

КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ И СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В ЖИДКОСТИ БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОГО ЛАВАЖА У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ С РАЗЛИЧНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ БРОНХИАЛЬНОГО ДЕРЕВА К МЕТАХОЛИНУ

В.И. Блажко, В.В. Ефимов, Л.С. Воейкова, И.В. Талалай

Институт терапии АМН Украины им. Л.Т. Малой, Харьков

Ключевые слова: бронхиальная астма, диагностика, цитокины.

Механизмы, лежащие в основе возникновения гиперчувствительности и гиперреактивности бронхов у больных бронхиальной астмой (БА), до настоящего времени остаются недостаточно изученными. Важное значение в возникновении и поддержании повышенной чувствительности бронхов имеют различные клеточно-медиаторные механизмы [1, 2, 5]. В последние годы основную роль в поддержании воспаления и формировании повышенной реактивности и чувствительности бронхов отводят различным клеткам-эффекторам и цитокинам [3,4]. Патохимические и патофизиологические изменения, происходящие у больных БА, приводят к активации системы цитокинов, группы водорастворимых полипептидных медиаторов, способствующих различным клеточным ответам и принимающих участие в иммунных и воспалительных процессах [6, 7].

Активация системы цитокинов, главным образом фактора некроза опухоли (ФНО- α), сопровождается патохимическими и патофизиологическими изменениями на уровне различных органов и тканей. Провоспалительные цитокины, участвующие в активации и прогрессировании БА, продуцируются нейтрофилами, активированными лимфоцитами, эндотелиальными и гладкомышечными клетками и представляют собой белковые молекулы. ФНО- α обладает широким спектром эффектов благодаря ФНО-опосредованной индукции генов факторов роста, цитокинов, факторов торможения, рецепторов торможения, рецепторов, факторов и белков острой фазы воспаления, пирогенов [7, 8].

Влияние провоспалительных цитокинов на функцию бронхиального дерева реализуется путем модулирования выработки эндогенного NO. Результаты исследований показали, что такие цитокины воспаления, как интерлейкин-1 (ИЛ-1), ФНО, интерфероны стимулируют синтез NO путем индук-

ции iNOS. Цитокининдуцированная форма NO оказывает прямое токсическое воздействие на различные отделы бронхолегочной системы, активирует процессы интерстициального роста и фиброза.

Цель исследования — изучение концентрации ИЛ-5, ИЛ-8 и ФНО- α , клеточного состава жидкости бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) у больных БА с различной чувствительностью бронхов к метахолину.

У 45 больных с различной тяжестью течения БА (15 — с легким течением, 15 — со средней тяжестью течения, 15 — с тяжелым течением) в возрасте от 18 до 60 лет был проведен метахолиновый тест и определена чувствительность бронхов к метахолину. Чувствительность бронхиального дерева определялась по минимальной дозе ингалируемого метахолина, приводящего к уменьшению ОФВ₁ более чем на 20% от исходного. До проведения метахолинового теста пациент не пользовался бронхорасширяющими препаратами в течение 8 ч, выполнял не менее 3 попыток форсированного выдоха с регистрацией наивысшего показателя ОФВ₁. Два лучших показателя ОФВ₁ не должны были отличаться более чем на 5% или 200 мл.

С помощью аппарата "Spira Electro" (Финляндия) со временем распыления 0,5 с и объемом воздуха 100 мл больной ингалировал 4,0 мл изотонического раствора натрия хлорида (всего 8 ингаляций) с последующим проведением форсированного выдоха с оценкой наивысшего показателя ОФВ₁. Если ОФВ₁ после вдыхания изотонического раствора был меньше 90% от исходного ОФВ₁, метахолиновый тест прекращали. Затем рассчитывали 80% от наибольшего показателя ОФВ₁ после ингаляции изотонического раствора. Если ОФВ₁ уменьшался после вдыхания определенной дозы метахолина до этого значения или меньше, пробу прекращали и считали положительной.

