

5. Кобылянский В.И. Методы исследования мукоцилиарной системы: возможности и перспективы // Тер. архив. 2001. №3. С.73–76.

6. Одириев А.Н., Колосов В.П., Луценко М.Т. Новый подход к диагностике мукоцилиарной недостаточности у больных бронхиальной астмой // Бюл. Сиб. отд-ния РАМН. 2009. №2 (136). С.75–80.

7. Чикина С.Ю. Патология мукоцилиарного клиренса при различных бронхолегочных заболеваниях // Мукоактивная терапия / под ред. А.Г.Чучалина. М.: Атмосфера, 2006. С.31–42.

8. Чучалин А.Г. Бронхоэктазы: клинические проявления и диагностические программы // РМЖ. 2005. Т.13, №4. С.177–183.

9. Management of congenital tracheomalacia: a single institution experience / Anton-Pacheco J.L. [et al.] // Chir. Pediatr. 2006. Vol.19. P.55–60.

10. Prenatal period to adolescence: the variable pres-

entations of congenital cystic adenomatoid malformation / Aslan A.T. [et al.] // Pediatr. Int. 2006. Vol.48. P.626–630

11. Bhandari A. Congenital malformations of the lung and the airway // Pediatric pulmonology / ed. H.Panitch. Mosby, 2005. P.35–59.

12. Kartagener M., Mulli K. Familiäres Vorkommen von bronchektasien // Schweiz. Z. Tuberk. 1956. Vol.13. P.221–225.

13. Meeks M., Bush A. Primary ciliary dyskinesia // Pediatr. Pulm. 2000. Vol.29. P.307–316.

14. Homozygosity mapping of a gene locus for primary ciliary dyskinesia of the heavy dynein chain DNAH5 as a candidate gene / Omran H. [et al.] // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2000. Vol.23. P.696–702.

15. Zach M.S., Eber E. Adult outcome of congenital lower respiratory tract malformations // Arch. Dis. Child. 2002. Vol.87. P.500–505.

Поступила 10.12.2009

Анатолий Васильевич Ленишин, руководитель лаборатории,  
675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22;  
Anatoliy V. Lenshin,  
22 Kalinin Str., Blagoveschensk, 675000;  
E-mail: cfpd@amur.ru



УДК 612-083[616.233-002.2:612.225]

А.Г.Приходько, Г.А.Макарова

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ В ИНИЦИАЦИИ И МОДУЛИРОВАНИИ ХОЛОДОВОЙ РЕАКТИВНОСТИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания Сибирского отделения РАМН, Благовещенск

### РЕЗЮМЕ

С целью изучения иммунологических механизмов холодовой гиперреактивности дыхательных путей исследовались общий IgE, интерлейкины IL-1, IL-4, IL-8, интерферон  $\gamma$  перед и после 3-минутной изокапнической гипервентиляции холодным (-20°C) воздухом у 79 больных хроническими болезнями органов дыхания. Полученные данные свидетельствуют, что у части больных с выявленной холодовой гиперреактивностью дыхательных путей существует IgE-опосредованный механизм формирования гиперреактивности дыхательных путей.

Ключевые слова: холодовая гиперреактивность дыхательных путей, иммунологические механизмы, цитокины.

### SUMMARY

A.G.Prikhodko, G.A.Makarova

## IMMUNOLOGIC MECHANISMS IN INITIATION AND MODELLING OF AIRWAY COLD RESPONSIVENESS

To study immunologic mechanisms of cold airway hyperresponsiveness, whole IgE, interleukins IL-1, IL-4, IL-8, interferon  $\gamma$  before and after 3-minute isocapnic hyperventilation by cold air (-20°C) in 79 patients with chronic respiratory diseases have been studied. The obtained data suggested that some patients with cold airway hyperresponsiveness have IgE-mediated mechanism of airway hyperresponsiveness forming.

Key words: cold airway hyperresponsiveness, immunologic mechanisms, cytokine.

