

РАЗЛИЧИЯ КАСКАДА ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Рябова Л.В., Зурочка А.В.

НИИ иммунологии Челябинской медицинской академии, г. Челябинск

Резюме. Изучали состояния системы регуляции лейкоцитов у больных бронхиальной астмой в стадии обострения при помощи исследования спонтанной и индуцированной продукции цитокинов (IL-4, IL-1 β , IL-10 и IFN γ) в супернатантах цельной крови и определяли коэффициенты соотношения их продукции в сравнении с контролем. 1 группа — больные бронхиальной астмой смешанной формы, легкой степени тяжести в стадии обострения. Контрольная группа — 12 человек условно здоровые лица. Цитокиновый каскад оценивался по спонтанной и индуцированной продукции стандартными митогенами фитогемагглютинином (PHA) и липополисахаридом (LPS) *E. coli* IL-4, IL-1 β , IL-10 и IFN γ . Полученные данные показывают, что при бронхиальной астме как модели хронического воспаления синтез и активация цитокинов зависит от фазы заболевания. В стадии обострения наблюдается дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов с преобладанием противовоспалительного IL-10, направленного на процесс затухания легочного воспаления.

Ключевые слова: бронхиальная астма, цитокины.

Ryabova L.V., Zurochka A.V.

SPECIFIC STAGE-DEPENDENT FEATURES OF CYTOKINE CASCADE IN THE PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

Abstract. A study of leukocyte regulation system in patients with exacerbated bronchial asthma (BA) was performed by means of measuring spontaneous and induced production of certain cytokines (IL-4, IL-1 β , IL-10 and IFN γ) in whole blood, and drawing some specific coefficients reflecting production of the cytokines, as compared to control values. Group 1 consisted of mixed-type BA patients, with mild clinical manifestations at exacerbation stage. A control group included twelve healthy persons. The cytokine network was evaluated according to spontaneous production of cytokines (IL-4, IL-1 β , IL-10 and IFN γ), or their induction with standard mitogens (PHA and *E. coli* LPS). The results obtained have shown that in BA as a clinical model of chronic inflammation, synthesis and activation of the cytokines depend on the phase of disease. At stage of exacerbation, an imbalance occurs between pro- and anti-inflammatory cytokines, with predominance of anti-inflammatory IL-10, which is targeted to suppression of bronchial inflammation. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 4-5, pp 493-498)

Введение

Хроническое воспаление — это патологический процесс, возникающий на фоне недо-

статочной интенсивности иммунного ответа, то есть хроническое воспаление всегда приводит к развитию иммунодефицитного состояния и нарушению процессов репарации [5, 6]. Следовательно, иммунные механизмы играют ключевую роль в патогенезе хронического воспаления [7]. При возникновении воспаления цитокиновая сеть регуляции иммунной систе-

Адрес для переписки:

454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (351) 260-50-05, моб. 8 (351) 270-56-35.
E-mail: lianarabowa@rambler.ru

мы является наиболее уязвимой точкой приложения в патологическом процессе. При любом хроническом течении воспаления основную роль играют макрофаги и лимфоциты, поэтому последнее обозначают как моноклеарно-инфильтративное [3, 4, 7]. Цитокины, выделяемые при макрофагально-лимфоцитарной инфильтрации, взаимно активируют эти клетки, создавая порочный круг, который поддерживает возникшую воспалительную реакцию. Важнейшую роль в этом играют γ -интерферон (IFN γ) и интерлейкин-4 (IL-4). При этом IFN γ регулирует клеточно-опосредованный иммунный ответ, а IL-4 и IL-10 — гуморальный [8]. При этом надо отметить, что цитокиновый каскад находится в организме в динамическом состоянии и в зависимости от фазы течения болезни меняет свои показатели, которые через клетки иммунной системы воздействуют на дыхательную систему и на весь организм в целом.

Бронхиальная астма (БА) — одно из наиболее распространенных хронических неспецифических заболеваний легких и может служить «моделью» формирования дефекта регуляторной сети на уровне взаимодействия IFN γ и IL-4 [1, 2]. Патогенез аллергических заболеваний, в частности БА, очень сложен. В формировании иммунного ответа воспаления бронхов участвуют иммунные реакции 1, 3 и 4 типов, но чаще других ведущую роль играет механизм 1 типа реакции. Определение выработки цитокинов моноклеарами периферической крови (МНПК) при стимуляции *in vitro* является более адекватным по сравнению с определением плазменного уровня цитокинов [8]. При активации *in vitro* такими агентами, как фитогемагглютинин (РНА) и бактериальный липополисахарид (LPS), МНПК секретируют в культурную среду целый спектр провоспалительных цитокинов. Выраженная спонтанная продукция цитокинов МНПК свидетельствует о том, что клетки уже активированы *in vivo* либо *in vitro* в результате методических манипуляций. Индуцированная продукция цитокинов позволяет оценить потенциальные возможности активации клеток.

