

На правах рукописи



КОСТРОВА ТАТЬЯНА ОЛЕГОВНА

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ НАРУШЕНИЙ
БАЛАНСА ЦИТОКИНОВ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИХ
КОРРЕКЦИИ У ЛИЦ С ХРОНИЧЕСКИМИ
НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ**

14.00.16 – патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Кемерово - 2007

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Кемеровская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», МУЗ «Клинический консультативно-диагностический центр» г. Кемерово.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Лисаченко Геннадий Васильевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
ФГУ «Новокузнецкий научно-
практический центр
медико-социальной экспертизы
и реабилитации инвалидов Росздрава»

Золоев Георгий Киимович

доктор медицинских наук, профессор,
«Омская государственная
медицинская академия Росздрава»

Долгих Владимир Терентьевич

Ведущая организация:

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», г. Томск

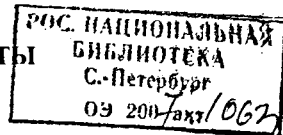
Защита состоится «6» сентября 2007 г. в 12 час. на заседании диссертационного совета Д 208.035.02 при ГОУ ВПО КемГМА Росздрава по адресу: 650029, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО КемГМА Росздрава.

Автореферат разослан «31» октября 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Разумов А.С.



Актуальность проблемы

Значительные достижения в изучении патогенеза и применении традиционных методов терапии хронических неспецифических заболеваний легких (ХНЗЛ) не являются актуально разрешающими вопросы заболеваемости и смертности при этой патологии и на сегодняшний день не существует методов лечения указанных заболеваний, позволяющих полностью элиминировать персистирующую инфекцию [Кокосов А.М., 1994; Кобылянский В.И., 2003].

Особенностью ХНЗЛ, а в частности ХОБЛ (хронической обструктивной болезни легких) является малосимптомное течение первые 10-15 лет, в связи с чем имеются определенные трудности ранней диагностики ХОБЛ [Barnes P.J., 2003; Ball P., 2005], когда еще имеется возможность частичной обратимости прогрессирующей обструкции дыхательных путей при использовании современных методов лечения отсутствуют методы постановки диагноза [Клейнер А.И., 1998; Шмелев Е.И., 2003].

В России данные медицинской статистики свидетельствуют — болезни органов дыхания занимают по распространенности 1-ое место — 15073,2 на 100000 населения, далее следуют сердечно-сосудистые заболевания — 14385,4; заболевания нервной системы — 13491,6. За последние 10-15 лет отмечается значительный рост распространенности хронических заболеваний легких среди населения — от 6 до 14% [Чучалин А.Г., 2000]. Неоспорима медико-социальная значимость заболеваний воздухоносных путей, составляющих высокий уровень заболеваемости, инвалидности, смертности населения во всем мире [Хайтов Р.М., 1995; Крылов А.А., 2005]. Хроническая бронхо-легочная недостаточность является причиной инвалидности почти 20% больных.

Хронические неспецифические заболевания легких (ХОБЛ и ХБ) — это группа заболеваний, при которых наиболее часто формируются иммунодефицитные состояния [Михайлова И.В., 2000; Хайтов Р.М., 2000]. Нет никаких сомнений в том, что в патогенезе этих заболеваний важную роль играют нарушения клеточного, гуморального, а также неспецифического иммунитета [Фрейдлин И.С., 1998].

Чаще обострения хронического бронхита (ХБ) являются, как правило,

манифестацией иммунных нарушений в организме [Чучалин А.Г., 2000; Хаитов Р.М., 2004]. Несмотря на то, что патогенез формирования хронического воспалительного процесса в легких сложен и включает в себя нарушения функционирования различных систем организма, ведущая роль принадлежит иммунопатологическим механизмам [Борисова А.М., 2005].

Длительная персистенция бактериальных и вирусных возбудителей способствует развитию системной воспалительной реакции и выбросу в циркуляцию медиаторов воспаления, главным образом, провоспалительных цитокинов. Большое значение в возникновении иммунодефицитных состояний на фоне хронического инфекционного синдрома придается нарушению баланса регуляторных и провоспалительных цитокинов, обеспечивающих межклеточную кооперацию [Петров Р.В., 1997; Осна Н., 1998].

По современным представлениям, хронизация воспалительного процесса при ХОБЛ обусловлена в значительной степени нарушениями позитивной и негативной иммунорегуляции. Данные литературы о дисбалансе цитокинов при этом заболевании многочисленны и разноречивы, а при ХОБЛ касаются лишь оценки провоспалительных цитокинов [Rosen F.S. et al., 1995].

Важную роль в патогенезе ХНЗЛ играет дизрегуляция баланса Т-хелперных цитокинов [Кетлинский С.А., 2006; Roitt I., et al., 1996; Mannino D.M., 2000]. Сведения об изменении профиля медиаторов Th1 и Th2 носят фрагментарный характер и не позволяют составить системное представление об иммунных нарушениях во взаимосвязи с клиническими проявлениями [Report D., 1963; Eckels D.D., 1999]. Также связь других цитокинов с основными иммунологическими параметрами и клиническими проявлениями заболевания изучена недостаточно или трактуется разноречиво [Ройт А., 2000]. Нет четких представлений, что различные уровни провоспалительных цитокинов определяют тяжесть и длительность воспалительного процесса [Серов В.В., 2005].

Отсутствие четких представлений о роли нарушений функций иммунной системы и дисбаланса цитокинов в формировании и прогрессировании ХНЗЛ определило цель настоящего исследования.

Цель исследования

Оценить патогенетическую значимость нарушений функций иммунной системы и дисбаланса цитокинов в развитии хронических неспецифических заболеваний легких и определить пути патогенетической коррекции.

Задачи исследования

1. Изучить состояние клеточного иммунитета (фенотипических особенностей и субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови) у больных ХНЗЛ в зависимости от степени тяжести заболевания.

2. Изучить баланс цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α , ИФН- γ) у больных с ХНЗЛ в зависимости от степени тяжести заболевания.