Патогенетически значимой представляется взаимосвязь измененной реактивности и резистентности дыхательной системы к экзогенным влияниям. В этом аспекте важным звеном патогенеза хронических болезней органов дыхания (БОД) следует предположить формирование особого иммуно-метаболического профиля, характеризующегося оксидативным стрессом, дисбалансом цитокинов как основных тканевых регуляторов хронического воспалительного процесса, в частности IL-4, IL-5, IL-13, а также IgE-зависимыми реакциями гладкомышечных клеток дыхательных путей. Представление об участии цитокинов и иммуноглобулина E в развитии у больных холодовой гиперреактивности дыхательных путей до настоящего времени остается несформированным. В то же время клиническая практика требует выделения в популяции больных хроническими БОД фенотипов, связанных с доминирующими патогенетическими механизмами развития данного синдрома, что чрезвычайно важно для поиска адекватных методов коррекции.

Целью работы служило определение роли цитокинов и иммуноглобулина E в развитии бронхоспазма, вызванного холодным воздухом.

#### Материалы и методы исследования

Нами проведено обследование 82 больных бронхиальной астмой (БА) легкой степени тяжести, хроническим необструктивным бронхитом и хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) 1-й стадии, средний возраст которых составил 36,5±1,51 лет, рост 169,4±1,27 см, вес 75,1±0,98 кг. Больные находились в фазе нестойкой ремиссии и не имели выраженных обструктивных нарушений. Критерием отбора пациентов служило отсутствие общих противопоказаний для проведения функциональных исследований, полное их согласие и осознание цели обследования.

С целью изучения предполагаемых механизмов, формирующих холодовую гиперреактивность дыха-

тельных путей, исследовались сывороточный IgE, интерлейкины IL-1, IL-4, IL-8, интерферон  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) до и после 3-минутной изокапнической гипервентиляции холодным (-20°C) воздухом (ИГХВ), в режиме 60% должной максимальной вентиляции легких. Вентиляционная функция легких оценивалась по данным кривой "поток-объем" форсированного выдоха перед началом холодовой провокации и после нее на 1 и 5 минутах восстановительного периода. Фенотипирование лимфоцитов осуществляли иммунофлюоресцентным методом с использованием моноклональных антител (ООО «Сорбент», Москва). Уровень общего IgE и цитокинов в сыворотке крови определялся при помощи иммуноферментного анализа с использованием наборов реактивов «ИЛ-ИФА-БЕСТ», «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Статистический анализ полученного материала проводился на основе стандартных методов вариационной статистики с оценкой достоверности различий по критерию Стьюдента (t).

#### Результаты исследования и их обсуждение

Анализ иммунологического статуса и уровня цитокинов в крови позволил нам сделать определенные выводы в отношении взаимосвязи последних с реактивностью дыхательных путей. В первую очередь патофизиологические изменения затрагивают клеточное звено иммунного ответа со снижением Т-хелперной активности лимфоцитов. Это находило свое отражение в профиле цитокинов, изученных нами в плазме крови больных БОД (табл.). Из всей исследованной группы существенное увеличение уровня секреции имели только два цитокина, ответственные за формирование Th1/Th2-воспалительной реакции. Нами найдено увеличение количества IL-4 и IFN- $\gamma$  в сыворотке крови и у больных ХБ, и у больных БА, что указывало на особенности текущего воспаления. В свою очередь, повышенные цифры IL-4 в сыворотке крови и уменьшение соотношения IFN- $\gamma$ /IL-4, в большей степени у больных БА, под-

