

Л.Ю. Долинина^{1*}, А.Н. Делиева¹, А.П. Каклюгин²,
Е.О. Богданова³, О.В. Галкина³, В.И. Трофимов¹

УДК 616.24-002.2(045)

ГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

¹ кафедра госпитальной терапии им. М.В. Черноруцкого

² клиника госпитальной терапии

³ лаборатория биохимического гомеостаза организма НИИ нефрологии

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Резюме

Обследовано 98 больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) различной степени тяжести в фазе затихающего обострения. Изучены уровни ИЛ-8, γ-ИФ, ФНО-α в мокроте, смывах из бронхов и сыворотке крови больных ХОБЛ. Подтверждена корреляция данных цитокинов с цитологическим составом мокроты и смывов из бронхов, С-реактивным белком сыворотки крови в зависимости от стадии заболевания. Выявлена связь курения с активностью местного и системного воспалительного процесса.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, воспаление, цитокины.

Abstract

We examined 98 patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) of varying severity in active phase of the fading. Levels of IL-8, γ-IF, TNF-α in sputum, bronchial washings and serum of patients with COPD were studied. Correlation between cytokine data with cytological structure of sputum and bronchial washings and C-reactive protein serum depending on the stage of disease was confirmed. Communication of smoking with activity of local and system inflammatory process was revealed.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, inflammation, cytokines.

В настоящее время ХОБЛ рассматривают не только как болезнь легких, но и как заболевание с «существенными внелегочными проявлениями» [9]. К причинам внелегочных проявлений прежде всего относят системную воспалительную реакцию, развивающуюся при ХОБЛ. На ранних стадиях заболевания воспалительный процесс, который чаще всего вызывается ингаляцией табачного дыма, локализуется в бронхолегочных путях (в основном малые дыхательные пути) и может быть обратимым. Со временем воспаление дыхательных путей становится персистирующим и распространенным (крупные бронхи, легочная паренхима, легочные сосуды), а в дальнейшем принимает и системный характер.

Точные механизмы системного воспаления при ХОБЛ изучены недостаточно. Предполагается, что взаимосвязь между местным (т.е. бронхолегоч-

ным) и системным воспалением осуществляется за счет:

- 1) выхода стресс-индуцированных цитокинов и свободных радикалов из бронхолегочной системы в системный кровоток;
- 2) активации лейкоцитов периферической крови или клеток-предшественников в костном мозге;
- 3) стимуляции костного мозга и печени провоспалительными медиаторами, высвобождаемыми воспалительными и структурными клетками [4].

Целью данной работы стала сравнительная оценка активности провоспалительных цитокинов — фактора некроза опухоли-α (ФНО-α), интерлейкина 8 (ИЛ-8) и γ-интерферона (γ-ИФ) в материале, полученном из бронхиального дерева (мокрота, смывы из бронхов, бронхоальвеолярный лаваж) и сыворотке крови больных ХОБЛ различной стадии. Также про-

Стадии ХОБЛ	Макрофаги (%)		Нейтрофилы (%)	
	Мокрота	Смыв из бронхов	Мокрота	Смыв из бронхов
1-я (n = 11)	24,1 ± 2,23	25,4 ± 3,73	36,28 ± 3,61	31,4 ± 4,4
2-я (n = 28)	26,2 ± 1,24	26,9 ± 1,44	38 ± 3,11	35 ± 2,42
3-я (n = 34)	14,6 ± 2,21	21,62 ± 5,54	54,8 ± 6,08	44,89 ± 6,08
4-я (n = 25)	17,6 ± 3,45	16,5 ± 1,53	50,1 ± 3,97	34,8 ± 4,01

Таблица 1. Сравнительный анализ клеточного состава мокроты и смывов из бронхов у больных ХОБЛ различной степени тяжести ($M \pm m$)

