

# ДИСБАЛАНС ЦИТОКИНОВ IL-1 $\beta$ И IL-1RA В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ЖИДКОСТИ БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОГО ЛАВАЖА У БОЛЬНЫХ ХОБЛ

Суркова Е.А., Кузубова Н.А., Сесь Т.П., Сологуб Т.С.,  
Резцова Ю.В., Яковлева Н.В., Егорова Н.В.

НИИ пульмонологии Санкт-Петербургского государственного Медицинского университета  
им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

**Резюме.** Целью исследования явилось определение уровней IL-1 $\beta$  и его ингибитора IL-1ra в сыворотке крови и жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ) больных ХОБЛ в зависимости от степени тяжести заболевания, активности воспалительного процесса, наличия бактериальной и вирусной инфекции.

**Методы.** Обследованы 20 пациентов (мужчин) 2-4 стадии ХОБЛ. Показано, что у больных ХОБЛ наблюдалось увеличение уровня IL-1 $\beta$  как в очаге воспаления, так и в сыворотке крови, которое в сыворотке зависело от степени тяжести заболевания и активности воспалительного процесса. В ЖБАЛ содержание IL-1 $\beta$  у всех обследованных больных значительно превышало уровень этого цитокина по сравнению с нормой уже на ранних стадиях формирования ХОБЛ. Уровень IL-1ra в сыворотке больных находился в пределах нормальных значений и незначительно нарастал в ЖБАЛ, что приводило к нарушению равновесия в соотношении IL-1ra /IL-1 $\beta$  как в очаге воспаления, так и на системном уровне. Наибольшая степень выявления респираторных возбудителей достоверно сочеталась со сниженным соотношением IL-1ra /IL-1 $\beta$ , что подтверждает данные об инфекционном агенте как патогенетической составляющей ХОБЛ.

**Ключевые слова:** про- и противовоспалительные цитокины, IL-1 $\beta$ , IL-1ra, ХОБЛ, респираторные патогены.

*Surkova E.A., Kuzubova N.A., Ses T.P., Sologub T.S., Reztsova Yu.V., Yakovleva N.V., Egorova N.V.*

## IMBALANCE OF IL-1 $\beta$ И IL-1RA CYTOKINES IN BLOOD SERUM AND BRONCHOALVEOLAR LAVAGE IN COPD PATIENTS

**Abstract.** The aim of present study was to determine levels of IL-1 $\beta$  and its inhibitor, IL-1ra in blood serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of 20 patients with COPD, depending on severity of their disease, activity of inflammatory process, bacterial and viral complication. Methods. Twenty male patients with COPD (stage 2 to 4) were examined. It was shown that all the patients with COPD displayed high levels of IL-1 $\beta$ , both in the area of inflammation, and in blood serum. The latter index was dependent on the severity of disease and activity of inflammatory process. In BALF, the contents of IL-1 $\beta$  in all the patients under study was significantly exceeded the normal levels of this cytokine even at the earliest stages of evolving COPD. concentration in serum was depended at stage of disease and activity of inflammatory process. There were no differences in IL-1 $\beta$  concentrations in BALF of 2 - 4 stage COPD patients. IL-1ra levels in the patients' serum were within normal levels, and tended to increase in BAL, thus causing imbalanced IL-1ra/IL-1 $\beta$  ratio both in the inflammatory area, as well as systemically. The maximal detection of respiratory pathogens did significantly correlate with decreased IL-1ra/IL-1 $\beta$  ratio, thus confirming the data on infectious agents as a pathogenetic component in COPD. (*Med. Immunol., 2006, vol.8, № 5-6, pp 667-672*)

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) - хроническое заболевание, сопровождаю-

щееся прогрессирующей обструкцией и ремоделированием ткани легкого. Цитокины являются сигнальными молекулами инициации и активизации воспалительного процесса. Доказательства роли провоспалительных цитокинов в иммунопатологии, формировании и протекании воспалительных процессов при ХОБЛ постоянно растут. IL-1 наряду с другими провоспалительными цитокинами (TNF- $\alpha$ , IL-8) играет ведущую роль при формиро-

### Адрес для переписки:

Суркова Елена Аркадьевна,  
НИИ пульмонологии СПбГМУ  
им. акад. И.П. Павлова,  
197089, г. Санкт-Петербург, ул.Рентгена, д.12.  
Тел.: 234-19-24.  
E-mail: esurkova@hotmail.ru

вании хронического воспаления при ХОБЛ [6, 10]. IL-1 $\beta$  относится к семейству цитокинов IL-1, обладает широким спектром биологической активности, активируя синтез других провоспалительных цитокинов и острофазовых белков, усиливая экспрессию молекул адгезии ICAM-1, VCAM-1, L-селектина, CXС и MIP-2 хемокинов [4, 9, 14]. Экспрессия IL-1 $\beta$  повышается у больных ХОБЛ [9, 13] и бронхиальной астмы [12].

