

Молекулярные маркеры воспаления в бронхиальном содержимом при различных фенотипах тяжелой бронхиальной астмы

Геренг Е.А., Суходоло И.В., Плешко Р.И., Огородова Л.М., Селиванова П.А., Кобякова О.С., Дзюман А.Н.

Molecular markers of an inflammation in bronchial contents at various phenotypes of a serious bronchial asthma

Gereng Ye.A., Sukhodolo I.V., Pleshko R.I., Ogorodova L.M., Selivanova P.A., Kobyakova O.S., Dzyuman A.N.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Геренг Е.А., Суходоло И.В., Плешко Р.И. и др.

Проведена комплексная иммунологическая оценка воспалительных реакций в бронхиальном содержимом у 30 пациентов с различными фенотипами тяжелой бронхиальной астмы (БА). Установлено, что популяционный состав лимфоцитов и цитокиновый профиль индуцированной мокроты отражает выраженность и характер воспалительных нарушений в дыхательных путях, что позволит использовать данную неинвазивную методику для выявления молекулярных маркеров тяжелых форм БА. При тяжелой терапевтически резистентной форме БА «brittle»-фенотипа в дыхательных путях увеличиваются общее количество CD4⁺-, CD19⁺-клеток и концентрация интерлейкина-4 на фоне снижения интерлейкина-10. При тяжелой форме БА фенотипа «хроническая астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» в бронхиальном секрете преобладают CD8⁺-лимфоциты, возрастает концентрация интерлейкина-8, трансформирующего фактора роста β.

Ключевые слова: индуцированная мокрота, бронхиальные смывы, интерлейкин-10, трансформирующий фактор роста β.

The complex immunologic estimation of inflammatory reactions in bronchial contents at 30 patients with various phenotypes of a serious bronchial asthma is spent. It is established that the population structure of lymphocytes and cytokines a profile of the induced phlegm reflects expression and character of inflammatory disturbances in respiratory tracts that will allow to use the given non-invasive method for revealing of molecular markers of serious forms of a bronchial asthma. At the serious terapevticheski-refractory form of a bronchial asthma «brittle» a phenotype in respiratory tracts total CD4⁺-, CD19⁺-cell and concentration interleukina-4 against depression interleukina-10 is enlarged. At the serious form of a bronchial asthma of a phenotype «the chronic asthma with the fixed bronchial obstruction» in a bronchial secret prevails CD8⁺-lymphocytes, concentration interleukina-8, the transforming growth factor-β increases.

Key words: induced sputum, bronchial lavage, interleukin-10, transforming growth factor-β.

УДК 616.248-039.3-008.855-076.5:578.52

Введение

Бронхиальная астма (БА) занимает ведущее место в структуре бронхолегочной заболеваемости у детей и взрослых. Неконтролируемые, терапевтически резистентные формы БА — глобальная проблема, но клеточный и молекулярный субстрат их практически не изучен, так как трудноосуществляемые бронхоскопические манипуляции являются единственным способом получения достоверной информации о состоянии бронхиального дерева [1, 6]. Эти манипуляции инвазивны и в случае тяжелого течения могут привести к обострению заболевания [4, 7].

В то же время существует унифицированная методика получения индуцированной мокроты (ИМ), клеточный состав которой считается интегральным показателем, отражающим глубину и характер воспалительных изменений бронхиального дерева [4]. В связи с вышесказанным перспективным направлением современной пульмонологии выступает поиск клеточных и молекулярных предикторов тяжелого течения БА в бронхиальной слизи.

Цель исследования — изучение отдельных показателей клеточного звена и концентрации гуморальных факторов местного иммунитета в ИМ и бронхи-

альных смывах (БС) у пациентов с различными фенотипами тяжелой формы БА.

