

ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.233-002-092.19:576.32/.36:616.112.93

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И ПОПУЛЯЦИОННОГО СТАТУСА ТУЧНЫХ КЛЕТОК ПРИ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ ВОСПАЛЕНИИ В БРОНХИАЛЬНОМ ДЕРЕВЕ

Е.А. Геренг

ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава, Томск
E-mail: e-gereng@mail.ru

THE ROLE OF CYTOKINES IN THE REGULATION OF FUNCTIONAL ACTIVITY AND POPULATIONAL STATUS OF MAST CELLS DURING ALLERGIC INFLAMMATION IN BRONCHIAL TREE

E.A. Gereng

Siberian State Medical University, Tomsk

Цель исследования: изучение роли цитокинов хелперного клона в формировании гетерогенных популяций тучных клеток при аллергическом воспалении дыхательных путей у пациентов с различными формами бронхиальной астмы. У 30 больных различными клиническими вариантами бронхиальной астмы предпринята попытка оценки морфофункционального статуса тучных клеток в биоптатах слизистой оболочки бронхов, а в бронхиальных смывах – содержания интерлейкина-4, интерлейкина-8, интерферона γ , фактора некроза опухоли α . Показано, что дисбаланс выработки основных иммунорегуляторных молекул (интерферона γ , интерлейкина-4) приводит к гетерогенной направленности атопического воспаления в слизистой оболочке бронхов и ассоциирован с развитием различных клинических вариантов бронхиальной астмы. Более интенсивная аккумуляция и дегрануляция тучных клеток, развивающаяся при действии интерлейкина-8, фактора некроза опухоли α , усугубляют аллергический паттерн воспаления и приводят к тяжелому течению астмы. Воспалительные изменения в бронхопроводящей системе при бронхиальной астме представляют собой комплексный процесс, опосредованный взаимодействием цитокинов и основных эффекторных клеток.

Ключевые слова: цитокины, фактор некроза опухоли α , тучные клетки.

The aim was to study a role of cytokines of heterogeneous populations of mast cells during allergic inflammation in patients with various clinical forms of bronchial asthma. There was a try to estimate morphofunctional status of mast cells in biopsy of mucous membrane of bronchial tubes and in bronchial washouts of 30 patients – the maintenance of interleukin-4, interleukin-8, interferon γ , the tumor necrosis factor. Disbalance development of the basic immunopathological molecules (interleukin-4, interferon γ) leads to a heterogeneous orientation of atopic inflammations in a mucous membrane of bronchial tubes and is associated with development of various clinical variants of a bronchial asthma. More intensive accumulation and degranulation of the corpulent cells, developing during the activity of interleukin-8 and tumors necrosis factor, aggravates an allergic pattern of an inflammation and leads to heavy current of asthma. As the research has shown, inflammatory changes in bronchial system during bronchial asthma, represent a complex process mediated by interaction of cytokines and basic effectors of cells.

Key words: cytokines, the tumor necrosis factor, mast cells.

Введение

Аллергическое воспаление дыхательных путей является многообразным процессом, в реализации которого принимают участие различные клеточные элементы, цитокины, ростовые факторы. Сложное взаимодействие

между клеточными и молекулярными маркерами играет ведущую роль в формировании ремоделирования слизистой оболочки у пациентов с тяжелой формой бронхиальной астмы (БА) [1, 2].

Тучные клетки (ТК), как доминантные популяции в аллергическом воспалении воздухоносных путей, непосред-

ственно причастны к нарушению функций легких при БА и к развитию других патофизиологических проявлений болезни [3, 7]. Многообразие иммуоцитокинов, генерирующих воспаление при астме, вызывает нарушения субпопуляционного статуса лаброцитов дыхательных путей, что изменяет клинико-функциональные проявления болезни. Интерлейкину-8 (ИЛ-8) и фактору некроза опухоли α (ФНО α) отводится значимая роль в формировании нейтрофильного типа воспаления, развивающегося при тяжелых формах БА [4, 5]. В настоящее время дискуссионным остается вопрос о значении данных регуляторных молекул в изменении морфофункционального статуса ТК. Цель настоящего исследования: изучить роль цитокинов хелперного клона в формировании гетерогенных популяций тучных клеток при аллергическом воспалении дыхательных путей у пациентов с различными формами бронхиальной астмы.

