

УДК 616.37-008.6:577.112

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ У БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ С ХРОНИЧЕСКИМ ВЫСЕВОМ BURKHOLDERIA CEPACIA

Д.Ф. Сергиенко, ГОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия»

Сергиенко Диана Фикретовна – e-mail: gazken@rambler.ru

Была изучена динамика провоспалительных (ИЛ-6, ИЛ-1, ИЛ-8, ИФН-) и противовоспалительных (ИЛ-4, ИЛ-10) цитокинов у детей с муковисцидозом при высеве из бронхиального дерева *B. cepacia* с учетом степени тяжести и особенностей клинического течения заболевания. Выявлено, что инфицирование *Burkholderia cepacia* может приводить к различным вариантам развития болезни, что находит свое отражение в системе цитокиновой регуляции. В результате исследования мы пришли к выводу, что совокупная оценка цитокинового статуса является чрезвычайно важной для прогнозирования дальнейшего течения заболевания, определения тактики изоляции больных и выбора схемы лечения.

Ключевые слова: муковисцидоз, цитокины, дети, *Burkholderia cepacia*.

We studied the dynamics of pro-inflammatory (IL-6, IL-1, IL-8, IFN-) and proto-inflammatory (IL-4, IL-10) cytokines in children with cystic fibrosis at sowing of the bronchial tree *B. cepacia* taking into account the severity and characteristics of clinical course of disease. Revealed that infection with *Burkholderia cepacia* can lead-dit to different variants of the disease, which is reflected in the cytokine regulation. Our study concluded that a cumulative assessment of cytokine-tion status is extremely important to predict the future course of the disease, determining the tactics of isolation of patients and choice of treatment regimens.

Key words: cystic fibrosis, cytokines, children, *Burkholderia cepacia*.

Введение

Муковисцидоз (МВ) – наследственное моногенное заболевание, характеризующееся поражением экзокринных желез жизненно важных органов и систем и имеющее обычно тяжелое течение и прогноз [1]. Качество и продолжительность жизни пациентов с кистозным фиброзом поджелудочной железы в первую очередь определяются степенью и характером поражения бронхолегочной системы, которое наблюдается у 85–90% пациентов. Респираторный тракт больных МВ представляет уникальную среду для существования бактерий: затрудненный мукоцилиарный клиренс, густая вязкая мокрота, маловентилируемые участки бронхиального дерева, специфичность строения апикальной поверхности эпителиальных клеток и дисбалансированный иммунитет способствуют инфицированию и колонизации бактериальными агентами [1].

Спектр патогенных микроорганизмов в легких больных МВ значительно отличается от спектра, характерного для других легочных заболеваний. Наиболее распространенными возбудителями при МВ являются *Staphylococcus Aureus*, *Haemophilus influenzae* и *Pseudomonas aeruginosa* (мукоидные и плоские штаммы) [1, 2]. В последнее время возросла

роль *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*), которая может приводить к формированию тяжелого, неконтролируемого гнойно-воспалительного процесса в респираторном тракте и гибели больного в течении нескольких лет после инфицирования [3].

Распространенность *B. cepacia* среди больных МВ в течение ряда лет была достаточно стабильной и составляла 3–4%, однако за последние 2 года доля пациентов, инфицированных этим микроорганизмом увеличилась до 11–12% [3, 4].

Род *B. cepacia* очень разнообразен и состоит из 9 различных видов бактерий (геномов), различающихся по генотипам, но имеющих минимальные отличия по фенотипам [5, 6, 7]. В настоящее время выделяют 3 типа реакций больного, зависящих от штамма *B. cepacia*, а именно: 1. отсутствие явных изменений в респираторном тракте, стабильное течение заболевания; 2. быстрое ухудшение респираторной функции с лихорадкой, потерей массы тела с развитием *Serapia*-синдрома; 3. fulminantное ухудшение респираторного статуса [3].

B. cepacia, как и любой другой микроорганизм, имеет свой арсенал токсинов, способных корректировать активность

клеток иммунной системы посредством цитокиновой регуляции изменяя активность воспалительного процесса [6, 8, 9].

Несмотря на активное изучение В. сераси́а во всем мире, остаются малоизвестными механизмы иммунного воспаления в респираторном тракте, запускаемые данным агентом, способы уклонения от антибактериальной терапии, межвидовые отношения с другими микроорганизмами. В то же время, изучения системы цитокиновой регуляции у больных муковисцидозом при контаминации В. сераси́а на разных этапах развития патологического процесса поможет уточнить полярность иммунного ответа, прогнозировать течение недуга и разработать дополнительные критерии диагностики фазы заболевания.

