

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Э.Г. Мурашов¹, С.В. Столов¹, А.А. Тотолян²

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,
Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера,
Санкт-Петербург, Россия

CYTOKINES PROFILE BRONCHOALVEOLAR LAVAGE PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

E.G. Murasov¹, S.V. Stolon¹, A.A. Totolian²

¹North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

²St. Petersburg Research Institute of epidemiology and microbiology named after Pasteur,
Saint-Petersburg, Russia

© Э.Г. Мурашов, С.В. Столов, А.А. Тотолян, 2012

Для оценки выраженности воспалительного процесса у 80 больных бронхиальной астмой изучено содержание ряда цитокинов в бронхоальвеолярной жидкости методом иммуноферментного анализа. Установлено, что обострение бронхиальной астмы сопровождается повышением содержания IL-4, IL-6, IL-8, GM-CSF. Продукция данных цитокинов у больных аллергической формой бронхиальной астмы происходит интенсивнее, чем у больных смешанной формой. После курса этиотропной терапии уровни цитокинов понизились, а содержание IFN- γ повысилось.

Ключевые слова: бронхоальвеолярная жидкость, цитокины, бронхиальная астма.

To assess the extent of inflammatory process in 80 patients with bronchial asthma examined the content of several cytokines in bronchoalveolar lavage enzyme analysis. Found that the exacerbation of bronchial asthma accompanied by increase of IL-4, IL-6, IL-8 and GM-CSF in bronchoalveolar lavage. Production of cytokines in patients with allergic form bronchial asthma is higher than in patients with mixed form. After a course of antiviral therapy levels have declined, and the contents of cytokine IFN- γ have increased.

Key words: bronchoalveolar lavage, cytokines, bronchial asthma.

Введение

В настоящее время бронхиальная астма (БА) является одним из наиболее значимых и часто встречающихся заболеваний в мире. Современная концепция патогенеза БА констатирует, что в её основе лежит хронический иммуновоспалительный процесс в стенке бронха [1–3]. В развитии такого воспаления участвуют мононуклеары, а также посредники межклеточной кооперации – цитокины и хемокины [4–6]. Изучение системы цитокинов у больных БА может быть полезным в оценке тяжести процесса и прогноза заболевания в целом [7, 8]. Вместе с тем, определение содержания цитокинов непосредственно в стенке бронха представляет большие трудности. В этой связи перспективным направлением изучения активности воспалительного процесса в бронхоальвеолярной ткани может стать оценка содержания цитокинов в бронхоальвеолярной жидкости (БАЖ),

получаемой при проведении лечебной санации бронхов [9–12].

Цель исследования – изучить цитокиновый спектр бронхоальвеолярной жидкости у больных с различными клиническими вариантами бронхиальной астмы.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 80 больных БА, из них 48 женщин и 32 мужчины. Средний возраст больных составил $51,3 \pm 7$ лет. У всех больных была диагностирована персистирующая (постоянная) БА средней тяжести. Верификация клинического варианта и тяжести БА проводилась в соответствии с GINA (2002).

Больные были разделены на 2 группы: 1-я группа – 40 больных с аллергическим вариантом БА, 2-я группа – 40 больных со смешанным вариантом БА. Длительность заболевания в 1-й группе составила $8,7 \pm 3,7$ лет, во 2-й – $15,6 \pm 5,1$ лет.

Группа сравнения была представлена 20 пациентами терапевтического отделения в возрасте $43,2 \pm 7$ лет без бронхолегочных заболеваний.

Параметры функции внешнего дыхания (ФВД) у больных БА при поступлении в стационар и выписке оценивали на электронном спироанализаторе «ДИАМАНТ» (табл. 1).

Таблица 1

Функция внешнего дыхания в группах больных БА при поступлении

Клинические варианты БА	Параметры ФВД		
	ОФВ ₁	ЖЕЛ	ПОС _{выд.}
Аллергический	$54,5 \pm 5,1$	$65,8 \pm 6,6$	$62,3 \pm 8,9$
Смешанный	$41,6 \pm 10,6$	$63,1 \pm 8,2$	$61,1 \pm 7,9$

Примечание: ОФВ₁ – объем форсированного выдоха за 1-ю секунду, ЖЕЛ – жизненная ёмкость лёгких; ПОС_{выд.} – пиковая объёмная скорость выдоха.