3. Оценить взаимосвязь нарушений функции иммунной системы и цитокинового дисбаланса со степенью тяжести клинических проявлений и вентиляционных нарушений (ОФВ1, ФЖЕЛ) у больных с ХОБЛ и ХБ.

4. Оценить возможности применения иммуностимулирующих препаратов (полиоксидоний, иммунофан) для патогенетической коррекции нарушений функций иммунной системы и цитокинового дисбаланса у больных с ХБ и ХОБЛ.

Научная новизна

Первые проведен сравнительный анализ содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у пациентов с разной степенью тяжести течения ХОБЛ и частыми обострениями бронхита на фоне иммуносупрессии и дисбаланса провоспалительных цитокинов и иммунорегуляторных медиаторов. Установлено, что у больных с ХНЗЛ, независимо от степени тяжести заболевания, формируются выраженные нарушения клеточного звена иммунитета, которые проявляются как уменьшением общего количества Т-лимфоцитов, в основном за счёт субпопуляции CD4⁺/CD8⁺, что приводит к существенной инверсии иммунорегуляторного индекса (CD4⁺/CD8⁺), так и снижением функциональной активности лимфоцитов, о чём свидетельствует снижение уровня активированных клеток, экспрессирующих маркеры ранней (CD25⁺) и поздней (HLA-DR⁺) активации, последнее усугубляется с нарастанием степени тяжести клинического течения заболеваний.

Впервые установлено, что изменения концентраций цитокинов в сыворотке крови пациентов с ХОБЛ и ХБ имеет однонаправленный характер: выявлено повышение содержания ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-4 при ХБ и ХОБЛ в зависимости от степени тяжести течения, а также изменения в уровнях ИФН- γ и ИЛ-2 в зависимости от стадии ХОБЛ и частоты обострений ХБ. Установлено, что тяжесть клинических проявлений у больных с ХОБЛ ассоциирована с более низким содержанием в сыворотке крови ИФН- γ и ИЛ-2 и высоким уровнем ИЛ-10 и имеющим тенденцию к снижению ИЛ-4 по мере утяжеления вентиляционных расстройств.

Показано, что у больных с ХОБЛ и ХБ в динамике проводимой терапии с применением иммуностимулирующих препаратов, наряду с частичной нормализацией измененных показателей клеточного иммунитета происходит снижение уровня провоспалительных цитокинов.

При ХНЗЛ устанавливается позитивная корреляция между концентрацией ФНО- α и количеством клеток, несущих на поверхности антиген CD95.

Улучшение показателей клеточного иммунитета и снижение уровня цитокинемии коррелируют с улучшением показателей вентиляционных расстройств при ХОБЛ, что сопряжено с положительной динамикой клинических проявлений.

Практическая значимость

Установлено, что при хронических неспецифических заболеваниях легких закономерно развиваются нарушения функции иммунной системы и баланса цитокинов, усугубляющиеся с увеличением продолжительности заболевания и тяжести клинического течения. Это свидетельствует о необходимости включения в комплекс лечебных мероприятий иммуностимулирующих препаратов. В работе показано, что патогенетически обоснованное применение иммуностимулирующих препаратов полиоксидония при ХБ и имунофана при ХОБЛ, оказывает нормализующее влияние на показатели клеточного иммунитета, баланс цитокинов и клиническое течение указанных заболеваний.

Совместное определение в сыворотке крови про- и противовоспалительных цитокинов целесообразно применять для оценки, прогноза, степени тяжести ХОБЛ и контроля эффективности проводимой терапии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При хронических неспецифических заболеваниях легких (ХБ и ХОБЛ) развиваются выраженные нарушения клеточного звена иммунной системы, которые проявляются как уменьшением количества Т-лимфоцитов за счет CD4⁺ клеток, так и снижением их функциональной полноценности (снижение уровня экспрессии маркеров ранней и поздней активации).

2. Для больных ХБ и ХОБЛ характерно развитие дисбаланса цитокинов, который проявляется увеличением содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10) при одновременном снижении Т-хелпер-1 зависимых (ИФН- γ и ИЛ-2) цитокинов, что ведет к индукции активационного апоптоза.

3. Установлена тесная взаимосвязь между тяжестью клинических проявлений, степенью вентиляционных нарушений с одной стороны и нарушениями клеточного звена иммунной системы и дисбалансом цитокинов с другой.

4. Базисная терапия у больных с ХНЗЛ не приводит к нормализации функции иммунной системы и баланса цитокинов. Введение в комплекс лечения иммуностимулирующих препаратов (полиоксидония, имунофана) оказывает нормализующее влияние на показатели клеточного иммунитета и баланс цитокинов, что благоприятно сказывается на клиническом течении заболеваний и увеличивает продолжительность ремиссии.

Внедрение результатов исследования

Основные результаты диссертационного исследования внедрены в практику терапевтической службы консультативного отдела МУЗ «Клинического консультативно-диагностического центра» г. Кемерово, а также в практическое применение пульмонологического отделения ГКБ № 11 г. Кемерово и учебный процесс на кафедре патологической физиологии ГОУ ВПО КемГМА Росздрава.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации доложены и обсуждены на 5-ой научно-практической конференции «Актуальные вопросы здравоохранения в г. Кемерово» (Кемерово, 2007), VIII Конгрессе РААКИ «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии» (Москва, 2007),

Российском научном обществе иммунологов (Кемерово, 2007).

Публикации По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 2 – в журналах, рекомендуемых ВАК РФ для публикаций основных результатов диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

Объем и структура диссертации Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, трех глав собственных исследований, обсуждения результатов исследования, заключения и выводов. Библиографический список содержит 200 литературных источников, из них 111 отечественных и 89 иностранных. Диссертация иллюстрирована 24 рисунками и 13 таблицами.

