

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ КАК МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ НЕАЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Трушина Е.Ю.¹, Костина Е.М.¹, Баранова Н.И.¹, Типикин В.А.¹

¹ПИУВ–филиал ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Минздрава России, Пенза, e-mail: giuv@sura.ru

В основе бронхиальной астмы (БА) лежит хроническое воспаление дыхательных путей. Иммунопатогенез определяет многообразие клинических фенотипов астмы. Цитокины являются основными медиаторами межклеточного взаимодействия, маркерами воспалительной реакции и определяют тип иммунного воспаления. В работе проведено изучение роли спонтанной и индуцированной продукции цитокинов IL-4, IL-10, IL-6, IL-8 лейкоцитами периферической крови в патогенезе неаллергической формы бронхиальной астмы. Показана значимость IL-6, IL-8 в иммунопатогенезе данного фенотипа БА. Установлено повышение уровней как спонтанной, так и индуцированной продукции IL-6, IL-8 в период относительной ремиссии заболевания. Индуцированная продукция цитокинов отражает резервные возможности иммунокомпетентных клеток в ответ на действие патогенов (аллергенов, вирусов, бактерий, токсинов). Это более точно отражает интенсивность воспалительной реакции и готовность клеток к ответной продукции медиаторов при персистенции воспаления респираторного тракта. Неаллергическая форма БА проявляется нейтрофильным типом воспаления дыхательных путей, что выражается повышением как спонтанной, так и индуцированной продукции IL-6, IL-8. В меньшей степени играет роль IL-10, как иммунорегуляторный медиатор баланса Th2 и Th1 клеток. Клиническое течение неаллергического варианта БА характеризуется более значимым снижением функции внешнего дыхания, частыми обострениями, неполным контролем астмы на фоне применения высоких доз стероидов.

Ключевые слова: бронхиальная астма, фенотипы, цитокины, воспаление.

THE CYTOKINES ROLE AS INFLAMMATION MOLECULAR MARKERS IN NON-ALLERGIC BRONCHIAL ASTHMA

Trushina E.Yu.¹, Kostina E.M.¹, Baranova N.I.¹, Tipikin V.A.¹

¹The Penza Institute for Further Training of Physicians - Branch Campus of the Federal State Budgetary Educational Institution of Further Professional Education «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Penza, e-mail: giuv@sura.ru

Chronic inflammation of the respiratory tract underlies the bronchial asthma (BA). Immunopathogenesis determines the variety of asthma clinical phenotypes. Cytokines are the main intercellular interaction mediators, markers of the inflammatory reaction and determine the type of immune inflammation. The role of spontaneous and induced production of IL-4, IL-10, IL-6, IL-8 cytokines by peripheral blood leukocytes in the pathogenesis of non-allergic bronchial asthma form has been studied in this work. The significance of IL-6, IL-8 in the immunopathogenesis of this BA phenotype has been shown. The increase of both spontaneous and induced IL-6 and IL-8 production levels in the period of relative remission of the disease has been established. Induced cytokines production reflects the reserve immunocompetent cells capabilities in response to the action of pathogens (allergens, viruses, bacteria, toxins). This more accurately reflects the intensity of inflammatory reaction and the cells readiness to responsible mediators production in the persistence of respiratory tract inflammation. The non-allergic BA form is manifested by the neutrophilic type of airways inflammation, which is expressed in the increase of both spontaneous and induced IL-6 and IL-8 production. IL-10 as an immunoregulatory mediator of Th2 and Th1 cells balance plays a lesser role in it. The clinical course of the non-allergic BA variant is characterized by a more significant decrease of the external respiration function, frequent exacerbations, incomplete asthma control against the background of high doses of steroids.

Keywords: bronchial asthma, phenotypes, cytokines, inflammation.

Бронхиальная астма (БА) является ведущим заболеванием респираторной медицины, заболеваемость которой неуклонно возрастает с каждым годом [1]. Патогенез БА сложен, многообразен и определяет тип, интенсивность воспаления дыхательных путей и ответ на проводимую терапию [2; 3]. Многообразие клинико-патогенетических вариантов БА активно

обсуждается последние годы [4; 5]. Помимо аллергической БА, выделяют: неаллергическую, вирус-индуцированную, нейтрофильную, позднюю неаллергическую и другие фенотипы БА [6]. Отличительной особенностью неаллергических фенотипов БА является персистенция воспаления дыхательных путей преимущественно инфекционного генеза, наличие бактериальных очагов хронической инфекции респираторного тракта, длительный стаж курения, низкие значения функции внешнего дыхания, толерантность к лечению глюкокортикостероидами (ГКС) [7].