Материал и методы

Проведено одномоментное сравнительное исследование пациентов с тяжелыми терапевтически резистентными формами БА фенотипа «brittle» (20 человек) и «хроническая астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» (гормонозависимая) (10 пациентов) в возрасте от 28 до 62 лет (средний возраст $(54,30 \pm 8,22)$ года). Длительность заболевания составила $(9,89 \pm 5,12)$ года. Диагноз и степень тяжести болезни верифицировали согласно критериям Глобальной стратегии по профилактике и лечению БА (GINA, 2008). Пациенты, включенные в исследование, соответствовали следующим критериям отбора:

1. «Brittle»-фенотип БА, подтвержденный медицинскими документами не ранее чем за 1 год до включения больного в исследование: наличие суточной вариабельности уровня пиковой скорости выдоха (ПСВ) с амплитудой более 40% в течение более половины 5-месячного периода на фоне максимально интенсивного лечения с применением высоких доз ингаляционных кортикостероидов (прием беклометазона в суточной дозе более 1,5 мг/сут, или будесонида более 1,0 мг/сут, или флутиказона пропионата более 0,75 мг/сут, частые ингаляции бронхолитиков);

2. Фенотип «хроническая астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» (гормонозависимая): постоянная персистенция симптомов БА, низкие показатели функции внешнего дыхания (ФВД) (объем форсированного выдоха за первую секунду не более 60% от должного, ПСВ менее 60% от должного) с наличием или отсутствием эпизодов внезапного ухудшения, требующих системной терапии глюкокортикостероидами (20—50 мг/сут по преднизолону в течение не менее

1 года), приводящей к неполному ответу.

До проведения любых процедур, связанных с данным исследованием, было получено письменное информированное согласие больного (одобрено локальным этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск) № 877 от 10.11.2008). Контрольная группа состояла из 10 здоровых некурящих доноров без патологии органов дыхания с аналогичными характеристиками по полу и возрасту (6 мужчин и 2 женщины в возрасте от 18 до 65 лет, средний возраст $(42,5 \pm 4,2)$ года).

Сбор ИМ осуществляли после ингаляций 3, 4, 5%-м раствором NaCl через ультразвуковой небулайзер с продолжительностью каждой 4—5 мин. Мокроту обрабатывали и исследовали по стандартной методике [4].

Бронхоскопию у обследованных лиц проводили в условиях стационара на фоне улучшения клинико-функциональных показателей течения болезни, вне обострения.

С целью получения бронхиальных смывов (БС) всем больным выполняли фибробронхоскопию по стандартной методике гибким фиброскопом (BF1T20, Olympus Corp., Япония). Процедуру бронхиального лаважа осуществляли через тубус бронхоскопа путем дробного введения изотонического раствора хлорида натрия (общим объемом 40—60 мл) с последующей аспирацией в стерильный силиконизированный контейнер [5].

БС, ИМ подвергали центрифугированию в течение 10 мин при 1 500 об/мин. Надосадочную жидкость разбирали на аликвоты и хранили при температуре -20°C в пластиковых пробирках. Определение концентраций интерлейкинов-4, -8, -10 (IL-4, -8, -10), интерферона- γ (interferon- γ (INF- γ)), фактора некроза опухоли α (tumor necrosis factor- α (TNF- α)), трансформирующего фактора роста β_1 (transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1)) проводили твердофазным иммуноферментным методом согласно инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем (ООО «Цитокин», г. Санкт-Петербург; ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск; Biosource, Бельгия). Учет результатов производили с применением спектрофотометра для микропланшетов Multiscan EX (ThermoLabSystems, Финляндия) при длине волны 450 нм.

В осадке БС и ИМ с рабочей концентрацией $2 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл подсчитывали число CD3⁺ (зрелые Т-клетки), CD4⁺ (Т-хелперы), CD8⁺ (Т-киллеры (супрессоры)), CD19⁺ (В-лимфоциты) методом мультипараметрической двухцветной цитофлюориметрии с помощью меченных ФИТЦ моноклональных антител (АО «Сорбент» ГНЦ — Институт иммунологии МЗ РФ, г. Москва). Подсчет производили на 200 лимфоцитов на флюоресцентном микроскопе Micros (Австрия) при длине волны 550 нм.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакета программ Statistica 6.0 for Windows с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни. Данные представляли в виде медианы Me , меру рассеивания — в виде квартильного интервала $Q_{0,25}$ — $Q_{0,75}$. Оценку взаимосвязи между

различными клеточными и гуморальными факторами осуществляли с помощью подсчета коэффициента корреляции рангов Спирмена r .

