

О. Р. Панасюкова, Л. П. Кадан, К. Ф. Чернушенко, О. М. Рекалова, В. М. Петішкіна,
А. С. Фірсова, О. І. Шпак, О. О. Венгерова

ОСОБЛИВОСТІ ЦИТОКІНОВОГО ПРОФІЛЮ У ХВОРИХ ІЗ ЗАГОСТРЕННЯМ ХОЗЛ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ ЗАХВОРЮВАННЯ

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»

Хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) сьогодні визначається як захворювання, яке характеризується не повністю зворотнім обмеженням прохідності дихальних шляхів, носить прогресуючий характер і пов'язано із запальною реакцією легеневої тканини на різноманітні подразники (патогенні агенти, гази, бактеріальне навантаження) [9, 12]. Ключовим елементом прогресування захворювання є хронічне дифузне запалення з залученням у патологічний процес бронхіальної стінки, інтерстиціальної тканини та ендотелію судин в легенях, що може призводити до розвитку пневмофіброзу та емфіземи з тяжкою легеневою недостатністю [3]. Протягом останніх років з'ясування особливостей патогенезу ХОЗЛ тісно пов'язане з уточненням ролі імунологічного дисбалансу на різних етапах патологічного процесу, який є одним із провідних факторів розвитку хронічного запального процесу як у легенях, так і у бронхах, а зрештою і прогресування захворювання [7].

Ключова роль у реалізації запальних реакцій належить гуморальним факторам природного імунітету, в число яких входить система комплементу, прозапальні цитокіни і інші фактори першої лінії імунного захисту. Динаміка їх рівнів може служити показником активності запального процесу. Останніми роками активно обговорюється питання про роль порушення цитокінів в ініціації та прогресуванні запального процесу в бронхолегеневій системі. Цитокіни є не тільки ендогенними регуляторами імунних реакцій, але і ключовими факторами, що індукують запальну реакцію та гострофазну відповідь організму, можуть чинити імунопатологічну дію на клітини та тканини [2]. Вони забезпечують послідовність, стрункість та завершеність імунної відповіді.

Більшість дослідників у хворих на ХОЗЛ визначає локальні та системні зміни, які включають оксидативний стрес, зміну рівнів гострофазових білків та запальних медіаторів, у тому числі — інтерлейкіну-8 (IL-8), IL-4, TNF α та ін., хоча й немає єдиної точки зору на їх вміст та роль при цьому захворюванні [1–3, 7, 8]. TNF α (кахексин) відносять до прозапальних цитокінів, який продукується моноцитами і макрофагами, природними кілерами, гранулоцитами крові, Т-лімфоцитами. В період запуску запалення він активує ендотелій, лейкоцити, продукцію інших прозапальних цитокінів. IL-8 є прозапальним цито-хемокином, синтезується моноцитами, макрофагами, нейтрофілами, ендотеліальними клітинами, ініціює респіраторний вибух, визиває масивну інфільтрацію тканин нейтрофілами. По рівню IL-8 можна судити про активність запального процесу в цілому [11], а разом з

TNF α та С-реактивним протеїном він відображає напруженість стану клітин запалення [13]. IL-4 — В-клітинний стимулюючий фактор, продукується Т-хелперами 2-го класу, сприяє їх диференціюванню, є антагонистом гамма-інтерферону, відноситься до антизапальних цитокінів. Рівень зазначених важливих цитокінів віддзеркалює напруженість і співвідношення запальних та прозапальних процесів.

Коректна оцінка особливостей цитокінового профілю в конкретному клінічному випадку, оцінка рівня цитокінів у різних біологічних матеріалах (сироватці, цільній крові, культуральних супернатантах та інш.) може зайняти важливе місце серед сучасних методів імунодіагностики і визначити їх роль у процесі хронізації запальних реакцій у хворих на ХОЗЛ [6].

У зв'язку з цим метою роботи було дослідження системних і локальних рівнів про- і протизапальних цитокінів: туморнекротизуючого фактору альфа (TNF α), інтерлейкіну-8 (IL-8), інтерлейкіну-4 (IL-4) у хворих з загостренням ХОЗЛ в залежності від стадії захворювання.

