

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОЙ ЛАВАЖНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

О. П. МАКАРОВА^{1,2}, Л. Н. ШИШКИНА³, А. П. ОГИРЕНКО⁴

INVESTIGATION OF THE PROINFLAMMATORY ACTIVITY OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUID IN LUNG CANCER AND INFLAMMATORY DISEASES OF RESPIRATORY ORGANS

O. P. MAKAROVA^{1,2}, L. N. SHISHKINA³, A. P. OGIRENKO⁴

¹ФБГУ Институт клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН,

²ФБГУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, г. Новосибирск,

³НИИ аэриологии ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово Новосибирской области,

⁴Городская клиническая специализированная туберкулезная больница № 1, г. Новосибирск

У 71 пациента с раком легкого и воспалительными заболеваниями органов дыхания (абсцесс легкого, инфильтративный туберкулез, туберкулема, фиброзно-кавернозный туберкулез) исследовали провоспалительную активность бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) при использовании биологической тест-системы – донорской крови. Супернатант БАЛЖ очищали фильтрацией через миллипоры, добавляли к крови и ставили тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест). В контроле применяли сбалансированный солевой раствор Хэнкса. Провоспалительный эффект БАЛЖ определяли как соотношение содержания диформазан-положительных нейтрофилов в опытной и контрольной пробе (индекс стимуляции). Воспалительный процесс, развивающийся при раке легкого, носил активный характер, о чем свидетельствовали накопление нейтрофилов в легких и высокая провоспалительная активность БАЛЖ, сравнимые с аналогичными показателями при абсцессе легкого и фиброзно-кавернозном туберкулезе.

Ключевые слова: рак легкого, воспалительные заболевания органов дыхания, бронхоальвеолярная лаважная жидкость.

The proinflammatory activity of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was investigated using the biological test system (donor blood) in 71 patients with lung cancer and inflammatory disease of respiratory organs (lung abscess, infiltrative tuberculosis, tuberculoma, fibrocavernous tuberculosis). The supernatant of BALF was purified by filtration through millipores and added to blood, and a nitroblue tetrazolium recovery test (HBT) was carried out. Hank's balanced salt solution was used in the control. The proinflammatory effect of BALF was defined as a diformazan-positive neutrophil count ratio in the experimental and control samples (stimulation index). The inflammatory process developing in lung cancer was active, as suggested by the accumulation of neutrophils in the lung and by the high proinflammatory activity of BALF, which were comparable with the similar indicators in lung abscess and fibrocavernous tuberculosis.

Key words: lung cancer, inflammatory diseases of respiratory diseases, bronchoalveolar lavage fluid.

До недавнего времени основной массив исследований был посвящен генетическим изменениям в организме, считавшимся главной движущей силой канцерогенеза. В опухолях легких, индуцированных курением, регистрировали мутации, связанные с онкогенами p53 и Kras, а в большинстве случаев, не ассоциированных с курением, аденокарцином – повышенную экспрессию эпидермального фактора роста [10]. За последние годы ситуация изменилась. Появились данные о том, что в прогрессировании рака легких не менее важную роль играет воспалительная реакция [9]. На экспериментальной модели хронической обструктивной болезни легких, индуцированной колонизацией нетипичной формы *Haemophilus influenzae* в дыхательных путях мышей, показано, что воспаление может способствовать развитию рака легкого и в отсутствие канцерогенных агентов,

таких как специфичные канцерогены табака [7]. Ключевую роль в развитии опухолюассоциированного воспалительного процесса в легких, который поддерживает пролиферацию клеток в легких и прогрессирование рака, играют макрофаги [6] и нейтрофилы. Продуценты фагоцитов работают в различных механизмах неопластического процесса в легких, начиная со стимуляции роста, инвазии и диссеминации, поддержки ангио- и лимфангиогенеза до иммуносупрессии [8]. Опухолевые клетки продуцируют спектр противовоспалительных медиаторов – интерлейкин-4, -10, трансформирующий фактор роста β_1 , простагландин E_2 [11], способных модифицировать функциональное состояние фагоцитов и активность воспалительного процесса, ассоциированного с опухолью. В связи с этим представляется важным выяснить уровень активности воспалительного процесса, сочетан-

