

# ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

Калинина Е.П., Лобанова Е.Г.

Владивостокский филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» СО РАМН – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток

**Резюме.** Изучен цитокиновый статус в крови и конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) у больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) в фазе ремиссии. Показано, что у больных ХОБЛ содержание как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов в цельной крови и КВВ зависит от тяжести заболевания. Выявлено увеличение секреции  $\text{TNF}\alpha$ , s- $\text{TNF}\alpha$  RI,  $\text{TGF-}\beta 1$  и bFGF в КВВ у пациентов с манифестацией ХОБЛ, что характеризует прогрессирование метаболических сдвигов в легочной ткани и выраженную стадию нарушений функции внешнего дыхания. Отклонения в цитокиновом профиле у больных ХОБЛ, в формировании которого значительную роль играют нарушения системного и локального клеточного иммунитета, являются одними из ведущих патогенетических звеньев, определяющих развитие заболевания.

**Ключевые слова:** хроническая обструктивная болезнь легких, цитокиновый профиль, респираторная функция, метаболические сдвиги.

*Kalinina E.P., Lobanova E.G.*

## CYTOKINE PROFILE FEATURES IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

**Abstract.** We studied cytokine profile in blood and exhaled breath condensate (EBC) in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) being in remission state. It is shown that pro- and anti-inflammatory cytokine contents depended on the disease severity, both in whole blood and EBC of the COPD patients. We have revealed an increase in  $\text{TNF}\alpha$ , s- $\text{TNF}\alpha$  RI,  $\text{TGF-}\beta 1$  and bFGF in EBC of patients with COPD manifestations, thus being indicative for progression of metabolic changes in lung tissue, and advanced stage of respiratory functional disturbances. Cytokine profile abnormalities in COPD patients resulting, in part, from systemic and local disorders of cellular immunity, represent a major pathogenetic mechanism determining the disease progression (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 6, pp 501-506)

**Keywords:** chronic obstructive pulmonary disease, cytokine profile, respiratory function, metabolic changes.

### Адрес для переписки:

Калинина Елена Петровна, д.м.н., научный сотрудник лаборатории биомедицинских исследований, ВФФГБУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» СО РАМН – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения  
690105, г. Владивосток - 105, ул. Русская, 73г.  
Тел./факс: (423) 234-55-02.  
E-mail: isachenko1@yandex.ru

### Введение

В основе развития патофизиологических изменений при заболеваниях респираторной системы лежит формирование хронического воспаления в дыхательных путях, приводящее к деструктивным процессам в легочной паренхиме, ремоделированию легочной ткани и, как следствие, развитию необратимой бронхиальной обструкции [2, 12]. Ключевую роль в воспали-

тельном процессе играют цитокины. Они выполняют функции медиаторов иммунной системы, регулируют силу, продолжительность иммунного ответа и воспалительного процесса [3, 4, 5, 7, 11]. Для защиты от избыточных проявлений системного воспаления в организме включаются механизмы негативного контроля, опосредованные продукцией противовоспалительных цитокинов и растворимых ингибиторов провоспалительных цитокинов, индуцирующие развитие глубокой иммунодепрессии. Баланс про- и противовоспалительных цитокинов на местном и системном уровнях определяет характер течения воспалительного ответа [2, 4, 11, 14]. В этой связи особый интерес представляют знания о фундаментальных цитокиноопосредованных механизмах клеточной коммуникации, характере нарушения межсистемного взаимодействия в реализации процесса воспаления при заболеваниях бронхолегочной системы.

**Цель работы:** изучить цитокиновый статус в крови и конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) у больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) в фазе ремиссии.