Воспаление является основным патогенетическим звеном БА, выделяют три типа: эозинофильное, нейтрофильное, малогранулоцитарное. Механизмы развития воспаления и бронхообструкции реализуются на уровне медиаторов (цитокинов) и клеток. По данным литературы, исследованию цитокинового профиля при аллергической БА посвящено множество работ, менее изучен этот вопрос при других фенотипах БА, в том числе при неаллергическом варианте [8; 9]. Важное значение в патогенезе БА имеет дисбаланс Th2 и Th1 типов иммунного реагирования. Интерлейкин-4 (IL-4) является основным медиатором аллергической реакции, Th2 типа иммунного ответа, путем индукции дифференцировки Th2 клеток и синтеза иммуноглобулина E (IgE) антител на причинно-значимые аллергены. Интерлейкин-10 (IL-10) является потенциальным противовоспалительным медиатором, который подавляет синтез многих белков воспаления, провоспалительных цитокинов. IL-10 выполняет иммунорегуляторную роль баланса Th2 и Th1 клеток. В работе Л.Н. Сорокиной с соавторами при исследовании цитокинов в сыворотке крови у больных неаллергической формы бронхиальной астмы, выявили высокие концентрации IL-4 и интерлейкина-6 (IL-6), наличие сопутствующей патологии – сахарного диабета приводило к снижению уровня IL-4 [10]. Эозинофильный тип воспаления характерен не только для ранней аллергической БА, но и для неаллергической БА с поздним началом.

Наиболее тяжелые пациенты чаще демонстрируют другой эндотип воспаления - нейтрофильный, в формировании которого могут принимать участие IL-6, IL-8, IL-17, IL-1 β , TNF- α [11]. IL-6 продуцируется макрофагами, дендритными клетками, тучными клетками и нейтрофилами. Также выработку IL-6 индуцируют процессы повреждения клеток вследствие продуктов распада бактерий и вирусов. Отмечается повышение уровня IL-6 в сыворотке крови при воспалительных заболеваниях. Рассматривается двусторонняя роль IL-6 в респираторном тракте: с одной стороны, при аллергическом воспалении он снижает количество эозинофилов и уровень IL-4, IL-5 в дыхательных путях, с другой - данный феномен способствует формированию фиброза в бронхолегочной системе [12].

Интерлейкин-8 (IL-8) является одним из основных провоспалительных хемокинов, образуемый нейтрофилами, макрофагами, эпителиальными и эндотелиальными клетками.

IL-8 обладает хемоаттрактантной активностью в отношении нейтрофилов и лимфоцитов и при высвобождении приводит к миграции этих клеток к участку тканевого повреждения. По данным литературы описывается высокий уровень IL-8 в сыворотке крови у больных БА, ассоциированной вирусной инфекцией [13].

В большей степени отмечено повышение уровня цитокинов, в том числе индуцированной продукции в период обострения астмы, что показывает важность роли цитокинов при активации воспаления. В работе А.В. Караулова с соавторами отмечено, что стимуляция синтеза и секреции цитокинов у больных бронхиальной астмой, в отличие от здоровых доноров, не всегда приводит к повышению их индуцированной продукции [14].

Таким образом, изучение иммунопатогенеза астмы позволит дифференцированно подойти к терапии БА с позиций индивидуального подхода, прогнозировать тяжесть течения и разрабатывать профилактические мероприятия.

Цель исследования

Изучить роль спонтанной и индуцированной продукции цитокинов IL-4, IL-10, IL-6, IL-8 лейкоцитами периферической крови в патогенезе воспаления неаллергической формы бронхиальной астмы.

Материал и методы исследования

Обследовано 96 больных с диагнозом БА на базе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Клиническая больница № 4» г. Пензы, из них - 20 (20,8%) мужчин, 76 (79,1%) женщин.

Больные были разделены на 2 группы: 1-ю группу (n=49) составили больные с неаллергической формой БА (НАБА), средний возраст составил 56,00 лет, средняя длительность течения заболевания – 10,00 лет; 2-ю группу сравнения (n=47) - больные с аллергической формой БА (АБА), средний возраст составил 56,00 лет, средняя длительность течения заболевания – 20,00 лет. Контрольную группу составили 17 человек, практически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с изучаемыми группами.

