

УРОВЕНЬ TGF β В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОМ ЛАВАЖЕ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

Суркова Е.А., Кузубова Н.А., Сесь Т.П., Егорова Н.В.,
Тотолян Арег А.

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Резюме. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – хроническое заболевание, сопровождающееся прогрессирующей обструкцией и ремоделированием ткани легкого. Формирование ХОБЛ характеризуется развитием воспаления, нарушением протеазо/антипротеазного и оксидантно/антиоксидантного баланса, активацией процессов фиброобразования. TGF β – фактор роста, регулирующий процессы синтеза белков экстраклеточного матрикса, прежде всего, коллагена и фибронектина, один из основных факторов индукции фиброза в дыхательных путях. В данной работе проводили исследование уровня фактора роста TGF β в сыворотке и ЖБАЛ больных ХОБЛ в зависимости от тяжести течения заболевания. У всех больных ХОБЛ уровень TGF β в сыворотке крови достоверно ($p < 0,01$) превышал значения нормы и не зависел от тяжести заболевания. У 81% больных установлено повышение фагоцитарной активности моноцитов, что может быть причиной активации синтеза TGF β моноцитами крови. Уровень TGF β в ЖБАЛ достоверно ($p < 0,05$) увеличивался с нарастанием тяжести ХОБЛ и коррелировал с содержанием альвеолярных макрофагов ($r = 0,39$; $p = 0,03$). Полученные результаты свидетельствуют о влиянии TGF β на хемотаксис макрофагов и участие в процессе ремоделирования ткани легких не только как активатора процесса фиброобразования, но и фактора, влияющего на уровень металлопротеиназ в очаге воспаления у больных ХОБЛ. Следовательно, TGF β осуществляет взаимосвязь между двумя основными компонентами, лежащими в основе ремоделирования легочной ткани: фиброобразованием дыхательных путей и формированием эмфиземы при ХОБЛ.

Ключевые слова: TGF β , бронхоальвеолярный лаваж, хроническая обструктивная болезнь легких.

Surkova E.A., Kuzubova N.A., Ses' T.P., Egorova N.V., Totolian Areg A.

TRANSFORMING GROWTH FACTOR β IN BLOOD SERUM AND BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Abstract. Progressive obstruction and lung tissue remodeling comprise an important feature of the airways in COPD patients. The main processes involved in tissue remodeling in COPD are protease/antiprotease, oxidant/antioxidant imbalances, like as inflammatory and fibrotic events that contribute to development or progression of disease. TGF β is a multifunctional growth factor that regulates synthesis of extracellular matrix proteins, primarily collagen and fibronectin, thus inducing fibrosis of respiratory ways. The aim of our study was to determine levels of TGF β in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of COPD patients. All the patients with COPD had increased levels of TGF β in serum, as compared with subjects without COPD ($p < 0.01$), but there was no difference in TGF β concentration between patients at different stages of disease. Increased phagocytic activity of blood monocytes was found in 81% of COPD patients, as compared to controls. Phagocytosis of apoptotic

Адрес для переписки:

Суркова Елена Аркадьевна,
к.б.н., старший научный сотрудник
НМЦ по молекулярной медицине.

197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8,
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Тел.: (812) 234-90-39.

Тел./факс: (812) 499-71-94.

T-cells and bacterial infection of monocytes leads to increased secretion of TGF β and it may cause higher levels of TGF β in peripheral blood. TGF β concentration in BALF of patients at stage III of disease was higher than in the patients at stage II ($p < 0.05$). The level of TGF β in BALF directly correlates with number of alveolar macrophages ($r = 0.39$; $p = 0.03$). These data indicate that TGF β is involved in chemotaxis of macrophages in COPD patients' airways. We conclude that increased secretion of TGF β by peripheral blood monocytes may be a result of their high phagocytic activity. Hence, TGF β mediates interactions between the two main components underlying lung tissue remodeling, i.e. fibrosis of respiratory airways, and development of emphysema in COPD. (*Med. Immunol.*, 2008, vol. 10, N 1, pp 93-98)