## Материалы и методы

Обследовано 118 человек: 108 мужчин, находившихся на лечении в клинике Владивостокского филиала ФГБУ «ДНЦ ФПД» СО РАМН — НИИ МКВЛ с диагнозом ХОБЛ в стадии ремиссии, подтвержденном соответствующими клиническими и лабораторными методами обследования, и 10 здоровых мужчин, не курящих с нормальной функцией внешнего дыхания (контрольная группа). Бронхиальная проходимость оценивалась по показателям объема форсированного выдоха за 1-ю секунду (ОФВ1) и форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ), индексу ОФВ1/ФЖЕЛ. За бронхиальную обструкцию принимались показатели  $\text{ОФВ1} < 80\%$  и  $\text{ОФВ1/ФЖЕЛ} < 70\%$ . Среди пациентов с ХОБЛ 61 человек имели легкую степень нарушений функции внешнего дыхания (ФВД) —  $\text{ОФВ1} (79,6 \pm 2,1\%)$  и  $\text{ОФВ1/ФЖЕЛ} (77,6 \pm 1,5\%)$ , средняя длительность заболевания у них была  $9,7 \pm 2,3$  года, средний возраст  $(56,0 \pm 1,2)$  лет. Показатели  $\text{ОФВ1} (58,2 \pm 4,1\%)$  и  $\text{ОФВ1/ФЖЕЛ} (66,2 \pm 2,1\%)$ , соответствующие средней степени нарушений ФВД, имели 23 пациента среднего возраста  $(59,2 \pm 2,9)$  лет с длительностью заболевания  $12,8 \pm 3,1$  лет. Остальные 24 обследованных в возрасте  $62,8 \pm 4,1$  года имели среднюю длительность заболевания  $18,2 \pm 2,5$  лет и тяжелые

нарушения функции внешнего дыхания:  $\text{ОФВ1} 43,9 \pm 2,1\%$ ,  $\text{ОФВ1/ФЖЕЛ} 57,3 \pm 2,1\%$  от должной. Диагноз ХОБЛ выставлялся в соответствии с Международной статистической классификацией болезней, травм и причин смерти X пересмотра (МКБ-10, 1992 г.) и согласно Глобальной стратегии: диагностика, лечение и профилактика ХОБЛ (GOLD, 2009 г.) [9, 15]. Исследование было одобрено этическим комитетом, все добровольцы подписали форму добровольного информированного согласия.

Изучение цитокинового статуса включало определение туморнекротизирующего фактора (TNF $\alpha$ ), основного фактора роста фибробластов (bFGF), трансформирующего фактора роста  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), растворимого лиганд-рецептора к TNF $\alpha$  (s-TNF $\alpha$  RI) в цельной крови и конденсате выдыхаемого воздуха. Сбор КВВ проводили в утренние часы, натощак, в положении сидя, после тщательного (5-кратного) полоскания рта теплой водой. Конденсат выдыхаемого воздуха получали методом Г.И. Сидоренко [1]. Кровь отбирали из локтевой вены в стерильные силиконизированные пробирки «Venoject». Уровень цитокинов определяли иммуноферментным методом с использованием наборов фирмы «Genzyme diagnostics». Измерения проводили в плоскодонных 96-луночных планшетах объемом 400 мкл на спектрофотометре Bio-tek Power Wave (США) при длине волны 450 нм.

Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью программной системы Statistica for Windows (версия 6.0). В связи с асимметричностью распределения совокупности значений показателей в группах вычисляли медиану (Me), границы варьирования изучаемой совокупности определяли от нижнего до верхнего квартилей ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ). Достоверность различий оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни ( $p_{m-u}$ ) для независимых группировок. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$  [13].