Активность IL-1 $\beta$  контролируется IL-1 рецепторным антагонистом (IL-1ra), который связывается с рецептором к IL-1, но не обладает провоспалительной активностью и поэтому действует как ингибитор IL-1. Генерация воспаления в респираторном тракте определяется соотношением про- и противовоспалительных цитокинов.

Известно, что в большинстве случаев эволюция ХОБЛ сопровождается бактериальной и/или вирусной инфекцией. Макрофаги, представляя первую линию защиты от бактериальной инфекции, секретуют провоспалительные цитокины IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8. Следовательно, бактерии и вирусы могут выступать как триггеры воспалительного процесса. Влияние вирусной и бактериальной инфекции на баланс про- и противовоспалительных цитокинов при ХОБЛ изучено не достаточно [13]. IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  стимулируют антимикробную защиту, осуществляемую нейтрофилами. Вместе с тем, дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов является одной из причин активизации процессов фиброобразования мелких бронхов и ремоделирования легочной ткани.

Целью данного исследования явилось определение уровней IL-1 $\beta$  и его ингибитора IL-1ra в сыворотке крови и жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ) у больных ХОБЛ в зависимости от степени тяжести заболевания, активности воспалительного процесса, наличия бактериальной и вирусной инфекции.

## Материалы и методы

Обследованы 20 пациентов (мужчин) в возрасте от 47 до 73 лет (средний возраст 60,2 $\pm$ 7,8 лет), находившихся на лечении в НИИ пульмонологии. Исследование проводилось 2 раза с интервалом 3 месяца. Лишь одного больного удалось обследовать однократно. Общее число наблюдений n=38. Диагноз ХОБЛ был поставлен в соответствии с диагностическими критериями Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD, 2003). У 5 больных была установлена 2 стадия, у 11 больных – 3 стадия ХОБЛ, у 4 больных – 4 стадия ХОБЛ. Больные были обследованы как в фазу обострения заболевания, так и в период ремиссии. Фаза ремиссии ХОБЛ диагностировалась при отсутствии следующих клинических критериев: повышения температуры тела, усиления кашля и одышки, увеличения

количества мокроты, изменения числа лейкоцитов и лейкоцитарной формулы, увеличения СОЭ.

В качестве материала исследования использовали сыворотку крови и ЖБАЛ. ЖБАЛ получали центрифугированием лаважной жидкости в течение 10 мин при 800g. Надосадочную жидкость разливали на аликвоты и хранили при -20 $^{\circ}$ C. Уровень IL-1 $\beta$  и IL-1ra определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем ТОО «Цитокин» Санкт-Петербург. Показатели оптической плотности образцов измеряли на фотометре «ELM-3000» фирмы DRG (США) при длине волны 450 нм. Контрольные значения содержания цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-1ra в сыворотке крови предоставлены производителем тест-систем, в ЖБАЛ - использованы данные литературы [11, 15].

Бактериологическое исследование бронхиального содержимого (утренняя порция мокроты и ЖБАЛ) больных ХОБЛ осуществлялось методом количественного посева с использованием серии десятикратных разведений исследуемого материала. Выявление и идентификация спектра бактерий проводились с использованием стандартных высокочувствительных питательных сред и диагностических дисков производства фирмы «Bio Merieux» (Франция). Этиологическая значимость выделенных микроорганизмов оценивалась согласно установленным диагностическим критериям: концентрация патогена  $\geq 10^6$  КОЕ/мл в мокроте и  $\geq 10^{3-4}$  КОЕ/мл в ЖБАЛ [2].

Вирусные и микоплазменную инфекции выявляли на основании регистрации соответствующих антигенов и антител. Антигены определяли с помощью иммунофлюоресцентного метода в клетках браш-биопсии слизистой носоглотки, бронхов и ЖБАЛ. Специфические антитела обнаруживали в парных сыворотках больных в реакции непрямой иммунофлюоресценции, торможения геагглютинации и связывания комплемента.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью прикладных программ «Statistica» и «Biostat». Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента и непарметрическому критерию Манна-Уитни.

