

Диагностика заболеваний легких

11

NEW

сокращения раздела:

БАЛ – бронхо-альвеолярный лаваж
ДФ – дефензины

ЛПС – липополисахарид
МВ – муковисцидоз

ELF – выстилающий эпителий

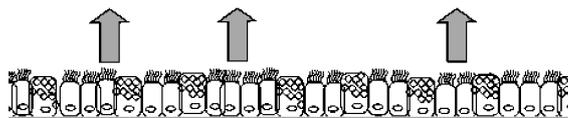
Вдыхаемые ежедневно человеком 11-15'000 литров воздуха содержат мириады потенциальных патогенов, разнообразные загрязняющие вещества и потенциальные стимуляторы воспаления. В нормальных здоровых легких жидкость выстилающего эпителия содержит разнообразные белки и пептиды врожденной иммунной системы, обеспечивающие эффективную антимикробную защиту. Эти защитные белки имеют антибактериальные, противовирусные и в ряде случаев, даже антигрибковые свойства. Спектр антимикробных эффектов таких соединений достаточно широк (от ингибирования образования биопленок до предотвращения репликации вирусов). Кроме того, эти пептиды и белки играют важную иммуномодулирующую роль. Они также вовлечены в важнейшие процессы, такие как опсонизация, облегчающая фагоцитоз бактерий и вирусов макрофагами и моноцитами. Эти соединения могут выступать в роли медиаторов воспаления и способны связывать бактериальные эндотоксины и СРG-мотивы. Они могут также влиять на экспрессию молекул адгезии и обладать антиоксидантной и антипротеазной активностью.

У пациентов с хронической бронхолегочной патологией обнаруживается угнетение антиоксидантной системы на фоне активации перекисного окисления липидов пропорционально тяжести патологического процесса. Одновременно у больных наблюдаются определенные изменения липидного обмена, проявляющиеся увеличением содержания β-липопротеидов и гиперхолестеринемией. Также обнаружены прямые корреляционные взаимоотношения между продуктами перекисного окисления липидов с наличием острофазовых белков и биогенными аминами.

Антиоксидантная система находится с биогенными аминами в обратной зависимости. Это приводит, с одной стороны, к угнетению выраженности иммунных, особенно клеточных реакций, дисбалансу регуляторных субпопуляций, с другой – к провокации развития аллергии, с третьей – к функциональным и

деструктивным изменениям клеток бронхолегочной и других систем организма, с четвертой – к расстройству тесно связанной с иммунной нейроэндокринной регуляции гомеостаза.

Медиаторы воспаления	Хемотаксические медиаторы	Антимикробные вещества
цитокины хемокины лейкотриены кальцитрин	LL-37/CAP-18 β-дефексин хемокины лейкотриены	дефексин LL-37/CAP-18 лизоцим лактоферрин SLPI
		элафин кальцитрин фосфолипиды A2 SP-A, SP-D азонолы пептидов



Роль эпителия дыхательных путей в защите организма от инфекций (no Bals, Hiemstra, 2004)

Структура, антимикробная и иммуномодулирующая активность антимикробных белков и пептидов*