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) характеризуется формированием хронического воспаления в дыхательных путях, образованием участков эмфиземы, изменением количества и состава экстраклеточного матрикса [11, 14]. Такие изменения выражены в большей степени в периферических отделах дыхательных путей и сопровождаются прогрессирующей обструкцией и ремоделированием ткани легкого.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе процесса ремоделирования легочной ткани при ХОБЛ, изучены недостаточно. Основное внимание исследователей уделяется процессам деструкции легочной ткани, являющейся результатом дисбаланса протеазо/антипротеазной и оксидантно/антиоксидантной систем [17, 21]. Исследования, посвященные процессам репарации/фиброзирования мелких дыхательных путей и легочной паренхимы, представлены в значительно меньшей степени, несмотря на то, что роль этих процессов в формировании и развитии заболевания высока [7, 21]. Возникающие структурные изменения ткани легкого являются результатом хронического воспалительного процесса, действия протеаз и факторов роста, индуцирующих пролиферацию и фиброз.

Трансформирующий фактор роста (TGF β) – мультифункциональный фактор роста, регулирующий процессы пролиферации, дифференциации и миграции клеток, а также ангиогенез и ремоделирование эндоплазматического ретикула посредством влияния на синтез белков экстраклеточного матрикса, прежде всего, коллагена и фибронектина. Его рассматривают как один из основных факторов индукции фиброза в дыхательных путях. TGF β индуцирует хемотаксис целого ряда клеток, в том числе макрофагов, Т-лимфоцитов [5, 24] и синтезируется во многих тканях, включая ткань легких. Данные о роли TGF β в патогенезе больных ХОБЛ малочисленны и противоречивы [6, 8, 20].

Целью данной работы явилось исследование уровня TGF β в сыворотке и жидкости бронхоальвеолярного (ЖБАЛ) больных ХОБЛ в зависимости от тяжести течения заболевания.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 35 пациентов в возрасте от 47 до 73 лет (средний возраст $60,2 \pm 7,8$ лет), проходившие стационарное лечение в НИИ пульмонологии. Обследование проводилось 2 раза с интервалом 3 месяца. Диагноз ХОБЛ был поставлен в соответствии с диагностическими критериями Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD, 2006) [12]. У 8 больных была установлена 2 стадия, у 27 больных – 3 стадия ХОБЛ. Больные были обследованы в фазу ремиссии заболевания, которая диагностировалась при отсутствии следующих клинических критериев: повышения температуры тела, усиления кашля и одышки, увеличения количества мокроты, изменения числа лейкоцитов и лейкоцитарной формулы, увеличения СОЭ.

В качестве материала исследования использовали сыворотку крови и ЖБАЛ. Последнюю получали при бронхоскопии, центрифугировали в течение 10 мин при 800g, надосадочную жидкость разливали на аликвоты и хранили при -20°C . Уровень TGF β в сыворотке и ЖБАЛ определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем фирмы DRG (США). Показатели оптической плотности образцов измеряли на фотометре «ELM-3000» (США) при длине волны 450 нм. В качестве контрольных значений содержания TGF β в сыворотке крови и ЖБАЛ были использованы данные литературы [9, 22]. Определение фагоцитарной активности моноцитов крови проводили по методу Шмелева Е.И. [4], характеризуя их поглотительную способность по степени захватывания частиц латекса. Фагоцитарную активность моноцитов оценивали по двум показателям: фагоцитарному числу – проценту фагоцитирующих клеток; фагоцитарному индексу – среднему числу частиц латекса, поглощенных одной клеткой. Фагоцитарную активность моноцитов считали повышенной при превышении по сравнению с нормальными значениями одного или двух указанных показателей.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью прикладных программ

