiveness of macrolides in chronic airway disease / BK Rubin, MO. Henke // *Chest.* – 2004. – Vol.125. – P.70-78.

Рецензенты:

Агеева Т.С., д.м.н., профессор, профессор кафедры пропедевтики внутренних болезней ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск;

Калюжина Е.В., д.м.н., профессор кафедры терапии ФПК и ППС ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Томск.