ного с раком легкого. Оценка активности воспаления, развивающегося в присутствии опухоли, может представлять интерес для разработки новых подходов к противоопухолевой терапии, направленных на модификацию функций фагоцитов. В результате сложных взаимоотношений между эффекторными клетками в зоне хронического воспалительного процесса макрофаги могут выделять хемотаксические для нейтрофилов факторы, включая лейкотриен B_4 , компонент комплемента 5a, тромбоцитактивирующий фактор, спектр хемокинов [2]. Цель исследования – сравнительное изучение общего провоспалительного потенциала и клеточного состава бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) при раке легкого и воспалительных заболеваниях органов дыхания.

Материалы и методы

Обследован 71 больной с разной патологией легких. У 12 больных был рак легкого (плоскоклеточный неороговевающий рак, аденокарцинома, мелкоклеточный рак – III стадия), у 19 – острый абсцесс, у 40 – различные формы туберкулеза (фиброзно-кавернозный, инфильтративный, туберкулемы). В первые дни после поступления в клинику до назначения терапевтических мероприятий им проведена диагностика заболевания с помощью клинко-лабораторного и инструментального обследования, включающего бронхоскопию с бронхоальвеолярным лаважем. У всех больных туберкулезом при бронхоскопии определялся неспецифический эндобронхит (НЭ). При процедуре бронхоальвеолярного лаважа использовали фибробронхоскоп. Для инстилляций применяли стерильный теплый (37°C) изотонический раствор хлорида натрия. Через катетер дробно по 50 мл вводили 100 мл стерильного теплого (37°C) физиологического раствора с последующей немедленной аспирацией. БАЛЖ фильтровали через два слоя марли и центрифугировали при 2 500 об./мин, $2-4^{\circ}\text{C}$ 15 мин на центрифуге ОС-6. Супернатант последовательно фильтровали через миллипоровые фильтры («Millipore», США) с диаметром пор 45 и 22 мкм для удаления клеточного дебриса и бактерий. Для тестирования стерильный фильтрат добавляли к донорской крови здоровых людей и ставили НСТ-тест по методу Park в модификации [3]. В контроле в инкубационную среду вносили аналогичный объем сбалансированного солевого раствора Хэнкса. Провоспалительный эффект БАЛЖ оценивали по отношению процента диформаза-позитивных нейтрофилов в опытной и контрольной пробе (по индексу стимуляции – ИС).

Клеточный осадок, полученный после центрифугирования БАЛЖ больных, ресуспендировали в 1 мл среды 199 с 20% телячьей сыворотки. Общее количество клеток подсчитывали в камере

Горяева. Жизнеспособность клеток оценивали по включению 0,1% трипанового синего. Готовили цитологические препараты, окрашивали по методу Паппенгейма и подсчитывали процент клеточных элементов, просматривая 100 клеток под световым микроскопом «Orthoplan» (Германия) при увеличении 1 000 (иммерсия). При этом в эндопульмональную цитограмму не включали эритроциты. Полученные результаты подвергали общепринятым методам вариационной статистики с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни [4].

Результаты

Согласно результатам ранее проведенных исследований, при низкой активности воспалительного процесса в легких БАЛЖ подавляла способность донорских лейкоцитов продуцировать реактивные метаболиты кислорода ($\text{ИС} \leq 1,0$), при умеренной активности стимулировала до 1,5 раза ($1,0 < \text{ИС} \leq 1,5$), а при высокой – свыше 1,5 раза ($\text{ИС} > 1,5$) [1].