Таблица

#### Основные показатели клеточного, гуморального иммунитета и цитокинового профиля больных БОД

Показатель	ХНБ	ХОБЛ	БА
Лимфоциты, %	31,6±1,28	33,1±2,31	34,8±1,35
CD3+, %	60,7±4,48	48,4±3,08	55,7±3,09
CD4+, %	47,0±3,06	36,7±2,14; p<0,05	45,8±2,81; p <sub>1</sub> <0,05
CD8+, %	14,4±4,36	12,2±3,27	17,8±2,08
CD20+, %	13,2±0,81	15,0±0,82	14,2±0,91
CD4+/CD8+	3,3±0,20	3,1±0,18	2,5±0,21; p<0,05
IgA, г/л	3,2±0,34	3,0±0,32	2,7±0,22
IgM, г/л	1,7±0,17	1,5±0,17	2,3±0,49
IgG, г/л	16,4±0,82	16,5±1,08	15,4±0,84
IgE, МЕ/мл	71,0±26,8	74,3±28,3	290,5±50,6 p<0,01; p <sub>1</sub> <0,01
IL-1ra, пкг/мл	302,6±29,4	289,9±23,7	301,3±24,1
IL-4, пкг/мл	39,1±8,8	40,99±9,5	55,0±13,1
IL-8, пкг/мл	9,1±0,9	9,1±1,5	10,8±1,4
IFN- $\gamma$ , пкг/мл	75,6±12,8	88,0±21,1	85,0±12,4

Примечание: p – уровень значимости различий в сравнении с больными ХНБ, p<sub>1</sub> – уровень значимости различий в сравнении с больными ХОБЛ.

тверждали преимущественную функциональную активность Th2-лимфоцитов, чему соответствовало увеличенное содержание общего IgE в данной группе больных.

Известно, что IL-4 не только способствует дифференцировке Th2-лимфоцитов и ингибирует развитие Th1-лимфоцитов, но и может увеличивать цитолитическую активность CD<sup>8+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов. Он оказывает влияние на моноциты и макрофаги, усиливает выброс TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8, IFN- $\gamma$ , рост тучной клетки и тем самым, вместе с другими цитокинами, участвует в неаллергическом воспалении, что частично объясняет увеличение его у больных ХОБЛ.

Проведенный нами контроль уровня цитокинов в крови после холодной бронхопровокации выявил высокую вариабельность индивидуальных значений. Несмотря на это, изменения в целом носили односторонний характер. Во всех группах отмечалась тенденция к увеличению IL-1 $\alpha$  после воздействия холодного воздуха, его прирост составил у больных БА – 12,6 $\pm$ 11,3; ХНБ – 16,0 $\pm$ 7,9; ХОБЛ – 27,0 $\pm$ 14,8 пкг/мл, что возможно могло блокировать пролиферацию Th2-лимфоцитов.

Несмотря на то, что IL-8, являясь мощным хемотрактантом нейтрофилов [5], участвует в воспалительной реакции, мы нашли минимальные различия показателей до и после пробы у больных БА и ХНБ – 0,4 $\pm$ 1,28; 0,02 $\pm$ 0,49 пкг/мл, соответственно, тогда как по мере формирования обструкции при ХОБЛ увеличение носило более выраженный характер 1,2 $\pm$ 0,74; пкг/мл. Ранее нами было показано, что холод может действовать повреждающе на дыхательные пути [3], высушивая слизистую бронхов, приводя к гиперосмолярности и тем самым нарушая эпителиальный слой. С другой стороны с утяжелением течения заболевания у больных ХОБЛ падение ОФВ<sub>1</sub> после ингаляции холодного воздуха становилось зависимым от уровня IL-8 в крови ( $r$ =-0,64;  $p$ <0,05), что подчеркивало воспалительный характер изменений.

Колебания в концентрации IL-4 у больных ХНБ и ХОБЛ были незначительными, в среднем по группе падение составляло 1,2 $\pm$ 6,16 пкг/мл и 3,2 $\pm$ 3,73 пкг/мл, соответственно. Более значимое снижение имели больные БА (12,6 $\pm$ 13,57 пкг/мл), которое за счет индивидуальной вариабельности не достигало достоверных различий. Полученные значения нас удивили, поскольку у астматиков мы ожидали найти увеличение уровня IL-4, как было представлено в работе M.S.Davis et al. [6], предполагая прямую зависимость между увеличением его продукции в тучных клетках и последующей активацией Th2-лимфоцитов. По всей видимости, IL-4 не является основным посредником в формировании холодной гиперреактивности дыхательных путей у больных БОД. К таким же выводам пришли В.А.Казначеев и др. [1], исследовав полиморфизм гена интерлейкина-4 у больных с atopической БА и не найдя связи между уровнем сывороточного IL-4 и общего IgE. Возможно, его участие носит опосредованный характер, в большей степени влияя на нитрооксидергические реакции. Существуют данные, что IL-4 совместно с IL-10 повышает активность аргиназы и, тем самым,

снижает содержание L-аргинина, участвующего в синтезе NO [2].