Результаты

Сравнительный анализ показателей ИМ и БС не выявил статистически значимых различий среди лиц контрольной группы.

При тяжелой форме БА «brittle»-фенотипа количество $CD3^+$, $CD4^+$, $CD19^+$ и концентрация ИЛ-4 статистически значимо ($p = 0,013$) преобладает в ИМ по сравнению с БС. При хронической астме с фиксированной бронхиальной обструкцией в ИМ по сравнению с БС достоверно ($p = 0,0015$) повышена концентрация ИЛ-8, TNF- α .

У пациентов с обоими фенотипами тяжелых форм БА по сравнению с лицами контрольной группы наблюдалось значимое увеличение клеточности ИМ. На фоне выраженного повышения общего числа $CD3^+$ -клеток в ИМ лица с «brittle»-астмой отличались от контрольной группы и больных с фенотипом «хроническая астма с фиксированной бронхиальной обструкцией» более высокими показателями $CD4^+$ и низкими значениями популяций цитотоксических лимфоцитов $CD8^+$ (таблица). Это сопровождалось изменением соотношения $CD4^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитов: при тяжелой форме астмы «brittle»-фенотипа оно составляло 2,75 : 1, при хронической астме с фиксированной бронхиальной обструкцией — 0,74 : 1 (в контрольной группе — 1,74 : 1).

В то же время ИМ пациентов с «brittle»-БА отличалась от двух других групп повышенным количеством В-лимфоцитов (таблица).

Субпопуляционный состав лимфоцитов индуцированной мокроты и бронхиальных смывов у пациентов с различными фенотипами тяжелой бронхиальной астмы (Me ($Q_{0,25}$ — $Q_{0,75}$))

Показатель	Тип биологической жидкости	Контрольная группа ($n = 10$)	Тяжелая форма бронхиальной астмы		p
			«brittle»-фенотип ($n = 20$)	хроническая астма с фиксированной обструкцией ($n = 10$)	
Общая клеточность, $\cdot 10^6/\text{мл}$	ИМ	1,17 (0,81—1,47)	3,38 (2,68—3,84)	3,56 (2,71—4,27)	$p_1 = 0,009$ $p_2 = 0,012$ $p_3 = 0,072$
	БС	1,12 (1,00—1,60)	3,74 (2,73—4,74)	3,91 (3,39—4,21)	$p_1 = 0,003$ $p_2 = 0,006$ $p_3 = 0,867$
$CD3^+$	ИМ	0,55 (0,38—0,68)	1,82 (1,43—1,96)	1,66 (1,30—1,86)	$p_1 = 0,003$ $p_2 = 0,008$ $p_3 = 0,685$
	БС	0,51 (0,33—0,82)	1,69 (1,24—2,03)	1,97 (1,77—2,09)	$p_1 = 0,036$ $p_2 = 0,007$ $p_3 = 0,524$
$CD4^+$	ИМ	0,34 (0,24—0,42)	0,87 (0,77—0,99)	0,71 (0,56—0,84)	$p_1 = 0,001$ $p_2 = 0,002$ $p_3 = 0,032$
	БС	0,32 (0,20—0,50)	1,08 (0,86—1,16)	0,82 (0,79—0,92)	$p_1 = 0,004$ $p_2 = 0,021$ $p_3 = 0,028$
$CD8^+$	ИМ	0,19 (0,13—0,24)	0,32 (0,21—0,43)	0,94 (0,64—1,24)	$p_1 = 0,007$ $p_2 = 0,018$ $p_3 = 0,042$
	БС	0,19 (0,12—0,29)	0,53 (0,32—0,94)	0,81 (0,60—0,84)	$p_1 = 0,001$ $p_2 = 0,026$ $p_3 = 0,014$
$CD19^+$	ИМ	0,09 (0,06—0,13)	0,37 (0,27—0,46)	0,25 (0,21—0,33)	$p_1 = 0,001$ $p_2 = 0,019$ $p_3 = 0,012$
	БС	0,10 (0,06—0,21)	0,43 (0,31—0,60)	0,31 (0,23—0,36)	$p_1 = 0,008$ $p_2 = 0,002$ $p_3 = 0,003$

Примечание. n — число пациентов; p_1 — величина статистической значимости различий при сравнении параметров контрольной группы и тяжелой формы БА «brittle»-фенотипа; p_2 — величина статистической значимости различий при сравнении показателей контрольной группы и тяжелой формы БА фенотипа «хроническая астма с фиксированной бронхиальной обструкцией»; p_3 — величина статистической значимости различий при сравнении показателей пациентов с тяжелой формой БА фенотипов «brittle» и «хроническая астма с фиксированной бронхиальной обструкцией».

