

В. В. Бугерук

**РОЛЬ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНІЕ-СТИМУЛЮЮЧОГО ФАКТОРА В ПАТОГЕНЕЗІ НАБУТОГО ЛЕГЕНЕВОГО АЛЬВЕОЛЯРНОГО ПРОТЕЇНОЗУ ТА НОВІТНІ ПІДХОДИ ДО ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАННЯ***Одеський державний медичний університет*

Легеневий альвеолярний протеїноз (ЛАП) — дифузне легеневе захворювання нез'ясованої етіології, при якому в альвеолах та інтерстиціальній тканині акумулюється фосфоліпопротеїновий дериват сурфактанту. В останні роки вивчені тонкі механізми патогенезу цього захворювання, продовжується розробка в експериментальних та клінічних умовах нових підходів до патогенетичної терапії. Тому актуальною є краща інформованість лікарської спільноти щодо сучасних можливостей діагностики та лікування ЛАП та більш пильна націленість спеціалістів на виявлення даного захворювання. Ціллю даного огляду є інформація про сучасну концепцію патогенезу та новітні підходи до лікування таких хворих.

При ЛАП порушується метаболізм сурфактанту. Сурфактант відіграє життєво значиму роль в зменшенні поверхневого напруження повітряно-рідинного шару альвеолярної стінки, що попереджує колапс альвеол та транссудацію рідини з капілярів до просвіту альвеол. Білки сурфактанту А, В, С та D допомагають виконувати поверхневоактивну функцію, приймають участь в метаболізмі сурфактанту, опсонізують мікробні патогени та стимулюють захисні функції альвеолярних макрофагів [22]. Ліпід та білки сурфактанту синтезуються, накопичуються та секретуються в альвеоли альвеолярними епітеліальними клітинами II типу. Очищення альвеол від сурфактанту здійснюється цими ж клітинами та альвеолярними макрофагами.

Набутий ЛАП на сучасному рівні розуміння вважається автоімунним захворюванням, при якому ідентифікована ключова роль гранулоцитарно-макрофагального колоніе-стимулюючого фактора (ГМКСФ) в легневих альвеолах. Нова концепція патогенезу ЛАП базується на відкриттях сучасної генної інженерії та імунології. Виявилось, що в мишей з видаленням геном, який кодує функцію ГМКСФ, розвивається ураження легень подібне до ЛАП. І при поглибленому імунологічному дослідженні людей, хворих на ЛАП, були знайдені нейтралізуючі антитіла до ГМКСФ. Проведені на тваринах дослідження показали, що генномодифіковані миші без ГМКСФ мають нормальний незмінний гемопоез, але дефіцит ГМКСФ викликає порушення гомеостазу сурфактанта [3,19]. Сурфактант у них має нормальну біоактивність, але не може бути нормально розщепленим [6]. В легенях у тварин визначається підвищений рівень моноцитарного хемотаксичного протеїну-1, такі ж зміни виявляються і в людей з набутим ЛАП [7,13]. Знаючи про підвищений ризик інфекцій при набутому ЛАП, досліджували загальну стійкість до інфекцій у генномодифікованих мишей. Такі тварини виявились особливо чутливими до стрептококів групи В [10], до *Pneumocystis carinii* (після виснаження CD4+ лімфоцитів) та мали суттєві порушення легеневого кліренсу бактеріальних, вірусних та грибкових патогенів [1]. Альвеолярні макрофаги у мишей без ГМКСФ виявлялись дефектними щодо клітинної адгезії, експресії патоген-розпізнаючих рецепторів, фагоцитозу, продукції супероксидних радикалів, мікробного кілінгу та секреції прозапальних цитокінів [13]. Усі ці порушення корегувались заміщенням ГМКСФ. Відповідно були зроблені висновки про важливу роль ГМКСФ в захисті легень від інфект-агентів безпосередньо в самих легенях.

Досліджувались також бітрансенні миші з генноінженерним системним дефіцитом ГМКСФ та з локальною продукцією ГМКСФ в легневих епітеліальних клітинах. Така локальна експресія ГМКСФ відновлювала гомеостаз сурфактанта [5]. Подальші дослідження підтвердили можливість ефективного лікування таких мишей інгаляціями аерозолу ГМКСФ [14]. Інші

докази ролі ГМКСФ в гомеостазі сурфактанту отримані в мишей з видаленими  $\beta$ -ланцюгами рецептора комплексу до ГМКСФ, інтерлейкіну-3 та інтерлейкіну-5. У них розвивались обмежені гемопоетичні порушення та захворювання легень, подібні до проявів ЛАП [15]. Трансплантація кісткового мозку в таких тварин призупиняла накопичення ліпопротеїнів [12], але не приводила до повного відновлення легеневої функції [2].