водился сравнительный анализ уровня изучаемых цитокинов с концентрацией маркера системного воспаления — С-реактивного белка (СРБ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для решения поставленных задач в клинике госпитальной терапии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова было обследовано 98 больных ХОБЛ различной степени тяжести в фазе затихающего обострения, из них 75 мужчин и 23 женщины. В период обострения 89 человек получали внутривенную терапию глюкокортикостероидами, 67 — небулайзерную терапию муколитиками и ингаляционными глюкокортикостероидами, 59 человек постоянно получали в среднем 1000 мкг бекламетазона дипропионата ингаляционно в качестве базисной терапии. Диагноз ХОБЛ, степень тяжести и активность течения заболевания устанавливали в соответствии с критериями Глобальной инициативы по ХОБЛ пересмотра 2009 г. [9]. Исходя из указаний того же руководства выделено 4 группы пациентов с различной степенью тяжести заболевания. 1-ю группу (n = 11) составили пациенты с 1-й стадией ХОБЛ, у которых регистрировалось только снижение индекса Тиффно менее 70% должного. 2-ю группу составили пациенты с ХОБЛ 2-й стадии (n = 28), у которых регистрировалось снижение объема форсированного выдоха (ОФВ1) менее 80% должного, снижение отношения ОФВ1 к форсированной жизненной емкости легких (ОФВ1/ФЖЕЛ) < 70%. В 3-ю группу (n = 34) вошли больные с ОФВ1 ≤ 50%, но более 30% должного. К 4-й группе (n = 25) отнесены пациенты с крайне тяжелым течением ХОБЛ (ОФВ1 < 30%). Критериями исключения из исследования были дыхательные нарушения при рецидивирующих тромбоэмболиях легочной артерии, раке легкого, системных аутоиммунных заболеваниях, тяжелой эндокринной, печеночной и почечной патологии. Средний возраст обследованных составил 61,87 ± 10,7 года. 76 человек были курильщиками со средним стажем курения 25,9 ± 1,8 пачка/лет. У 41 человека имел место контакт с вредными факторами на работе. Всем пациентам после подписания информированного добровольного согласия на медицинское вмешательство проводилось комплексное клинко-инструментальное и лабораторное обследование по плану пульмонологического больного. Дополнительно исследовался анализ крови на СРБ, ФНО-α, ИЛ-8, γ-ИФ. Концентрация провоспалительных цитокинов также исследовалась в мокроте, смывах из бронхов и бронхо-

альвеолярном лаваже. ФНО-α, ИЛ-8 и γ-ИФ определялись методом иммуноферментного анализа с использованием наборов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург). Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «SPSS for Windows», версия 13.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ клеточного состава мокроты и смывов из бронхов выявил, что и в той, и в другой биологической жидкости при 1-й и 2-й стадиях ХОБЛ преобладает макрофагальная реакция, при 3-й и 4-й — нейтрофильная реакция. При этом достоверной разницы между клеточным составом мокроты и смывов из бронхов не получено (табл. 1).

При сравнительном изучении концентрации провоспалительных цитокинов в мокроте, смывах из бронхов и бронхоальвеолярном лаваже наиболее высокие значения для ФНО-α (p < 0,005 для ФНО-α мокроты) были выявлены у больных со 2-й стадией ХОБЛ (табл. 2). Полученные данные соотносятся с результатами цитологического анализа мокроты и смывов из бронхов. При 1-й и 2-й стадиях ХОБЛ преобладает макрофагальная реакция, регистрируется достоверно более высокий уровень ФНО-α, который оказывает прямое цитотоксическое действие, поддерживает альтерацию ткани бронхов и выраженность воспалительной реакции [6]. На 3-й стадии уровень ФНО-α остается высоким за счет повышенной выработки его макрофагами и, возможно, за счет эффекта накопления. Также на этой стадии наибольших значений достигает уровень ИЛ-8 в мокроте и смывах из бронхов. ИЛ-8 и ФНО-α способствуют активации нейтрофилов, что и было подтверждено в результате изучения цитологического состава биологических жидкостей, полученных из бронхов больных. Высокий уровень нейтрофилов, возрастающий от 2-й к 3-й стадии ХОБЛ, свидетельствует о неаллергическом характере воспаления. Высокая активность воспаления, которая увеличивается при 2-й и 3-й стадиях болезни, подтверждает значение воспаления и указывает на роль противовоспалительной терапии в прогрессировании ХОБЛ [4].