Цель исследования: изучить особенности цитокиновой регуляции у детей с муковисцидозом при контаминации В. сераси́а в бронхиальном дереве с учетом степени тяжести и особенностей клинической картины заболевания.

Материалы и методы

Основу исследования составили 39 детей в возрасте от 4 до 17 лет с диагнозом муковисцидоз, находящихся на лечении в отделении медицинской генетики Детской республиканской клинической больницы г. Москвы. У всех пациентов в микробиологическом пейзаже мокроты идентифицирована *Burkholderia cepacia* в различных титрах. В 78% случаев наблюдался высеv монокультуры *Burkholderia cepacia*, в 22% всех случаев в сочетании с другими возбудителями (*Ps. aeruginosa*, *S. aureus*). Средний возраст обследованных детей составил 13,1 года. Выявлено, что большую часть больных составляют мальчики – 64,5%, девочки меньшую – 35,5%. Среди мальчиков преобладали пациенты в возрасте от 12 до 16 лет, среди девочек больные от 7 до 11 лет.

Всем больным диагноз МВ верифицировался на основании анамнестических данных, доминирующих клинических синдромов – респираторного и кишечного; подтверждался трехкратными положительными потовыми пробами методом пилокарпинового электрофореза по L.E. Gibson и R.E. Cooke (диагностические цифры – более 60 ммоль/л) или на системе «Макродакт»-«Sweat-Chek» (диагностические цифры – более 80 ммоль/л). Некоторым больным в сомнительных случаях дополнительно проводилось измерение разности электрических потенциалов на эпителии носа (ниже -40mV) и ДНК-диагностика.

Для достижения поставленной цели больные были разделены на 3 группы согласно степени тяжести заболевания. Первую составили дети с тяжелой формой заболевания – 29 больных, во второй – диагностирована среднетяжелая форма заболевания (9 пациентов), в третьей – классифицирована легкая степень недуга (1 пациент). Учитывая, что в группе с тяжелой формой МВ наблюдались различные клинические варианты течения бронхолегочного процесса после инфицирования *Burkholderia cepacia*, мы сочли необходимым разделить тяжелобольных на 2 подгруппы: первую (9 детей) составили пациенты, у которых после заражения

В. сераси́а наблюдалось прогрессирующее ухудшение респираторного статуса или развитие Сераси́а-синдрома; вторую (20 детей) – больные, у которых появление В. сераси́а не вызвало явных изменений в клинической картине заболевания.

Исследования проводились на основе собственных наблюдений и данных медицинской документации. Все дети были обследованы по общим клиническим методикам согласно стандартам, рекомендованным для данной категории больных.

Содержание интерлейкинов (ИЛ) в сыворотке крови и в мокроте определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург) и «BCM Diagnostics» (США).

В контрольную группу для иммунологических исследований вошло 20 практически здоровых детей того же возраста, не болевших ОРЗ в течение последних 2 месяцев перед обследованием.

Обработка данных

Математическую обработку результатов исследования проводили с использованием описательных статистик: Ме (медиана) и Q1–Q3 (квартиль 1–3). Для анализа количественных признаков при сравнении двух независимых выборок применяли критерий Манна–Уитни, при сравнении трех и более выборок – Н-критерий Краскола–Уоллисса. Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Различия считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Нами впервые в Российской Федерации была предпринята попытка проанализировать изменения цитокиновой регуляции у больных МВ, инфицированных *Burkholderia cepacia* с учетом особенностей клинического течения заболевания. В ходе исследования нами были получены следующие результаты.

У единственного пациента (мальчика 17,5 лет) с легкой формой заболевания уровень как провоспалительных цитокинов не отличался от нормативных, только титр ИФН- оказался повышен в 2 раза. Мальчик был инфицирован *Burkholderia cepacia* более 2 лет назад. До этого в течении 9 лет в мокроте наблюдался хронический высеv золотистого стафилококка. Необходимо отметить, что, несмотря на смену возбудителя у ребенка сохранялась неполная клинико-лабораторная ремиссия более 2 лет (на фоне адекватно проводимой базисной и противовоспалительной терапии), показатели функции внешнего дыхания отражали сохранность вентиляционной функции легких, ребенок продолжал посещать общеобразовательную школу, заниматься спортом.

38 больным было диагностировано среднетяжелое или тяжелое течение заболевания. Данные иммунологического обследования представлены в таблице.

ТАБЛИЦА.