## Результаты

В результате исследования у больных с ХОБЛ в фазе клинической ремиссии была зарегистрирована гиперцитокинемия за счет высокого содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов на системном (в цельной крови) и локальном (КВВ) уровнях (табл. 1, 2). У больных ХОБЛ I и II стадии в цельной крови выявлено повышение уровня s-TNF $\alpha$  RI в 2,2 раза. Наблюдалось незначительное повышение

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ХОБЛ В ФАЗЕ РЕМИССИИ

Показатели, пг/мл	Группа обследованных лиц				Рm-u
	Контроль, n = 10	ХОБЛ I, n = 61	ХОБЛ II, n = 23	ХОБЛ III, n = 24	
TNF $\alpha$	4,9 (4,3; 5,3)	5,4 (4,64; 6,7)	5,4 (4,9; 6,0)	7,6 (5,5; 9,4)	p <sub>к-I</sub> NS p <sub>к-II</sub> 0,003 p <sub>к-III</sub> 0,003
s-TNF $\alpha$ RI	773,9 (552,0; 1059,1)	1680,2 (1538,0; 1780,4)	1693,8 (1548,9; 1965,0)	1945,5 (1769,6; 2089,9)	p <sub>к-I</sub> 0,000007 p <sub>к-II</sub> 0,000006 p <sub>к-III</sub> 0,000006
bFGF	39,9 (38,0; 42,2)	50,2 (44,2; 54,1)	51,9 (49,1; 54,0)	47,2 (41,7; 52,0)	p <sub>к-I</sub> 0,002 p <sub>к-II</sub> 0,038 p <sub>к-III</sub> 0,038
TGF- $\beta$ 1	1518,6 (1470,8; 1531,7)	45930,4 (42765,1; 47839,0)	46031,1 (45213,0; 47240,1)	43789,0 (40295,2; 44737,3)	p <sub>к-I</sub> 0,0002 p <sub>к-II</sub> 0,0002 p <sub>к-III</sub> 0,0002

**Примечание.** Данные представлены в виде Me (P<sub>25</sub>; P<sub>75</sub>), Рm-u – достоверное отличие значений у больных ХОБЛ от контроля, NS – недостоверное отличие.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В КОНДЕНСАТЕ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА У ПАЦИЕНТОВ С ХОБЛ

Показатели, пг/мл	Группа обследованных лиц				Рm-u
	Контроль, n = 10	ХОБЛ I, n = 61	ХОБЛ II, n = 23	ХОБЛ III, n = 24	
TNF $\alpha$	3,1 (2,7; 4, 6)	8,4 (7,3; 11,3)	10,7 (8,7; 12,3)	8,7 (7,1; 9,7)	p <sub>к-I</sub> 0,00004 p <sub>к-II</sub> 0,000007 p <sub>к-III</sub> 0,00004
s-TNF $\alpha$ RI	4,6 (3,9; 5,3)	18,5 (16,9; 21,2)	19,4 (17; 20,4)	23,5 (17,3; 25,7)	p <sub>к-I</sub> 0,0005 p <sub>к-II</sub> 0,0004 p <sub>к-III</sub> 0,0002
bFGF	15,3 (13,4; 16,7)	47,4 (39; 52,3)	54,5 (48,7; 60,0)	49,1 (42,1; 50,4)	p <sub>к-I</sub> 0,004 p <sub>к-II</sub> 0,0009 p <sub>к-III</sub> 0,008
TGF- $\beta$ 1	655,4 (612,1; 728,3)	1265,4 (1195,5; 1345,1)	1289,2 (1263,8; 1345,0)	1282,7 (1193,4; 386,2)	p <sub>к-I</sub> 0,0003 p <sub>к-II</sub> 0,0003 p <sub>к-III</sub> 0,0003

**Примечание.** Данные представлены в виде Me (P<sub>25</sub>; P<sub>75</sub>), Рm-u – достоверное отличие значений у больных ХОБЛ между группами и от контроля.