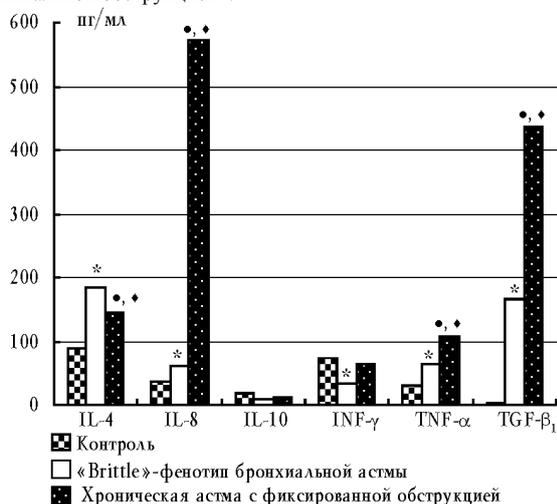


Рис. 1. Количественные показатели цитокинов и сигнальных молекул в индуцированной мокроте при различных фенотипах тяжелой бронхиальной астмы. Здесь и на рис. 2: * — статистическая значимость различий ($p < 0,01$) при сравнении показателей контрольной группы и тяжелой формы БА «brittle»-фенотипа; ♦ — статистическая значимость различий ($p < 0,01$) при сравнении показателей контрольной группы и тяжелой формы БА фенотипа «хроническая астма с фиксированной бронхиальной обструкцией»; • — статистическая значимость различий ($p < 0,01$) при сравнении показателей пациентов с тяжелой формой БА фенотипов «brittle» и «хроническая астма с фиксированной бронхиальной обструкцией»

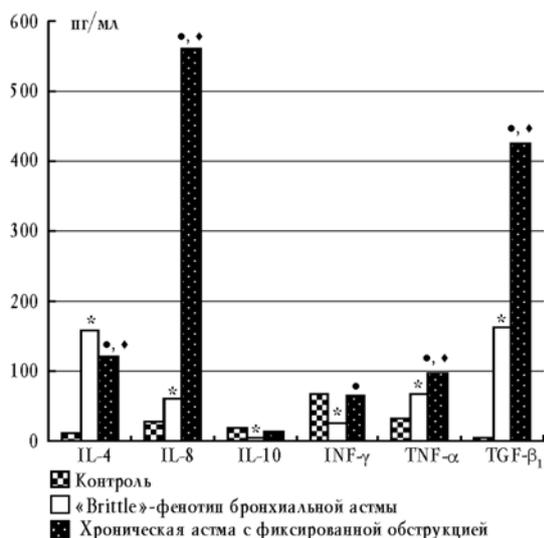


Рис. 2. Количественные показатели цитокинов и сигнальных молекул в бронхиальных смывах при различных фенотипах тяжелой бронхиальной астмы

ИМ пациентов с тяжелой формой БА «brittle»-фенотипа и хронической астмой с фиксированной брон-

хиальной обструкцией отличалась от контрольной группы более высокой концентрацией IL-4, -8, TNF- α и снижением IL-10. Концентрация IL-4 в ИМ у пациентов с «brittle»-фенотипом тяжелой БА была выше, а IL-8, TNF- α , напротив, ниже аналогичных показателей у больных с хронической астмой с фиксированной бронхиальной обструкцией (рис. 1). Наблюдался сдвиг в сторону Th2-клеточного ответа, на что указывает статистически значимое ($p = 0,001$) повышение соотношения IL-4 и INF- γ у больных с обеими формами БА.