По степени тяжести больные были распределены следующим образом: со среднетяжелым течением – 42 (43,75%), тяжелым – 54 (56,25%) человека. Все пациенты получали противовоспалительную терапию в соответствии с рекомендациями GINA 2016. Согласно российским и международным клиническим рекомендациям, средние дозы ингаляционных глюкокортикостероидов (ИГКС) получали 38 (39,5%), высокие дозы – 58 (60,4%) человек.

Диагноз БА установлен в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями и Глобальной стратегией: диагностика, лечение и профилактика БА (GINA 2016). Диагноз АБА поставлен на основании отягощенного аллергологического анамнеза,

подтвержденного положительными результатами специфических IgE-антител к пыльцевым и бытовым аллергенам. Диагноз НАБА был установлен путем исключения наличия атопии к неинфекционным аллергенам. Все больные получили полное клинико-лабораторное обследование в соответствии со стандартами обследования больных с БА на базе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Клиническая больница № 4» г. Пензы.

Функция внешнего дыхания (ФВД) изучалась при помощи спирометра MicroLab (Англия) с определением объема форсированного выдоха в секунду (ОФВ₁, %, л), форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ, %, л), модифицированного индекса Тиффно (ИТ=ОФВ₁/ФЖЕЛ, %), в соответствии с требованиями ATS (American Thoracic Society - Американское торакальное общество). Пиковая скорость выдоха (ПСВ) и суточный разброс ПСВ (разница между утренними и вечерними измерениями в процентах) измерялись с помощью пикфлоуметра Vitalograph (Ирландия).

Исследование спонтанной и индуцированной продукции IL-4, IL-10, IL-6, IL-8 лейкоцитами периферической крови проведено в Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) ПИУВ – филиала ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Минздрава России (заведующая ЦНИЛ – доцент, д.б.н. Баранова Н.И.). Материалом для исследования служили супернатант спонтанной и фитогемаглютенин (ФГА) -индуцированной продукции клеток больных БА и здоровых лиц контрольной группы. Для оценки спонтанной и ФГА-индуцированной продукции цитокинов был проведен тест *ex vivo*. Определение концентрации IL-4, IL-10, IL-6, IL-8 в супернатанте спонтанной и ФГА-индуцированной продукции клеток иммунной системы осуществлялось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) при помощи тест-систем «Интерлейкина-4-ИФА-Бест», «Интерлейкина-10-ИФА-Бест», «Интерлейкина-6-ИФА-Бест», «Интерлейкина-8-ИФА-Бест», (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Статистическая обработка материала проводилась с помощью пакета прикладных программ Statistica 6,0 на персональном компьютере. При сравнении групп между собой использовали критерий Манна-Уитни. Показатели представлены в виде медианы (Me) и квартилей (P25%; P75%). Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Клинические проявления НАБА характеризовались персистирующим, не полностью контролируемым течением с частыми обострениями (более 2 раз в год). Основным провоцирующим фактором обострений являлись острые респираторные инфекции у большинства пациентов с НАБА. Среди сопутствующей патологии преобладали заболевания респираторного тракта: гайморит, полисинусит, полипоз носа, гнойный бронхит. У 5 человек

в анамнезе были отмечены перенесенные пневмонии. Показатели ФВД значительно различались у больных НАБА в сравнении с АБА ($p < 0,05$). В группе больных с НАБА ОФВ₁ составил 1,57 л (58,00%), наблюдались суточные колебания ПСВ 24,00%, несмотря на проводимую терапию ($p < 0,05$). Больные с НАБА получали высокие дозы стероидов в 2 раза чаще, чем при аллергическом варианте.

При изучении уровня цитокинов у больных с аллергическим и неаллергическим фенотипом БА был выявлен разнонаправленный характер изменений (таблица).