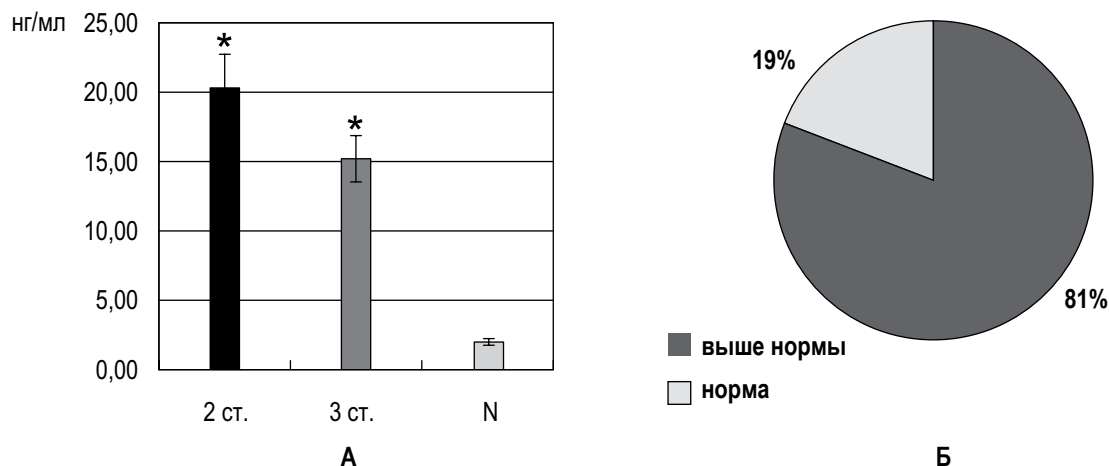


Рисунок 1. Уровень TGF β в сыворотке крови больных ХОБЛ (А) и фагоцитарная активность моноцитов крови (Б)

Примечание: * – достоверные различия по сравнению с нормой при $p < 0,005$.

«Statistica» и «Biostatistica». Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента и непараметрическому критерию Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Исследование содержания TGF β в сыворотке крови больных ХОБЛ показало значительное увеличение его уровня по сравнению с нормой у всех обследованных больных независимо от тяжести течения заболевания (рис. 1А). По данным литературы, синтез TGF β макрофагами и моноцитами усиливается при активации этих клеток [10, 13]. Одной из возможных причин активации моноцитов периферической крови больных ХОБЛ является усиление их фагоцитарной активности. В нашем исследовании определение активности фагоцитоза моноцитов показало, что у 81% обследованных больных отмечались повышенные значения фагоцитарного числа, фагоцитарного индекса моноцитов или обоих этих показателей одновременно (рис. 1Б). Известно, что ХОБЛ характеризуется активацией процесса апоптоза Т-лимфоцитов в дыхательных путях [18]. Таким образом, усиление фагоцитоза в период клинической ремиссии может быть обусловлено захватом и перевариванием моноцитами клеток, подвергнувшихся апоптозу. Миграция лимфоцитов не только из кровяного русла в очаг воспаления, но и из дыхательных путей в кровь приводит к увеличению фагоцитарной активности моноцитов крови не только за счет поглощения ими Т-лимфоцитов крови, но и за счет усиленного поступления в кровяное русло Т-лимфоцитов, подвергнувшихся апоптозу непосредственно в очаге воспаления [13]. В то же время в крови

больных ХОБЛ отмечается не только увеличение продукции TGF β моноцитами, но и увеличение экспрессии рецепторов к TGF β на поверхности Т-лимфоцитов (TGFR), что свидетельствует о возможном влиянии TGF β на активность, хемотаксис и апоптоз Т-лимфоцитов [13]. Таким образом, увеличение уровня TGF β в крови больных ХОБЛ, в свою очередь, может усиливать апоптоз Т-лимфоцитов периферической крови, приводя к нарушению гомеостаза.