## Результаты и обсуждение

Содержание IL-1 $\beta$  в сыворотке крови у всех обследованных больных было достоверно выше ( $p < 0,001$ ) чем у здоровых доноров. У больных с 3-й и 4-й стадией ХОБЛ уровень IL-1 $\beta$  в сыворотке периферической крови достоверно превышал ( $p < 0,005$ ) этот показатель у пациентов со 2-й стадией ХОБЛ (рис.1). Количество IL-1 $\beta$  нарастало в период обострения заболевания по сравнению с периодом клинической ремиссии (рис.1). В ЖБАЛ со-

держание IL-1β у всех обследованных больных в 40-60 раз превышало уровень этого цитокина по сравнению с нормой. Уровень IL-1β в ЖБАЛ можно рассматривать как один из важных характеристик активности воспалительного процесса в легочной ткани. Уже у больных со второй стадией заболевания концентрация IL-1β достигала высоких значений в очаге воспаления и достоверно не изменялась ни при нарастании тяжести заболевания, ни

при усилении активности воспалительного процесса (рис.1) Высокий уровень IL-1β в ЖБАЛ уже на второй стадии заболевания свидетельствует о том, что патологические процессы в очаге воспаления происходят на более ранней стадии формирования ХОБЛ, в то время как системные изменения формируются позднее, к третьей стадии заболевания.

Уровень IL-1ra в сыворотке всех обследованных больных находился в пределах нормальных значе-

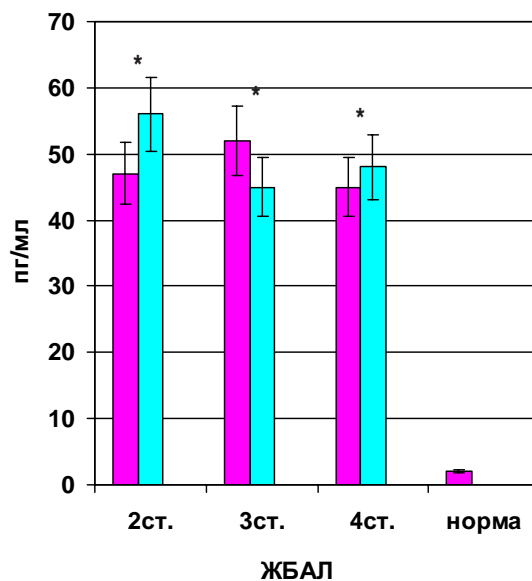
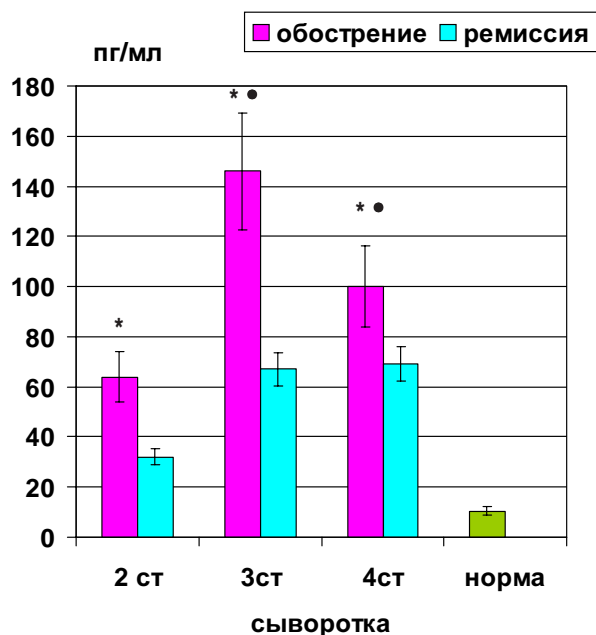


Рис.1. Уровень IL-1β в сыворотке и ЖБАЛ больных ХОБЛ. Достоверность \* - p < 0,001, • - p < 0,005