Аллергологическое обследование включало кожные скарификационные пробы с неинфекционными аллергенами, а также определение уровня в сыворотке крови общего IgE и катионного белка эозинофилов. Материалом для иммунологического и цитологического исследования служил бронхоальвеолярный лаваж, полученный на 2–3 сутки госпитализации после стойкого купирования бронхоспазма и стабилизации клинического состояния. Повторный забор бронхоальвеолярного лаважа проводили перед выпиской, обычно на 16 сутки после поступления в стационар. Для получения смыва из участка лёгкого бронхоскоп продвигали до «заклинивания» в сегментарный или субсегментарный бронх. Бронхоальвеолярную жидкость получали с помощью бронхоскопа цитологической щёткой. Содержание в бронхоальвеолярном лаваже цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF) определяли на анализаторе Bio-Plex (фирма «Bio-Red» USA). Чувствительность тест-системы для различных цитокинов находилась в диапазоне 0,27–0,5 пг/мл.

Лечение в стационаре проводили согласно рекомендациям ВОЗ (1998) и GINA (2006) β_2 -агонистами быстрого действия через небулайзер по одной дозе беродуала (1 мл) каждые 20 мин в течение одного часа в сочетании с ингаляцией кислорода. При отсутствии эффекта добавляли парентерально глюкокортикостероиды (преднизолон 1 мг/кг с интервалом 2 ч). При сохранении ПСВ (пиковая скорость выдоха) ниже 60% от должного или от наилучшего значения в

течение 3 ч приступ расценивали как тяжёлый. К лечению добавляли метилксантины. Насыщающую дозу вводили из расчёта 5–6 мг/кг массы тела; поддерживающую дозу – в виде длительной инфузии по 0,5–0,6 мг/кг массы тела. Одновременно увеличивали дозу парентеральных глюкокортикостероидов: 250 мг гидрокортизона сукцината или 90–120 мг преднизолона каждые 6 ч. Эффективность лечения оценивали по приросту ОФВ₁ на 15% и более.

Клинические и инструментальные данные обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA for Windows (версия 5.11). Для статистического анализа использовался расчёт средней величины (M) и её ошибки (m). Для оценки значимости различных показателей для согласованных групп использовался непараметрический критерий Вилкоксона, для несогласованных – Манна – Уитни. Для определения взаимосвязи изучаемых показателей проводился корреляционный анализ Пирсона и Спирмана. Критерием статистической достоверности получаемых выводов считали общепринятую в медико-биологических исследованиях величину $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования была изучена цитология бронхоальвеолярного лаважа (табл. 2). Установлено, что до начала лечения в БАЖ у больных атопической БА отмечается достоверно меньшее количество полиморфноядерных нейтрофилов по сравнению с группой больных смешанной БА ($21,5 \pm 4,8$ и $11,3 \pm 2,8\%$ соответственно, ($p < 0,05$)). Минимальное количество этих клеток определяется у здоровых лиц ($2,2 \pm 0,3\%$).

Повышение содержания полиморфноядерных нейтрофилов во 2-й группе до начала лечения связано, по нашему мнению, с патогенетическими особенностями формирования воспаления у больных смешанной БА, в обострении которой активно участвует микробная инфекция, индуцирующая рекрутирование в бронхиальное дерево клеток общевоспалительного назначения. В отношении макрофагов отмечена противоположная зависимость: самый низкий их уровень был выявлен при смешанной форме БА ($51,2 \pm 7,1\%$), а максимальный – в группе здоровых лиц ($81,1 \pm 4,5\%$). Патогенетическое лечение изменило количественные соотношения фагоцитирующих клеток в БАЖ: в обеих группах больных содержание макрофагов повысилось, а количество полиморфноядерных

нейтрофилов достоверно уменьшилось, хотя и не достигло значений лиц контрольной группы.

Специфичным признаком для больных atopической БА явилось многократное увеличение в БАЖ количества тучных клеток (4-кратное) по сравнению со смешанной формой БА ($2,2 \pm 0,5$ и $0,5 \pm 0,1\%$ соответственно, ($p < 0,001$)). На фоне лечения количество тучных клеток существенно уменьшилось, особенно в группе atopической БА. Необходимо заметить, что в группе контроля тучные клетки не выявлялись вовсе.