Белок	Структура	Пулмонарный источник	Антимикробная активность	Иммуномодулирующая активность и др. свойства
Лактоферрин	Железосвязывающий гликопротеин, 80 кДа	Вторичные специфические гранулы нейтрофилов, эпителиальные клетки подслизистой	Бактерицидная, бактериостатическая активность, ингибирование образования биопленок, антигрибковая, антипаразитарная и антивирусная активность	Связывает ЛПС и может предотвращать септический шок. Связывает СРG-мотивы. Антиоксидант. Прокoагулянт. Стимулирует гранулопoэз. Антиопухoleвая активность
SLPI	Не гликозилированный белок, 11,7 кДа	Макрофаги, эпителиальные клетки, нейтрофилы	Бактерицидная, бактериостатическая, антивирусная активности	Сильный ингибитор протеаз (эластаза нейтрофилов, катепсин G, трипсин, химотрипсин, химазы). Ингибирует ЛПС-индуцированную NF-κB активацию. Атенуирует пулмонарный рекрутинг нейтрофилов в моделях сепсиса. Ухудшает LTA и ЛПС индуцированную экспрессию провоспалительных генов в моноцитах и макрофагах.
Лизоцим	Фермент, 14 кДа	Вторичные специфические гранулы нейтрофилов, эпителиальные клетки подслизистой	Бактерицидная, бактериостатическая активность	Нет сведений
Дефензины	Пептиды, 3-5 кДа	Азурофильные гранулы нейтрофилов и эпителиальные клетки легких	Бактерицидная, бактериостатическая активность. Антигрибковая, антипаразитарная и антивирусная активность.	Митогенная активность. Хемоаттрактанты. Стимуляция активации и дегрануляции тучных клеток. Стимуляция и высвобождение хемокинов нейтрофилов и моноцитов. Участвуют в эпителиальной репарации легких путем усиления пролиферации эпителиальных клеток.
LL-37	Пептид, требующий протеолитического воздействия для высвобождения функционально зрелого антимикробного пептида	Вторичные специфические гранулы нейтрофилов, эпителиальные клетки подслизистой	Бактерицидная, бактериостатическая активность. Антигрибковая и антивирусная активность.	Снижает синтез TNF-α макрофагами, стимулированными ЛПС, и может отвечать за миграцию клеток иммунной системы в сайты воспаления и инфекции. Регуляция экспрессии хемокинов нейтрофилами и макрофагами. Модулирует экспрессию цитокинов. Регуляция ангиогенеза.
BPI	Белок, 55 кДа	Первичные гранулы нейтрофилов	Бактерицидная, бактериостатическая активность. Действует как опсонин, усиливает нейтрофильный фагоцитоз.	Ингибирование CD14-зависимой активации клеток эндотоксинaми. Ингибирование ангиогенеза. Опсонин.
Коллектины: сурфактанты A и D (SP-A и SP-D)	Липопротеиновый комплекс	Пневмоциты II типа, клетки Клара	Ключевые опсонины, облегчающие фагоцитоз бактерий и вирусов. Бактерицидная, бактериостатическая активность. Антигрибковая и антивирусная активность.	Оба белка (SP-A и -D) могут модулировать функции лейкоцитов
Лакто-пероксидаза	Фермент	Эпителий дыхательных путей	Бактерицидная, антигрибковая и антивирусная активность	
CCL20	Хемокин со структурой, сходной с HBD (β-дефензинами человека)	Эпителий дыхательных путей	Бактерицидная активность против грамотрицательных бактерий	Стимулирует миграцию В-клеток, незрелых дендритных клеток и популяции Т-лимфоцитов памяти

* См. главу «Эндогенные антимикробные пептиды и белки», стр. 367

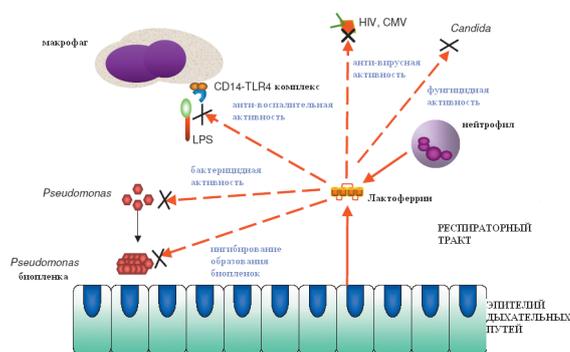
(по Rogan et al., 2006 с дополнениями)

Лактоферрин (Lf)

Антимикробная и иммуномодулирующая активность Lf схематически представлена на рисунке. Было показано, что бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ) пациентов с кистозным фиброзом при наличии активной инфекции *Pseudomonas* содержит значительно меньше Lf, чем БАЛ таких больных без активной инфекции *Pseudomonas*. Такое снижение уровня Lf приводит к ухудшению способности предотвращать образование *Pseudomonas* биопленок.