Матеріали та методи

Роботу виконано за кошти державного бюджету України. Клінічне, рентгенологічне, функціональне та імунологічне обстеження проведено 64 хворим із загостренням ХОЗЛ. Діагноз ХОЗЛ (I, II, III або IV стадії) встановлювався на підставі клініко-функціонального обстеження хворих відповідно наказу МОЗ України за № 128 від 19.03.2007 року [5]. Серед обстежених було 36 чоловіків (56,2 %) і 28 жінок (43,8 %) у віці від 20 до 78 років, середній вік — (58,0 $\pm$ 1,7) років, які проходили стаціонарне лікування у відділеннях Державної установи "Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського АМН України". Контрольну групу для визначення рівня цитокінів у крові склали 20 практично здорових осіб — донорів крові, серед яких було 9 чоловіків (45,0 %) та 11 жінок (55,0 %) віком від 19 до 52 років, середній вік — (45,7 $\pm$ 1,2) років. Бронхо-альвеолярний змив (БАЗ) для дослідження локального вмісту цитокінів був одержаний у 20 хворих на ХОЗЛ, середній вік — (57,1 $\pm$ 3,5) років, під час бронхоскопії під місцевою анестезією фіброскопом "Olimpus". БАЗ отримували після введення в субсегментарний бронх фракційно 100–300 мл підігрітого до 37° стерильного фізіологічного розчину з подальшою його аспірацією.

Спірометричне обстеження хворих проводилось з використанням апарату "MicroLab" (Велика Британія). Вміст цитокінів в сироватці крові та БАЗ визначали методом імуноферментного аналізу з використанням комерційних тест-систем: TNF α , IL-4 — ТОВ "Протеиновый кон-тур" (Росія), IL-8 — "Цитокин" (Росія).

3 метою аналізу одержаних даних було сформовано 6 груп хворих. Для оцінки системного рівню цитокінів (у сироватці крові) 64 хворих були розподілені на 4 групи в залежності від стадії ХОЗЛ (I, II, III або IV). В 1 групу увійшли 13 хворих (20,3 % обстежених) з I стадією ХОЗЛ (легкий перебіг). 2 групу було сформовано з 26 осіб (40,6 %) з II стадією ХОЗЛ (перебіг помірної тяжкості). До 3 групи увійшли 17 пацієнтів (26,6 %) з III стадією ХОЗЛ (тяжкий перебіг). У 4 групу увійшло 8 хворих (12,5 %) з IV стадією (дуже тяжкий перебіг).

5 і 6 групи були сформовані для оцінки вмісту цитокінів в БАЗ від 20 хворих: у 5 групу увійшли 7 хворих (35,0 %) з I стадією ХОЗЛ, в 6 групу включили 13 осіб (65,0 %) з II, III, IV стадіями ХОЗЛ. В 5 і 6 групах хворих також оцінювали ступінь активності запального процесу за кількістю нейтрофілоцитів в БАЗ.

Статистична обробка результатів досліджень проводилась за допомогою ліцензійних програмних продуктів, які входили до пакету Microsoft Office Professional 2000, ліцензія Russian Academic OPEN No Level № 17016297. Всі результати представляли у вигляді $\bar{x}$ — кількості обстежених хворих у групі, середньоарифметичного значення ($\bar{M}$), помилки середньоарифметичного значення (m). Для оцінки статистично значимої різниці між середніми значеннями показників у вибірках використовувався двовибірковий t-тест Стюдента, у вибірках із непараметричним розподілом — двовибірковий критерій Уїлкоксона [4]. За рівень статистичної значимості приймалися значення показника вірогідності різниці між групами (p) рівні/менші 0,05.