Личный вклад Формирование рабочей гипотезы, определение темы исследования, разработка программы и ее проведение, сбор и обработка, анализ материала проведены лично автором. Исследование показателей клеточного иммунитета и показателей цитокинового статуса проводилось с учетом научно-методических рекомендаций и было выполнено на базе иммунологической лаборатории МУЗ «Клинический консультативно-диагностический центр», зав. лабораторией – Мартыненко И.В.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика клинического материала

В выполненной работе представлены результаты динамического клинико-иммунологического исследования 132 человек (рис. 1) - 110 человек составили пациенты с ХНЗЛ, которые были разделены на 4 группы соответственно нозологической характеристики, 22 человека - группа контроля. В качестве объекта исследования в работе были использованы периферическая кровь, сыворотка крови больных хроническим бронхитом и больных ХОБЛ легкой, средней и средне-тяжелой степенью течения, периферическая кровь, сыворотка здоровых доноров.

Из обследованных пациентов в возрасте от 30 до 65 лет был 41 мужчина и 69 женщин. При обработке материала ретроспективно выделены подгруппы 0-20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70 лет. Обследование проводилось до и после проведения иммунокорректирующей терапии.

Диагноз ХОБЛ (I. 44) и ХБ (I. 41) был установлен по рекомендациям ВОЗ (1995, г.), в соответствии с МКБ-10, верифицирован на основании патогномонических клинических проявлений заболевания – жалоб (кашля, характера мокроты, одышки), физикального осмотра, спирометрии, анамнестических данных, указывающих на факторы риска ХОБЛ, семейного анамнеза хронической легочной патологии.

Критерии включения составили: пациенты с ХОБЛ в стабильной фазе (вне обострения), с длительностью заболевания 10 и более лет, частотой обострений не менее 3-4 раз в год; с показателями бронхиальной проходимости - ОФВ1 между $\geq 30\%$ и $\leq 80\%$ от должного расчетного уровня, ОФВ1/ФЖЕЛ $\leq 70\%$, с увеличением ОФВ1 менее, чем на 15% от исходного уровня спустя 15 минут после ингаляции 400 мкг сальбутамола; пациенты с хроническим бронхитом в период обострения заболевания; информированное согласие пациентов;



Рисунок 1 - Дизайн исследования

Критерии исключения составили: пациенты с бронхиальной астмой, бронхоэктатической болезнью, легочным туберкулезом, муковисцидозом,

онкопатологией, пациенты с дыхательной недостаточностью и потребностью в кислородотерапии, пациенты, получавшие кортикостероиды (ингаляционные и пероральные) в течение 2-х месяцев до проведения исследования, нежелание пациента соблюдать назначения врача. Обследование пациентов проходило в течение 2005-2006 года.

По клиническим вариантам ХОБЛ были выделены 3 подгруппы (рис. 1):

1 подгруппа - 40 человек с легким течением заболевания - ХОБЛ-1;

2 подгруппа - 25 человек со средней степенью тяжести течения - ХОБЛ-2;

3 подгруппа - 23 человека со средне-тяжелым течением ХОБЛ-3;

Всего пациентов с ХОБЛ - 88 человек.

Группе больных с ХБ (22 пациента) в составе комплексной терапии был назначен полиоксидоний (нетоксичный, водорастворимый, биodeградируемый синтетический полимер со средней молекулярной массой 100 кД, обладающий иммуномодулирующими, антиоксидантными мембрано-протекторными свойствами), внутримышечно по 6мг через день в курсовой дозе 90мг, 88 пациентам с ХОБЛ, получающих базисный ингалятор, был добавлен имунофан (регуляторный пептид, синтетический тимомеметик) по схеме - 1 мл 0,005% раствора внутримышечно через 1 день, 20 инъекций на курс.

Имуноферментный метод определения цитокинов

Для оценки уровня про- и противовоспалительных цитокинов измеряли концентрацию ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α , ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-2, ИФН- γ . Определения концентрации про- и противовоспалительных цитокинов проводилось с помощью твердофазного имуноферментного анализа на имуноферментном анализаторе «Униплан», Россия. Были использованы наборы цитокинов производства ТОО «Цитокин», г. Санкт-Петербург.

В методе использован «сэндвич» - вариант твердофазного имуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использовались два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к интерлейкину [Фримель Г., 2000]. Моноклональные антитела к интерлейкинам были иммобилизованы на внутренней поверхности лунок.

Во время инкубации с субстратной смесью происходило окрашивание

раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся меченых антител. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочной кривой определялась концентрация соответствующего цитокина.

Определение субпопуляционной структуры иммунокомпетентных клеток методом проточной цитометрии

Исследование клеточного иммунитета пациентам проводилось на проточном цитофлюориметре-Simultest™ MK-Lymphocyte BECTON DICKINSON (USA), предназначенного для подсчета процентного содержания следующих зрелых субпопуляций лейкоцитов человека в лизированной цельной крови (LWB): Т-лимфоцитов (CD3⁺), Т-хелперов (CD4⁺), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺), и натуральных киллеров - NK (CD16⁺), лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы к ИЛ-2 (CD25⁺), лимфоцитов, экспрессирующих Fas-антиген (CD95⁺) и HLA-DR⁺ (молекулы главного комплекса гистосовместимости). Моноклональные антитела («Сорбент», Москва) в этом методе предварительно метятся флюоресцином изотиоцианатом (ФИТЦ). Исследования выполнялись в соответствии с описаниями, представленными в руководстве Медуницына Н.В. «Лимфоциты и методы» (2004).

Метод лизирования цельной крови (LWB), который был использован при работе с Simultest™ IMK- Lymphocyte, не требует выделения клеток на градиенте плотности, позволяет сократить время пробоподготовки и сводит к минимуму работу с цельной кровью [Маркелова Е.В, 2005]. Для обработки результатов использовали программу CellQuest (Becton Dickinson, USA), используя параметры прямого (FSC), бокового (SSC) светорассеяния, многоцветной флюоресценции.

Исследование проводилось на базе иммунологической лаборатории.

Статистическая обработка материалов проводилась на персональном компьютере с помощью программ «Statistica 6,0» (StatSoft).