Интерес представляет динамика IFN- $\gamma$  после холодной провокации. Так как его продукция в основном ограничена субпопуляцией Т-лимфоцитов (CD<sup>4+</sup> и CD<sup>8+</sup>), то, скорее всего, он мог принимать непосредственное участие в формировании реакции к холодному воздуху. Было найдено снижение уровня IFN- $\gamma$  в крови после пробы ИГХВ у больных ХОБЛ (12,9 $\pm$ 12,14; пкг/мл), и более существенное у больных БА (19,1 $\pm$ 7,83  $p$ <0,05; пкг/мл). Установлено, что IFN- $\gamma$  оказывает обширное иммунорегуляторное влияние на различные клетки, не только подавляя активность Th2-лимфоцитов, но обладая провоспалительным действием, он способен стимулировать эпителиоциты дыхательных путей в выбросе цитокинов, специальных молекул адгезии, усилить выход TNF- $\alpha$  из альвеолярных макрофагов, вызванный запуском IgE реакции или эндотоксином, увеличить продукцию IL-1, PAF и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> из моноцитов, оказываясь посредником цитотоксических реакций при ингибировании аллергического воспаления. Имеются сведения, что IFN- $\gamma$  усиливает выделение гистамина. Существуют данные, что назначение экзогенного IFN- $\gamma$  предотвращает эозинофильное воспаление и гиперреактивность дыхательных путей.

Более наглядные результаты нами получены при изучении больных с холодной гиперреактивностью дыхательных путей и высоким содержанием общего IgE в сыворотке крови. Исследование исходного уровня IgE и сопоставление его с реакцией к холодному воздуху показало, что повышение общего IgE в крови утяжеляет последнюю (рис.).

Учитывая то, что уровень IL-4 в сыворотке не изменялся после холодной провокации, одним из возможных механизмов увеличения активности IgE служило угнетение продукции IFN- $\gamma$  CD<sup>8+</sup> лимфоцитами. Было обнаружено, что у лиц с повышенным содержанием IgE исходные значения ОФВ<sub>1</sub> имели тесную связь с уровнем IFN- $\gamma$  ( $r$ =0,62;  $p$ <0,05), измеренным перед провокацией. В этой же группе отмечалось достоверное снижение IFN- $\gamma$  – 23,31 $\pm$ 9,31 пкг/мл ( $p$ <0,05) после ИГХВ. Полученное нами уравнение регрессии (1) определило меру участия его в IgE-зависимых механизмах формирования гиперреактивности дыхательных путей, в основе которой лежит классическая реакция связывания IgE с высокоаффинными рецепторами к Fc-фрагменту IgE на поверхности тучных клеток в тканях гладких мышц или на циркулирующих базофилах крови. Перекрестное связывание рецепторов комплексами «антиген-IgE» вызывает активацию тучных клеток с высвобождением медиаторов воспаления, участвующих не только в формировании аллергического ответа, но и реактивности дыхательных путей. Поскольку тучные клетки и базофилы сами являются богатым источником цитокинов, то они могут усиливать IgE-зависимые реакции, не участвуя в его синтезе [4].

$\Delta$ ОФВ<sub>1</sub> = -12,11 - 0,041 · IFN- $\gamma$  - 0,014 · IgE, (1)  
где  $\Delta$ ОФВ<sub>1</sub> – максимальное изменение ОФВ<sub>1</sub> после ИГХВ, выраженное в процентах от исходной величины вне зависимости от времени наступления реакции, уровнем IFN- $\gamma$ , полученный после провокации,

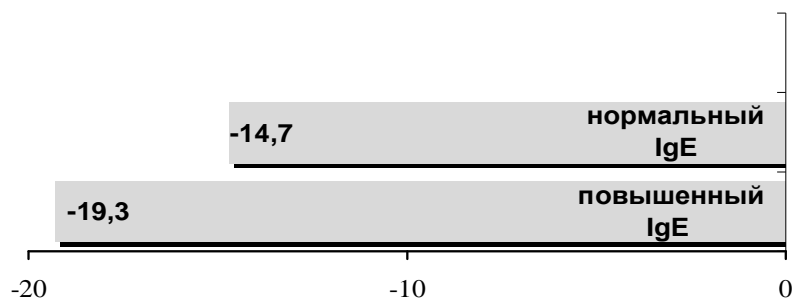


Рис. Влияние повышенного IgE на холодовую реактивность дыхательных путей.