Значения спонтанной и индуцированной продукции цитокинов IL-4, IL-10, IL-6, IL-8 (пг/мл) лейкоцитами крови у больных с различными фенотипами бронхиальной астмы

Показатель, пг/мл	Контрольная группа (n=17) Me [P25%; P75%]	АБА (n=47) Me [P25%; P75%]	НАБА (n=49) Me [P25%; P75%]
IL-4 спонт.	0,00 [0,00-0,00]	0,00 [0,00-0,30]	0,00 [0,00-0,00]
IL-4 инд.	16,10 [8,40-25,60]	17,30* [13,40-24,80]	13,40* [10,00-17,60]
IL-10 спонт.	3,19 [2,40-7,50]	17,50* [3,50-21,60]	8,95*. ** [3,20-15,50]
IL-10 инд.	131,30 [105,60-145,20]	161,80* [141,10-273,40]	139,00* [120,60-193,20]
IL-6 спонт.	54,10 [27,90-94,40]	94,40 [31,90-275,60]	399,00*. ** [239,90-494,70]
IL-6 инд.	9844,00 [9840,00-9849,00]	9860,00* [9844,00-9886,00]	9918,00*. ** [9886,00-9930,00]
IL-8 спонт.	427,40 [387,00-450,50]	450,50* [401,10-585,50]	586,20*. ** [567,30-587,00]
IL-8 инд.	6014,00 [5786,00-6068,00]	6846,00* [6022,00-9016,00]	9005,00*. ** [8064,00-9034,00]

Примечания:

*- статистически значимое различие показателей между группами больных АБА и НАБА и здоровыми донорами (Mann-Whitney тест, $p < 0,05$);

** - статистически значимое различие показателей между группами больных АБА и НАБА (Mann-Whitney тест, $p < 0,05$);

спонт. – содержание цитокинов в супернатанте при спонтанной продукции клетками;

инд. - содержание цитокинов в супернатанте при ФГА-индуцированной продукции клетками.

Изменений по уровню спонтанной и индуцированной продукции IL-4 в сравнении

между группами больных с НАБА и АБА выявлено не было ($p > 0,05$). Индуцированная продукция ИЛ-4 у больных БА в сравнении с результатами контрольной группы значительно различалась в обеих группах ($p < 0,05$). Повышение индуцированной продукции ИЛ-4 у больных БА в сравнении со здоровыми лицами отражает большую готовность к реагированию Т-лимфоцитов на антиген, это наиболее выражено при АБА ($p < 0,05$). Развитие аллергического воспаления по Th2 типу иммунного реагирования характерно для больных с аллергическим фенотипом БА. ИЛ-4, вероятно, не имеет ведущего значения в патогенезе воспаления при НАБА.

По ИЛ-10 получены значимые различия по результатам при сравнении групп больных с НАБА, АБА и здоровыми донорами как по спонтанной, так и индуцированной продукции ($p < 0,05$). Спонтанная продукция ИЛ-10 у больных НАБА была в 2 раза меньше в сравнении с АБА ($p < 0,05$), но в 2,8 раза выше в сравнении со здоровыми донорами ($p < 0,05$). Индуцированная продукция ИЛ-10 у больных НАБА составила 139,00 пг/мл, у больных с АБА - 161,80 пг/мл ($p < 0,05$), результаты, полученные у больных с БА, значительно различались в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$). ИЛ-10 выполняет иммунорегуляторную роль в балансе Th1 и Th2 типов иммунного ответа при формировании воспаления респираторного тракта не только у больных с АБА, но и у больных с НАБА.

Спонтанная продукция ИЛ-6 у больных НАБА составила 399,00 пг/мл, что в 2,2 раза выше, чем в группе больных АБА, и в 7,8 раза выше в сравнении со здоровыми лицами ($p < 0,05$). Индуцированная продукция ИЛ-6 составила 9918,00 пг/мл, что также имело достоверную значимость в сравнении результатов, полученных у больных с АБА и здоровых лиц ($p < 0,05$). Повышение спонтанной и индуцированной продукции ИЛ-6 может говорить о преобладании воспаления инфекционного характера. ИЛ-6 поддерживает персистенцию инфекционного, нейтрофильного типа воспаления респираторного тракта. Фенотип НАБА в большей степени связан с инфекционным фактором (вирусами, бактериями), очагами хронической инфекции в респираторном тракте. Известна значимость ИЛ-6 в формировании необратимой обструкции бронхов, фиброза легочной ткани, что снижает эффективность проводимой терапии. 2/3 наблюдаемых пациентов с НАБА получали высокие дозы стероидов, при этом достичь полного контроля БА не удалось.