Для каждой выборки данных оценивали следующие показатели: вид распределения, среднюю арифметическую величину, среднее квадратичное отклонение и ошибку средней арифметической величины.

Оценку достоверности средних величин проводили с использованием

коэффициента (t), где t - принималась равным 1,96 ($p=0,05$), который сравнивался со стандартными критическими значениями оценочных таблиц (по Стьюденту). Для достоверного определения связи количественных распределений вычислялся коэффициент линейной корреляции (r).

Для сравнения групп использовались значения точного теста Фишера, и χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса. Для выявления различий между совокупностями использовался критерий Стьюдента (t). Определялась также ошибка процентного показателя (m). Для оценки достоверности различий между связанными выборками использовали парный непараметрический Т-критерий Вилкоксона.

Для исследования взаимосвязи между исходными признаками использовали корреляционный анализ. Степень корреляции определялась силой связи. При наличии прямой связи коэффициент корреляции может быть в пределах от 0 до +1, а при обратной - от 0 до -1. Коэффициент корреляции равный 0, свидетельствует о полном отсутствии связи.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Субпопуляционная структура клеток иммунной системы пациентов с ХОБЛ и ХБ

Анализ субпопуляционного распределения лимфоцитов крови выявил статистически значимое уменьшение количества Т-лимфоцитов у пациентов всех групп. Содержание иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов было изменено не равномерно (табл. 1).

Преимущественно было уменьшено абсолютное содержание $CD4^+$ Т-лимфоцитов, обладающих хелперно-индукторными свойствами ($CD4^+$), уровни $CD8^+$ Т-лимфоцитов с цитотоксическими свойствами у больных с ХОБЛ со средним и средне-тяжелым течением заболевания были увеличены, а при легком течении и ХБ соответствовали показателям здоровых лиц. Низкий уровень экспрессии рецепторов $CD4^+$ свидетельствовал о слабом Т-клеточном пролиферативном ответе на бактериальные антигены и супрессии регуляторного звена иммунитета.

Выявленный дисбаланс регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов ($CD4^+/CD8^+$) приводил к существенной инверсии иммунорегуляторного индекса. Самые низкие показатели ИРИ соответствовали наиболее тяжелому течению ХОБЛ и ХБ.

Таблица 1 - Показатели клеточного иммунитета пациентов с ХНЗЛ (M±m)

Показатель		Здоровые n= 22	ХБ n=22	ХОБЛ-1 n=40	ХОБЛ-2 n=25	ХОБЛ-3 n=23
Лейкоциты 10 ⁹ /л		7,5± 0,40	4,8± 0,24*	5,8 ± 0,31* **	5,2± 0,3	4,2± 0,37* **
Лимфоциты	%	30 ± 2,2	25,4 ± 0,35* **	33,7± 1,5	30,9± 1,9*	29,1 ± 0,8*
	Абс. 10 ⁹ /л	1,61± 0,05	1,2 ± 0,076*	1,7± 0,1	1,6 ± 0,08* **	1,3 ± 0,1* **
CD3 ⁺ лимфоциты	%	70,4± 1,5	55,6 ± 0,76*	56,97± 4,1* **	53,4 ± 2,9*	48,8 ± 6,8 *
	Абс. 10 ⁹ /л.	1211± 59,25	734,5 ± 52,1*	962,4 ± 82,0	880,0± 68,7* **	729,8 ± 83,27 ***
CD4 ⁺ лимфоциты	%	41,06± 1,07	30,0 ± 0,77*	33,5 ± 4,64* **	30,1 ± 4,84* **	28,3 ± 5,3* **
	Абс. 10 ⁶ /л	660,9± 26,05	369 ± 31,45*	562,1 ± 125,6	472± 49,3* **	459,2 ± 49,3*
CD8 ⁺ лимфоциты	%	24,6± 0,9	31 ± 0,72* **	25,7± 1,46	27,5 ± 3,5* **	31,8± 1,5* **
	Абс. 10 ⁶ /л	396,2± 19,87	370 ± 21,1*	370,1± 25,5* +	412,3± 40,3	478,2 ± 38,1* **
ИРИ (CD4 ⁺ /CD8 ⁺)		1,7± 0,07	0,98 ± 0,03* **	1,42 ± 1,04	1,13 ± 0,33* **	0,99 ± 0,3*
CD16 ⁺ лимфоциты	%	18,7± 1,2	32,3 ± 0,73* **	17,7± 1,6* **	25,08± 1,7* **	25,2± 1,5*
	Абс. 10 ⁶ /л	323,1± 28,9	347,2 ± 27,25* **	296 ± 177,25	340,1± 31,01	411± 41,3* **
HLA-DR ⁺ лимфоциты	%	20,2± 0,38	13,91 ± 0,26	15,6 ± 0,21*	12,8± 0,3* **	11,38± 0,2
	Абс. 10 ⁶ /л	330,3± 16,1	165,1± 10,5* **	260,6 ± 16,7*	184,9± 12,8* **	174,7± 10,9* **
CD25 ⁺ лимфоциты	%	4,4± 0,14	2,7± 0,11*	3,67± 0,12*	1,9 ± 1,06*	1,3± 0,13*
	Абс. 10 ⁶ /л	71,09± 2,8	34,0± 3,01* **	62,49± 5,02*	26,5± 3,3*	22,1± 2,4*
CD95 ⁺ лимфоциты	%	18,9± 0,48	30,99± 0,8* **	20,1± 0,9* **	27,8± 1,4*	30,5± 1,2* **
	Абс. 10 ⁶ /л	307,1± 13,6	377,7± 30,8* **	341,9± 27,5*	373± 32,2* **	482± 28,6*

Примечание: (*) – достоверность различий по сравнению со здоровыми донорами; (***) – по сравнению между группами при $p < 0,05$; (M±m) M-выборочное среднее, m-ошибка среднего

Статистически значимое увеличение относительной и абсолютной численности CD8⁺ популяции лимфоцитарных клеток у пациентов со средним и средне-тяжелым течением ХОБЛ свидетельствовало о нарушенной регуляции иммунного ответа. Несмотря на повышенное содержание CD8-позитивных лимфоцитов, эффективность цитотоксического ответа у пациентов с ХОБЛ - 2, 3 была снижена, это проявлялось рецидивирующими респираторными инфекциями

верхних дыхательных путей и заболеваниями ЛОР-органов.