исходный уровень IgE у больных с холодовой гиперреактивностью дыхательных путей. Значимость регрессии – 97,3%.

Кроме того, исходно повышенное содержание общего IgE в крови может потенцировать механизмы бронхоспастической реакции вне зависимости от активности Т-лимфоцитов. В классическом варианте переключение на синтез IgE опосредовано IL-4, IL-13 и молекулой CD40, относящейся к суперсемейству рецепторов TNF- $\alpha$ , который экспрессируется на всех В-лимфоцитах. Другой путь переключения классов антител на синтез IgE может происходить путем взаимодействия с кортикостероидным гормоном. Гидрокортизон запускает продукцию IgE В-лимфоцитами через экспрессию белка CD40L, количество которого зависит от титра в сыворотке крови кортизола. С повышением уровня кортизола при воздействии стрессовых факторов происходит мгновенная индукция экспрессии CD40L глюкокортикоидами и запускается механизм синтеза IgE. Фактор активации В-лимфоцитов и лиганд, запускающий пролиферацию, также способны участвовать в синтезе IgE. Они продуцируются преимущественно моноцитами и дендритными клетками под влиянием IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , липополисахаридами, CD40L [7].

Следовательно, один из механизмов, принимающих участие в формировании гиперреактивности дыхательных путей к холодному воздуху, связан с IgE-зависимыми иммунологическими реакциями, которые в большей степени присущи больным БА. Об этом свидетельствует повышенное содержание исходного уровня IgE, полученная нами прямая связь между исходным содержанием кортизола в крови и последующей реакцией к холодному воздуху ( $r=0,52$ ;  $p<0,05$ ), а также особенности изменения цитокинового профиля после пробы

ИГХВ у этих больных. Безусловно, найденные нами зависимости не только важны с точки зрения выявления основных механизмов, участвующих в формировании гиперреактивности дыхательных путей, но и лечения данной группы пациентов, подбор медикаментозной терапии которым должен проводиться с учетом выявленных закономерностей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Казначеев В.А., Гервазиев Ю.В., Гервазиева В.Б. Частота встречаемости полиморфизма (С-33Т) в промоторе гена интерлейкина-4 у больных атопической бронхиальной астмой в российской популяции // Астма. 2005. Т.6, №1–2. С.18–22.
2. Покровский В.И., Виноградов Н.А. Оксид азота, его физиологические и патофизиологические свойства // Тер. архив. 2005. №1. С.82–87.
3. Приходько А.Г., Перельман Ю.М. Холодовая реактивность дыхательных путей у больных хроническим бронхитом // Пульмонология. 2003. №3. С.24–28.
4. Цибулкина В.Н. Бронхиальная астма: распространенность, механизмы развития, факторы, определяющие тяжесть заболевания, общие принципы специфической и неспецифической терапии // Казанский мед.ж. 2005. Т.86, №5. С.353–360.
5. Chung K.F., Barnes P.J. Cytokines in asthma // Thorax. 1999. Vol.54. P.825–857.
6. Cold weather exercise and airway cytokine expression / M.S. Davis [et al.] // J. Appl. Physiol. 2005. Vol.98. P.2132–2136.
7. Gena R.S., Jabata H.H., Brodeur S.R. Регуляция механизма рекомбинации переключения на синтез иммуноглобулина E // Аллергология и иммунология. 2005. Т.6, №1. С.23–37.

Поступила 30.11.2009

Анна Григорьевна Приходько, ведущий научный сотрудник,  
675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22;  
Anna G.Prikhodko,  
22 Kalinin Str., Blagoveschensk, 675000;  
E-mail: cfpd@amur.ru