Результати дослідження

Динаміка змін рівнів цитокінів у сироватці крові хворих на ХОЗЛ в залежності від стадії представлена в таблиці 1. З'ясовано, що при легкому перебігу ХОЗЛ (1 група) системні рівні TNF α , IL-8 і IL-4 статистично не відрізнялись від нормальних, але зростали по мірі збільшення тяжкості перебігу ХОЗЛ і досягали максимальних значень у хворих 3 групи, тоді як у пацієнтів 4 групи різко зменшувались. Так, у хворих 2 групи було статистично підтверджено підйом (відносно групи донорів) системного рівня протизапального IL-4 — до $(61,2 \pm 26,4)$ пг/мл, у хворих 3 групи — прозапальних TNF α — до $(27,5 \pm 10,5)$ пг/мл і IL-8 — до $(89,4 \pm 21,8)$ нг/мл. Це могло свідчити про вірогідну максимальну цитокінову активацію Т-хелперів 2 типу при II стадії ХОЗЛ й найбільшу виразність ознак системного запалення у хворих при III стадії захворювання, що супроводжувалось клінічним прогресуванням процесу і збільшенням бронхіальної обструкції. У хворих 4 групи, порівняно з 3 групою, у сироватці крові вірогідно зменшувалась концентрація TNF α — до $(3,2 \pm 1,6)$ пг/мл і IL-8 — до $(41,7 \pm 4,7)$ нг/мл, $p < 0,05$. Системний рівень протизапального IL-4 в 4 групі знижувався у 3,1 рази у порівнянні з хворими 2 групи і у 3,9 рази відносно такого у пацієнтів 3 групи. Отже, при загостренні ХОЗЛ у дуже тяжких хворих могли спостерігатися ознаки виснаження функціонального ресурсу імунологічного реагування, що супроводжувалось падінням вмісту в сироватці крові прозапальних цитокінів і виразною тенденцією ($p < 0,2$) до зменшення протизапальних цитокінів.

Таблиця 1

Вміст цитокінів в сироватці крові хворих на ХОЗЛ в залежності від стадії захворювання ($M \pm m$)

Показники	Група здорових	Групи хворих			
		1 (n=12)	2 (n=26)	3 (n=17)	4 (n=8)
TNF α (пг/мл)	7,9 $\pm$ 0,8	6,7 $\pm$ 2,5	15,4 $\pm$ 6,3	27,5 $\pm$ 10,5*	3,2 $\pm$ 1,6#
IL-8 (нг/мл)	45,03 $\pm$ 3,4	65,3 $\pm$ 28,6	96,2 $\pm$ 31,5	89,4 $\pm$ 21,8*	41,7 $\pm$ 4,7#
IL-4 (пг/мл)	7,6 $\pm$ 0,8	20,7 $\pm$ 12,1	61,2 $\pm$ 26,4*	76,0 $\pm$ 36,1	19,5 $\pm$ 8,5

Примітки: * — різниця з показником здорових осіб статистично значима ($p < 0,05$), # — різниця показника в 3 та 4 групах статистично значима ($p < 0,05$).

Дані вмісту цитокінів у БАЗ в залежності від стадії ХОЗЛ представлені в таблиці 2. Доведено, що підвищення кількості нейтрофільних гранулоцитів в БАЗ є свідченням запального процесу у дихальних шляхах і може віддзеркалювати його активність: низька характеризується підвищенням відносної кількості нейтрофілоцитів в межах 10 %, середня — до 11–30 % і висока — більше 30,0 %) [8]. Кількість нейтрофілоцитів у БАЗ була вірогідно підвищена у пацієнтів як 5, так й 6 групи, при цьому у хворих 6 групи вона була дещо вищою ($p < 0,1$) (табл. 2). У той же час кількість хворих з високим відносним вмістом нейтрофілоцитів в БАЗ (≥ 31 %) спостерігалась тільки у $(14,3 \pm 13,2)$ % хворих 5 групи і у $(53,8 \pm 13,8)$ % хворих 6 групи ($p < 0,05$), що свідчило про збільшення кількості хворих з виразним бронхіальним запаленням при зростанні тяжкості перебігу ХОЗЛ.