При неопластическом процессе легких БАЛЖ больных обладала высокой флогогенной активностью и в среднем в 1,69 раза усиливала продукцию реактивных метаболитов кислорода донорскими нейтрофилами так же, как и у больных с абсцессом легкого и различными формами туберкулеза легких, сопровождающихся НЭ (рис. 1). Однако при туберкулезе легких и при абсцессе легкого встречались больные, у которых БАЛЖ не только не стимулировала активность донорских лейкоцитов в НСТ-тесте, но и, напротив, подавляла.

У 70% обследованных больных с раком легкого БАЛЖ обладала высокой провоспалитель-

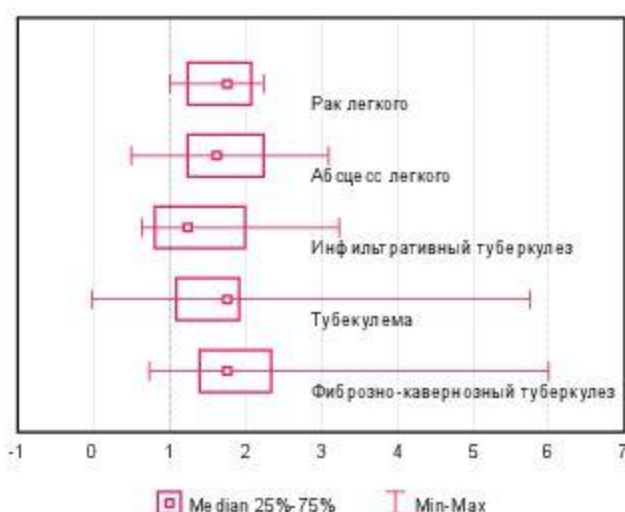


Рис. 1. Показатели провоспалительной активности БАЛЖ, определяемой по индексу стимуляции, у больных при раке легкого и обострении хронических воспалительных заболеваний органов дыхания

ной активностью, у остальных 30% – умеренной, т. е. стимулировала продукцию реактивных метаболитов донорскими лейкоцитами до 1,5 раза ($1,0 < \text{ИС} < 1,5$) (рис. 2). При абсцессе легкого встречаемость лиц с высоким флогогенным потенциалом БАЛЖ составляла 50%, с умеренной активностью – 45% и с низкой – 5%. При туберкулезном процессе легких с НЭ общая провоспалительная активность БАЛЖ чаще всего соответствовала тяжести заболевания. У всех больных при бронхоскопическом исследовании выявили гнойный распространенный эндобронхит с ярковыраженными явлениями воспаления слизистой оболочки, что повлияло на активность обострения туберкулезного процесса. Однако среди этих больных встречались лица, БАЛЖ которых практически не стимулировала лейкоциты в НСТ-тесте. Более того, в отдельных случаях наблюдали не повышение, а, напротив, снижение показателей НСТ-теста. Доля лиц с низкой флогогенной активностью БАЛЖ ($\text{ИС} < 1,0$) среди больных инфильтративным туберкулезом составила более 45% (5 из 11), при туберкулезе – 21% (3/15), а при фиброзно-кавернозном туберкулезе – 8% (1/14).

Цитологические показатели БАЛЖ обследованных больных свидетельствовали об остроте воспалительной реакции. Хотя общая численность клеток в БАЛЖ больных раком легкого находилась в пределах нормы, но основную долю (69%) клеток составляли нейтрофилы (табл.). Только у одного больного нейтрофилы БАЛЖ составляли 10%, у остальных их доля колебалась от 39 до 98%. У практически здоровых некурящих людей в БАЛЖ находят единичные нейтрофилы. За «норму» в данном исследовании приняты цитологические показатели БАЛЖ здоровых лиц, полученные Л. К. Романовой и др. [5]. Высокая

флогогенная активность БАЛЖ и отсутствие роста общего числа клеток, вероятно, связаны с торможением работы костного мозга, вызванным дефицитом пластических веществ, которые поглощает для своего роста опухоль. Абсолютное количество нейтрофилов в БАЛЖ больных раком легкого превысило норму в 76 раз. Второй по численности популяцией клеток были альвеолярные макрофаги, их доля составляла в среднем 13%. Содержание лимфоцитов и эозинофилов у больных раком легкого оказалось близким к норме (табл.). Третьей по численности в цитограмме БАЛЖ была популяция клеток бронхиального эпителия, на их долю приходилось до 14,5% (табл.). Большинство эпителиоцитов окрашивалось трипановым синим, что указывало на их нежизнеспособность.