Мультифункциональные свойства лактоферрина

(по Rogan et al., 2006)



Секреторный ингибитор протеазы лейкоцитов (SLPI)

SLPI экспрессируется макрофагами, нейтрофилами и эпителием слизистых. Наряду с лактоферрином и лизоцимом, SLPI является одним из наиболее важных белков системы врожденной иммунной защиты в респираторных секретах. Значительное содержание SLPI можно обнаружить в БАЛ и в назальных секретах. С-терминальный домен SLPI обладает свойствами ингибитора сериновых протеиназ. Он играет важную протекторную роль против эластазы, высвобождающейся в сайтах инфекционного воспаления при дегрануляции нейтрофилов. SLPI также ингибирует катепсин G. В дополнение к антипротеазной активности, SLPI имеет важные антибактериальные, антивирусные и противовоспалительные свойства.

SLPI чувствителен к протеазам. Расщепить и инактивировать SLPI могут катепсины B, L и S. Анализ образцов жидкости выстилающего эпителия (ELF), полученных от пациентов с эмфиземой выявил в них присутствие активного катепсина L и расщепленного SLPI. Было показано, что сериновые и цистеиновые протеазы, продуцируемые при астме, где в качестве аллергена выступает клещ домашней пыли, расщепляют SLPI и могут увеличивать восприимчивость к инфекциям у этих пациентов.

Дефензины (Дф)

Наиболее важные свойства Дф приведены в таблице. Повышенный уровень HNP1-3 обнаруживается у пациентов, страдающих различными воспалительными заболеваниями легких (пневмония, кистозный фиброз, панбронхиолит, острый респираторный дистресс синдром, хронический бронхит, идиопатический пульмонарный фиброз). Показано, что α-Дф участвуют в патогенезе этих заболеваний. Определение концентрации HNP1-3 у подобных пациентов может быть полезным инструментом для оценки тяжести и активности заболевания. HNP1-3 могут играть важную роль в патогенезе туберкулеза, а их уровень в плазме может быть полезным маркером тяжести заболевания и ухудшения пульмонарной функции. Кроме того, известно, что α-Дф вносят серьезный вклад в процесс репарации легких, благодаря усилению пролиферации эпителиальных клеток. Предполагается, что α-Дф могут также играть определенную роль в патогенезе рака легких. Все три известных β-Дф (HBD) были также обнаружены в легких.

Кателицидин LL-37

LL-37 в дополнение к антимикробной активности играет важную роль в процессах воспаления и ремоделирования тканей. Он стимулирует ангиогенез, индуцирует пролиферацию легочных эпителиальных клеток, ускоряет закрытие ран эпителия дыхательных путей, стимулирует высвобождение цитокинов (например, IL-8) и миграцию клеток. Показано, что определение концентрации LL-37 является полезным маркером активности заболеваний и важно для прогноза при пневмонии, саркоидозе, кистозном фиброзе. LL-37 также способен нейтрализовать ЛПС, гетерополимеры грамотрицательных бактерий, которые ассоциированы с органической пылью. Иначе говоря, он важен в патогенезе различных респираторных заболеваний, вызываемых органической пылью, включая токсический синдром органической пыли и хронические обструктивные заболевания легких (астма, аллергический альвеолит).

Бактерицидный белок, повышающий проницаемость (BPI)

Показано, что BPI, который высвобождают в легочную жидкость нейтрофилы, играет очень важную роль в элиминации инвазивных патогенов. У пациентов, страдающих заболеваниями самой разной этиологии, такими как кистозный фиброз, дефицит транспортера (TAP) или воспалительные заболевания кишечника, выявляются специфические антитела к BPI, которые могут нейтрализовать антимикробную активность

этого белка. Все упомянутые заболевания характеризуются хроническим или профузным воздействием грамотрицательных бактерий или эндотоксинов на организм. По ряду оценок до 91% больных кистозным фиброзом имеют антитела к BPI. У таких пациентов это, в свою очередь, обеспечивает условия, благоприятные для образования биопленок *P. aeruginosa*. Показано, что в подобных случаях уровень антител к BPI коррелирует с колонизацией *P. aeruginosa* и повреждением легких. Общие сведения о биологической активности BPI приведены в таблице.