Аналогичная тенденция наблюдалась и в отношении ИЛ-8. Уровень спонтанной продукции ИЛ-8 у больных с НАБА составил 586,20 пг/мл, у больных с АБА 450,50 пг/мл соответственно ($p < 0,05$). Индуцированная продукция ИЛ-8 также была выше в группе НАБА в сравнении с группами АБА и здоровыми донорами ($p < 0,05$) и составила – 9005,00 пг/мл. Известно, что ИЛ-8 продуцируется нейтрофилами. Повышение продукции ИЛ-8 определяется функциональной активностью нейтрофилов в ответ на внедрение патогенных агентов и

напряженностью противoinфекционной защиты организма. Его значимость в патогенезе НАБА подтверждает хроническое течение воспаления и его инфекционный тип.

Выводы

Таким образом, IL-4, IL-10, IL-6, IL-8 могут выступать маркерами различных типов воспаления, определяя клинико-патогенетический вариант БА. При АБА преобладают цитокины, участвующие в Th2 типе иммунного ответа, что характерно для формирования аллергического (эозинофильного) типа воспаления респираторного тракта. При НАБА повышен уровень провоспалительных цитокинов, высвобождение которых происходит под влиянием активации инфекционных агентов. НАБА проявляется нейтрофильным типом воспаления дыхательных путей, что выражается торпидностью к проводимой ИГКС терапии. Результаты исследования индуцированной продукции цитокинов можно применять в реальной клинической практике.

Список литературы

1. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (GINA). National Institutes of Health; National Heart, Lung, and Blood Institute. Updated 2016 [Электронный ресурс]. - URL: <http://ginasthma.org/wp-content/uploads/2016/04/wms-GINA-2016-main-report-final.pdf>. (дата обращения: 10.06.2018).
2. Современный взгляд на иммунопатогенез бронхиальной астмы / О.М. Курбачева [и др.] // Российский аллергологический журнал. – 2016. - № 2. – С. 10-14.
3. Особенности воспаления у больных бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких и маркеры воспаления / Г.Б. Федосеев [и др.] // Российский аллергологический журнал. – 2014. - № 2. – С. 44-58
4. Пыцкий В.И. Вопросы патогенеза и основные принципы лечения больных различными формами бронхиальной астмы // Аллергология и иммунология. – 2008. - Т. 9. - № 4. – С. 480-482.
5. В поисках истины: что такое бронхиальная астма? / Г.Б. Федосеев [и др.] // Пульмонология. - 2015. - № 25 (1). - С. 5-18.
6. Молекулярные маркеры воспаления в бронхиальном содержимом при различных фенотипах тяжелой бронхиальной астмы / Е.А. Геренг [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – Т. 10. – № 3. – С. 24-30.
7. Фассахов Р.В. Тяжелая бронхиальная астма: фенотипы и роль малых дыхательных путей // Российский аллергологический журнал. – 2012. - № 6. – С. 49-54.
8. Рябова Л.В., Зурочка А.В. Различия каскада цитокинов у больных бронхиальной

астмой в зависимости от стадии течения заболевания // Медицинская иммунология. – 2007. - Т. 9. - № 4-5. – С. 493-498.

9. Иммунологические маркеры неконтролируемого течения атопической бронхиальной астмы у детей / М.В. Смольникова [и др.] // Медицинская иммунология. - 2017. - Т. 19. - № 4. - С. 453-460.

10. Особенности цитокинового спектра у больных неаллергической бронхиальной астмой в сочетании с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа / Л.Н. Сорокина [и др.] // Медицинская иммунология. – 2017. - Т. 19. - № 3. – С. 313-318.

11. Борисова Т.В., Сокурченко С.И., Караулов А.В. Особенности цитокинового профиля, фенотипа и фагоцитарной активности нейтрофилов крови больных бронхиальной астмой в период обострения // Клиническая практика. – 2013. - № 3. – С. 11-19.

12. Wang J., Homer R.J., Chen Q., Elias J.A. Endogenous and exogenous IL-6 inhibit aeroallergen-induced Th2 inflammation // J. Immunol. - 2000. - Vol. 165. - № 7. - P. 4051–4061.

13. Косякова Н.И. Вирус-индуцированная бронхиальная астма и роль герпетической инфекции в развитии бронхиальной обструкции у детей // Поликлиника - Спецвыпуск Инфекционные болезни/Болезни органов дыхания. – 2016. – № 4. – С. 49-52.

14. Спонтанная и индуцированная продукция цитокинов лейкоцитами периферической крови у больных бронхиальной астмой в стадии обострения / А.В. Караулов [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9. - № 4. – С. 93-96.