содержания TNF $\alpha$  ( $p_{k1}$  NS) у больных ХОБЛ I стадии и достоверное увеличение уровня TNF $\alpha$  ( $p_{k1}$  0,003) у пациентов с ХОБЛ II стадии. При III стадии ХОБЛ в цельной крови выявлено повышение концентрации s-TNF $\alpha$  RI в 2,5 раза и уровня TNF $\alpha$  в 1,5 раза. Уровень экспрессии противовоспалительных цитокинов в цельной крови регистрировался в сверхвысокой концентрации у всех пациентов с ХОБЛ. Так, содержание TGF- $\beta$ 1 в цельной крови у больных с ХОБЛ I, II и III стадий не зависело от степени тяжести и было выше в 30 раз ( $p_{k1-III}$  0,0002) по сравнению с контрольной группой. Уровень bFGF у больных с ХОБЛ I стадии ( $p_{k1}$  0,002) достоверно был выше, чем в контрольной группе. Максимальное содержание bFGF было выявлено у больных с ХОБЛ II стадии ( $p_{k1}$  0,0038), незначительное увеличение bFGF зафиксировано у больных с ХОБЛ III стадии ( $p_{k1}$  0,0038). Все значения были достоверно выше, чем в контрольной группе.

Исследование уровня секреции TNF $\alpha$ , s-TNF $\alpha$  RI, bFGF и TGF- $\beta$ 1 в КВВ у пациентов с ХОБЛ позволили установить характерные особенности локального воспаления (табл. 2). Содержание TNF $\alpha$  в КВВ у пациентов с ХОБЛ I стадии было выше в 2,7 раза по сравнению с контрольной группой. У пациентов с ХОБЛ II стадии уровень TNF $\alpha$  в КВВ был выше в 3,3 раза, ХОБЛ III стадии — в 2,8 раз по сравнению с контрольной группой. Уровни s-TNF $\alpha$  RI в КВВ у всех пациентов с ХОБЛ значительно превышали показатели контроля, так в I и II стадий в 4 раза, в III стадии в 5 раз ( $p_{k1}$  0,0005,  $p_{k1}$  0,0004,  $p_{k1}$  0,0002). Содержание TGF- $\beta$ 1 в КВВ у пациентов ХОБЛ с I, II и III стадий было выше в 1,9 раза по сравнению с контрольной группой ( $p_{k1-III}$  0,0003). Максимальное повышение bFGF в КВВ наблюдалось у больных ХОБЛ II стадии, значения bFGF превышали показатели контроля в 3,5 раз ( $p_{k1}$  0,0009). У пациентов ХОБЛ I и III стадий уровень bFGF в КВВ был так же выше значения контрольной группы, но ниже чем у пациентов ХОБЛ II стадии ( $p_{k1}$  0,004,  $p_{k1}$  0,008).

## Обсуждение

Исследование позволило установить характерные особенности уровня секреции цитокинов TNF $\alpha$ , s-TNF $\alpha$  RI, TGF- $\beta$ 1 и bFGF в цельной крови и КВВ у пациентов с ХОБЛ, что свидетельствует о весомой роли этих факторов в патогенезе заболевания. Уже в I стадии заболевания ХОБЛ уровень TNF $\alpha$  как в крови, так и в КВВ значительно увеличен, а с утяжелением процесса

(ХОБЛ II, III стадий) его синтез постепенно возрастает. Высокая концентрация TNF $\alpha$  определяет формирование бронхообструктивного синдрома, способствует неблагоприятному течению патологического процесса и сопряжена с реакцией повреждения и воспаления [18, 20].

Одним из наиболее вероятных механизмов повышения уровня s-TNF $\alpha$  RI в крови, который продуцируется в значительных количествах интактными и стимулированными мононуклеарными клетками, является усиление его синтеза *de novo* в ответ на избыточную экспрессию цитокинов [19]. Растворимые рецепторы TNF $\alpha$  могут участвовать как в трансдукции сигнала и механизмах межклеточной кооперации, так и служить ловушкой для цитокинов. Связывание TNF $\alpha$  со специфическим рецептором способствует запуску сигнала активации генов TNF $\alpha$  через митогенактивированные белки, необходимые для развития воспалительного ответа [8]. Вместе с тем, избыточное содержание растворимой формы s-TNF $\alpha$  RI в крови и КВВ у больных ХОБЛ на фоне гиперпродукции TNF $\alpha$  свидетельствует о невозможности купировать экспрессию провоспалительных цитокинов, что может быть следствием нарушения межклеточной коммуникации. Дисбаланс синтеза цитокинов и их рецепторов может обуславливать нарушение цитокиновой регуляции и являться патофизиологической основой развития системного хронического воспаления при прогрессировании ХОБЛ [6].