Цитокиновый профиль у больных муковисцидозом при контаминации *Burkholderia cepacia*

		Средне-тяжелая форма n=9	Тяжелая форма (n=29)		Норма
			Первая подгруппа n=9	Вторая подгруппа n=20	
ИЛ1	сыворотка	26,5	28,8	57,5** ^	19,5
(пг/мл)	мокрота	58,5	93,7^^	175,5^^	
ИЛ-6	сыворотка	27,1	157,5***^^	52,5 * ^	20,9
(пг/мл)	мокрота	89,6	639,5^^	236,6	
ИЛ-8	сыворотка	33,0*	272,8***^^	78,6** ^	13,1
(пг/мл)	мокрота	818,2	2386,9^^	1276,2 ^	
ИФН-	сыворотка	138,4**	68,9^^	91,4*	51,1
(пг/мл)	мокрота	485,6	193,8^	380,6 ^^	
ИЛ4	сыворотка	19,7	64,9***^^	28,8** ^	14,7
(пг/мл)	мокрота	80,2	594,6^^	208,8 ^	
ИЛ-10	сыворотка	7,8	5 *	5*	15,3
(пг/мл)	мокрота	36,9	88,9^^	64,5^	

Значения представлены в медианах.

* – $p < 0,05$, достоверность различий с контрольными показателями;

** – $p < 0,01$ достоверность различий с контрольными показателями;

*** – $p < 0,001$, достоверность различий с контрольными показателями;

– $p < 0,05$, достоверность различий с первой подгруппой;

– $p < 0,01$ достоверность различий с первой подгруппой;

– $p < 0,001$ достоверность различий с первой подгруппой;

^ – $p < 0,05$ достоверность различий со среднетяжелой формой;

^^ – $p < 0,01$ достоверность различий со среднетяжелой формой;

^^^ – $p < 0,001$ достоверность различий со среднетяжелой формой.

У детей со среднетяжелой формой (9 человек) значения провоспалительных (ИЛ-1b, ИЛ-6) и противовоспалительного (ИЛ-4) цитокинов в сыворотке крови не отличались от показателей здоровых детей. В то же время, уровень основного хемоаттрактанта (ИЛ-8 и ИФН- γ) был повышен. В мокроте уровень цитокинов был значительно выше, чем в сыворотке крови, что указывает на локальность воспалительного процесса. По соотношению ИФН- γ /ИЛ-4 как в сыворотке крови, так и мокроте, можно было констатировать превалирование клеточного типа иммунного ответа.

Сепационной инфекции в бронхиальном дереве у 5 пациентов предшествовал хронический высев золотистого стафилококка, у 4 больных – 2 штаммов (мукоидный и плоский) синегнойной палочки. Со времени инфицирования (от 6 месяцев до 2,5 лет) выраженной отрицательной динамики в течение заболевания не наблюдалось: показатели внешнего дыхания сохранялись в пределах возрастной нормы, количество обострений, как и до заражения *Burkholderia cepacia*, не превышало 2 раз в год, массо-ростовые индексы оставались в норме, легочные осложнения за этот период диагностированы не были.

У 9 из 29 пациентов с тяжелой формой MB с момента идентификации в мокроте *Burkholderia cepacia* наблюдалось фульминантное ухудшение респираторного статуса. Это нашло отражение в снижении на 15–20% основных показателей вентиляционной функции легких (жизненной емкости легких (ЖЕЛ), объема форсированного выдоха (ОФВ), скоростных показателей в бронхах крупного, среднего, мелкого

калибра МС75-50-25), учащении обострений в 1,5–2 раза, присоединении легочных осложнений. У 2 пациентов из данной подгруппы было отмечено развитие сепация-синдрома, вследствие которого один ребенок скончался. Необходимо отметить, что длительность контаминации у одного из них была чуть больше года, у второго – сепация-синдром развился при первичном высева возбудителя при исследовании микробиологического пейзажа мокроты.

В ходе исследования мы обратили внимание на необычную динамику цитокинов у детей с фульминантным течением заболевания: на фоне крайне высоких показателей провоспалительных (ИЛ-8, ИЛ-6 (6–20-кратное увеличение)) и противовоспалительного цитокина (ИЛ-4 (5-кратный подъем)) наблюдается слабая активация ИФН- γ , ИЛ-1 (увеличение концентрации в 1,5–2 раза относительно нормы). Соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 свидетельствовало о выраженной девиации иммунного ответа в сторону гуморального механизма (1,05 при норме 3,5), в основе которого лежит активация В-лимфоцитов и синтез иммуноглобулинов различных классов. В результате повреждающего действия рекрутированных нейтрофилов (вследствии влияния ИЛ-8), циркулирующих иммунных комплексов, свободных радикалов происходит повреждение морфологических структур органа с формированием бронхоэктазов, что клинически выражается в быстро прогрессирующем снижении функции внешнего дыхания, что имело место у данной подгруппы больных.