В ИМ у пациентов, страдающих хронической астмой с фиксированной бронхиальной обструкцией по сравнению с «brittle»-фенотипом тяжелой БА выявлялись более высокие значения TGF- β_1 (рис. 1).

CD-типирование лимфоцитов и иммуноферментный анализ ИМ и БС при тяжелых формах БА показали однонаправленные изменения клеточного и гуморального звеньев местной защиты в обеих группах пациентов (рис. 2).

Обсуждение

Сравнительный анализ ИМ и БС у пациентов с различными фенотипами тяжелой БА продемонстрировал более высокие показатели местных факторов защиты слизистой оболочки бронхов. Этот факт свидетельствует о вовлечении в воспалительный процесс при астме не только верхних, но и нижних отделов дыхательных путей, а клеточный состав и цитокиновый профиль ИМ в отличие от лаважной жидкости является суммарным показателем, отражающим патоморфологическое состояние проксимального и дистального отдела бронхиального дерева.

Установлено, что оба клинических фенотипа тяжелой БА характеризовались различным клеточным и молекулярным составом бронхиального секрета. Согласно проведенным клинко-функциональным тестам, тяжелая форма БА «brittle»-фенотипа в 96,3% случаев протекала по экзогенному (атопическому) варианту с преобладанием поливалентной сенсибилизации. Аллергический механизм иммунологических реакций при «brittle»-астме подтверждается однонаправленным повышением общего числа CD4⁺, CD19⁺-лимфоцитов как в ИМ, так и в БС и увеличением соотношения IL-4 и INF- γ (таблица, рис. 1, 2). Это указывает на преобла-

дание Th2-зависимого иммунного ответа с усиленной трансформацией В-лимфоцитов в IgE-продуцирующие плазматические клетки при «brittle»-фенотипе тяжелой БА последующим развитием патофизиологических проявлений астмы [7, 8, 12]. Данный

факт подтверждается множественной положительной корреляционной взаимосвязью между CD3⁺- и CD19⁺-лимфоцитами в БС и CD4⁺-лимфоцитами в ИМ (рис. 3).