Сурфактантный белок D (SP-D)

SP-D принадлежит к коллагеновому подсемейству гликопротеинов и кальций-зависимых лектинов (коллектинов). SP-D представляет собой белок, состоящий из 3 субъединиц с м.м. 43 кДа, которые связаны своими N-концами. Каждая субъединица состоит из по крайней мере, четырех дискретных структурных доменов: короткого N-терминального, относительно длинного коллагенового, короткого амфипатического связывающего пептида и C-концевого домена, распознающего лектин C-типа (CRD).

SP-D синтезируют и секретируют два типа нерасщепленных эпителиальных клеток в периферических дыхательных путях: альвеолярные клетки II типа и клетки Клара. Он также экспрессируется в различных эпителиальных клетках в желудочно-кишечном и мочеполовом трактах. В легких SP-D принимает участие во врожденном иммунном ответе на вдыхаемые микроорганизмы и органические антигены. SP-D связывается с поверхностными гликоконъюгатами различных микроорганизмов и олигосахаридами, ассоциированными с поверхностью целого ряда органических антигенов. Этот белок усиливает опсонизацию микроорганизмов и ограничивает воспалительный ответ в легких.

Было показано, что экспрессия SP-D может быть связана с рядом заболеваний: кистозным фиброзом, острой интерстициальной пневмонией (ARDS), астмой, бронхо-легочной дисплазией, альвеолярным протеинозом и т.п. Хроническое воспаление связано с заметным дефицитом SP-D. Исследования на животных продемонстрировали увеличение уровня экспрессии SP-D в случаях силикоза и гипероксии (у крыс) также как и при сверхэкспрессии ИЛ-4 или инвазии инфекционных агентов (у мышей).

Хемокин CCL20

CCL20 имеет сходные структурные и функциональные свойства с β -Дф человека. Этот хемокин синтезируют эпителиальные клетки дыхательных путей и нейтрофилы. Воспалительные цитокины (ИЛ-1 β и TNF- α)

регулируют экспрессию этого белка через NF- κ B путь. CCL20 обладает антимикробной активностью против широкого спектра грамотрицательных бактерий. Показано, что БАЛ пациентов с кистозным фиброзом содержит высокие концентрации CCL20 по сравнению с нормальным БАЛ.

Clara Cell Protein (белок клеток Клара – секреторных клеток бронхиолы)

Белок клеток Клара человека (CC16, CC10, утероглобин, мочевого белок 1 или секреторный белок клеток Клара) принадлежит к семейству секретоглобинов и является белком, секретируемым нерасщепляемыми клетками бронхиол. Существуют убедительные данные о его ингибиторной активности в отношении фосфолипазы A₂, а также о иммуномодулирующих свойствах данного белка, включая ингибирование передачи сигналов гамма интерферона и регуляцию Th1 vs. Th2 лимфоцитов. Этот белок был предложен в качестве потенциального периферийного маркера респираторного эпителиального повреждения и бронхиальной дисфункции. Начиная с 1994 г. регулярно сообщалось о присутствии CC16 одновременно в сыворотке и БАЛ. Повышение концентрации CC16 в сыворотке обычно коррелирует с возрастом, воздействием асбеста, хлористого азота и озона, саркоидозом и интенсивной искусственной вентиляцией легких с положительным давлением в конце выдоха (PEEP). Понижение уровня сывороточного CC16 наблюдается после резекции легких, у рабочих, подвергающихся воздействию кварца (кремнезема), курильщиков и при астме. Снижение концентрации CC16 также показано в амниотической жидкости плодов, страдающих от пульмонарной гипоплазии, вызванной различными механизмами (диафрагмальная грыжа, диабетическая фетопатия, синдромы Тернера и Дауна). Оказалось, что накопление CC16 в плевральном выпоте связано с диффузией этого белка из легких, которые при кардиально-плевральном застое содержат высокий уровень CC16.

Миелопероксидаза (MPO)

MPO играет серьезную роль в индукции повреждения легких при различных заболеваниях. Известно, что жидкость ELF большинства пациентов с идиопатическим легочным фиброзом содержит высокие концентрации MPO и воспалительных клеток, которые самопроизвольно выделяют значительное количество H₂O₂. Показано, что уровень MPO значительно повышен у недоношенных детей с большей степенью незрелости или у тех, у кого развиваются хронические заболевания легких.