Знайдені підтвердження ролі ГМКСФ в патогенезі ЛАП також і в людей. У дорослих пацієнтів з ЛАП виявляється порушення гематологічна відповідь на додаткове введення ГМКСФ [8]. Пацієнти мали нормальну чи підвищену кількість та щільність рецепторів і нормально відповідали на гранулоцитарний колоніе-стимулюючий фактор (молекула його відрізняється від молекули ГМКСФ). Хоч відповідь на ГМКСФ у хворих на ЛАП була порушена, але не відсутня, оскільки високі дози могли викликати ефект [17]. Виявлявся нормальний ген ГМКСФ з нормальним рівнем ГМКСФ mRNA, а вивільнення білків з альвеолярних макрофагів порушувалось. *In vitro*, альвеолярні макрофаги були здатні до синтезу та відповідали на ГМКСФ. У хворих на ЛАП визначався підвищений рівень інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) [8]. Нейтралізація ІЛ-10 приводила до збільшення продукції та вивільнення ГМКСФ *in vitro* [20].

Подальші роботи повідомляють про факти, які підтримують концепцію ключової ролі ГМКСФ в патогенезі ЛАП. Так, в рідині бронхо-альвеолярного лаважу (БАЛ) у пацієнтів з ідіопатичним ЛАП, знайдений фактор, який специфічно пригнічує функцію ГМКСФ. Нейтралізуючі антитіла до анти-ГМКСФ імуноглобуліну G також були виявлені в рідині БАЛ та сироватці крові хворих на ЛАП. Антитіла виявлені у всіх 21 пацієнтів з ЛАП, які вивчалися в двох дослідженнях [9,21], але були відсутні у 2 пацієнтів з вторинним ЛАП, у 53 здорових пацієнтів з групи контролю та 14 пацієнтів з іншими легневими хворобами [21]. Це підтверджує, що нейтралізуючі антитіла можуть призвести до дисфункції альвеолярних макрофагів та редукції кліренсу сурфактанта [21].

Отже, сучасна концепція патогенезу ідіопатичного ЛАП вважає, що сурфактант накопичується в альвеолах із-за уражених механізмів кліренсу. Порушений кліренс може бути пов'язаний з дисфункцією альвеолярних макрофагів. Відносно зниження активності ГМКСФ призводить до накопичення ліпопротеїнів в макрофагах та до пригнічення функції цих клітин. Активність ГМКСФ може бути інгібована через імунні механізми, а саме продукцією ГМКСФ нейтралізуючих антитіл. При ЛАП ІЛ-10 пригнічує синтез ГМКСФ та стимулює продукцію В-клітинних антитіл до ГМКСФ, а це нейтралізує активність ГМКСФ. Зменшується можливість ГМКСФ впливати на дозрівання макрофагів, порушується деградація сурфактанту, який переповнює легеневі альвеоли. Однак сучасне розуміння патогенезу ЛАП має певні межі. Залишається нез'ясованим, що первинно запускає продукцію автоантитіл та як саме ЛАП набувається; чи є автоантитіла до ГМКСФ причиною ЛАП чи епіфеноменом; чому ЛАП може мати епізодичний перебіг із спонтанними ремісіями. Якщо ЛАП хоч би частково автоімунне захворювання з нейтралізуючими антитілами, які викликають відносний дефіцит ГМКСФ і подальшу дисфункцію альвеолярних макрофагів, то потрібні дослідження для встановлення кореляції між титром антитіл та перебігом захворювання, з спонтанним одужанням чи з застосуванням лікуванням. Продовжується вивчення відношення до даного захворювання II типу епітеліальних альвеолярних клітин, які мають ключове значення в нормальному гомеостазі сурфактанту.

Визначення антитіл до ГМКСФ в плазмі крові нині вважають надійним, неінвазивним діагностичним тестом для встановлен-

ня діагнозу ЛАП, оскільки антитіла знайдені у всіх обстежених пацієнтів із цим захворюванням [9,21]. Однак спонтанне виникнення автоантитіл до ГМКСФ можливе і при інших захворюваннях [11]. Так, доведена присутність низького чи середнього рівнів у плазмі 41 з 425 пацієнтів із відомими автоімунними захворюваннями (більшість складала хворі з myasthenia gravis).