Микробиологические исследования последних лет показали, что липополисахарид (ЛПС) некоторых геномоваров (в частности III – V. *cepacia*) обладает выраженным потенциалом для стимуляции синтеза провоспалительных цитокинов, однако характеризуется и относительной слабостью в способности активации макрофагов к синтезу ИЛ-1. Стало известно, что *Burkholderia cepacia* способна проникать в макрофаги и длительно сохраняться в их вакуолях, при этом не изменяя способности клетки к выработке фактора некроза опухоли (ФНО) и ИЛ-6, но инактивируя систему интерферонообразования. По всей видимости, выявленные изменения цитокинового статуса у тяжелобольных детей обусловлены влиянием ЛПС V. *cepacia* [10].

У больных с тяжелой формой MB из второй подгруппы наблюдалось повышение концентрации исследуемых цитокинов в сыворотке крови и мокроте, однако, достоверно менее значимое, чем у больных первой подгруппы.

Мы полагаем, что столь выраженные различия течения заболевания после заражения *Burkholderia cepacia* между пациентами связаны с инфицированием различными геномоварами. По данным зарубежной литературы, быстрое снижение респираторной функции с лихорадкой, с развитием Сепация-синдрома или фульминантное ухудшение респираторного статуса возникает при инфицировании II и III геномоваром, относительное сохранное состояние функции легких – I и V геномоварами [9, 10].

Заключение

Таким образом, инфицирование *Burkholderia cepacia* может приводить к различным вариантам течения болезни, что нашло свое отражение в цитокиновой регуляции. При фульминантном ухудшении респираторного статуса или развитии сепации-синдрома наблюдается многократное повышение (в 10 и более раз относительно показателей нормы) провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-6 и ИЛ-8, на фоне нарушения интерферонообразования, что приводит к выраженной девиации иммунного ответа в сторону гуморального механизма, в основе которого лежит активация В-лимфоцитов и синтез иммуноглобулинов различных классов.

При втором варианте, характеризующимся стабильным клиническим течением заболевания, наблюдается умеренное повышение провоспалительных цитокинов – в 2–3 раза, что сопоставимо с выраженностью цитокинового ответа при контаминации респираторного тракта *Staphylococcus Aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Несмотря на параллелизм, показатели в мокроте в разы превышали аналогичные значения в сыворотке крови, что свидетельствует о преобладании локального синтеза цитокинов в очаге воспаления – в легких.

Учитывая высокую степень достоверности различий между группами, анализ динамики показателей цитокинового статуса в биологических жидкостях, наряду с общепринятыми тестами, может быть использован для прогнозирования дальнейшего течения заболевания, территориального разделения больных и выбора дальнейшей тактики лечения.

В то же время, проведенное нами исследование демонстрирует необходимость генотипирования инфекции, вызываемой различными представителями *Burkholderia cepacia*, что снабдит врачей важной информацией, касающейся патогенности и трансмиссивности штаммов, вовлекаемых в инфекционный процесс.



ЛИТЕРАТУРА

1. Капранов Н.И., Каширская Н.Ю., Воронкова А.Ю. [и др.]. Муковисцидоз: современные достижения и актуальные проблемы. М. 2008. 104 с.
2. Koch C. Early infection and progression of Cystic Fibrosis Lung Disease. *Pediatric Pulmonology*. 2002. № 34 (3). P. 232–236.
3. Семькин С.Ю. *Burkholderia cepacia* – новая угроза больных муковисцидозом. Материалы IX национального конгресса по муковисцидозу «Муковисцидоз у детей и взрослых». 2009. 12–15 апреля. Москва.
4. Mahenthalingam E., Urban T., Goldberg J. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nat Rev Microbiol*. 2005. № 3 (2). P. 144–156.
5. Aaron S.D., Ferris W., Henry D.A. et al. Multiple combination bactericidal antibiotic testing in cystic fibrosis patients infected with *Burkholderia cepacia*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000. № 161. P. 1206–1212.
6. Whitby P.W., Carter K.B., Hatter K.L. Identification of member of the *Burkholderia cepacia* complex by species-specific PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000. № 38. P. 2962–2968.
7. Mahenthalingam E., Bischof J., Byrne S.K. DNA-Based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000. № 38. P. 3165–3173.
8. Moore J.E., Millar B.C., Jiru X. Rapid characterisation of the genomovars of the *Burkholderia cepacia* complex by PCR-single-stranded conformational polymorphism [PCR-SSCP] analysis. *Journal of Hospital Infection*. 2001. № 48. P. 129–134.
9. Soyza A., Morris K., McDowell A. *Burkholderia cepacia* complex genomovars in UK patients with cystic fibrosis referred for lung transplantation. *Thorax*. 2004. № 59 (6). P. 526–528.
10. Soyza A., Ellis C., Khan C. et al. *Burkholderia cenocepacia* lipopolysaccharide, lipid A, and proinflammatory activity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004. № 170. P. 70–77.