Наличие аллергического компонента в развитии иммуноопосредованного воспаления у больных atopической БА подтверждено также и содержанием эозинофилов в БАЖ. Их уровень был выше по сравнению со смешанной БА ($10,2 \pm 2,5$ и $7,1 \pm 2,8\%$ соответственно, ($p > 0,05$)). Повторное исследование, выполненное через 10 дней, показало почти двукратное снижение содержания эозинофилов у больных atopической БА ($10,2 \pm 2,5$ и $6,1 \pm 1,6\%$ соответственно, ($p < 0,05$)). Минимальное количество эозинофилов выявлялось в группе контроля ($1,5 \pm 0,1\%$).

При оценке содержания лимфоцитов в БАЖ установлено их достоверное повышение в обеих группах больных БА по сравнению с контрольной группой, однако различий в содержании лимфоцитов в зависимости от варианта БА выявлено не было. Под влиянием лечения содержание лимфоцитов изменилось: в обеих группах больных их уровень понизился до показателей, характерных для лиц контрольной группы.

Содержание клеток бронхиального эпителия в фазу обострения БА оказалось наиболее высоким у пациентов со смешанной формой заболевания и достоверно превышало этот показатель у больных с atopической БА ($14,2 \pm 3,3$ и $6,8 \pm 3,6\%$ соответственно, ($p < 0,05$)). При этом обращает внимание увеличение содержания эпителиальных клеток на фоне лечения, особенно выраженное при atopической БА.

При изучении содержания цитокинов в БАЖ выявлено существенное увеличение уровней ряда интерлейкинов (IL-4, IL-6, IL-8), а также фактора некроза опухоли (TNF- α) и колоние-стимулирующего фактора (GM-CSF) в обеих группах больных БА (табл. 3).

Таблица 2

Показатели цитологического состава бронхоальвеолярного лаважа у больных с различными клиническими вариантами БА ($M \pm m$)

Цитологический состав БАЛ, %	Атопическая БА 1-я группа		Смешанная БА 2-я группа		Контроль	Р
	Обострение	Ремиссия	Обострение	Ремиссия		
	1	2	3	4	5	
Полиморфноядерные нейтрофилы	$11,3 \pm 2,8$	$5,3 \pm 3,5$	$21,5 \pm 4,8$	$10,4 \pm 3,7$	$2,2 \pm 0,3$	$P_{1,3} < 0,05$ $P_{1,2} < 0,05$ $P_{1,5} < 0,01$ $P_{2,4} < 0,05$ $P_{3,5} < 0,01$ $P_{4,5} < 0,05$ $P_{3,4} < 0,05$
Макрофаги	$60,4 \pm 4,2$	$78,2 \pm 5,7$	$51,2 \pm 7,1$	$62,5 \pm 6,3$	$81,1 \pm 4,5$	$P_{1,5} < 0,05$ $P_{3,5} < 0,05$ $P_{4,5} < 0,05$
Бронхиальный эпителий	$6,8 \pm 3,6$	$11,3 \pm 5,1$	$14,2 \pm 3,3$	$17,3 \pm 2,9$	$7,5 \pm 0,1$	$P_{1,3} < 0,05$ $P_{4,5} < 0,05$ $P_{3,5} < 0,05$
Тучные клетки	$2,2 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	—	$P_{1,3} < 0,001$ $P_{1,2} < 0,01$ $P_{1,4} < 0,001$
Лимфоциты	$9,7 \pm 2,1$	$7,2 \pm 1,9$	$7,3 \pm 1,5$	$5,2 \pm 0,8$	$6,4 \pm 1,2$	$P_{1,4} < 0,05$
Эозинофилы	$10,2 \pm 2,5$	$6,1 \pm 1,6$	$7,1 \pm 2,8$	$5,2 \pm 1,7$	$1,5 \pm 0,1$	$P_{1,2} < 0,05$ $P_{1,4} < 0,05$ $P_{1,5} < 0,01$

**Показатели содержания цитокинов в бронхоальвеолярной жидкости
у больных с различными клиническими вариантами БА (M±m)**