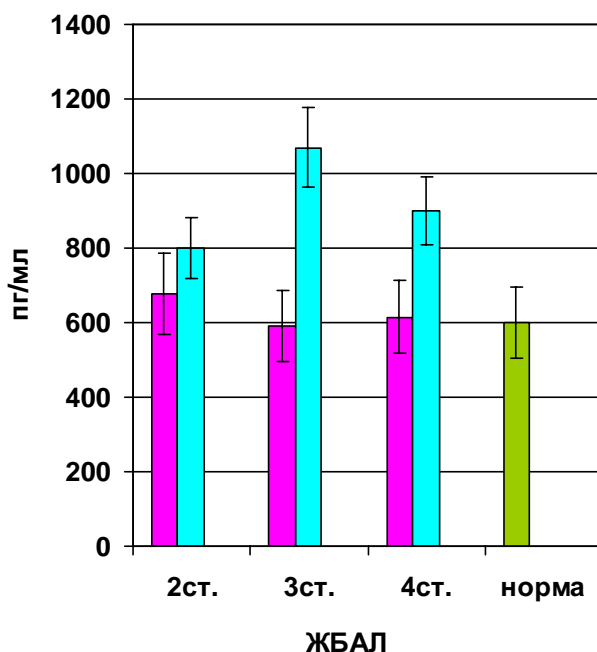
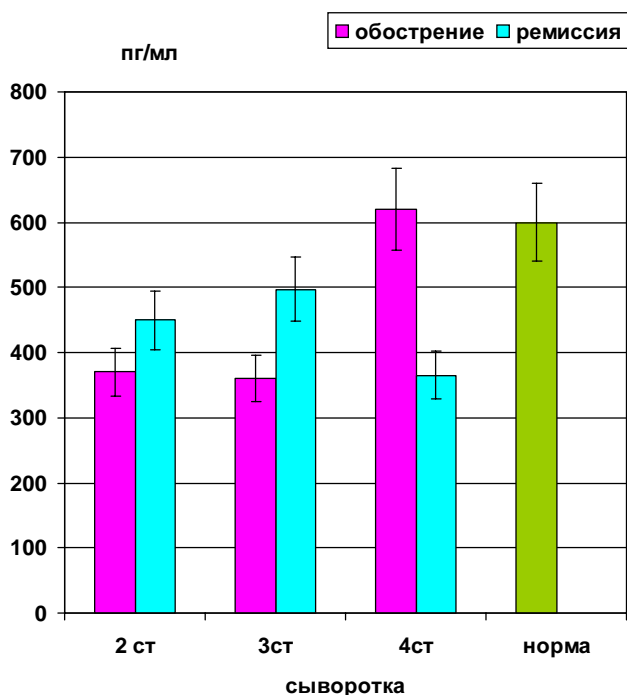