Численні терапевтичні підходи були випробувані для лікування хворих на ЛАП протягом багатьох років. Використовувались антибіотики, кортикостероїди, постуральний дренаж, інтермітуючий додатковий тиск при вдиханні аерозолію амброзолу, гепарину, фізіологічного розчину, аерозолію ацетилцистеїну, аерозолію трипсину. Але успішно лікується набутий ЛАП тільки з 1960 року проведенням повного легеневого лаважу, який залишається і сьогодні стандартом ведення таких хворих.

Недавні досягнення в розумінні патогенезу ЛАП привели до розробки альтернативної терапевтичної стратегії. В центрі уваги знаходиться лікування, направлене на корекцію відносного дефіциту ГМКСФ його заміщенням або супресією автоантитіл до ГМКСФ. Проведені кілька проспективних досліджень 2 фази з вивченням можливостей ГМКСФ терапії у хворих із набутим ЛАП. В першому дослідженні, яке тривало з 1995 по 1998 роки, у 14 пацієнтів була перевірена ефективність підшкірного введення ГМКСФ в добовій дозі 5 мг на кілограм ваги хворого протягом 6–12 тижнів [18]. 5 хворих мали відповідь на таку дозу із середнім збільшенням градієнта альвеолярно-артеріолярної дифузії на 23,2 мм Нг; у 4 пацієнтів клінічний ефект отримано при збільшенні початкової дози до 20 мг/кг на добу. Решта пацієнтів не мали покращання навіть на високих дозах препарату. Друге дослідження, яке проводилось в 1998 році, повідомляє про отриманий ефект у 3 з 4 пацієнтів, яким призначалися підшкірні ін'єкції ГМКСФ в зростаючих дозах протягом 12 тижнів [8]. Всі троє пацієнтів мали симптоматичне, функціональне та рентгенологічне покращання та зменшення середнього градієнту альвеолярно-артеріолярної дифузії з 48,3 мм Нг до 18,3 мм Нг після 16 тижнів лікування. Такі попередні результати дають надію, однак механізм ефекту ГМКСФ терапії залишається неясним. Спостерігається зменшення рівня легеневого анти-ГМКСФ антитіл, яке асоціюється з клінічним покращанням, а це дозволяє зробити припущення, що розвивається десенсибілізація до ГМКСФ [16]. Побічні ефекти терапії, такі як лихоманка, міалгії, слабкість, висипання, болючість у місці ін'єкції, слабо виражені та виникають у 20–30 % хворих. Важкі ускладнення мають менш, ніж 2 % пацієнтів, і включають болі в кістках, гіпотензію та гіпоксемію після введення першої дози. Гематологічна відповідь на лікування проявляється лейкоцитозом [8, 18]. Курсове лікування ГМКСФ має високу вартість. Перспективною може бути терапія анти-ІЛ-10 антитілами, які в умовах *in vitro* ефективно підвищують продукцію ГМКСФ.

Гематологічна природа захворювання та повідомлення про рецидиви ЛАП після трансплантації легень дозволяють зробити припущення, що може бути корисною у таких хворих трансплантація кісткового мозку [4]. Суперечні результати отримані поки що лише у моделях на мишах [2].

Таким чином, клінічні дослідження, вивчення трансгенних тварин дозволили змінити концепцію патогенезу та лікування хворих на легеневий альвеолярний протеїноз. Визначені особливості критичного сповільнення кліренсу альвеолярного сурфактанту через автоімунні механізми пригнічення ГМКСФ. Дослідження показали ключову роль ГМКСФ у регуляції дозрівання легневих альвеолярних макрофагів, у регуляції гомеостазу легеневого сурфактанту, в стимуляції різноманітних механізмів захисту легень від мікробних інвазій. Поєднання традиційних та сучасних підходів до діагностики захворювання та ведення таких хворих суттєво поліпшує результати їх лікування та довготривалий прогноз.