У пациентов с ХОБЛ и ХБ определялись различия в уровнях активированных клеток, экспрессирующих маркер ранней активации Т-звена - CD25⁺ (лимфоциты, несущие рецепторы к ИЛ-2) и HLA-DR⁺, относящихся поздним маркерам активации Т-клеточной популяции. Индикаторы ранних и поздних фаз активации Т-клеточного звена иммунитета ассоциировались со снижением количества CD3⁺ лимфоцитов.

Выраженное статистически значимое снижение содержания активированных CD25⁺ клеток соответствовало пациентам с клиническими проявлениями ХОБЛ-3 и хроническим бронхитом, что свидетельствовало о снижении функциональной активности лимфоцитов у данного контингента больных.

Выявленные изменения снижения уровня лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR⁺ (табл. 1), также свидетельствовали о снижении функциональной активности лимфоцитов пациентов с ХОБЛ на фоне иммуносупрессии.

По результатам анализа экспрессии CD95⁺ (молекул связанных с индукцией апоптоза, фактором некроза опухоли) было выявлено достоверное повышение экспрессии проапоптотического маркера во всех четырех группах по сравнению с группой здоровых лиц и подтверждало наличие иммунодефицита у пациентов за счет обеднения в крови важнейшего пула циркулирующих лимфоцитов - зрелых Т-клеток, несущих маркеры ранней и поздней активации.

Проведенный анализ иммунного гомеостаза 88 больных ХОБЛ легкого, среднего и средне-тяжелого течения и 22 пациентов с ХБ выявил наличие иммунодепрессии, которая характеризовалась определенным набором измененных показателей иммунного статуса: абсолютной лимфопенией, сниженной экспрессией рецепторов HLA-DR⁺, повышенным апоптозом лимфоцитов. В процессе иммунного ответа у пациентов с ХОБЛ и ХБ возник дисбаланс соотношений функциональных субпопуляций Т-клеток.

Цитокиновый профиль пациентов с ХОБЛ и ХБ

Выявленное в процессе обследования содержание в сыворотке крови больных ХБ и ХОБЛ провоспалительных цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α

значительно превышало их уровни у здоровых людей (табл. 2).

Статистически значимо это касалось уровня ИЛ-1 β , который в 4,6 раза был выше контрольного значения при ХБ и в 37,2 при ХОБЛ-3, ИЛ-6, который в 38 раз был выше уровня контроля при ХБ и в 51,5 при ХОБЛ-3, ИЛ-8, который в 20,7 раза превышал соответствующие показатели группы контроля при ХБ и в 13,7 раза при ХОБЛ-3. Отчетливо выделялось увеличение концентрации ФНО- α . Этот цитокин в 240 раз был выше уровня контроля при ХБ и в 83 раза при ХОБЛ-3. Уровни цитокинов, продуцируемых лимфоцитами Th-1 типа, в частности, ИФН- γ был в 2,5 раза ниже контрольных значений при ХБ и в 7,5 раз при ХОБЛ-3. Медиатор Th-2 типа - ИЛ-4 был достоверно увеличен в 6,8 раза при ХБ и ИЛ-10 в 70 раз так же при ХБ, а в 96,4 раза при ХОБЛ-3, по сравнению с концентрациями тех же самых цитокинов у здоровых лиц.

Таблица 2 - Показатели цитокинового статуса пациентов с ХНЗЛ (M \pm m)

Цитокины пг/мл	Здоровые n=22	ХБ n=22	ХОБЛ-1 n=40	ХОБЛ-2 n=25	ХОБЛ-3 n=23
ИЛ-1 β	20,8 \pm 3,1	96,2 \pm 26,1* **	22,11 \pm 2,0* **	112 \pm 9,58* **	775,8 \pm 124,1*
ИЛ-2	29,2 \pm 2,8	16,6 \pm 2,2* **	46,6 \pm 20,5	23,44 \pm 3,2*	7,51 \pm 1,6*
ИЛ-4	23,8 \pm 0,7	162,8 \pm 28,1* **	68,51 \pm 1,6*	59,1 \pm 2,9* **	38,46 \pm 1,79**
ИЛ-6	1,3 \pm 0,56	49,7 \pm 7,9* **	1,12 \pm 0,19* **	10,77 \pm 7,8* **	66,96 \pm 31,1* **
ИЛ-8	18,7 \pm 6,8	373,4 \pm 28,2*	25,55 \pm 3,8*	37,22 \pm 9,3*	247,9 \pm 104,6*
ИЛ-10	1,87 \pm 1,1	72,5 \pm 8,4* **	1,91 \pm 0,63* **	91,7 \pm 23,6* **	179,9 \pm 14,2*
ФНО- α	0,01 \pm 0,01	24,1 \pm 0,9* **	0,51 \pm 0,17*	0,36 \pm 0,14* **	0,83 \pm 0,23* **
ИФН- γ	64,4 \pm 2,9	25,1 \pm 1,1* **	76,4 \pm 21,8* **	36,44 \pm 10,0* **	9,1 \pm 1,8* **

Примечание: (*) – достоверность различий по сравнению со здоровыми лицами;
(**) – достоверность различий по сравнению с больными до лечения, при $p < 0,05$

T-лимфоциты в процессе активации приобретают усиленную экспрессию рецепторов для ИЛ-2 и ФНО- α . В синергизме с ИЛ-2 ФНО- α усиливает продукцию T-клетками ИФН- γ , ИЛ-2 является ростовым фактором T-лимфоцитов.