Рис.2. Уровень IL-1ra в сыворотке и ЖБАЛ больных ХОБЛ

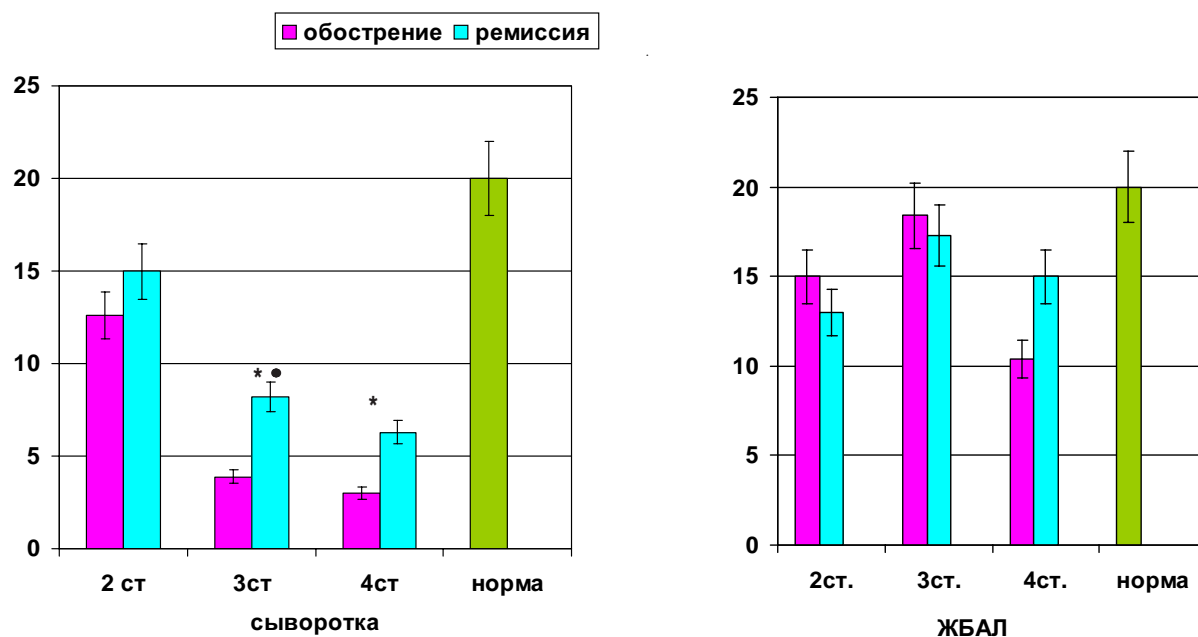


Рис.3. Соотношение IL-1α / IL-1β в сыворотке и ЖБАЛ больных ХОБЛ. Достоверность \* -  $p < 0,005$ .

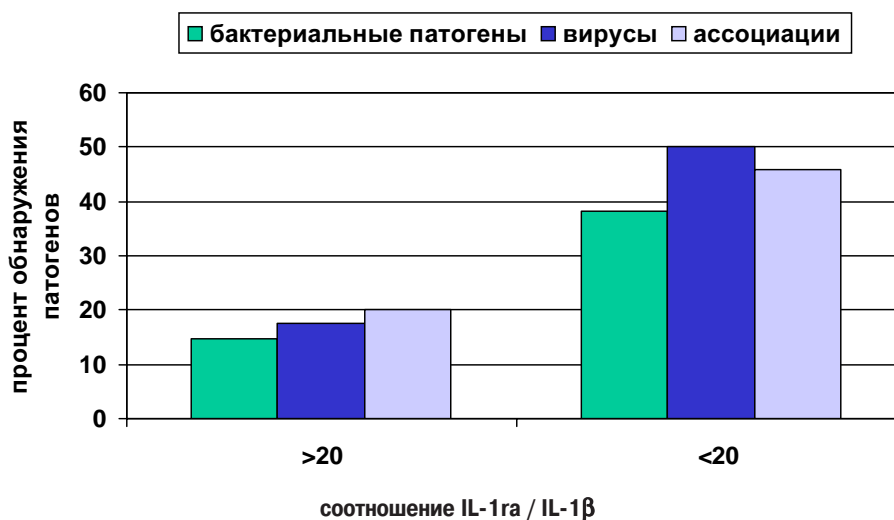


Рис.4. Частота обнаружения респираторных патогенов и соотношение IL-1α / IL-1β в ЖБАЛ больных ХОБЛ. Достоверность \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ .

ний (рис.2) Содержание IL-1α в ЖБАЛ превышало таковые значения в сыворотке, но также достоверно не отличалось у больных ХОБЛ с разной степенью тяжести заболевания. В период клинической ремиссии у больных ХОБЛ отмечалась тенденция к нарастанию концентрации IL-1α в ЖБАЛ по сравнению с периодом обострения заболевания.

Увеличение уровня IL-1β как в очаге воспаления, так и в сыворотке крови приводило к нарушению равновесия в соотношении IL-1α / IL-1β. Вместе с тем, отношение между про- и противовоспалительными цитокинами имеет большое физиологическое и клиническое значение, оказывает влияние на формирование и течение [4] патологических процессов при ХОБЛ. Отношение между IL-1β и IL-1α мож-

но рассматривать как один из эффективных маркеров активности воспаления [5]. Показано [7, 15], что для инактивации биологической активности IL-1β необходимо значительное (10-100-кратное) превышение содержания IL-1α по отношению к IL-1β. По данным Park et al. [11], в ЖБАЛ волонтеров молярное соотношение IL-1α / IL-1β составляло 80-120. Анализ соотношения IL-1α / IL-1β в сыворотке крови обследованных больных ХОБЛ показал, что при второй стадии заболевания это отношение находилось на нижней границе нормы и составляло 10-15 раз. При нарастании тяжести заболевания оно снижалось до 6-6,5 раз и достоверно ( $p < 0,005$ ) отличалось от нормальных значений (рис.3). В ЖБАЛ молярное соотношение IL-1α / IL-1β находилось на

нижней границе нормы, не превышало 13-18 раз и достоверно не отличалось при разной степени тяжести ХОБЛ (рис.3). Высокие концентрации IL-1 $\beta$  в ЖБАЛ уже при 2 стадии формирования ХОБЛ и более низкое, неадекватное, нарастание уровня IL-1ra можно рассматривать как одну из причин относительной недостаточности IL-1ra уже на ранних стадиях формирования ХОБЛ в очаге воспаления. Другой причиной дисбаланса в соотношении IL-1ra/IL-1 $\beta$ , возможно, является усиление клиренса IL-1ra [15].