Другой возможной причиной активации фагоцитоза является наличие бактериальной инфекции. Для ХОБЛ характерно достаточно частое выявление вирусной и/или бактериальной инфекции не только в период обострения заболевания, но и в фазу ремиссии, что связано с невозможностью полной эрадикации возбудителя при хроническом процессе [1, 3]. Ранее мы показали [2], что у обследованных нами больных ХОБЛ респираторные патогены обнаружены в более чем 80% проб бронхиального содержимого. Бактериальный спектр представлен, прежде всего, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, в единичных случаях – *S. aureus*. Ведущими вирусными агентами были РС- и аденовирусы. С меньшей частотой выявлялась *M. pneumoniae*. Примерно в половине исследований зарегистрированы вирусно-бактериальные ассоциации. С другой стороны, повышенная чувствительность больных ХОБЛ к инфекции может быть связана с высоким уровнем TGF β , снижающим активность иммунной системы [15].

Однако, независимо от причины, установленное нами значительное увеличение содержания TGF β в сыворотке крови больных ХОБЛ уже

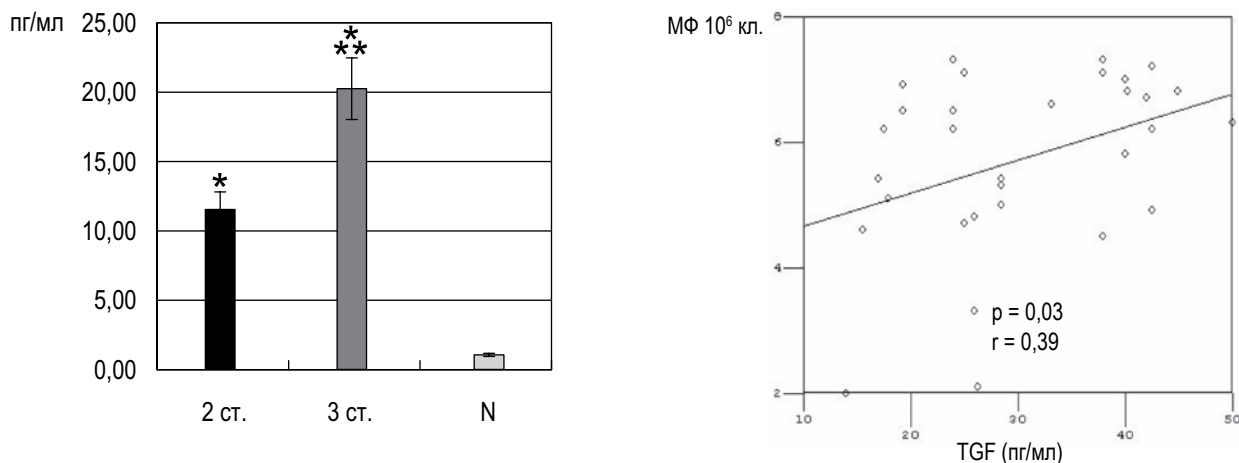


Рисунок 2. Уровень TGFβ (А) и корреляционная зависимость содержания макрофагов и TGFβ в ЖБАЛ больных ХОБЛ (Б)

Примечания: * – достоверные различия по сравнению с нормой при $p < 0,005$; ** – достоверные различия между группами больных при $p < 0,05$.

на ранних этапах заболевания может приводить к системным изменениям, в частности являться одной из причин формирования легочной гипертензии [23], часто наблюдаемой у этих пациентов.

Исследование содержания TGFβ в ЖБАЛ показало более высокий ($p < 0,005$) его уровень у больных ХОБЛ по сравнению с нормой, который достоверно ($p < 0,05$) возрастал с нарастанием степени тяжести заболевания (рис. 2А), что связано, по-видимому, с увеличением его синтеза непосредственно в очаге воспаления. По данным литературы, усиление экспрессии TGFβ мРНК у курящих и больных ХОБЛ установлено в бронхиальном эпителии, альвеолярных макрофагах, клетках гладкой мускулатуры [22, 24]. При этом интенсивность экспрессии нарастала с увеличением длительности курения и усилением степени обструкции дыхательных путей [22]. Нами не установлена корреляция между содержанием TGFβ в ЖБАЛ и в сыворотке крови больных ХОБЛ ($p = 0,84$; $r = 0,04$), что свидетельствует о независимом синтезе TGFβ в клетках периферической крови и ткани легкого и указывает на важность использования ЖБАЛ для оценки активности воспалительного процесса у больных ХОБЛ непосредственно в легочной ткани. Уровень TGFβ в очаге воспаления у обследованных нами пациентов положительно коррелировал с содержанием макрофагов в ЖБАЛ ($r = 0,39$; $p = 0,03$) (рис. 2Б). Такая корреляция с содержанием нейтрофилов в ЖБАЛ не обнаружена. Полученные результаты подтверждают гипотезу о влиянии TGFβ на хемотаксис макрофагов [7]. Увеличение числа макрофагов в очаге воспаления приводит к значительному нарастанию содержания метал-