При абсцессе легкого высокая флогогенная активность БАЛЖ сочеталась с повышенным общим количеством клеток, основную массу которых также составляли нейтрофилы. Накопление нейтрофилов в воздухоносных путях больных с абсцессом легкого сопровождалось значительным снижением числа альвеолярных макрофагов в БАЛЖ (табл.). У 3 больных макрофаги полностью отсутствовали, у 10 – их содержание не превышало 10%, в остальных случаях составляли половину всех клеток. У небольшой части больных основную долю клеток (40-99%) в БАЛЖ представляли не фагоциты, а клетки бронхиального эпителия. В остальных случаях эпителиоциты представлены от 1 до 20%. Содержание лимфоцитов в цитограмме большинства больных находилось в пределах нормы (табл.). Почти у всех больных с абсцессом легкого в БАЛЖ отсутствовали эозинофилы.

При туберкулезном процессе общая численность клеток и нейтрофилов в БАЛЖ определялась тяжестью заболевания и наличием НЭ.

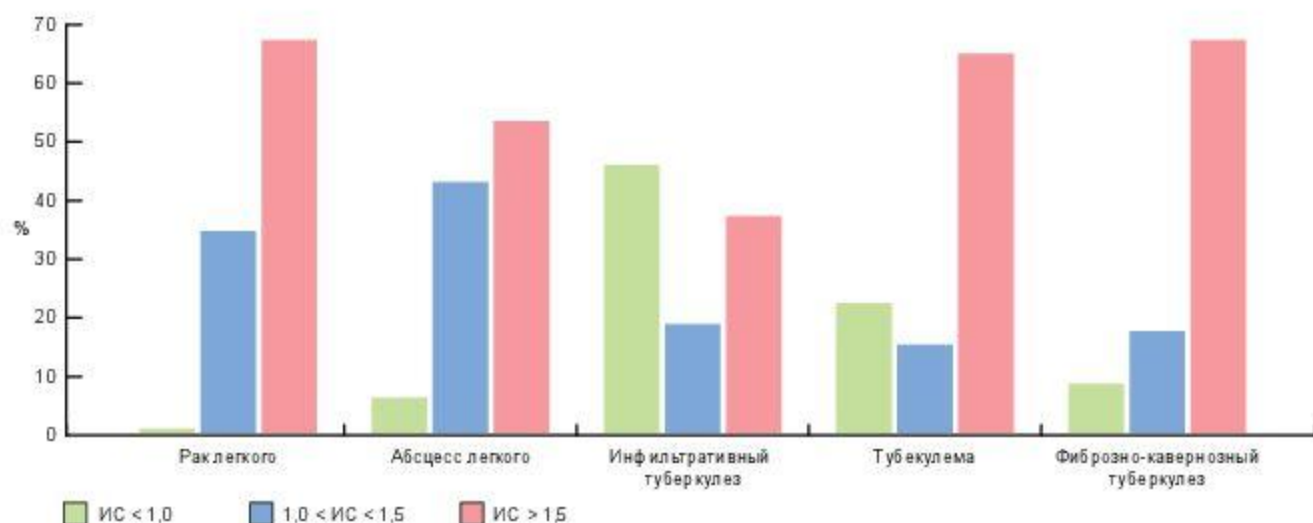


Рис. 2. Частота встречаемости различных вариантов провоспалительной активности БАЛЖ у больных при раке легкого и обострении хронических воспалительных заболеваний органов дыхания