Причиной возникновения дисбаланса в системе IL-1 $\beta$ /IL-1ra может быть инфекция. Для ХОБЛ характерно достаточно частое выявление вирусной и/или бактериальной инфекции как в период обострения заболевания, так и в фазу ремиссии, что связано с невозможностью полной эрадикации возбудителя при хроническом процессе. По современным представлениям, до 75-80% обострений ХОБЛ имеет инфекционную природу [1, 3]. Показано [13], что инфицирование *Chlamydia pneumoniae* альвеолярных макрофагов больных ХОБЛ приводит к снижению соотношения IL-1ra/IL-1 $\beta$  по сравнению с контрольной группой.

В нашем исследовании респираторные патогены обнаружены в 82,4% проб бронхиального содержимого больных ХОБЛ. Бактериальный спектр был представлен *S.pneumoniae* и *H.influenzae*, в единичных случаях – *S.aureus*. Ведущими вирусными агентами были РС- и аденовирусы. С меньшей частотой выявляли *M.pneumoniae*. Примерно в половине исследований (46,4%) зарегистрированы вирусно-бактериальные ассоциации.

Для анализа взаимосвязи наличия респираторной инфекции и соотношения IL-1ra/IL-1 $\beta$  были сформированы две группы: 1-я - со значением этого соотношения большего или равного 20 и 2-я – с соотношением IL-1 $\beta$ /IL-1ra <20. Это условное разделение было продиктовано широким диапазоном колебаний полученных значений соотношения IL-1 $\beta$  и его рецепторного антагониста IL-1ra в пределах от 2 до 20 или значительно выше (>40). По данным большинства авторов [7, 15], отношение IL-1 $\beta$ /IL-1ra равное 20 находится на нижней границе нормы.

При значениях соотношения IL-1ra/IL-1 $\beta$  > 20 (1-группа) (n=10) частота обнаружения вирусных и бактериальных патогенов была незначительной и составила соответственно 17,6 и 14,7%. Вирусно-бактериальные ассоциации регистрировались в 20 % исследованного материала (рис. 4).

Наибольшее число наблюдений – 24 (70,6%) составило вторую группу, с более низким соотношением IL-1ra/IL-1 $\beta$ . Обращает на себя внимание более высокий уровень выявления респираторных возбудителей у этой группы больных по сравнению с первой. Патогенные микроорганизмы были об-

наружены в 38,2% случаев (p <0,05) и в 50% - вирусные агенты (p <0,01). При этом сочетанное выявление вирусных и бактериальных патогенов установлено практически в половине наблюдений (рис.4).

Таким образом, высокое содержание IL-1 $\beta$  в крови и ЖБАЛ, явное преобладание сочетания сниженного соотношения IL-1ra/IL-1 $\beta$  с высокой частотой обнаружения вирусных и бактериальных патогенов в бронхиальном содержимом больных ХОБЛ может свидетельствовать о длительной индукции синтеза IL-1 $\beta$  инфекционным агентом, персистенция которого характерна для хронического течения инфекционного процесса при ХОБЛ.

Баланс про- и противовоспалительных цитокинов является необходимым условием ограничения патологических процессов в легочной ткани. Вместе с тем, полученные нами результаты свидетельствуют, что у всех больных ХОБЛ отмечается нарушение равновесия в соотношении провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  и его антагониста IL-1ra, что связано с увеличением содержания IL-1 $\beta$  и отсутствием компенсаторного увеличения IL-1ra, необходимого для сдерживания прогрессирования хронического воспалительного процесса при ХОБЛ. Эти нарушения не ограничиваются только очагом воспаления, но проявляются и на системном уровне.

## Выводы

1. У больных ХОБЛ установлено нарушение равновесия в соотношении провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  и его рецепторного антагониста IL-1ra, что связано с увеличением содержания IL-1 $\beta$  и отсутствием компенсаторного увеличения IL-1ra. Эти изменения в очаге воспаления происходят на более ранней стадии формирования ХОБЛ, системные изменения формируются позднее, к третьей стадии заболевания.