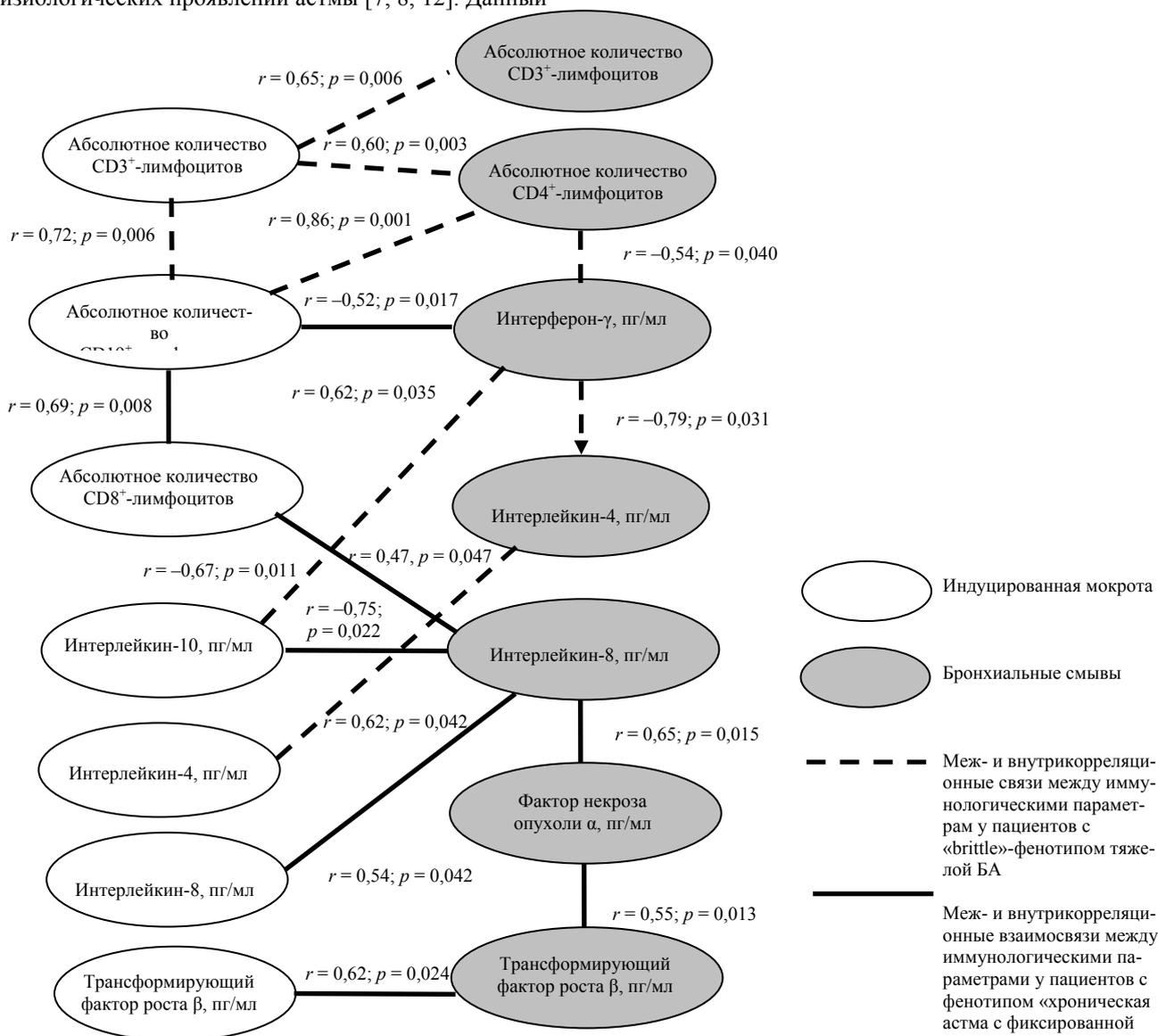


Рис. 3. Результаты корреляционного анализа иммунологических показателей индуцированной мокроты и бронхиальных смывов при различных фенотипах тяжелой бронхиальной астмы

У пациентов, страдающих хронической астмой с фиксированной бронхиальной обструкцией, на фоне статистически значимого ($p = 0,0025$) повышения общего числа CD3⁺-лимфоцитов наблюдалось увеличение пула CD8⁺-клеток. Известно, что последние вырабатывают перфорин, гранзим-В, TNF- α — вещества, которые среди прочих иммунологических

эффектов могут запускать апоптоз бронхиальных клеток и активацию нейтрофильных реакций в дыхательных путях [4, 10, 13].

Важно отметить, что TNF- α , в больших концентрациях определяемый в ИМ и БС, у пациентов с хронической астмой с фиксированной бронхиальной обструкцией активизирует IL-8, который является сти-

мулятором высвобождения TGF- β_1 [11, 13]. Это подтверждено результатами данного исследования (рис. 3). Профиброзные эффекты TGF- β_1 , вероятно, становятся ведущими в ремоделировании слизистой оболочки бронхов при хронической астме с фиксированной обструкцией [2, 3, 11].

Тяжелая форма БА независимо от фенотипа отличается дефектом противовоспалительного ответа, что проявляется снижением концентрации IL-10 в бронхиальном содержимом. Противовоспалительный эффект IL-10 при атопии реализуется через увеличение продукции Т-лимфоцитами INF- γ [7]. Это подтверждается положительной корреляционной связью между концентрацией INF- γ и IL-10 у пациентов с «brittle»-фенотипом тяжелой формы БА (рис. 3).

Ингаляционное введение INF- γ больным тяжелой терапевтически резистентной формой БА приводит к увеличению функциональной активности CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-клеток (Treg), продуцирующих IL-10, что снижает концентрацию IL-4, -5 и выраженность воспалительной реакции в слизистой оболочке бронхов [3, 7]. У пациентов с хронической астмой с фиксированной бронхиальной обструкцией это подтверждается выявленной обратной корреляцией между IL-10 и IL-8, TNF- α в ИМ и БС (рис. 3).

Выводы

1. Популяционный состав лимфоцитов и цитокиновый профиль индуцированной мокроты отражают выраженность и характер воспалительных нарушений в дыхательных путях, что позволит использовать данный неинвазивный метод для выявления молекулярных маркеров различных фенотипов тяжелой бронхиальной астмы.