Материалы и методы

Нами было проведено исследование спонтанной и индуцированной стандартными митогенами

(РНА и LPS *E. coli*) продукции IFN γ , IL-4, IL-1 β и IL-10 в супернатантах цельной крови. Также были рассчитаны коэффициенты соотношения их выработки у условно здоровых лиц и у больных БА легкой степени тяжести в стадии обострения и в стадии ремиссии. Группа условно здоровых лиц была сформирована врачом-терапевтом во время проведения углубленного профилактического осмотра, включающего консультацию врача аллерголога-иммунолога. В эту группу вошли 16 условно здоровых лиц, не имеющих на момент исследования острой и хронической патологии в анамнезе. В группу больных БА легкой степени тяжести смешанной формы (инфекционно-зависимой и аллергической) вошли 44 человека в возрасте от 18 до 40 лет, из которых 30 человек были в стадии обострения, а 14 человек в стадии ремиссии. Диагноз был подтвержден врачом аллергологом-иммунологом на основании клинических, лабораторных и инструментальных исследований.

Для исследования спонтанной и индуцированной митогенами продукции IFN γ , IL-4, IL-1 β и IL-10 (контрольные группы) кровь брали из локтевой вены в две стерильные силиконовые пробирки с гепарином (150 ед/мл), разводили (1:5) стерильной средой RPMI 1640 («Sigma») с добавлением 2 мл L-глутамин («Sigma») и 80 мкг/мл гентамицина.

Для спонтанной продукции цитокинов в лунки 24-луночного планшета вносились по 1 мл среды RPMI 1640 с добавлением 2 мл L-глутамин («Sigma»), 80 мкг/мл гентамицина и 1 мл разведенной в 5 раз крови.

Для РНА-индуцированной продукции цитокинов в лунки планшета вносились по 1 мл рабочего раствора РНА («DIFCO») и 1 мл разведенной в 5 раз крови (конечная концентрация РНА 50 мкг/мл).

Для LPS-индуцированной продукции цитокинов в лунки планшета вносились по 1 мл рабочего раствора LPS *E. coli* («Sigma») и 1 мл разведенной в 5 раз крови (конечная концентрация LPS *E. coli* 30 мкг/мл).

Планшеты с исследуемыми образцами культивировали при 37°C и 5% CO $_2$ в CO $_2$ -инкубаторе. По прошествии времени инкубации супернатанты отбирали для исследования на наличие цитокинов.

Для определения спонтанной и митоген-индуцированной продукции цитокинов в супернатантах были использованы тест-системы для иммуноферментного анализа «ИФА-IFN γ »,

ТАБЛИЦА 1. СПОНТАННАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ $IFN\gamma$ И СООТНОШЕНИЯ УРОВНЕЙ СПОНТАННОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ *IN VITRO* В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В СТАДИИ РЕМИССИИ И ОБОСТРЕНИЯ

Показатели	Продукция $IFN\gamma$ в группах обследованных		
	БА, фаза обострения n = 30	БА, фаза ремиссии n = 14	условно здоровые n = 16
Спонтанная продукция $IFN\gamma$, пг/мл	550,7±173,85	566,8±144,1	434,38±142
РНА индуцированная продукция $IFN\gamma$, пг/мл	6633,8±849	6619,55±728,2	7349,81±1003
ИС (отношение РНА индуцированной продукции $IFN\gamma$ к спонтанной продукции $IFN\gamma$)	12±4,9*	41,91±15,63	45,65±10,3
LPS индуцированная продукция $IFN\gamma$, пг/мл	899,94±734*	1726±831,94	5132,82±1102,04
ИС (соотношение LPS индуцированной продукции $IFN\gamma$ к спонтанной продукции $IFN\gamma$)	1,63±4,24	1,93±0,58	3,42±0,47

Примечание: * – достоверность отличий показателей группы БА в стадии обострения от показателей условно здоровых ($p < 0,05$) (соотношение подсчитано с учетом индивидуальных показателей).