α1-антитрипсин (α1-АТ)

Недостаточность содержания α1-АТ^{••} в организме отмечается при эмфиземе легких в раннем детском возрасте и у взрослых. При недостатке α1-АТ имеет место снижение защиты слизистых бронхиального дерева и легочной паренхимы от повреждающего действия протеолитических ферментов, освобождающихся из лейкоцитов и микробных клеток при повторных эпизодах воспаления. Эти «избыточные» ферменты могут приводить к повреждению эластических волокон, истончению и разрыву альвеолярных перегородок. Наследственный дефицит α1-АТ имеет аутосомно-рецессивный характер наследования. При дифференциальном диагнозе следует отличать вторичную эмфизему, развившуюся вследствие хронических обструктивных заболеваний легких, от первичной врожденной. Первичная эмфизема легких обусловлена наследственным дефицитом α1-АТ.[•]

европеоидной расы. Носительство гена этой болезни вовсе не редкость: 1:25 – 1:30. Это аутосомно-рецессивная наследственная болезнь; ответственный за нее ген белка CFTR, расположенный в хромосоме 7 (в настоящее время клонирован). Белок CFTR функционирует в качестве хлорного канала в клеточной мембране эпителиальных клеток, выстилающих выводные протоки поджелудочной железы, кишечника, бронхолегочной системы, урогенитального тракта. Сейчас уже хорошо известно, что проницаемость апикальной мембраны для ионов Cl⁻ при МВ составляет 1/15 от нормальной, в то время как проницаемость для ионов Na⁺ увеличена почти в 4 раза. Это вызывает нарушения ионного транспорта в апикальной мембране клеток экзокринных органов. Измененная секреция Cl⁻ и гиперборсorption Na⁺ в респираторном эпителии приводит к изменению электролитного состава секрета, к его дегидратации и сгущению, нарушению мукоцилиарного клиренса, рецидивирующему инфицированию дыхательных путей, деструкции бронхов и эластической стромы легких, к прогрессирующему снижению вентиляционной функции легких, к выделению аномального и густого секрета в дыхательные пути. Выраженность симптоматики в различных органах весьма вариабельна у разных пациентов. У 80% больных ожидаемая продолжительность жизни составляет более 20 лет.

• Информацию о маркерах НСЕ и SCC см. в главе «Онкомаркеры», стр. 208

•• см. главу «Маркеры воспаления и оксидативного стресса», стр. 355

Компания «БиоХимМак» предлагает тест-системы для диагностики муковисцидоза методом ПЦР.

Муковисцидоз (МВ)

МВ – наиболее часто встречающееся потенциально летальное наследственное заболевание. Частота МВ составляет примерно 1 на 2500 у лиц

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА



Кат. №	Производитель	Наименование, количество/упаковка
НК317	НВТ	Альфа-дефензин 1-3 (HNP1-3), 192
НК314	НВТ	Бактерицидный белок, повышающий проницаемость (BPI), 192
416-5230	Orgentec	Антитела к BPI, 96
НК329	НВТ	Лактоферрин, 192
НК316	НВТ	Секреторный ингибитор протеиназы лейкоцитов (SLPI), 192
НК321	НВТ	LL37, 192
НК324	НВТ	MPO, 192
194-0591	BioVendor	Сурфактантный белок D (SP-D), 96
191-0222	BioVendor	Белок клеток Клара (Clara Cell Protein), 96
DM3A00	R&D	CCL20/MIP-3α, 96
473-6750	Immunodiagnostik	α1-антитрипсин, 96
420-10	CanAg	Нейрон-специфическая енолаза (HCE), 96
800-10	CanAg	Антиген плоскоклеточной карциномы (SCC), 96
F9946	Pronto	Pronto CF Euro-1, муковисцидоз (F508, G542X, R1162X, W1282X, N1303K, 1717-1(G>A)), 24
F9901	Pronto	Pronto CF Basic, муковисцидоз (F508, G542X, W1282X, N1303K, 3849+10Kb), 24
F9920	Pronto	Pronto CF Open, муковисцидоз (S549R, G85E, D1152H, W1089X, 1717-1(G>A), 405+1G>A, Q359K/T360K, 4010 del TATT), 24x4