Відомо, що у осіб без респіраторної патології вміст TNF α у БАЗ знаходиться в межах від 3,1 пг/мл до 4,2 пг/мл [1], а концентрація IL-8 відповідає $(3,91 \pm 1,66)$ нг/мл [10]. Отримані нами дані підтвердили високу активність запального процесу у хворих із загостренням ХОЗЛ, оскільки рівень TNF α у БАЗ хворих на ХОЗЛ був у 4–6 разів, а рівень IL-8 — в сотні раз вищим. Було встановлено, що локальна продукція прозапальних цитокінів зростала при збільшенні тяжкості перебігу ХОЗЛ. Якщо у пацієнтів 5 групи (з легким перебігом) концентрація IL-8 в БАЗ відповідала $(229,7 \pm 71,6)$ нг/мл, то у хворих 6 групи (з помірним і тяжким перебігом ХОЗЛ) цей показник збільшувався до $(912,9 \pm 264,7)$ нг/мл, $p < 0,05$. Аналогічна тенденція визначалась відносно вмісту в БАЗ TNF α , але це не було підтверджено статистично.

Таблиця 2

Вміст нейтрофільних гранулоцитів і цитокінів у БАЗ хворих на ХОЗЛ в залежності від стадії захворювання ($M \pm m$)

Показники	Група здорових	Групи хворих	
		1 (n=12)	2 (n=26)
Кількість нейтрофілоцитів (%)	1,3 $\pm$ 0,5	20,4 $\pm$ 9,1*	43,2 $\pm$ 8,9*
TNF α (пг/мл)	–	14,9 $\pm$ 6,7	24,2 $\pm$ 5,7
IL-8 (нг/мл)	–	229,7 $\pm$ 71,6	912,9 $\pm$ 264,7#

Примітки: * — різниця з показником здорових осіб статистично значима ($p < 0,05$), # — різниця показника в групах статистично значима ($p < 0,05$).

Таким чином, вищенаведене може свідчити про те, що виразність змін цитокінової продукції при загостренні ХОЗЛ залежала від стадії захворювання.

Висновки

1. На початкових стадіях розвитку ХОЗЛ (I стадія) на фоні нормальної системної продукції про- і протизапальних цитокінів тільки в легенях реєструється гіперпродукція прозапальних цитокінів TNF α і IL-8.

2. По мірі прогресування хвороби (II–III стадія ХОЗЛ) дисбаланс цитокінів проявляється і на системному рівні, активність запального процесу наростає по мірі збільшення тяжкості захворювання, що відбувається на фоні зростання нейтрофільного запалення у бронхах з підвищенням локальної концентрації IL-8.

3. Дуже тяжкий перебіг ХОЗЛ (IV стадія) супроводжується виснаженням функціонального ресурсу імунологічного реагування, про що свідчить різке зниження концентрації в крові прозапальних (TNF α , IL-8) і тенденція до зниження протизапального (IL-4) цитокінів.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Активность воспаления и возможность ее модификации при обострении хронической обструктивной болезни легких* [Текст] / Е. А. Каразей [и др.]. — Режим доступа : http://www.belmapo.by/downloads/klin_farmakologia/aktivnost_vospalenja.doc8.
2. Демьянов, А. В. Диагностическая ценность исследования уровней цитокінов в клинической практике [Текст] / А. В. Демьянов, А. Ю. Котов, А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. — 2003. — № 3. — С. 20–35.
3. *Изменение уровня маркеров воспаления и состояние периферического кровотока в микроциркуляторном русле кожи у больных хронической обструктивной болезнью легких* [Текст] / И. В. Тихонова [и др.] // Пульмонология. — 2008. — № 1. — С. 57–61.
4. Лапач, С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel [Текст] / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич — Киев : Морион, 2000. — 320 с. — ISBN 966-7632-16-4.
5. Наказ МОЗ України від 19.03.2007 р. № 128 "Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю "Пульмонологія" // Київ — 2007. — 146 с.
6. Останин, А. А. Сравнительная оценка уровня 17 цитокінов в сыворотке и цельной крови здоровых доноров методом проточной флуориметрии [Текст] / А. А. Останин, Е. Р. Черных // Цитокины и воспаление. — 2005. — Т. 4, № 2. — С. 25–32.
7. Перцева, Т. О. Роль системных маркеров запалення у формуванні імунологічної відповіді на інфекцію/колонізацію у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень [Текст] / Т. О. Перцева, Л. І. Конопкіна // Укр. пульмонолог. журн. — 2007. — № 1 — С. 22–26.
8. Самсонова, М. В. Диагностические возможности бронхоальвеолярного лаважа [Текст] / М. В. Самсонова // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. — 2006. — № 4. — С. 8–12.
9. Фещенко, Ю. И. Актуальные вопросы хронического обструктивного заболевания легких [Текст] / Ю. И. Фещенко // Укр. пульмонологічний журнал. — 2010. — № 1. — С. 6.
10. Цитокиновый профиль у больных простым хроническим бронхитом с диспластическими изменениями бронхиального эпителия [Текст] / Л. В. Гердт [и др.] // Сибирский онкологический журнал. — 2004. — № 4 (12). — С. 48–52.