Исходя из полученных результатов можно сказать, что максимальная активность воспалительного процесса в бронхах регистрируется на 2-й и 3-й стадиях заболевания. Основными клетками воспаления являются макрофаги и нейтрофилы, синтезирующие провоспалительные цитокины, прежде всего ФНО-α, и именно

* Контакты. E-mail: liuba2612@mail.ru. Телефон: (812) 499-68-98

Стадии ХОБЛ	Сыворотка крови			Мокрота			Смыв из бронхов			Бронхоальвеолярный лаваж		
	ФНО-α	ИЛ-8	γ-ИФ	ФНО-α	ИЛ-8	γ-ИФ	ФНО-α	ИЛ-8	γ-ИФ	ФНО-α	ИЛ-8	γ-ИФ
1-я (n = 11)	9,25 ± 2,63	26,70 ± 2,58	694,06 ± 51,7	3,74 ± 0,2	430,93 ± 31,0	1,8 ± 0,17	5,08 ± 0,16	10,2 ± 1,3	1,75 ± 0,47	1,4 ± 0,1	2,4 ± 1,05	5,9 ± 1,06
2-я (n = 28)	14,05 ± 3,0*	19,48 ± 3,43	308 ± 28,68	37,39 ± 3,14*	2683,5 ± 20,24	58,66 ± 3,5	7,02 ± 0,62	248,1 ± 11,3	5,26 ± 0,12	7,92 ± 2,7	298,0 ± 27,2	47,6 ± 4,7
3-я (n = 34)	4,91 ± 0,9	28,69 ± 2,92	208,68 ± 32,5	22,56 ± 3,37	2980,28 ± 20,5	57,9 ± 2,25	10,48 ± 1,8	606,8 ± 11,08*	88,26 ± 6,7	0,7 ± 0,05	261,4 ± 10,7	1,2 ± 0,5
4-я (n = 25)	3,03 ± 0,1	16,2 ± 1,04	88,23 ± 2,58	16 ± 3, 2	2618 ± 20,36	55,25 ± 1,5	7,02 ± 0,42	503,1 ± 1,44	5,3 ± 0,42	3,08 ± 0,05	185 ± 20,02	1,01 ± 0,11

* — различия достоверны p < 0,005 между значениями данного показателя у больных ХОБЛ 1-й, 2-й и 3-й стадий.

Таблица 2. Концентрация ФНО-α, ИЛ-8 и γ-ИФ в сыворотке крови и материале из бронхов у пациентов с ХОБЛ различной степени тяжести, пг/мл (M ± m)

этот цитокин описывается как основной в запуске и поддержании системного воспаления при ХОБЛ [5, 6, 8]. При изучении концентрации γ-ИФ в мокроте, смывах из бронхов и бронхоальвеолярном лаваже (табл. 2) более высокое значение данного маркера выявлено в бронхоальвеолярном лаваже больных ХОБЛ 2-й стадии (47,6 ± 4,7 пг/мл). В доступной литературе встречаются исследования, где максимальные значения уровня γ-ИФ, а также ФНО-α мокроты выявляются при начальных стадиях заболевания. Это, вероятно, объясняется тем, что γ-ИФ и ФНО-α являются основными провоспалительными цитокинами, продуцируемыми макрофагами, которые поддерживают повреждение клеток и активность воспалительной реакции на начальных стадиях заболевания [6].

Анализ уровня изучаемых маркеров воспаления и клеточного состава мокроты, смывов из бронхов и бронхоальвеолярного лаважа показал, что достоверной разницы данных показателей в различных биологических жидкостях не выявлено. Это позволяет сделать вывод о равноценной информативности анализа мокроты, получаемой неинвазивным методом, и смывов из бронхов и бронхоальвеолярного лаважа, для которых необходимо проведение бронхоскопии. Полученные данные также свидетельствуют об информативности исследования цитограммы спонтанно отделяемой мокроты в количественной оценке характера воспалительного процесса в бронхах [2, 10].