ТАБЛИЦА 2. СПОНТАННАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ $IL-1\beta$ И СООТНОШЕНИЯ УРОВНЕЙ СПОНТАННОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ *IN VITRO* В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В СТАДИИ РЕМИССИИ И ОБОСТРЕНИЯ

Показатели	Продукция $IL-1\beta$ в группах обследованных		
	БА, фаза обострения n = 30	БА, фаза ремиссии n = 14	условно здоровые n = 16
Спонтанная продукция $IL-1\beta$, пг/мл	259,78±56,6	480,58±81,22*	377,17±77,44
РНА индуцированная продукция $IL-1\beta$, пг/мл	387,1±57,7	496,91±103,81	442,54±101
ИС (отношение РНА индуцированной продукции $IL-1\beta$ к спонтанной продукции $IL-1\beta$)	1,49±1,01	3,45±1,68	1,35±0,1
LPS индуцированная продукция $IL-1\beta$, пг/мл	413±76,11	569,16±98,29	616,5±82,86
ИС (отношение LPS индуцированной продукции $IL-1\beta$ к спонтанной продукции $IL-1\beta$)	1,59±1,34	1,29±0,09	1,59±0,08

Примечание: * – достоверность отличий показателей больных БА в стадии обострения в сравнении с показателями больных БА в стадии ремиссии ($p < 0,05$) (соотношение подсчитано с учетом индивидуальных показателей).

ТАБЛИЦА 3. СПОНТАННАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ IL-4 И СООТНОШЕНИЯ УРОВНЕЙ СПОНТАННОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ IN VITRO В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В СТАДИИ РЕМИССИИ И ОБОСТРЕНИЯ

Показатели	Продукция IL-4 в группах обследованных		
	БА, фаза обострения n = 30	БА, фаза ремиссии n = 14	условно здоровые n = 16
Спонтанная продукция IL-4, пг/мл	9,56±1,4 ^{***} *	59,16±3,96	20,12±5,65
РНА индуцированная продукция IL-4, пг/мл	9,67±1,25 ^{***,*}	85,52±11,03	35,58±7,5
ИС (отношение РНА индуцированной продукции IL-4 к спонтанной продукции IL-4)	1,01±0,81	1,4±0,13	5,98±2,31
LPS индуцированная продукция IL-4, пг/мл	10,44±4,91*	68,44±6,76	24,83±6,83
ИС (отношение LPS индуцированной продукции IL-4 к спонтанной продукции IL-4)	1,09±3,5	1,23±0,19	4,6±1,61

Примечания: * – достоверность отличий показателей больных БА в стадии обострения от показателей больных БА в стадии ремиссии; ** – достоверность отличий показателей группы БА в стадии обострения от показателей условно здоровых (p < 0,05) (соотношение подсчитано с учетом индивидуальных показателей).

ТАБЛИЦА 4. СПОНТАННАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ IL-10 И СООТНОШЕНИЯ УРОВНЕЙ СПОНТАННОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ IN VITRO В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В СТАДИИ РЕМИССИИ И ОБОСТРЕНИЯ

Показатели	Продукция IL-10 в группах обследованных		
	БА, фаза обострения n = 30	БА, фаза ремиссии n = 14	условно здоровые n = 16
Спонтанная продукция IL-10, пг/мл	183,26±22,97 ^{***,*}	40,18±6,89	43,97±9,86
РНА индуцированная продукция IL-10, пг/мл	568,9±0,29 ^{***,*}	45,83±15,27	136,1±26,09
ИС (отношение РНА индуцированной продукции IL-10 к спонтанной продукции IL-10)	3,1±0,01 ^{**}	1,6±0,57	25,17±12
LPS индуцированная продукция IL-10, пг/мл	328,55±96,8 ^{***,*}	112,58±20,93	83,35±11,42
ИС (отношение LPS индуцированной продукции IL-10 к спонтанной продукции IL-10)	1,79±4,2	5,98±1,91	2,65±0,53

Примечания: * – достоверность отличий показателей больных БА в стадии обострения от показателей больных БА в стадии ремиссии; ** – достоверность отличий показателей группы БА в стадии обострения от показателей условно здоровых (p < 0,05) (соотношение подсчитано с учетом индивидуальных показателей).

«ИФА–IL-4», «ИФА–IL-1 β », «ИФА–IL-10» (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург), согласно прилагаемой инструкции снимали полученные оптические плотности на иммуноферментном анализаторе «Antos 2020» (Италия). Расчеты количества цитокинов проводили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы. Количество выражали в пг/мл. После оценки концентрации спонтанных и индуцированных цитокинов рассчитывали ряд индексов. Первый индекс стимуляции митогенами (ИС) высчитывали как соотношение показателей индуцированного LPS или РНА тестов к спонтанным тестам.