лопротеиназ, в первую очередь, MMP9 и MMP12, действие которых, наряду с сериновыми протеазами нейтрофилов, приводит к эмфизематозным изменениям легочной ткани. С другой стороны, MMP9 индуцирует протеолиз латентной формы TGFβ, способствуя образованию активного TGFβ из неактивного предшественника, и тем самым способствует усилению процессов фиброобразования в легочной ткани. Такой механизм может представлять возможную взаимосвязь между двумя основными компонентами, лежащими в основе ремоделирования легочной ткани: фиброобразованием дыхательных путей и формированием эмфиземы при ХОБЛ. Результатом этих событий является структурная перестройка легочной ткани. От преобладания того или иного механизма у больного в конкретном участке легочной ткани будет зависеть направление ремоделирования, то есть развитие фиброобразования или эмфиземы. Следовательно, TGFβ можно рассматривать как один из ключевых факторов, вовлеченных в процесс перестройки легких при ХОБЛ.

TGFβ, наряду с другими регуляторными факторами, участвует в поддержании структурной и функциональной целостности легкого. В этой связи важно отметить двухфазную природу биологических эффектов TGFβ, зависящую от его концентрации и присутствия других факторов. Так, показано, что в системе *in vitro* TGFβ оказывал иммуносупрессивный эффект в пикомолярных концентрациях, в то время как в фемтомолярных концентрациях TGFβ усиливал гуморальный иммунный ответ [16], а также ингибировал ангиогенез при концентрациях в нг/мл и усиливал его при концентрациях в пг/мл [19].

Следовательно, установленное нами нарастание уровня TGF β в очаге воспаления приводит к качественным изменениям в структуре легочной ткани, что способствует прогрессированию необратимой обструкции, а следовательно, и степени тяжести ХОБЛ.

Таким образом, трансформирующий фактор роста TGF β следует рассматривать как один из ключевых цитокинов, участвующий в формировании и прогрессировании ХОБЛ, оценка уровня которого необходима для характеристики активности воспалительного процесса, степени повреждения легочной паренхимы и ремоделирования легочной ткани у этой категории больных.