2. Установлена высокая частота (82,4%) инфицированности бронхиального содержимого обследованных больных ХОБЛ вирусными и бактериальными патогенами. Наибольшая степень выявления респираторных возбудителей достоверно сочеталась со сниженным соотношением рецепторного антагониста IL-1ra и провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , что подтверждает данные об инфекционном агенте как патогенетической составляющей ХОБЛ путем активации эффекторных клеток воспаления.

## Список литературы

1. Авдеев С.Н. Обострение ХОБЛ: значение инфекционного фактора и антибактериальная терапия. // РМЖ. – 2003. – Т.11. – № 22. – С.1205-1211.
2. Бактериологические исследования в кн.: Пневмология в пожилом и старческом возрасте. // Рук.

для врачей под ред. А.Н.Кокосова. – МЕД МАСС МЕДИА, 2005. – С.163-168.

3. Шмелев Е.И. Хроническая обструктивная болезнь легких. Москва, 2003. – 112 с.

4. Abdelaziz M., Devalia J., Khair O., Calderon M., Sapsford R., Davies R. The effect of conditioned medium from cultured human bronhial epithelial cells on eosinophil and neutrophil chemotaxis and adherence in vitro // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 1995. – Vol.13. – P.728-737.

5. Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJ, Fiocchi C, Pizarro TT, Cominelli F. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation // J. Immunol. – 1995. – Vol.154. – P.2434-2440.

6. Chung K.F. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease // Eur. Resp. J. – 2001. – Vol.34. – P.50-59.

7. Coulter K., Wewers M., Lowe M., Knoell D. Extracellular regulation of interleukin (IL-1 $\beta$ ) through lung epithelial cells and defective IL-1 type II receptor expression // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 1999. – Vol.20. – P.964-975.

8. Joos L., McIntyre L., Ruan J., Connet J., Anthonisen N., Weir T., Pare P., Sandford A. Association of IL-1 $\beta$  and IL-1 receptor antagonist galotypes with rate of decline in lung function in smokers // Thorax – 2001. – Vol.56. – P.863-866.

9. Lappalainen U., Whitsett J., Wert S., Tichelaar W., Bry K. Interleukin -1 $\beta$  causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in adult murine lung // Amer. J. of Resp. Cell and Mol. Biol. – 2005. – Vol.32. – P.311-318.

10. Oudijk, Nijhuis EH, Zwank MD, van de Graaf EA, Mager HJ, Coffey PJ, Lammers JW, Koenderman L. Systemic inflammation in COPD visualised by gene profiling in peripheral blood neutrophils // Thorax. – 2005. – Vol.60. – P.538-544.

11. Park W., Goodman R., Steinberg K., Ruzinski J., Radella F., Park D., Pugin J., Skerret S., Hudson L., Martin T. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome // Am. J. of Respir. And Crit. Care Med. – 2001. – Vol.164. – P.1896-1903.

12. Pujol J., Cosso B., Daures J. Interleukin -1 release by alveolar macrophages in asthmatic patients and healthy subjects // Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. – 1990. – Vol.91. – P.207-210.

13. Rupp J., Kothe H., Mueller A. Maass M., Dalhoff K. Imbalanced secretion of IL-1 and IL-1RA in Chlamidia pneumoniae-infected mononuclear cells from COPD patients // Eur. Resp. J. – 2004. – Vol.22. – P.274-279.

14. Tsang Y., Neelamegham S., Hu Y. Synergy between L-selectin signaling and chemotactic activation during neutrophil adhesion and transmigration // J. Immunol. – 1997. – Vol.159. – P.4566-4577.

15. Tsao T., Hong J., Li L., Hsieh M, Liao S., Chang K. Imbalance between tumor necrosis factor- $\alpha$  and its soluble forms, and interleukin -1 $\beta$  and interleukin-1 $\beta$  receptor antagonist in BAL fluid of cavitary pulmonary tuberculosis // Chest. – 2000. – Vol.117. – P.103-109.

16. Yang Y., Bin W., Aksoy M., Kelsen S. Regulation of interleukin-1 $\beta$  inhibitor release by human airway epithelial cells // Eur. resp. J. – 2004. – Vol. 24. – P.360-366.

*поступила в редакцию 27.06.2006*

*принята к печати 05.09.2006*