2. При тяжелой форме БА «brittle»-фенотипа в дыхательных путях доминируют признаки атопического компонента иммунного ответа на фоне увеличения общего количества CD4⁺, CD19⁺-лимфоцитов, IL-4 и снижения концентрации IL-10.

3. Одновременное повышение в бронхиальном содержимом количества CD8⁺-лимфоцитов, концентрации

IL-8 и TGF- β_1 указывает на их активное участие в реализации воспалительных реакций в бронхиальном дереве при тяжелой форме БА фенотипа «хроническая астма с фиксированной бронхиальной обструкцией».

Литература

1. *Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы* / под ред. А.Г. Чучалина. М., 2006. 160 с.
2. *Дугарова И.Д., Анаев Э.Х., Осельникова Т.П. и др.* Экспрессия цитокинов в конденсате выдыхаемого воздуха и ее взаимосвязь с клинико-функциональными показателями бронхиальной астмы // Пульмонология. 2010. № 3. С. 57—61.
3. *Дугарова И.Д., Анаев Э.Х., Чучалин А.Г.* О роли цитокинов при бронхиальной астме // Пульмонология. 2009. № 4. с. 96—101
4. *Геренг Е.А., Суходоло И.В., Пleshко Р.И. и др.* Роль клеточных и молекулярных мишеней в формировании различных паттернов воспаления при гетерогенных фенотипах тяжелой бронхиальной астмы // Пульмонология. 2009. № 5. С. 57—61.
5. *Непомнящих Г.И.* Биопсия бронхов: морфогенез общепатологических процессов в легких М.: Медицина, 2005. 405 с.
6. *Фисенко В.* Цитокины и лейкотриены: участие в патогенезе аллергического ринита, бронхиальной астмы и возможности фармакологического воздействия // Врач. № 10. 2007. С. 14—20.
7. *Barnes P.J.* Cytokines and chemokines in asthma // *European Respiratory Journal*. 2010. V. 29. P. 43—59.
8. *Barnes P.J.* Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease // *Nature Rev. Immunol.* 2008. V. 8 (3). P. 183—192.
9. *Beckett P.A., Howarth P.H.* Pharmacotherapy and airway remodelling in asthma // *Thorax*. 2003. V. 58. P. 163—174.
10. *Cazzola M.* Anti-TNF-alpha and Th1 cytokine-directed therapies for the treatment of asthma // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2006. V. 6. P. 43—50.
11. *Hamilton L.M., Torres-Lozano C., Puddicombe S.M. et al.* The role of Epidermal Growth Factor Receptor in Sustaining Neutrophil Inflammation in Severe Asthma // *Clin. Exp. Allergy*. 2003. V. 33. P. 233—240.
12. *Miranda C.* Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004. V. 113. P. 101—108.
13. *Reuter S., Heinz A., Sieren M. et al.* Mast cell-derived tumor necrosis factor is essential for allergic airway disease // *Eur. Respir. J.* 2008. V. 31 (12). P.773—782.

Поступила в редакцию 09.03.2011 г.

Утверждена к печати 01.04.2011 г.

Сведения об авторах

Е.А. Геренг — канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник ЦНИЛ, доцент кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ (г. Томск).

И.В. Суходоло — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой морфологии и общей патологии СибГМУ (г. Томск).

Р.И. Пleshко — д-р мед. наук, профессор кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ (г. Томск).

Л.М. Огородова — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАМН, зав. кафедрой факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета СибГМУ (г. Томск).

Геренг Е.А., Суходоло И.В., Пleshко Р.И. и др.

Молекулярные маркеры воспаления в бронхиальном содержимом...

П.А. Селиванова — канд. мед. наук, ассистент кафедры госпитальной терапии с курсом физической реабилитации и спортивной медицины СибГМУ (г. Томск).

О.С. Кобякова — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой общей и врачебной практики (семейной медицины) ФПК и ППС СибГМУ (г. Томск).

А.Н. Дзюман — канд. мед. наук, доцент кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Геренг Елена Андреевна, тел. 8-913-871-13-62; e-mail: e-gereng@mail.ru