Абсолютное и относительное содержание клеток в БАЛЖ больных при обострении вторичного туберкулеза легких ($M \pm m$)

Группы обследованных больных	n	Общее число клеток $10^5/\text{мл}$	Нейтрофилы	Альвеолярные макрофаги	Лимфоциты	Эозинофилы	Клетки эпителия
Норма % $\times 10^5/\text{мл}$	9	$2,6 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,3$ $0,03 \pm 0,01$	$92,4 \pm 1,3$ $2,41 \pm 0,50$	$5,8 \pm 1,2$ $0,28 \pm 0,06$	$0,5 \pm 0,1$ $0,010 \pm 0,004$	—
Рак легкого % $\times 10^5/\text{мл}$	12	$3,99 \pm 1,62$	$69,0 \pm 15,1^{***}$ $2,29 \pm 1,11^*$	$13,00 \pm 6,83^{***}$ $0,44 \pm 0,32$	$2,33 \pm 1,96$ $0,2 \pm 0,2$	$1,16 \pm 1,16$ $0,002 \pm 0,002$	$14,50 \pm 9,25$ $1,06 \pm 0,65$
Абсцесс легкого % $\times 10^5/\text{мл}$	19	$11,10 \pm 5,29^*$	$54,90 \pm 8,64^{***}$ $9,02 \pm 5,39$	$17,30 \pm 4,97^{***}$ $1,19 \pm 0,37^{**}$	$5,94 \pm 1,56$ $0,37 \pm 0,15$	$0,39 \pm 0,27$ $0,004 \pm 0,003$	$21,30 \pm 7,29$ $0,65 \pm 0,18$
ТБ инфильтративный % $\times 10^5/\text{мл}$	11	$1,46 \pm 0,35$	$47,6 \pm 12,1^{***}$ $0,92 \pm 0,41^*$	$22,10 \pm 7,13^{***}$ $0,19 \pm 0,12^{**}$	$2,86 \pm 1,58$ $0,002 \pm 0,001^{***}$	$0,57 \pm 0,37$ $0,0007 \pm 0,0005^*$	$36,00 \pm 14,68$ $0,33 \pm 0,25$
Туберкулема % $\times 10^5/\text{мл}$	15	$5,10 \pm 1,39^*$	$67,20 \pm 6,02^{***}$ $3,96 \pm 1,23^{**}$	$19,5 \pm 4,73^{***}$ $0,92 \pm 0,43^*$	$3,73 \pm 2,03$ $0,04 \pm 0,028^{**}$	$0,33 \pm 0,23$ $0,0060 \pm 0,0005^*$	$9,93 \pm 3,50$ $0,21 \pm 0,08$
ФКТ % $\times 10^5/\text{мл}$	14	$6,42 \pm 2,15^*$	$68,00 \pm 6,24^{***}$ $5,54 \pm 2,09^*$	$15,10 \pm 3,34^{***}$ $0,35 \pm 0,13^{***}$	$3,21 \pm 1,31$ $0,08 \pm 0,04^{**}$	$0,86 \pm 0,32$ $0,0020 \pm 0,0006$	$12,90 \pm 5,31$ $0,46 \pm 0,23$

Примечание: n – число случаев; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по сравнению с нормой.

Наибольшее количество клеток в БАЛЖ обнаруживалось при фиброзно-кавернозном туберкулезе – $6,44 \pm 2,11 \times 10^5/\text{мл}$. Немного меньше было содержание клеток в БАЛЖ при туберкулезе – $5,23 \pm 1,48 \times 10^5/\text{мл}$. Наименьшее число клеток присутствовало в БАЛЖ при инфильтративном туберкулезе – $1,46 \pm 0,35 \times 10^5/\text{мл}$. Накопление клеток в дыхательных путях происходило за счет нейтрофилов (табл.). Самый высокий процент этих клеток встречался в цитограмме больных фиброзно-кавернозным туберкулезом. Самое высокое содержание нейтрофилов выявляли при фиброзно-кавернозном туберкулезе, а наименьшее – при инфильтративном. Самое низкое содержание альвеолярных макрофагов в БАЛЖ находили у лиц с инфильтративным туберкулезом. Численность лимфоцитов и эозинофилов в БАЛЖ больных с различными формами туберкулеза с НЭ не превышала нормы (табл.). Второй по численности популяцией клеток, обнаруживаемой в БАЛЖ больных туберкулезом, были альвеолярные макрофаги (табл.). Больше всего альвеолярных макрофагов находили у больных с туберкулемами и инфильтративным туберкулезом. Наименьшее количество макрофагов встречалось в цитограмме больных фиброзно-кавернозным туберкулезом.