Установлен дисбаланс между двумя типами клеток иммунной системы –

Th-1 и Th-2. Функция Th-1 подавлена, о чем свидетельствует снижение продукции ИФН- γ и экспрессия рецепторов ИЛ-2. Это служит доказательством угнетения функции Т-клеточного звена иммунитета у лиц с рецидивирующим течением ХНЗЛ [Черешнев В.А., 2005].

Следует отметить, что более высокий уровень концентрации цитокинов: ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 наблюдался у пациентов со средне-тяжелым течением ХОБЛ. Диагностически значимый, более 100-200 пг/мл подъем уровней цитокинов у большинства больных выявлен во 2-3 стадии ХОБЛ. Установлено динамическое снижение, в соответствии со степенью тяжести течения ХОБЛ, уровня ИЛ-4 на фоне резкого повышения уровней провоспалительных цитокинов.

Уровень ИЛ-4 на начальной стадии заболевания при ХОБЛ-1 являлся наиболее высоким, по увеличению степени тяжести клинического течения имел тенденцию к снижению, то есть коррелировал со степенью тяжести ХОБЛ, в то время как уровень ИЛ-10 в сыворотке крови больных повышался и с анамнезом ХОБЛ более 20 лет был максимальным.

Уровень ИЛ-8, продуцируемый активированными макрофагами и обеспечивающий хемотаксис нейтрофильных лейкоцитов у пациентов всех обследуемых групп имел тенденцию к повышению. Самые высокие концентрации ИЛ-8 определялись у пациентов с ХОБЛ, длительностью анамнеза 15-20 лет и пациентов с хроническим рецидивирующим бронхитом. Эти показатели превышали контрольные значения здоровых лиц соответственно в 13,2 и 19,9 раза.

У пациентов с тяжелым течением ХОБЛ, при выраженной гиперпродукции провоспалительных цитокинов не наблюдалось адекватно высокого уровня Th-1 зависимых цитокинов (ИЛ-2, ИФН- γ). То есть, у пациентов со средней и средне-тяжелой степенью течения ХОБЛ не наблюдалось адекватного противовоспалительного ответа.

Установлено, что при обострении ХБ отмечается повышение уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α и снижение уровня ИЛ-2. Угнетение продукции ИЛ-2 дополнительно свидетельствует о выраженности Т-клеточных дисфункций.

Концентрация ИФН- γ у пациентов снижалась параллельно степени тяжести

ХОБЛ. Самая минимальная концентрация соответствовала ХОБЛ-3, что в 3 раза было меньше нормативных показателей здоровой группы. Снижение уровня ИФН- γ у пациентов с различной степенью тяжести ХОБЛ происходило контррегулярно увеличению концентрации ИЛ-10.

Увеличение содержания ИЛ-4 при минимальных значениях ИЛ-2 и ИФН- γ свидетельствует о преимущественной функциональной активности Th-2 типа. Установлено, что в процессе хронизации, на фоне персистирующего инфекционного агента происходит истощение выработки ИФН- γ активированными лимфоцитами, с этим связано его значительное снижение.

Установлен высокий коэффициент прямой корреляции между количеством CD95⁺ клеток, несущих основной маркер апоптоза и концентрацией ФНО- α в сыворотках крови пациентов с ХОБЛ 2 и 3.

Установлена высокая степень корреляции между показателями ИЛ-4, ИЛ-10 и показателями спирометрии, что дает возможность использования их в качестве достоверных маркеров активности воспаления и выраженности степени тяжести течения ХОБЛ, соответствующей ограничению скорости воздушного потока.

Полученные данные свидетельствуют о том, что выявленный дисбаланс цитокинов, в формировании которого значительную роль играют нарушения клеточного иммунитета, является одним из ведущих патогенетических звеньев определяющих развитие ХОБЛ и ХБ. Это определяет необходимость иммунокорректирующего воздействия на это звено.

Динамика иммунологических показателей и цитокинового баланса у больных с ХОБЛ и ХБ в ходе терапии, включающей иммуностимулирующие препараты

Применение имунофана сопровождалось положительной динамикой иммунологических показателей по окончании лечения. То есть, привело к достоверному повышению и нормализации CD3⁺, CD4⁺ Т-лимфоцитов у пациентов всех групп. Инверсия иммунорегуляторного индекса у пациентов трех групп с ХОБЛ и ХБ достигла нормы в 96% случаев.

После проведения иммунотерапии у пациентов с ХОБЛ - 1, 2, 3 наблюдалось

повышение уровня активированных лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней (CD25⁺) и поздней (HLA-DR⁺) активации, при чем у пациентов с ХОБЛ - 1, 2 повышение достигало нормы, а у пациентов с ХОБЛ-3 увеличилось на 75%.

После проведения у пациентов ХОБЛ и ХБ иммунотерапии экспрессия Fas-антигена (CD95⁺), участвующего в индукции активационного апоптоза снизилась, что говорит о снижении апоптической смерти лимфоцитов.

Проведение иммунотерапии имунофаном восстанавливает уровень Т-хелперов до нормальных значений и эта нормализация коррелирует со стойкой клинической ремиссией, длящейся от 8 до 12 месяцев.

У больных с патологией бронхо-легочной системы и высоким уровнем продукции фактора некроза опухоли (ФНО- α) действие имунофана вызывало снижение уровня провоспалительных цитокинов. Уровень ИЛ-1 β при ХОБЛ-2 снизился в 4 раза по сравнению с исходным значением, при ХОБЛ-3 снизился в 7 раз. Это говорит о стабилизации цитокинового баланса.

Содержание ИЛ-4 при использовании имунофана при ХОБЛ-1 выросло в 2 раза по сравнению с исходным значением, при ХОБЛ-2 в 1,7 раза, при ХОБЛ-3 в 2,5 раза. Это свидетельствовало об успешной борьбе организма с инфекцией.

Уровень ИЛ-6 после проведения иммунотерапии имел тенденцию к снижению. Это являлось свидетельством, что имунофан оказывает иммунорегуляторное влияние на продукцию ФНО- α и ИЛ-6, а также отчетливо действует на продукцию других цитокинов: ИФН- γ и ИЛ-2.