Материал и методы

Проведено одномоментное сравнительное нерандомизированное исследование 30 больных БА, стратифицированных по тяжести болезни (87% больных – женщины, средний возраст пациентов – $45,1 \pm 14,2$ лет, стаж болезни – $8,15 \pm 1,34$ лет). На основании диагностических критериев документа GINA 2006 [8] у 10 пациентов верифицирована легкая, у 11 – среднетяжелая, у 9 – тяжелая форма БА. Критериями включения в исследование выступали следующие клинико-функциональные параметры. Амбулаторные и стационарные пациенты в возрасте от 33 до 59 лет с ранее подтвержденным диагнозом астма; неконтролируемое течение болезни (АСТ < 19 баллов); положительные результаты кожных прик-тестов с одним и более аэроаллергенами; обратимость бронхиальной обструкции; ПК₂₀ в метахолиновом тесте равное или меньше 8 мг/мл; отсутствие в течение последнего месяца острых респираторных симптомов, обострения БА. После включения в исследование всем больным в зависимости от тяжести болезни назначена противовоспалительная терапия в виде моно-и комбинированных ингаляционных кортикостероидов в соответствии с рекомендациями GINA 2008 [8]. Работа проведена по протоколу, утвержденному на заседании локального этического комитета ГОУ ВПО Росздрава 10.11.2008 г. (регистра-

ционный № 877). До включения в исследование все пациенты подписывали информированное согласие.

Бронхоскопию проводили в условиях стационара при отсутствии выраженных клинических проявлений обострения болезни. Бронхиобиопаты получали методом щипковой биопсии со слизистой оболочки среднедолевого бронха правого легкого, помещали в 10–12% забуференный формалин, заливку гистологических препаратов проводили по стандартной методике. Выявление ТК осуществляли с помощью основного коричневого [3]. В субпопуляции ТК идентифицировали лаброциты с высокой (I), умеренной (II) и низкой (III) степенью дегрануляции (соответственно, низко-, умеренно- и высокогранулированные клетки). Для оценки активности общей популяции ТК подсчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК), характеризующий усредненную степень гранулированности тучных клеток, а значит, уровень их активности.

Для получения бронхиальных смывов (БС) в сегментарный или субсегментарный бронх правого легкого дробно по 20–60 мл вводили 150 мл стерильного физиологического раствора, предварительно подогретого до 37 °C с последующей аспирацией содержимого в стерильный силиконизированный контейнер. БС центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин. Количество интерлейкина-4 (ИЛ-4), ИЛ-8, ФНО α интерферона γ (ИНФ γ) определяли в надосадке иммуоферментным методом ("Вектор-Бест" Новосибирск, "Roche" Швеция).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, USA). Для оценки статистической значимости различий показателей выборок, не подчиняющихся нормальному закону распределения, использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (U-тест) для сопоставления двух независимых групп по количественному признаку. С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R). Коэффициент корреляции и уровень статистической значимости считали достоверным, если вероятность ошибки не превышала 0,05 [11].

Результаты и обсуждение

Согласно критериям включения ни один пациент на "старте" исследования не имел контролируемого течения

Таблица

Сравнительная характеристика цитокинов и иммуноглобулина Е у пациентов с различными клиническими вариантами бронхиальной астмы, Ме (25–75%)

Показатели	Бронхиальная астма					
	Легкая, n=10	Среднетяжелая, n=11	Тяжелая, n=9	p ₁	p ₂	p ₃
IgE, (сыв.) (МЕ/мл)	109,3 (105,3–146,5)	115,7 (108,5–230,2)	254,1 (233,0–325,6)	0,4273	0,0005	0,0643
ИЛ-4 в БС, пг/мл	32,0 (25,0–34,0)	110,6 (100,3–145,3)	126,0 (95,3–235,0)	0,0002	0,0006	0,1509
ИНФ γ , в БС, пг/мл	6,00 (4,5–8,5)	28,9 (17,9–33,4)	99,3 (48,5–123,0)	0,0004	0,0001	0,0002
ИЛ-4/ИНФ γ	5,3 (4,0–5,5)	3,8 (4,3–5,6)	1,3 (1,6–1,9)	0,0003	0,0004	0,0623
ИЛ-8 в БС, пг/мл	104,8 (75,2–154,5)	125,4 (90,1–240,6)	327,6 (148,9–550,6)	0,4496	0,0052	0,0081
ФНО α , в БС, пг/мл	37,2 (15,9–46,5)	59,0 (36,0–99,0)	210,9 (188,9–310,0)	0,0191	0,0001	0,0002

Примечание: p₁ – уровень статистической значимости при сравнении показателей у пациентов с легкой и среднетяжелой формой бронхиальной астмы; p₂ – уровень статистической значимости при сравнении показателей у пациентов с легкой и тяжелой формой бронхиальной астмы; p₃ – уровень статистической значимости при сравнении показателей у пациентов со среднетяжелой и тяжелой формой бронхиальной астмы.