Цитокины пг/мл	Атопическая БА		Смешанная БА		Контроль	P
	Обострение	Ремиссия	Обострение	Ремиссия		
	1	2	3	4	5	
IL-2	1,2±0,1	1,0±0,1	1,6±0,2	0,96±0,1	1,09±0,1	н/д
IL-4	128±12	54,0±7,5	94,2±12	37,6±5,4	5,9±1,0	P _{1,3} < 0,05 P _{1,2} < 0,05 P _{3,4} < 0,05 P _{1,5} < 0,01 P _{3,5} < 0,01 P _{4,5} < 0,05 P _{2,4} < 0,05
IL-6	150±8	41,6±2	51,4±3	8,4±2,6	2,7±0,4	P _{1,3} < 0,01 P _{1,2} < 0,01 P _{3,4} < 0,01 P _{1,5} < 0,01 P _{3,5} < 0,01 P _{4,5} < 0,05 P _{2,4} < 0,01
IL-8	5824±103	1020±85	2143±98	864±37	159±23	P _{1,3} < 0,05 P _{3,5} < 0,001 P _{1,2} < 0,01 P _{3,4} < 0,05 P _{1,5} < 0,001 P _{4,5} < 0,01
IL-10	3,6±0,4	1,2±0,1	4,2±0,4	2,0±0,2	1,0±0,1	P _{1,5} < 0,05 P _{3,5} < 0,05 P _{1,2} < 0,05 P _{3,4} < 0,05
GM-CSF	6,0±0,2	2,6±1,1	3,7±0,4	1,7±0,8	1,2±0,7	P _{1,2} < 0,05 P _{3,4} < 0,05 P _{3,5} < 0,05 P _{1,5} < 0,01
IFN-γ	3,2±0,9	5,7±1,4	2,6±1,0	10,6±2,6	2,3±0,1	P _{1,2} < 0,05 P _{3,4} < 0,05 P _{2,5} < 0,05 P _{4,5} < 0,01
TNF-α	2,6±0,1	1,0±0,4	1,8±0,2	1,3±0,7	0,77±0,1	P _{1,5} < 0,05

Результатами данного исследования установлено, что различные патогенетические варианты БА характеризовались индивидуальными цитокиновыми профилями. Так, для атопической формы более характерно повышение IL-4, IL-6, IL-8, GM-CSF, значения которых были достоверно выше, чем у больных смешанной БА (128±12 и 94,2±12 пг/мл для IL-4, 150±8 и 51±3 пг/мл для IL-6, 5825±103 и 2143±98 пг/мл для

IL-8 и 6,0±0,2 и 3,7±0,4 пг/мл для GM-CSF). Также необходимо отметить, что содержание в бронхоальвеолярной жидкости всех изученных цитокинов, за исключением IL-2, многократно (от 2 до 70 раз) превышало уровни контрольной группы.

Проводимая терапия основного заболевания была эффективной независимо от патогенетического варианта БА, что подтверждалось

снижением цитокиновой активности в обеих группах больных. Через две недели уровни IL-4 и GM-CSF снизились в два раза, а IL-6 и IL-8 – более чем трёхкратно. Также была отмечена тенденция к снижению содержания IL-10 и TNF- α . Вместе с тем, уровень IL-2 в БАЖ не отличался от группы контроля и не изменялся под влиянием лечения как в группе atopической, так и смешанной формы БА. Уровень IFN- γ , напротив, достоверно повышался на фоне базисной терапии в обеих группах больных: на 50% при atopической БА и почти четырёхкратно при смешанной форме БА.

Проведенные нами цитологическое и иммунологическое исследования БАЖ подтвердили наличие выраженного иммуноопосредованного воспаления в бронхолегочной ткани больных БА. Кроме того, они свидетельствуют о высокой практической значимости данной методики в дифференциальной диагностике различных форм БА. В процессе изучения содержания цитокинов и клеточного состава бронхоальвеолярной жидкости установлены отличия двух патогенетических вариантов БА. Для atopической БА характерным оказалось многократное увеличение содержания тучных клеток по сравнению со смешанной формой БА. Анализ содержания цитокинов в БАЖ показал большую выраженность иммунного воспаления в легочной ткани у больных atopической БА по сравнению со смешанным вариантом БА, для которой оказались характерными максимальные уровни IL-6 и IL-8. Патогенетическая терапия, включающая глюкокортистероиды, β_2 -агонисты и метилксантины, уменьшала выраженность показателей клеточного и цитокинового звена воспаления.