При исследовании сыворотки крови у пациентов с ХОБЛ различной степени тяжести выявлено достоверное повышение (p < 0,005) уровня ФНО-α у больных со 2-й стадией заболевания. Уровень γ-ИФ был наиболее высоким на 1-й и 2-й стадиях (табл. 2). Эти результаты соотносятся с уровнем цитокинов в мокроте и бронхоальвеолярном лаваже. При 2-й стадии ХОБЛ регистрируется самый высокий уровень ФНО-α

в мокроте (37,39 ± 3,14 пг/мл, p < 0,005) и γ-ИФ в бронхоальвеолярном лаваже (47,6 ± 4,7 пг/мл, p < 0,005).

В то же время у пациентов с 4-й стадией ХОБЛ наблюдались наименьшие значения ИЛ-8, ИФ-γ и ФНО-α. По данным литературы, этот факт объясняется снижением синтеза цитокинов вследствие истощения белково-энергетических ресурсов и иммунологической недостаточности, снижением фагоцитарного индекса нейтрофилов при более тяжелом течении заболевания [3]. Б.А. Черняк, Ф.И. Петровский в своих работах описывают похожие результаты, подтверждая высокий уровень воспалительной реакции при 1-й и 2-й стадиях заболевания, а также системность воспалительного процесса [6].

Однако чаще в литературе описываются обратные результаты [2, 7, 11]. Показано нарастание уровня γ-ИФ и ИЛ-8 при тяжелой и крайне тяжелой стадиях ХОБЛ, что объясняется более выраженной антигенной стимуляцией при тяжелом течении ХОБЛ. Таким образом, полученные к настоящему моменту данные нельзя считать однозначными. Выявленное снижение уровня активности провоспалительных цитокинов при 4-й стадии ХОБЛ можно объяснить тем, что эта группа пациентов получала ингаляционные глюкокортикостероиды как базисную терапию не менее 4 лет, им проводилась наиболее активная противовоспалительная терапия в период обострения в сочетании с антибактериальной терапией и холинолитиками длительного действия.

При изучении концентрации СРБ в крови больных с различной степенью тяжести ХОБЛ выявлены более высокие значения при 1-й (17,8 мг/л) и 2-й (10,24 мг/л) стадиях заболевания, в то время как у больных с 3-й и 4-й стадиями регистрировалось практически нормальное значение уровня СРБ в крови (5,2 мг/л). СРБ является неспецифическим маркером системного вос-

Группы	СРБ мг/л	ФНО-α сыворотки	ФНО-α смывов
Курильщики (n = 76)	12,7 ± 4,5*	12,19 ± 4,0*	6,3 ± 1,9*
Некурящие (n = 22)	3,15 ± 0,94	8,57 ± 4,03	2,15 ± 1,8

* — различия достоверны p < 0,005 между значениями у курильщиков и некурящих.

Таблица 3. Уровень СРБ и ФНО-α у курящих и некурящих пациентов с ХОБЛ (M ± m)

паления и относится к острофазовым белкам, т.е. его концентрация, как правило, повышается либо в самом начале воспалительного процесса, либо в острую фазу. Также СРБ усиливает продукцию провоспалительных цитокинов. Снижение уровня СРБ сыворотки крови у пациентов с тяжелым и крайне тяжелым течением ХОБЛ обусловлено, возможно, тем, что пациенты этих групп получали ингаляционные глюкокортикостероиды как базисную терапию в сочетании с холинолитиками пролонгированного действия и системные глюкокортикостероиды в период обострения. Учитывая данные результаты, можно предположить, что назначение базисной противовоспалительной терапии рационально на более ранних стадиях ХОБЛ.