астмы.

Сравнительная характеристика цитокинов в БС и сывороточного IgE у пациентов с различными клиническими вариантами астмы представлена в таблице.

У всех пациентов, независимо от типа болезни, нами установлено повышение количества сывороточного IgE, наиболее выраженное при тяжелом течении болезни. Высокий уровень специфического IgE у этих групп пациентов указывает на atopический характер воспаления, развивающегося в слизистой оболочке бронхального дерева. При легком течении БА в БС нами обнаружены самые низкие показатели медиаторов аллергического воспаления. Концентрация ИЛ-4 в БС при среднетяжелой и тяжелой форме БА в 3,4 и 3,6 раза, а количество ИНФγ, соответственно, в 4,6 и 14,8 превышала показатели, полученные при легком фенотипе болезни. Обнаруженная нами разница в концентрации иммунорегуляторных молекул в БС указывает на потенциально более высокую активность воспалительного процесса в слизистой оболочке бронхов, приводящую к тяжелому течению астмы. Это подтверждается и отрицательной корреляционной взаимосвязью, выявленной нами, между концентрацией IgE в сыворотке крови ($r=-0,59$, $p=0,0088$), ИЛ-4 в БС ($r=-0,55$, $p=0,0018$) и показателями пиковой скорости выдоха. В то же время, более высокое соотношение ИЛ-4/ИНФγ обнаружено при легкой астме – 5,3 (95% CI: 4,0–5,5), наименьшее при тяжелой БА – 1,3 (95% CI: 1,6–1,9). При среднетяжелом течении болезни это соотношение составляло 3,8 (95% CI: 4,3–5,6).

Этот факт свидетельствует о реализации иммунного ответа по Th2 механизму с вовлечением многообразного ансамбля воспалительных клеток. Известно, что под влиянием ИЛ-4, высвобождаемого из дендритных клеток, происходит трансформация нативных Т-лимфоцитов (Th0) в Th2 фенотип, который регулирует выработку IgE, что реализует atopический тип аллергических реакций, наблюдаемый нами у пациентов с легкой и средней степенью БА [10, 12]. Нарушение выработки основных иммуномодулирующих молекул в БС с одновременным снижением соотношения ИЛ-4/ИНФγ указывает на нарушение хелперной регуляции иммунного ответа, что нашло свое отражение в более тяжелом типе БА. Участие ИНФγ в формировании тяжелого неконтролируемого течения болезни подтверждается и в обнаруженной нами статистически значимой ($p=0,0001$) обратной корреляции между данным цитокином и пиковой скоростью выдоха ($r=-0,92$). Ряд авторов указывают на важное значение ИНФγ, вырабатываемого хелперами 1-го типа, в стимуляции выработки ИЛ-8 макрофагами в слизистой оболочке бронхального дерева [10]. Результатом этого процесса является обнаруженное нами более

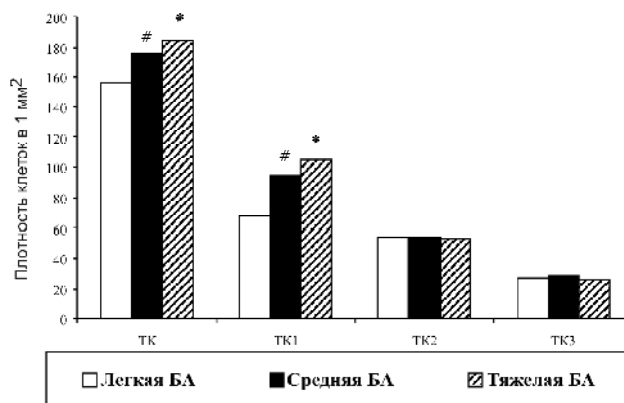


Рис. 1. Плотностные распределения тучных клеток в слизистой оболочке бронхов при различных формах бронхиальной астмы. Примечание: # – достоверность различий при сравнении показателей пациентов с легкой и среднетяжелой формой бронхиальной астмы; * – достоверность различий при сравнении показателей пациентов с легкой и тяжелой формой бронхиальной астмы