Таким образом, полученные в исследовании данные позволяют говорить о различных механизмах развития обострения БА у больных при atopической и смешанной формах заболевания. При первом варианте БА иммунологическая активность существенно выше, чем у больных смешанной БА. Оценка клеточного состава БАЖ, а оптимально и содержания цитокинов, проведенная по окончании курса этиотропной терапии, может служить методом контроля эффективности лечения больных БА.

Выводы

1. Исследование клеточного состава и содержания цитокинов в БАЖ позволяет проводить дифференциальную диагностику различных форм БА. Для больных atopической БА харак-

терно высокое содержание тучных клеток; для больных смешанной БА – полиморфноядерных нейтрофилов. Специфическими маркерами atopической БА могут быть многократно повышенные уровни IL-6 и IL-8.

2. Патогенетическая терапия БА нормализует клеточный состав БАЖ, снижает содержание IL-4, IL-6, IL-8, GM-CSF и повышает уровень IFN- γ . Оценка клеточного состава и содержания цитокинов БАЖ может служить показателем эффективности лечения заболевания.

Литература

1. Царёв, В.П. Нарушения иммунологического гомеостаза у больных бронхиальной астмой / В.П. Царёв // Медицинские новости. – 2003. – № 9. – С. 3–7.
2. Рябова, Л.В. Бронхоальвеолярный лаваж в диагностике поражения лёгких при бронхиальной астме / Л.В. Рябова [и др.] // Материал 5-й конференции иммунологов Урала. – Оренбург, 2006. – С. 170–171.
3. Волкова, Л.И. Характеристика бронхиальных смывов у больных с различными формами бронхиальной астмы и хроническим обструктивным бронхитом / Л.И. Волкова [и др.] // Пульмонология. – 1998. – № 3. – С. 59–63.
4. Ryabava, L. Cytokine regulation of the chronic inflammation of bronchial asthma patients / L. Ryabava, A. Zurochka // Eur. Respir. J. – 2005. – Vol. 26. – Suppl. 49. – P. 590.
5. Рябова, Л.В. Различия каскада цитокинов у больных бронхиальной астмой в зависимости от стадии течения заболевания / Л.В. Рябова, А.В. Зурочка // Медицинская иммунология. – 2007. – Т. 9. – № 4/5. – С. 491–498.
6. Teran, L.M. CCL chemokines and asthma / L.M. Teran // Immunol Today. – 2000. – Vol. 21. – № 5. – P. 235–242.
7. Зурочка, А.В. Оценка иммунного статуса и продукции цитокинов у больных atopической и смешанной бронхиальной астмой / А.В. Зурочка [и др.] // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11. – № 2/3. – С. 279–286.
8. Блажко, В.И. Клеточный состав и содержание цитокинов в жидкости бронхоальвеолярного лаважа у больных бронхиальной астмой с различной чувствительностью бронхального дерева к метахолину / В.И. Блажко [и др.] // Украинский терапевтический журнал. – 2004. – № 3. – С. 92–95.
9. Самсонова, М.В. Стандартные цитопрепараты бронхоальвеолярного лаважа в

исследовании и патологии лёгких / М.В. Самсонова, А.Л. Черняев // Лаборатория. – 1997. – № 6. – С. 6–7.

10. *Wen, F.Q.* Interleukin-4 and interleukin-13 enhanced transforming growth factor-beta2 production in cultured human bronchial epithelial cells is attenuated by interferon-gamma / F.Q. Wen [et al.] // Am J Respir Cell Moll Biol. – 2002. – Vol. 26. – № 4. – P. 282–290.

11. *Bloumen, K.* The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung / K. Bloumen [et al.] // Immunology Letters. – 2007. – № 113. – P. 6–18.

12. *Lampinen, M.* The role of interleukin-5, interleukin-8 and RANTES in the hemotactic attraction of eosinophils to the allergic lung / M. Lampinen, S. Rak, P. Venge // Clin. Exp. Allergy. – 1999. – Vol. 29. – P. 314–322.

С.В. Столов

e-mail: sergey.stolov@spbmapo.ru