Персистированию воспаления способствует привлечение к месту первичного повреждения фагоцитарноактивных клеток — нейтрофилов, макрофагов, иммунокомпетентных клеток, являющихся основными источниками медиаторов воспаления [3]. Если TNF $\alpha$  действует преимущественно на начальных этапах воспалительного процесса, то TGF- $\beta$ 1 необходим для его завершения. Считают, что одним из ведущих факторов действия TGF- $\beta$  является ингибирование высвобождения TNF $\alpha$  в систему циркуляции [3, 21]. В то же время другие исследователи [8, 16] связывают защитное действие TGF- $\beta$  на клетки организма с его стабилизирующим влиянием на функции эндотелиальных клеток и способностью блокировать адгезию нейтрофилов и лимфоцитов к эндотелию. Баланс системы провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, факторов роста, регулирующих их выработку и взаимодействие, а также привлекающих к месту воспаления новые иммунокомпетентные клетки, определяет степень перехода

обратимой обструкции дыхательных путей в необратимую и, следовательно, определяет тяжесть течения ХОБЛ [5, 10, 11].

Известно, что макрофагзависимые цитокины TGF- $\beta$ 1, bFGF угнетают продукцию IL1, IFN $\gamma$  и являются базисными факторами роста фибробластов, индукторами неоваскуляризации и формирования грануляций и реэпитализации [10, 18]. Сочетание гиперпродукции TNF $\alpha$  и TGF- $\beta$  способствует развитию отека тканей, что возможно объясняет формирование нарушений бронхиальной проходимости у больных ХОБЛ с последующим замещением нормальной легочной ткани на фиброзную, чему способствует гиперсекреция bFGF [18]. Повышенный синтез bFGF стимулирует пролиферацию фибробластов и синтез коллагена и приводит к замещению легочной ткани на фиброзную [17]. Не исключено, что повышенный синтез TGF- $\beta$ 1 и присутствие патологической индукции синтеза bFGF, способствуют с одной стороны рецидивирующему течению хронического воспаления, с другой — активному замещению нормальной легочной ткани на фиброзную, т.е. постоянному прогрессированию необратимой бронхиальной обструкции [1, 15, 16].

Таким образом, у больных ХОБЛ содержание как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов в цельной крови и КВВ зависит от тяжести заболевания. Выявленное увеличение секреции TNF $\alpha$ , s-TNF $\alpha$  RI, TGF- $\beta$ 1 и bFGF в КВВ у пациентов с манифестацией ХОБЛ характеризует прогрессирование метаболических сдвигов в легочной ткани и выраженную стадию нарушений функции внешнего дыхания. Отклонения в цитокиновом профиле у больных ХОБЛ, в формировании которого значительную роль играют нарушения системного и локального клеточного иммунитета, являются одними из ведущих патогенетических звеньев, определяющих развитие заболевания.