11. *Уровень провоспалительных цитокинов в оценке активности воспалительного процесса при бронхолегочной патологии у детей* [Текст] / Я. С. Гущина [и др.] // Цитокины и воспаление. — 2006. — Т. 5, № 4. — С. 36–38.
12. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO workshop report. Last updated 2010. www.goldcopd.org.
13. Turino, G. M. COPD and biomarkers: the search goes on [Text] / G. M. Turino // Thorax. — 2008. — V. 63. — P. 1032–1034.

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У БОЛЬНЫХ С ОБОСТРЕНИЕМ ХОЗЛ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЗАБОЛЕВАНИЯ

О. Р. Панасюкова, Л. П. Кадан, Е. Ф. Чернушенко,
Е. М. Рекалова, В. Н. Петишкіна, А. С. Фирсова,
О. И. Шпак, О. А. Венгерова

Резюме

С целью определения особенностей цитокинового профиля у больных с обострением ХОЗЛ обследовано 64 пациента с I–IV стадиями заболевания. Исследовали содержание фактора некроза опухоли альфа (TNF α), интерлейкина-8 (IL-8) и интерлейкина-4 (IL-4) в сыворотке крови. У 20 больных определяли уровни TNF α , IL-8 и количество нейтрофилов в бронхоальвеолярном смыве (БАС). Содержание цитокинов исследовали методом иммуноферментного анализа, нейтрофилов — методом микроскопии в мазке БАС. Установлена зависимость изменений цитокиновой продукции от стадии заболевания. При I стадии ХОЗЛ повышенное содержание TNF α и IL-8 регистрировалось только в БАС. При прогрессировании болезни (II–III стадии) гиперпродукция цитокинов определялась и в сыворотке крови. IV стадия ХОЗЛ сопровождалась резким снижением уровней TNF α и IL-8 в сыворотке крови больных. По мере увеличения тяжести заболевания отмечалось повышение степени активности воспалительного процесса в легких, о чем свидетельствовал рост количества нейтрофилов и концентрации IL-8 в БАС.

CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH ACUTE EXACERBATION OF COPD IN DIFFERENT STAGES OF DISEASE

O. R. Panasiukova, L. P. Kadan, K. F. Chernushenko,
E. M. Rekalova, V. N. Petishkina, A. S. Firsova,
O. I. Shpak, O. A. Vengerova

Summary

Sixty four patients with acute exacerbation of I–IV stages COPD were examined to determine the cytokine profile. The content of tumor necrosis factor alpha (TNF α), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-4 (IL-4) in serum have been measured. The levels of TNF α , IL-8 and neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined in 20 patients. The content of cytokines was examined using enzyme immunoassay, neutrophils count — using the method of BALF smear microscopy. The level of cytokine production correlated with the stage of the disease. The elevated TNF α and IL-8 levels were detected only in BALF in first stage of COPD. Increased production of cytokines was associated with the progression of the disease (II–III stage). In stage IV there was a significant decrease of serum TNF α and IL-8 levels. An increase of neutrophil count and IL-8 concentration in BALF confirmed a correlation between the degree of inflammation in lungs and the severity of disease.