Увеличение концентраций противовоспалительных цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10 у больных получавших имунофан следует считать благоприятным признаком, поскольку подобная реакция свидетельствует о ликвидации воспаления.

Применённая схема иммунокоррекции - имунофан (1 мл 0,005% раствора внутримышечно через 1 день до 20 инъекций на курс) позволила восстановить показатели клеточного иммунитета и цитокиновый баланс. Клинический эффект выражался в исчезновении симптомов вторичной иммунной недостаточности - гнойной мокроты, кашля, одышки, а также в улучшении общего самочувствия. Установлено снижение числа обострений и удлинение продолжительности ремиссий (рис. 2, 3) на 65,2% при ХОБЛ - 1, 2, при ХОБЛ-3 на 50% и на 90,1%

при ХБ. Средняя суммарная продолжительность обострений при использовании иммунофана при ХОБЛ-1 уменьшилась в 2 раза, при ХОБЛ-2 в 1,9 раза, при ХОБЛ-3 в 1,5 раза. Применение иммунофана у пациентов с ХОБЛ приводило к уменьшению вентиляционных расстройств. Показатели ОФВ1 у пациентов с ХОБЛ – 2, 3 увеличились на 18%.

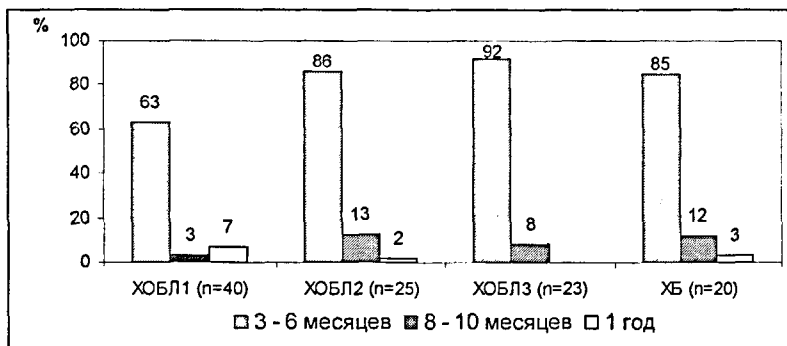


Рисунок 2 – Динамика ремиссии ХОБЛ и ХБ до иммунотерапии

Применение при ХБ иммуномодулятора полиоксидония одновременно с базисной терапией приводило к ликвидации иммунодефицитного состояния, нормализации содержания провоспалительных цитокинов, при относительно высоких уровнях противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10).

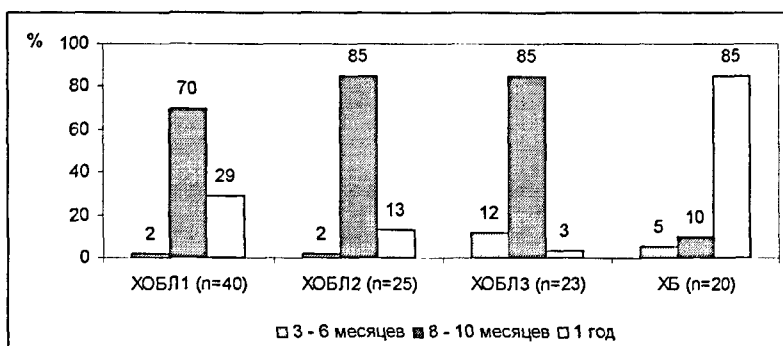


Рисунок 3 – Динамика ремиссии при ХОБЛ и ХБ после иммунотерапии

Клинически это проявлялось уменьшением кашля, одышки, количества и гнущности мокроты, температуры, нормализацией вентиляционных показателей.

Число эпизодов обострений у больных ХБ снизилось при использовании полиоксидония по сравнению с традиционной терапией на 70,1%. Средняя суммарная продолжительность обострений при использовании полиоксидония при ХБ уменьшилась приблизительно в 2 раза.

Таким образом, в процессе иммунотерапии, нормализация баланса цитокинов и восстановление показателей иммунного статуса, являющихся основными звеньями патогенеза ХОБЛ и ХБ, благоприятно сказывается на клиническом течении этих заболеваний, что еще раз подтверждает ведущую патогенетическую значимость дисбаланса цитокинов и нарушений клеточного иммунитета в развитии ХОБЛ и ХБ.

Выводы

1. При хронических неспецифических заболеваниях легких у больных независимо от степени тяжести заболевания формируются выраженные нарушения клеточного звена иммунитета, которые проявляются уменьшением общего количества Т-лимфоцитов, в основном за счёт субпопуляции $CD4^+$ клеток. Это приводит к существенной инверсии иммунорегуляторного индекса ($CD4^+/CD8^+$). Параллельно происходит снижение функциональной активности лимфоцитов, о чём свидетельствует снижение уровня активированных клеток, экспрессирующих маркеры ранней ($CD25^+$) и поздней ($HLA-DR^+$) активации. Указанные изменения усугубляются с нарастанием степени тяжести клинического течения заболеваний.

2. У больных ХБ и ХОБЛ, протекающих на фоне вторичной иммунной недостаточности, развивается дисбаланс цитокинов, который проявляется увеличением содержания провоспалительных (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α) и противовоспалительных (ИЛ-4, ИЛ-10) цитокинов, при одновременном снижении Т-хелпер-1 зависимых (ИНФ- γ , ИЛ-2) медиаторов. Возникший дисбаланс цитокинов ведет к индукции активационного апоптоза, о чем свидетельствует увеличение количества лимфоцитов, экспрессирующих рецептор СД 95^+ , указанные изменения прогрессируют с увеличением степени тяжести ХОБЛ.