До начала исследования всем больным была проведена бронхоскопия с оценкой эндоскопической картины и последующей инстилляцией 50 мл теплого изотонического раствора натрия хлорида и его аспирацией. Полученную жидкость центрифугировали, из осадка изготавливали мазки, окрашивали гематоксилином и эозином и по Романовскому, определяли клеточный состав жидкости. Спирографию проводили с помощью аппарата "Спирометр-3000" (Япония) с оценкой основных показателей: ЖЕЛ, ФЖЕЛ, ОФВ₁, ПОС выд., МОС 25%, МОС 50%, МОС 75%.

В жидкости БАЛ определяли концентрацию ИЛ-5, ИЛ-8, ФНО- α иммуноферментным методом с использованием наборов производства фирмы "Протеиновый контур" (Россия), руководствуясь инструкцией изготовителя.

В табл. 1 представлен клеточный состав жидкости БАЛ у больных с различной чувствительностью к метахолину. Наибольшее количество альвеолярных макрофагов выявлено у пациентов с низкой чувствительностью к метахолину ((75,8 \pm 3,8)%) и достоверно превысило их содержание у больных с умеренной ((62,4 \pm 3,5)%, $P < 0,05$) и высокой чувствительностью ((57,2 \pm 3,1)%, $P < 0,05$).

У больных с высокой чувствительностью к метахолину содержание эозинофилов оказалось самым высоким и достоверно превышало таковой показатель у больных с умеренной чувствительностью ((10,8 \pm 1,2) и (6,5 \pm 1,1)%) соответственно, $P < 0,05$) и у больных с низкой чувствительностью к метахолину ((10,8 \pm 1,2) и (3,2 \pm 0,7)%) соответственно, $P < 0,001$).

Таким образом, у больных БА отмечается обратная зависимость между их чувствительностью к метахолину и количеством эозинофилов в жидкости БАЛ.

Количество нейтрофилов у больных с высокой чувствительностью к метахолину достоверно превысило аналогичный показатель у пациентов с умеренной и низкой чувствительностью —

(12,9 \pm 1,6) и (7,4 \pm 1,8)%, $P < 0,05$, а также (12,9 \pm 1,6) и (5,9 \pm 1,7)%) соответственно, $P < 0,05$. Различия между группами больных БА с умеренной и низкой чувствительностью к метахолину статистически недостоверны.

Процентное содержание эпителиальных клеток в жидкости БАЛ у пациентов с высокой и умеренной чувствительностью к метахолину достоверно не отличалось ((13,4 \pm 1,6) и (12,2 \pm 1,7)%) соответственно, $P > 0,05$). По сравнению с количеством эпителиальных клеток у больных с низкой чувствительностью различия достоверны (см. табл. 1).

Количество лимфоцитов у обследованных статистически не отличалось и составило при низкой чувствительности к метахолину — (6,2 \pm 1,4)%, при умеренной чувствительности — (5,9 \pm 1,2)%, при высокой чувствительности — (7,2 \pm 1,3)%.

Таким образом, наиболее значимым оказалось высокое содержание эозинофилов и нейтрофилов в жидкости БАЛ у больных БА с высокой чувствительностью к метахолину.

У пациентов с высокой чувствительностью к метахолину концентрация ИЛ-5 и ИЛ-8 достоверно превышала показатели, отмеченные у больных с умеренной и низкой чувствительностью. Так, содержание ИЛ-8 при высокой чувствительности к метахолину также достоверно превышало показатели при умеренной и низкой чувствительности (табл. 2).

Достоверных различий в содержании ФНО- α в жидкости БАЛ у больных разных групп нами не отмечено.