## ЛІТЕРАТУРА

- Berclaz P. Y., Zsengeller Z., Shibata Y. Endocytic internalization of adenovirus, nonspecific phagocytosis, and cytoskeletal organization are coordinately regulated in alveolar macrophages by GM-CSF and PU.1 // *J. Immunol.* — 2002. — Vol. № 169. — P. 6332–6342.
- Cooke K. R., Nishinakamura R., Martin T. R. Persistence of pulmonary pathology and abnormal lung function in IL-3/GM-CSF/IL-5 common beta receptor-deficient mice despite correction of alveolar proteinosis after BMT // *Bone Marrow Transplant.* — 1997. — Vol. № 20. — P. 657–662.
- Dranoff G., Crawford A. D., Sadelain M., Ream B., Mulligan R. C. Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis // *Science.* — 1994. — Vol. № 264. — P. 713–716.
- Gaine S. P., O'Maricaigh A. S. Pulmonary alveolar proteinosis: lung transplant or bone marrow transplant [letter] // *Chest.* — 1998. — Vol. № 113. — P. 563–564.
- Huffman J. A., Hull W. M., Dranoff G., Mulligan R. C., Whitsett J. A. Pulmonary epithelial cell expression of GM-CSF corrects the alveolar proteinosis in GM-CSF-deficient mice // *J. Clin. Invest.* — 1996. — Vol. № 97. — P. 649–655.
- Ikegami M., Ueda T., Hull W. Surfactant metabolism in transgenic mice after granulocyte macrophage-colony stimulating factor ablation // *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol Physiol)* 14. — 1996. — Vol. № 270. — P. 650–658.
- Iyonaga K., Suga M., Yamamoto T., Ichiyasu H., Miyakawa H., Ando M. Elevated bronchoalveolar concentrations of MCP-1 in patients with pulmonary alveolar proteinosis // *Eur. Respir. J.* — 1999. — Vol. № 14. — P. 383–389.
- Kavuru M. S., Sullivan E. J., Piccin R., Thomassen M. J., Stoller J. K. Exogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor administration for pulmonary alveolar proteinosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2000. — Vol. № 161. — P. 1143–1148.
- Kitamura T., Tanaka N., Watanabe J. Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor // *J. Exp. Med.* — 1999. — Vol. № 190. — P. 875–880.
- LeVine A. M., Reed J. A., Kurak K. E., Cianciolo E., Whitsett J. A. GM-CSF-deficient mice are susceptible to pulmonary group B streptococcal infection // *J. Clin. Invest.* — 1999. — Vol. № 103. — P. 563–569.
- Meager A., Wadhwa M., Bird C. Spontaneously occurring neutralizing antibodies against granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with autoimmune disease // *Immunology.* — 1999. — Vol. № 97. — P. 526–532.
- Nishinakamura R., Wiler R., Dirksen U. The pulmonary alveolar proteinosis in granulocyte macrophage colony-stimulating factor/interleukins 3/5 Bc receptor-deficient mice is reversed by bone marrow transplantation // *J. Exp. Med.* — 1996. — Vol. № 183. — P. 2657–2662.
- Paine R. III, Morris S. B., Jin H. Impaired functional activity of alveolar macrophages from GM-CSF-deficient mice // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* — 2001. — Vol. № 281. — P. 1210–1218.
- Reed J. A., Ikegami M., Cianciolo E. R. Aerosolized GM-CSF ameliorates pulmonary alveolar proteinosis in GM-CSF deficient mice // *Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol. Physiol.)* 20. — 1999. — Vol. № 76. — P. 556–563.
- Robb L., Drinkwater C. C., Metcalf D. Hematopoietic and lung abnormalities in mice with a null mutation of the common beta subunit of the receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukins 3 and 5 // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1995. — Vol. № 92. — P. 9565–9569.
- Schoch O. D., Schanz U., Koller M. BAL findings in a patient with pulmonary alveolar proteinosis successfully treated with GM-CSF // *Thorax.* — 2002. — Vol. № 57. — P. 277–280.
- Seymour J. F., Begley C. G., Dirksen U. Attenuated hematopoietic response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with acquired pulmonary alveolar proteinosis // *Blood.* — 1998. — Vol. № 92. — P. 2657–2667.
- Seymour J. F., Presneill J. J., Schoch O. D. Therapeutic efficacy of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with idiopathic acquired alveolar proteinosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2001. — Vol. № 163. — P. 524–531.
- Stanley E., Lieschke G. J., Grail D. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1994. — Vol. № 91. — P. 5592–5596.
- Tchou-Wong K., Harkin T. J., Chi C., Bodkin M., Rom W. N. GM-CSF gene expression is normal but protein release is absent in a patient with pulmonary alveolar proteinosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 1997. — Vol. № 156. — P. 1999–2002.
- Thomassen M. J., Yi T., Raychaudhuri B., Malur A., Kavuru M. S. Pulmonary alveolar proteinosis is a disease of decreased availability of GM-CSF rather than an intrinsic cellular defect // *Clin. Immunol.* — 2000. — Vol. № 95. — P. 85–92.
- Weaver T.E., Whitsett J.A. Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins // *Biochem. J.* — 1991. — Vol. № 273. — P. 249–264.