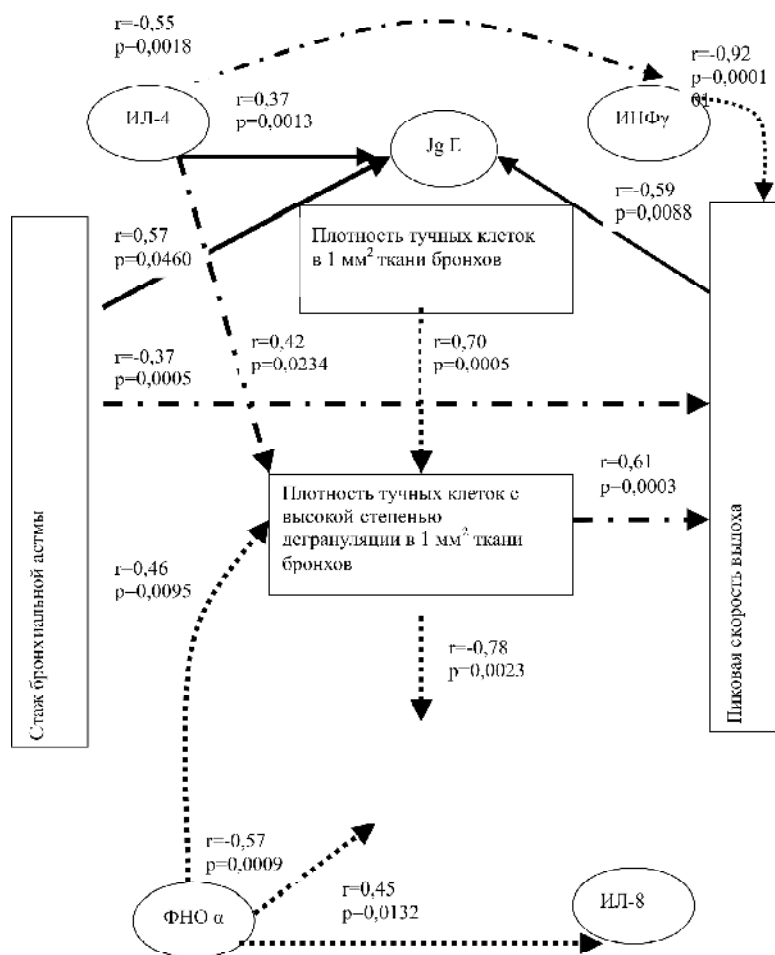


Рис. 2. Результаты корреляционного анализа между содержанием цитокинов и клинико-морфологическим анализом при различных типах бронхиальной астмы: r – коэффициент корреляции Спирмена; p – уровень значимости коэффициента корреляции; —→ – взаимосвязи для пациентов с легкой БА; - - -→ – взаимосвязи для пациентов со средней степенью БА;→ – взаимосвязи для пациентов с тяжелой БА

высокое количество ИЛ-8 в БС у пациентов с тяжелым течением БА – 327,6 (95% CI: 148,9–550,6), соответственно при легком типе БА – 104,8 (95% CI: 75,2–154,6), при среднетяжелом течение – 125,4 (95% CI: 90,1–240,6). Важная роль в моделировании аллергического воспаления принадлежит ТК, дегрануляция которых приводит к высвобождению множества лимфокинов, регулирующих структурные и функциональные нарушения органов дыхания при различных типах астмы [3, 7, 13].

Тяжелая форма БА отличается от легкого и среднетяжелого фенотипа более высокой плотностью лаброцитов в слизистой оболочке бронхов с одновременным повышением общего числа низкогранулированных популяций (ТК1) (рис. 1).