Таким образом, проведенное исследование показало статистические различия в клеточном составе жидкости БАЛ и концентрации цитокинов у больных с различной чувствительностью к метахолину. При высокой чувствительности количество эозинофилов и нейтрофилов, концентрация ИЛ-5 и ИЛ-8 достоверно превышали аналогичные показатели при умеренной и низкой чувствительности, что может свидетельствовать об участии этих кле-

Таблица 1. Клеточный состав жидкости бронхоальвеолярного лаважа у больных бронхиальной астмой с различной чувствительностью к метахолину, %

Показатель	Низкая чувствительность (n=11)	Умеренная чувствительность (n=16)	Высокая чувствительность (n=18)
Альвеолярные макрофаги	75,8 \pm 3,8	62,4 \pm 3,5	57,2 \pm 3,1**
Эозинофилы	3,2 \pm 0,7	6,5 \pm 1,1*	10,8 \pm 1,2**
Эпителиальные клетки	5,2 \pm 1,4	12,2 \pm 1,7*	13,4 \pm 1,6
Нейтрофилы	5,9 \pm 1,7	7,4 \pm 1,8	12,9 \pm 1,6**
Лимфоциты	6,2 \pm 1,4	5,9 \pm 1,2	7,2 \pm 1,3

Примечание: * — различия достоверны ($P < 0,01$) в сравнении с группой низкой чувствительности;

** — различия достоверны ($P < 0,01$) в сравнении с группой умеренной чувствительности.

Таблиця 2. Концентрація цитокинів в жидкості бронхоальвеолярного лаважа у больних бронхіальною астмою з різною чутливістю до метакхоліну, пг/мл

Показатель	Низка чутливість (n=11)	Умеренная чутливість (n=16)	Высокая чутливість (n=18)
Интерлейкин-5	29,4±7,4	57,4±6,8*	84,2±9,4**
Интерлейкин-8	26,4±4,7	58,7±7,3*	96,7±8,3**
ФНО-α	78,3±8,4	84,3±9,7	89,6±10,2

Примечание: * различия достоверны ($p < 0,01$) в сравнении с группой низкой чувствительности;

** различия достоверны ($P < 0,01$) в сравнении с группой умеренной чувствительности.

Таблиця 3. Коефіцієнт кореляції між клітинним складом рідини БАЛ і дозою метакхоліну

	Альвеолярні макрофаги	Еозинофіли	Епітеліальні клітини	Нейтрофіли	Лімфоцити
Доза метакхоліну	0,47	-0,71	0,32	-0,63	0,12

Таблиця 4. Коефіцієнт кореляції між концентрацією цитокинів в жидкості БАЛ і дозою метакхоліну

	Интерлейкин-5	Интерлейкин-8	ФНО-α
Доза метакхоліну	-0,62	-0,57	0,09

ток в формуванні гіперчутливості і гіперреактивності бронхів у больних БА. Низка чутливості і реактивності бронхів у больних з важким теченням БА може пояснюватися зменшенням вираженості запальних змін у слизистій бронхіального дерева і преевалюванням необоротної обструкції.

Учитывая полученные данные, мы изучили тесноту функциональной связи между изученными показателями.

В табл. 3 представлены коэффициенты корреляции между чувствительностью бронхов к метакхоліну, определяемой по минимальной дозе этого препарата, приводящего к уменьшению ОФВ₁ более чем на 20%, и клеточным составом жидкости БАЛ.

Как видно из представленных данных, наиболее тесная обратная функциональная связь прослеживается между дозой метакхоліну и процентным со-

держанием эозинофилов ($r = -0,71$), дозой метакхоліну и количеством нейтрофилов ($r = -0,63$).

В табл. 4 представлены коэффициенты корреляции между чувствительностью бронхов к метакхоліну и концентрацией интерлейкинов в жидкости БАЛ.

Наиболее тесная обратная функциональная связь выявлена между чувствительностью бронхов к метакхоліну и концентрацией ИЛ-5 ($r = -0,62$), менее тесная — между дозой метакхоліну и концентрацией ИЛ-8 ($r = -0,57$).