При изучении влияния курения на уровень СРБ и провоспалительных цитокинов было выявлено, что у курящих пациентов уровень СРБ, ФНО-α сыворотки крови и ФНО-α смывов из бронхов достоверно выше, чем у некурящих (p < 0,005), что подтверждает роль курения в развитии местного и системного воспаления (табл. 3).

Выводы

1. Полученные результаты свидетельствуют практически об одинаковой информативности мокроты, смывов из бронхов и бронхоальвеолярного лаважа при изучении активности местного воспалительного процесса, что позволяет рекомендовать более редкое применение инвазивных методов получения биоматериала. Исследование мокроты дает возможность оценить активность воспаления при ХОБЛ как на клеточном, так и на гуморальном уровне.

2. При 1-й и 2-й стадиях ХОБЛ наблюдается острая воспалительная реакция, которую характеризуют повышенный уровень СРБ сыворотки крови, макрофагальная реакция мокроты и смывов из бронхов, достоверно повышенный уровень ФНО-α и γ-ИФ сыворотки крови, мокроты и смывов из бронхов.

3. 3-я стадия заболевания характеризуется достоверно более высоким содержанием нейтрофилов, снижением содержания макрофагов в мокроте, прогрессированием воспалительной реакции с достоверным повышением ИЛ-8 сыворотки и мокроты, что может доказывать влияние персистирующей бактериальной инфекции на течение и прогрессирование заболевания в более поздних стадиях.

4. В 4-й стадии развития ХОБЛ активность местного и системного воспаления уменьшается. Вероятна связь снижения уровня цитокинов на этой стадии с продолжительной базисной терапией ингаляционными глюкокортикостероидами.

5. На основании сравнительного анализа цитологического исследования мокроты и смывов из бронхов, уровня ФНО-α, ИЛ-8 и γ-ИФ, СРБ в сыворотке крови и ФНО-α, ИЛ-8 и γ-ИФ в материале, полученном из бронхов, можно сделать вывод, что данные маркеры диагностически значимы на всех стадиях развития ХОБЛ.

6. Проведенное исследование позволило выявить и подтвердить связь курения с наличием и активностью как местного, так и системного воспалительного процесса.

Ⓐ

Список литературы

1. Авдеев С.Н. ХОБЛ и сердечно-сосудистые заболевания: механизмы ассоциации // Пульмонология. 2008. № 1. С. 5–10.
2. Авдеев С.Н., Анаев Э.Х., Чучалин А.Г. Применение метода индуцированной мокроты для оценки интенсивности воспаления дыхательных путей // Пульмонология. 1997. № 2. С. 81–86.
3. Бархатова Д.А. Системное воспаление и состояние нутритивного статуса при хронической обструктивной болезни легких. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. 2009. 26 с.
4. Букреева Е.Б. Этиология инфекционного процесса и особенности воспаления при хронической обструктивной болезни легких. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 2004. 56 с.
5. Цветкова О.А., Абидов А.М. Роль макрофагов и цитокинов в формировании воспаления и прогрессировании хронической обструктивной болезни легких // Российские медицинские вести. 2010. № 3. С. 21–25.
6. Черняк Б.А., Петровский Ф.И. Воспаление при ХОБЛ и возможности фармакотерапевтического контроля // Пульмонология и аллергология. 2008. № 1. С. 23–24.
7. Agusti A., Noguera A., Sauleda J., Sala E., Pons J., Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease // Eur Respir. 2003. № 21. P. 347–360.
8. Barczyk A. et al. Cytokine production by bronchoalveolar lavage T-lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease // Allergy Clin. Immunol. 2006. № 117. P. 1484–92.
9. Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). 2009.
10. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease Oxidative Stress Study Group // Respir Crit Care Med. 1997. № 156. P. 341–357.
11. Seitova G.N., Bukreyeva Ye.B., Kremis I.S., Puzryyov V.P. Association of cytokines gene polymorphisms (TNF and IL8) with chronic obstructive pulmonary disease development // Бюллетень сибирской медицины. 2010. № 3. С. 9–11.