При статистической обработке иммунологических данных использовались параметрические методы Стьюдента с определением средней арифметической (М), ошибки средней арифметической (m), переменной Стьюдента t с оценкой достоверности по критерию значимости Р. Различия между группами признавались достоверными при $P > 95\%$ ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Как видно из таблицы 1, продукция клетками IFN γ при БА как в стадии обострения, так и в стадии ремиссии практически однотипны. В группе условно здоровых лиц выработка клетками IFN γ ниже, чем в группе больных БА, но результаты не достигли статистической достоверности.

Исследования продукции IFN γ выявляют статистически достоверное снижение РНА-стимулированной выработки IFN γ у лиц с БА в стадии обострения и тенденцию к снижению в стадии ремиссии в сравнении с условно здоровыми лицами.

При изучении LPS-стимулированной выработки IFN γ определено достоверное снижение в группе БА в стадии обострения в сравнении и с группой вне обострения, и с группой условно здоровых лиц.

Как видно из таблицы 2, спонтанная продукция провоспалительного цитокина IL-1 β снижена в сравнении с условно здоровыми, но разница не достигает статистически достоверных результатов, в то время как спонтанная продукция IL-1 β у больных БА в стадии ремиссии достоверно выше, чем в стадии обострения. При определении индекса соотношения РНА-индуцированной и LPS-индуцированной продукции IL-1 β индекс значительно ниже у лиц БА в стадии обострения,

чем в стадии ремиссии. Также эти результаты ниже в сравнении с условно здоровыми лицами, но достоверных результатов не получено.

Как видно из таблицы 3, при анализе спонтанной продукции IL-4 мы отмечаем достоверное снижение у лиц БА в стадии обострения в сравнении с БА в стадии ремиссии в пять раз, а в сравнении с условно здоровыми – в два раза. Также отмечается достоверное снижение РНА-индуцированной продукции IL-4 при БА в стадии обострения в сравнении с БА в стадии ремиссии и с условно здоровыми. При анализе LPS-индуцированной продукции IL-4 достоверное снижение при БА в стадии обострения отмечается только по сравнению со стадией ремиссии, в то время как различия с условно здоровыми не наблюдается. При определении индекса соотношения LPS-индуцированной и РНА-индуцированной продукции IL-4 достоверных различий не отмечается.

Как видно из таблицы 4, спонтанная продукция IL-10 достоверно выше в стадии обострения БА в сравнении с БА в стадии ремиссии и с группой условно здоровых.

Достоверное повышение уровня IL-10 у больных БА в стадии обострения получено и при РНА-индуцированной, и при LPS-индуцированной продукции IL-10 в сравнении с двумя другими группами.

При подсчете индекса соотношения РНА-индуцированной продукции IL-10 к спонтанной выявлено статистически достоверное снижение индекса при БА в обострении в сравнении с условно здоровой группой.

Полученные данные показывают, что при бронхиальной астме синтез и активация цитокинов зависит от фазы заболевания. В стадии обострения наблюдается дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов с преобладанием противовоспалительного IL-10, действие которого направлено на процесс затухания легочного воспаления.

Список литературы

1. Детская аллергология / Под ред. А.А. Баранова, И.И. Балаболкина. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 687 с.
2. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. — М.: МИА, 2003. — 603 с.
3. Пальцев М.А., Иванов А.А., Северин С.Е. Межклеточные взаимодействия. — М.: Медицина, 2003. — 287 с.

4. Паттерсон Р., Грэммер Л.К., Гринбергер П. Аллергические болезни. Диагностика и лечение.: Пер. с англ. — М.: ГЭОТАР Медицина, 2000. — 734 с.

5. Федосеев Г.Б. Аллергология. — СПб.: Норд-медиздат, 2001. — Т. 1, 2. — 815 с.

6. Чучалин А.Г. Бронхиальная астма. — М.: Агар, 1997. — Т. 1, 2. — 805 с.

7. Ярилин А.А. Основы иммунологии. — М.: Медицина, 1999. — 607 с.

8. Chung F., Fabbri L.M. Asthma // Eur. Respir. Monogr. — 2003. — Vol. 8, N 1. — P. 458.

поступила в редакцию 03.08.2006

отправлена на доработку 14.11.2006

принята к печати 24.04.2007