3. Тяжесть клинических проявлений и степени вентиляционных нарушений

(ОФВ1, ФЖЕЛ) у больных ХБ и ХОБЛ находятся в тесной взаимосвязи с нарушениями клеточного иммунитета (снижением количественного содержания Т-лимфоцитов и их функциональной полноценности) и развивающимся дисбалансом цитокинов. О чём свидетельствует прямая корреляционная зависимость с одной стороны - между уровнем повышения провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α) и обратная зависимость между уровнем снижения иммунорегуляторных медиаторов (ИЛ-2, ИФН- γ). А с другой - показателями функции внешнего дыхания - (ОФВ1, ФЖЕЛ), определяющими варианты клинического течения ХОБЛ. Чем выраженнее тяжесть течения ХОБЛ, тем больше увеличение продукции провоспалительных цитокинов и снижение уровня Т-хелпер-1 маркерных медиаторов. Концентрация ИЛ-4 снижается с увеличением длительности и тяжести течения ХОБЛ.

4. Проведение базисной терапии у больных ХБ и ХОБЛ не приводит к нормализации показателей клеточного иммунитета и баланса цитокинов. Это свидетельствует о продолжающемся воспалительном процессе. Введение в комплекс лечения курсового применения иммуностимулирующих препаратов - полиоксидония при хроническом бронхите и имунофана при ХОБЛ, оказывает нормализующее влияние на показатели клеточного иммунитета и баланс цитокинов (про- и противовоспалительных, иммунорегуляторных), что благоприятно сказывается на клиническом течении указанных заболеваний и увеличивает продолжительность ремиссии.

5. Дисбаланс цитокинов, в формировании которого существенную роль играют нарушения клеточного иммунитета, является одним из ведущих звеньев патогенеза, определяющих развитие воспалительного процесса при хронических неспецифических заболеваниях легких (ХБ, ХОБЛ), а его ликвидация благоприятно сказывается на клиническом течении указанных заболеваний.

Практические рекомендации

1. Для повышения объективности оценки прогноза, степени тяжести течения ХОБЛ и ХБ, эффективности проводимой терапии целесообразно определять содержание про- и противовоспалительных цитокинов и показатели

клеточного иммунитета.

2. В комплекс базисной терапии ХНЗЛ необходимо включение иммунокорректирующих препаратов – имунофана и полиоксидония. Рекомендуемая частота проведения курсов иммунотерапии имунофаном при ХОБЛ и полиоксидония при ХБ - один раз в 8-10 месяцев. Показанием к назначению повторного курса иммунотерапии является снижение относительного содержания Т-хелперов, определяемое в процессе проведения иммунологического мониторинга - один раз в год.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Кострова, Т.О. Роль про- и противовоспалительных цитокинов в развитии патологии бронхолегочной системы / Т.О. Кострова // Современные технологии и организация работы многопрофильной больницы: тез. докл. межрегиональной конф. – Кемерово, 2005. – С. 34-37.
2. Кострова, Т.О. Клинико-иммунологические критерии и современная иммунотерапия вторичных иммунных состояний / Т.О. Кострова // Актуальные проблемы деятельности диагностических центров в современных условиях. - Екатеринбург, 2005. – С. 45-49.
3. Цитокины. Интерлейкины, монокины и лимфокины. Значение в регуляции иммунного ответа и межсистемных взаимодействий: метод. рекомендации для врачей всех специальностей, ординаторов и интернов / А.А. Коростелев, Г.В. Лисаченко, Т.О. Кострова и др. – Кемерово, 2005. – 70 с.
4. Коростелев, А.А. Иммунопрофилактика хронических рецидивирующих инфекций / А.А. Коростелев, И.А. Гаврилкина, Т.О. Кострова // Современные медицинские технологии: ежегодный сборник науч. тр. - Кемерово, 2007. – Вып.2. – С. 77-78.
5. Кострова, Т.О. Значение цитокинов в регуляции иммунного ответа, клиническое применение препаратов цитокинов / Т.О. Кострова, Г.В. Лисаченко, Я.И. Колпинская // Современные медицинские технологии: ежегодный сборник науч. тр. - Кемерово, 2007. - Вып.1. – С. 65-69.
6. Кострова, Т.О. Цитокиновый профиль пациентов с хроническим бронхитом /

- Т.О. Кострова // Рос. аллергологический журн. – 2007. - № 3; Прилож. №1. – С. 57-58.
7. Кострова, Т.О. Экологическое влияние окружающей среды на состояние иммунной системы жителей региона / Т.О. Кострова // Вестник Кузбасского научного центра. – Кемерово, 2007. – Вып.5, Т. 2. – С. 92-63.
 8. Пономарева, М.В. Новые возможности обеспечения контрацепции ВИЧ-инфицированных женщин / М.В. Пономарева, Т.О. Кострова, О.Т. Шраер // Трудный пациент – 2006, №9; Т. 4. – С. 44-45.
 9. Патогенетическая значимость нарушения баланса цитокинов у лиц с хроническими неспецифическими заболеваниями легких / Т.О. Кострова, Г.В. Лисаченко, И.В. Мартыненко и др. // Сибирский медицинский журн. – 2007. – Т. 22, № 4. – С. 30-35.

Список сокращений

ВИН	—	вторичная иммунная недостаточность
ГЗТ	—	гиперчувствительность замедленного типа
ИЛ	—	интерлейкин
ИФН - γ	—	интерферон-гамма
ОФВ1	—	объем форсированного выдоха за 1-ю секунду
ФНО- α	—	фактор некроза опухоли-альфа
ХБ	—	хронический бронхит
ХНЗЛ	—	хронические неспецифические заболевания легких
ХОБЛ	—	хроническая обструктивная болезнь легких
CD	—	кластер дифференцировки
HLA-DR	—	антиген – молекула главного комплекса гистосовместимости класса 2
Th	—	T-хелперы

2007A
26565

№ 2 6 5 6 5

Отпечатано редакционно-издательским отделом
ГОУ ВПО КемГМА Росздрава

650029, Кемерово,
ул. Ворошилова, 22а.
Тел./факс. +7(3842)734856;
epd@kemsma.ru



Гарнитура таймс. Тираж 100 экз.
Формат 21 x 30½. У.п.л. – 1,5
Подписано в печать 8.10.2007

Отпечатано с готового оригинал-макета
Лицензия ЛР №21244 от 22.09.97