Список литературы

1. Авдеев С.Н. Обострение ХОБЛ: значение инфекционного фактора и антибактериальная терапия // РМЖ. – 2003. – № 22. – С. 1205-1211.
2. Суркова Е.А., Кузубова Н.А., Сесь Т.П., Сологуб Т.С., Резцова Ю.В., Яковлева Н.В., Егорова Н.В. Дисбаланс цитокинов IL-1 β и IL-1 α в сыворотке крови и жидкости бронхоальвеолярного лаважа у больных ХОБЛ // Медицинская иммунология. – 2006. – № 5-6. – С. 667-672.
3. Шмелев Е.И. Хроническая обструктивная болезнь легких. – Москва, 2003. – 112 с.
4. Шмелев Е.И., Бумагина Р.К., Мизарева Ю.Т. Феномен антигенспецифической супрессивной функциональной активности нейтрофилов периферической крови у больных хроническим бронхитом и абсцессом легкого // Иммунология. – 1981. – № 3. – С. 61-64.
5. Adams D., Hathaway M., Shaw J., Burnett D. Transforming Growth factor β induces human T-lymphocyte migration in vitro // J. Immunol. – 1991. – Vol. 147. – P. 609-612.
6. Barnes P. Mediators of Chronic Obstructive Pulmonary Disease // Pharmacol. Rev. – 2004. – Vol. 56. – P. 515-548.
7. Boer W., Schadewijk A., Sont J., Sharma H. Transforming Growth factor β and recruitment of macrophage and mast cells in airways in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 1998. – Vol. 158. – P. 1951-1957.
8. Camoretti-Mercado B., Solway J. Transforming Growth factor β 1 and disorders of the lung // Cell Biochem. Biophys. – 2005. – Vol. 43. – P. 131-148.
9. Domogata-Kulawic J., Hoser G., Safianovska A., Gruberg-Jaworska H., Chasan R. Elevated TGF β 1 concentration in bronchoalveolar lavage fluid from patients with primary lung cancer // Arch. Immunol. Ther. Exp. – 2006. – Vol. 54. – P. 143-147.
10. Fadok V., Bratton D., Konowal A., Freed P., Westcott J., Henson P. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2 and PAF // J. Clin. Invest. – 1998. – Vol. 101. – P. 890-898.
11. Finlay G., O'Donnell M.D., O'Conner C.M., Hayes J., FitzGerald M. Elastin and collagen remodeling in emphysema: a scanning electron microscopy study // Am. J. Pathol. – 1996. – Vol. 149. – P. 1405-1415.
12. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the Diagnostic, Management and prevention of COPD. NHLBI/WHO workshop report. Bethesda, National heart, Lung and Blood Institute. update.2006. <http://www.goldcopd.com>.
13. Hodge S., Hodge G., Reynolds P., Scicchitano R., Holmes M. Increased production of TGF β and apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood in COPD // Am. J. Physiol. Lung. – 2003. – Vol. 285. – P. 492-499.
14. Lang M., Fiaux G., Gillyooly M. Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and non-emphysematous lungs // Thorax. – 1994. – Vol. 49. – P. 319-326.
15. Lee H., Rich S., Differential activation of CD8⁺ T-cells by Transforming Growth factor β // J. Immunol. – 1993. – Vol. 151. – P. 668-677.
16. McKarns S., Letterio J., Kaminski N. Concentration-dependent bifunctional effect of TGF-beta 1 on immunoglobulin production: a role Smad3 in IgA production in vitro // Int. Immunofarmacol. – 2003. – Vol. 3. – P. 1761-1774.
17. Mac Nee W. Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease // Proc. Am. Thorac. Soc. – 2005. – Vol. 2. – P. 258-266.
18. Majo J., Ghezzi H., Cosio M. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema // Eur. Resp. J. – 2001. – Vol. 17. – P. 945-953.
19. Pepper M., Vassalli J., Orci L., Montesano R. Biphasic effect of Transforming Growth factor β 1 on in vitro angiogenesis // Exp. Cell Res. – 1993. – Vol. 204. – P. 356-363.
20. Pons A., Sauleda J., Noguera A., Pons J. Decreased macrophage release of TGF- β and TIMP-1 in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // Eur. Resp. J. – 2005. – Vol. 26. – P. 60-66.
21. Shapiro S., Ingenito E. The pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: advances in the past 100 years // Am. J. Resp. Cell Moll. Biol. – 2005. – Vol. 32. – P. 367-372.

22. Takizawa H., Tanaka M., Takami K., Ohtoshi T., Ito K., Saton M. Increased expression of Transforming Growth factor β 1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2001. — Vol. 163. — P. 1476-1483.

23. Voelkin N., Tuder R. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension // Eur. Resp. J. — 1995. — Vol. 8. — P. 2129-2138.

24. Wahl S., Hunt D., Wakefield L., McCatney-Francis N. Transforming Growth factor type β induced monocyte chemotaxis and growth factor production // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1987. — Vol. 84. — P. 5788-5792.

поступила в редакцию 07.09.2007

отправлена на доработку 28.09.2007

принята к печати 29.12.2007