Обсуждение

Результаты наших исследований показали, что неопластический процесс в легких у обследованных больных сопровождался развитием воспалительного процесса с высокой активностью. Об этом свидетельствовали накопление нейтрофильных лейкоцитов в дыхательных путях у большинства обследованных больных и высокая общая провоспалительная активность БАЛЖ.

Заключение

Таким образом, оценка цитологического состава и общей провоспалительной активности БАЛЖ позволяет объективно определять уровень инфильтрации лейкоцитами пораженного органа и их возможности в проявлении деструктивного потенциала, которые можно отнести к основным критериям остроты воспалительной реакции. Накопление нейтрофилов в дыхательных путях больных раком легкого в сочетании с высокой общей провоспалительной активностью БАЛЖ свидетельствовало о развитии воспалительного процесса, активность которого была сравнима с активностью при различных формах туберкулеза с НЭ и абсцесса легких.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маянский Д. Н., Макарова О. П., Шинкина Л. Н. и др. Провоспалительная активность бронхоальвеолярной лаважной жидкости при обострении хронических заболеваний легких // Пульмонология. – 1998. – № 4. – С. 44–55.
2. Маянский Д. Н., Урсов И. Г. Лекции по клинической патологии. – Новосибирск, 1997.
3. Маянский Д. Н., Щербяков В. И., Макарова О. П. Комплексная оценка функций фагоцитов при воспалительных заболеваниях // Метод. реком. Министерство здравоохранения РСФСР. – Новосибирск, 1985. – 17 с.
4. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
5. Романова Л. К., Овчаренко С. И., Младковская Т. Б. и др. Особенности клеточных реакций в легких во время обострения бронхиальной астмы // Пульмонология. – 1992. – № 1. – С. 20–26.
6. Balli D., Ren X., Chou F. S. et al. Foxm1 transcription factor is required for macrophage migration during lung inflammation and tumor formation // Oncogene. – 2011 Dec 5. doi: 10.1038/onc.2011.549.

7. Barta P., Van Pelt C., Men T. et al. Enhancement of lung tumorigenesis in a Gprc5a knockout mouse by chronic extrinsic airway inflammation // *Mol Cancer*. – 2012. – Vol. 11, № 1. – P. 4.

8. Bremnes R. M., Al-Shibli K., Donnem T. et al. The role of tumor-infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer // *J. Thorac Oncol*. – 2011. – Vol. 6, № 4. – P. 824-833.

9. Dougan M., Li D., Neuberg D. et al. A dual role for the immune response in a mouse model of inflammation-associated lung cancer // *J. Clin. Invest*. – 2011. – Vol. 121, № 6. – P. 2436-2446. doi:10.1172/JCI44796.

10. Herbst R. S., Heymach J. V., Lippman S. M. Lung cancer // *N. Engl. J. Med*. – 2008. – Vol. 359, № 13. – P. 1367-1380.

11. Lewis C., Murdoch C. Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies // *Am. J. Pathol*. – 2005. – Vol. 167, № 3. – P. 627-635.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Макарова Ольга Петровна

ФБГУ «Научно-исследовательский институт

клинической и экспериментальной лимфологии» СО РАМН.

Факс: 8 (383) 335-95-31.

Поступила 15.04.2012