## Список литературы

1. Аатравматический метод исследования поверхностноактивных свойств лёгкого (сурфактанта) / Под ред. Г.И. Сидоренко, Э.И. Зборовского, Д.И. Левина. — Минск: б/и, 1984. — 11 с.
2. Зарембо И.А. Хроническая обструктивная болезнь легких: распространенность и смертность // Аллергология. — 2006. — № 1. — С. 39-43.
3. Зубова С.Г., Окулов В.Б. Молекулярные механизмы действия фактора некроза опухолей и трансформирующего фактора роста b в процессе ответа макрофага на активацию // Иммунология. — 2001. — № 5. — С. 18-22.
4. Калинина Е.П., Исаченко Е.Г., Цывкина Г.И. Цитокиновый дисбаланс у больных хроническим обструктивным бронхитом // Клинич. медицина. — 2003. — № 7. — С. 25-27.
5. Калинина Е.П., Исаченко Е.Г. Определение тяжести течения хронической обструктивной болезни легких по уровню секреции TNF- $\alpha$  и IL-8 // Аллергология. — 2005. — № 3. — С. 27-29.
6. Калинина Е.П., Иванов Е.М., Лобанова Е.Г. Нарушения межсистемных взаимодействий при хроническом воспалительном ответе // Медицинская иммунология. — 2007. — Т. 9, № 6. — С. 581-588.
7. Калинина Е.П., Лобанова Е.Г. Диагностический критерий прогрессирования хронической обструктивной болезни легких // Бюллетень СО РАМН. — 2010. — Т. 141, № 1. — С. 5-8.
8. Клетки иммунной системы / Под ред. И.С. Фрейдлина, А.А. Тотоляна. СПб.: Наука, 2001. — 309 с.
9. Клинические рекомендации и алгоритмы. Пульмонология / Под ред. А.Г. Чучалина. — М.: Волга Медиа, 2004. — 72 с.
10. Патология системы иммунитета / Под ред. Д.К. Новикова. — М.: Национальная академия микологии, 2003. — 368 с.
11. Симбирцев А.С. Цитокины — новая система регуляции защитных реакций организма // Цитокины и воспаление. — 2002. — Т. 1, № 1. — С. 9-16.
12. Славянская Т.А., Сепиашвили Р.И., Вишняков М.И., Чихладзе М.В. Иммунологический мониторинг больных хроническим бронхитом в динамике восстановительной иммунореабилитации // Int. J. Immunorehabilitation. — 1999. — N 11. — С. 70-79.
13. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / Под ред. О.Ю. Реброва. — М.: Медиа Сфера, 2003. — 312 с.
14. Тотолян А.А. Роль хемокинов и их рецепторов в иммунорегуляции // Иммунология. — 2001. — № 5. — С. 7-15.
15. Хроническая обструктивная болезнь легких. Федеральная программа (2 издание) / Под ред. А.Г. Чучалина. — М.: Медицина, 2004. — 82 с.
16. Bartram U., Speer C.P. The Role of Transforming Growth Factor b in Lung Development and Disease // J. Chest. — 2004. — Vol. 125. — P. 754-765.

17. Guicciardi M.E., Gores G.J. Life and death by death receptors // J. Faseb. — 2009. — Vol. 23, N 6. — P. 1625-1637.
18. Kirchner S., Holler E., Haffner S., Andreesen R., Eissner G. Effect of different tumor necrosis factor (TNF) reactive agents on reverse signaling of membrane integrated TNF in monocytes // J. Cytokine. — 2004. — Vol. 28. — P. 67-74.
19. MacEwan D.J. TNF ligands and receptors a matter of life and death // Br. J. Pharmacol. — 2002. — Vol. 135, N 4. — P. 855-875.
20. Olsson I., Gatanaga T., Gullberg U., Lantz M., Granger G.A. Tumor necrosis factor (TNF) binding proteins (soluble TNF receptor forms) with possible roles in inflammation and malignancy // J. Eur. Cytokine Netw. — 1993. — Vol. 4. — P. 169-180.
21. Хаубет А., Марин-Аргедас А., Ларо С. et al. Transforming Growth Factor-Beta 1 Gene Polymorphisms Are Associated With Disease Progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis // Am. J. Respiratory Critical Care Med. — 2003. — Vol. 168, N 4. — P. 431-435.

поступила в редакцию 19.06.2012

принята к печати 29.06.2012