Наряду с этим, СЦК у пациентов с тяжелым типом болезни был достоверно ($p=0,0126$) ниже аналогичных параметров у больных с другими клиническими вариантами астмы. Так, при тяжелом течении СЦК составляет 1,52 (95% CI: 1,5–1,6), при среднетяжелом – 2,8 (95% CI: 2,2–3,6), при легком – 2,6 (95% CI: 2,4–2,8). Представленные данные указывают на доминантную роль лаброцитов в нарушении структурной архитектоники бронхиальной стенки, приводящей к утяжелению течения заболевания. Возможно, ИЛ-8 активизирует высвобождение ФНО α из лаброцитов, что нашло свое отражение у пациентов с тяжелым течением болезни в повышении общего числа ТК с высокой степенью дегрануляции. Этот факт подтверждается экспериментальными исследованиями S. Rauter et al. [7], которые на овальбуминовой модели БА обнаружили высокую активность ТК по высвобождению ФНО α после предварительной стимуляции их ИЛ-8. Корреляционный анализ, проведенный нами, продемонстрировал, что у пациентов с тяжелым течением болезни имеется статистически значимая ($p=0,0132$) положительная взаимосвязь между плотностью ТК1 в слизистой оболочке, СЦК и концентрацией ФНО α , ИЛ-8 в БС (рис. 2). Считается, что ФНО α , высвобождаемый из ТК при их активации, приводит к гипертрофии гладкомышечных клеток бронхов и усилению пролиферации фибробластов [4, 9, 13]. Такое сочетание процессов фиброза и гладкомышечной гиперплазии у пациентов с тяжелым течением болезни нарушает функциональную активность мышечных элементов бронхов, что приводит к дисрегуляции их сократительной функции. Это отражается в развитии выраженной бронхиальной гиперреактивности – доминантном патофизиологическом признаке тяжелого течения астмы [7, 9, 13].

Таким образом, изменение выработки основных цитокинов (ИЛ-4, ИНФ γ) приводит к гетерогенной направленности иммунопатологического воспаления в слизис-

той оболочки бронхов и сопровождается развитием различных клинических вариантов БА. Более интенсивная аккумуляция и дегрануляция ТК, развивающаяся при действии ИЛ-8 и ФНО α , усугубляет аллергический паттерн воспаления и приводит к тяжелому течению БА. Воспалительные изменения в бронхопроводящей системе при астме, как показало наше исследование, представляет собой комплексный процесс, опосредованный взаимодействием цитокинов и основных эффекторных клеток.

Литература

1. Чучалин А.Г. Тяжелые формы бронхиальной астмы // Тер. архив. – 2001. – Т. 73, № 3. – С. 5–9.
2. Фисенко В., Чичкова Н. Ремоделирование при бронхиальной астме: принципы формирования и возможности фармакологического воздействия // Врач. – 2006. – № 12. – С. 14–20.
3. Зуга М.В., Невзорова В.А., Гельцер Б.И. Тучные клетки и их значение в физиологии и патологии легких // Тер. архив. – 1999. – Т. 71, № 3. – С. 76–80.
4. Старикова И.А., Фрейдлин И.С., Соколов Д.И., Сельков С.А. Изменение свойств эндотелиальных клеток линии EA.hy926 под влиянием фактора некроза опухоли α , интерферона γ и интерлейкина 4 // Иммунология. – 2005. – № 2. – С. 83–87.
5. Silvestri M., Bontempelli M., Giancomelli M. et al. High serum levels of tumor necrosis factor α and interleukin-8 in severe asthma: markers of systematic inflammation // Clin. Exp. Allergy. – 2006. – Vol. 36, № 11. – P. 1373–1381.
6. Boulet L-P., Sterk P.J. Airway remodelling: the future // Eur. Respir. J. – 2007. – Vol. 30, № 9. – P. 831–834.
7. Reuter S., Heinz A., Sieren M. et al. Mast cell-derived tumor necrosis factor is essential for allergic airway disease // Eur. Respir. J. – 2008. – Vol. 31, № 12. – P. 773–782.
8. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы / под ред. А.Г. Чучалина. – М., 2008. – 160 с.
9. Barnes P.J. New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma // J. Allergy Clin. Immunol. – 1999. – Vol. 83. – P. 1013–1026.
10. Truyen E., Coteur L., Dilissen E. et al. Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients with asthma and chronic bronchitis // Thorax. – 2006. – Vol. 61. – P. 202–208.
11. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ STATISTICA. – М.: Медиа Сфера, 2002. – 305 с.
12. Schmidt D., Watson N., Ruhlmann E. et al. Serum IgE levels predict human airway reactivity in vitro // Clin. Exp. Allergy. – 2000. – Vol. 30. – P. 917–921.
13. Barnes J. Cytokines and chemokines in asthma // Eur. Resp. J. – 2007. – Vol. 29. – P. 43–59.

Поступила 12.12.2009