Полученные данные подтверждают важную роль ИЛ-5 и ИЛ-8 в формировании бронхіальної гіперреактивності, зв'язаної з еозинофільною і нейтрофільною інфільтрацією дихальних шляхів. Таким образом, определение содержания ИЛ-5 (в меньшей степени ИЛ-8) в жидкости БАЛ может служить информативным методом диагностики реактивности бронхов.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Жданов В.Ф. Решенные и нерешенные проблемы БА: с чем мы вступаем в XXI век // Международный медицинский журн.— 2000.— Т 6, № 4.— С. 15—23.
2. Arm J.P., Lee T.H. The pathology of bronchial asthma // Adv. Immunol.— 1992.— Vol. 51.— P. 323—382.
3. Bousquet J., Jeffery P.K., Busse W.W., Johnson M. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling // Am. J. Respir. Crit. Care Med.— 2000.— Vol. 161.— P. 1720—1745.
4. Chung K.F., Barnes P.J. Cytokines in asthma // Thorax.— 1999.— Vol. 54.— P. 825—837.
5. Global strategy for asthma management and prevention // US National Institute of Health. NIH Publication № 02-3659, Feb. 2002.
6. Lampinen M., Rak S., Venge P. The role of interleukin-5, interleukin-8 and RANTES in the chemotactic attraction of eosinophils to the allergic lung // Clin. Exp. Allergy.— 1999.— Vol. 29.— P. 314—322.
7. Leckie M.J., Ten Brinke A., Khan J. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway responsiveness and the late asthmatic response // Lancet.— 2000.— Vol. 356.— P. 2144—2148.
8. Vignola A.M., Chanez P., Chiappara G., Siena L. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages and T-lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis // J. Allergy Clin. Immunol.— 1999.— Vol. 103.— P. 563—573.

**КЛІТИННИЙ СКЛАД ТА ВМІСТ ЦИТОКІНІВ У РІДИНІ БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОГО ЛАВАЖУ
У ХВОРИХ НА БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ
З РІЗНОЮ ЧУТЛИВІСТЮ БРОНХІАЛЬНОГО ДЕРЕВА ДО МЕТАХОЛІНУ**

В.І. Блажко, В.В. Єфімов, Л.С. Воейкова, І.В. Талалай

Вивчено клітинний склад рідини бронхоальвеолярного лаважу (БАЛ), концентрацію в ній інтерлейкінів (ІЛ-5, ІЛ-8) та фактора некрозу пухлин (ФНП- α) у 45 хворих на бронхіальну астму з різною чутливістю бронхів до метакхоліну. У хворих з високою чутливістю кількість еозинофілів та нейтрофілів, концентрація ІЛ-5, ІЛ-8 достовірно перевищувала аналогічні показники при помірній та низькій чутливості, що свідчить про участь цих клітин у формуванні гіперчутливості та гіперреактивності бронхів у хворих на бронхіальну астму. Виявлення вмісту ІЛ-5 у рідині БАЛ може слугувати інформативним методом діагностики реактивності бронхів.

**CELLULAR COMPOSITION AND CYTOKINES LEVEL
IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGE LIQUID IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA
AND DIFFERENT SENSITIVITY OF BRONCHIAL TREE TO METHACHOLINE**

V.I. Blazhko, V.V. Efimov, L.S. Voeykova, I.V. Talalay

Cellular composition of bronchoalveolar lavage liquid (BALL) was studied as well as BALL levels of interleukines (IL-5, IL-8) and tumor necrosis factor (TNF- α) in 45 patients with bronchial asthma (BA) with different sensitivity of bronchial tree to methacholine. In patients with high sensitivity to methacholine the number of eosinophiles and neutrophils, IL-5 and IL-8 concentrations were significantly higher than similar indices in patients with moderate and low sensitivity, that indicates that these cells participate in the formation of bronchial hypersensitivity and hyperreactivity in patients with BA. The assessment of IL-5 level in BALL could be the useful informative method for bronchial reactivity diagnostics.