

УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ И ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С КОЛИЧЕСТВОМ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК У КУРЯЩИХ И НЕКУРЯЩИХ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ

Карпучок А.В., Кадушкин А.Г.

*Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра биологической химии, г. Минск*

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, цитокины, некурящие люди, II-8.

Резюме: в статье приведены данные о количественном изменении цитокинов в периферической крови у курящих и некурящих пациентов с хронической обструктивной болезнью легких.

Resume: data presented on plasma cytokine levels in non-smoking and smoking patients with chronic obstructive pulmonary disease.

Актуальность. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) характеризуется прогрессирующим ограничением скорости воздушного потока, которое

вызывается поражением мелких бронхов (обструктивный бронхиолит) и деструкцией паренхимы (эмфизема). Предполагают, что к 2020 году ХОБЛ войдет в первую тройку причин заболеваемости и смертности в мире [2].

Особенностью ХОБЛ является ее неуклонно-прогрессирующий характер течения, когда ухудшения функции легких можно ожидать даже на фоне проводимой терапии [1]. Поэтому продолжают изучаться механизмы развития этого заболевания.

При ХОБЛ характерно накопление нейтрофилов, макрофагов и Т-лимфоцитов в легочной паренхиме и стенке дыхательных путей. Этим клеткам принадлежит ключевое значение в формировании деструктивных изменений легочной ткани. Межклеточные взаимодействия между ними и их функциональное состояние регулируют цитокины. Они участвуют в формировании воспалительных реакций, в том числе, привлечении иммунокомпетентных клеток из кровотока в очаг воспаления. Внимание исследователей сконцентрировано на провоспалительных цитокинах, таких как интерлейкины 1β (IL- 1β), IL-6, IL-8, фактор некроза опухоли α (TNF- α), интерферон γ (IFN- γ), и на противовоспалительных протеинах (IL-10). Однако данные об изменении их концентрации в крови при ХОБЛ противоречивы. Нередко больные анализировались без учета фактора курения. Между тем, сообщают о молекулярно-клеточных особенностях развития этого заболевания у курящих и некурящих пациентов. В частности, показана повышенная концентрация альфа-1-антитрипсина и С-реактивного белка у курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с некурящими больными [1,3].

Цель: определение закономерностей количественного изменения цитокинов (IL- 1β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ) в плазме крови курящих и некурящих пациентов с ХОБЛ, а также оценка их взаимосвязи с количеством иммунокомпетентных клеток.

Задачи: 1. Определить закономерности количественного изменения цитокинов (IL- 1β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ) в плазме крови курящих и некурящих пациентов с ХОБЛ; 2. Оценить взаимосвязь уровня цитокинов с количеством иммунокомпетентных клеток.

Материал и методы. В исследовании приняли участие 21 некурящий пациент с ХОБЛ, 20 курящих пациентов с ХОБЛ, 20 некурящих здоровых людей и 21 здоровый курильщик. К некурящим мы относили людей, которые выкурили в течение жизни менее 100 сигарет.

Оценка функции внешнего дыхания осуществлялась по стандартной методике на аппарате SpiroUSB с использованием программного обеспечения Spida5 (MicroMedical Limited, Англия) в соответствии с рекомендациями Американского торакального и Европейского респираторного сообществ. Для оценки качества жизни пациентов с ХОБЛ использовали шкалу САТ (COPD Assessment Test, оценочный тест по ХОБЛ).

Венозную кровь у обследуемых пациентов забирали рано утром натощак в объеме 10 мл в пробирку, содержащую этилендиаминтетрацет калия в качестве антикоагулянта. Для получения плазмы образцы центрифугировали по истечении одного часа после забора крови (3000 об/мин, 15 мин). До анализа образцы хранили при температуре -75°C . В плазме крови определяли концентрацию IL- 1β , IL-6, IL-8,

IL-10, TNF- α , IFN- γ (Вектор-Бест, Российская Федерация, R&D Systems, США) методом иммуноферментного анализа на иммуноферментном анализаторе «StatFax 3200» (Awareness Technology, США). К 100 мкл крови добавляли по 10 мкл моноклональных антител. Панель антител включала CD3-APC/CCR5-PE, CD3-APC/CD8-PE, CD4-FITC (R&D Systems, BeckmanCoulter, США). Анализ популяций лимфоцитов проводили на проточном цитометре CytomicsFC500 с использованием программного обеспечения СХР (BeckmanCoulter, США).

Статистическую обработку проводили с помощью пакета прикладных программ StatisticaforWindows 8.0. Для всех имеющихся выборок данных проверяли гипотезу нормальности распределения по критерию Колмогорова-Смирнова. Поскольку они не подчинялись нормальному распределению, анализ проводили методами непараметрической статистики. Рассчитывались медиана и интерквартильный размах (25 % - 75 %). Для сравнения данных между группами использовался U-критерий Манна-Уитни. Оценка взаимосвязи между показателями проводилась вычислением коэффициента корреляции по Спирмену (*SpearmanR*). Достоверными считались различия при уровне значимости p менее 0,05.

Результаты и их обсуждение. Результаты измерения концентрации цитокинов в периферической крови демонстрируют повышение уровня IL-8 и TNF- α в общей группе пациентов с ХОБЛ (курящих и некурящих) по сравнению с соответствующей группой здоровых людей. Концентрация IL-8 была выше у курильщиков с ХОБЛ, чем у курильщиков без ХОБЛ (таблица 1). Аналогичное изменение этого показателя имело место у некурящих пациентов.

Уровень TNF- α в периферической крови был значительно выше у некурящих больных ХОБЛ, чем у здоровых некурящих людей. У курящих пациентов подобные изменения этого цитокина отсутствовали. Примечательно, что у здоровых людей значения этого показателя также существенно различались в зависимости от фактора курения. У курильщиков они были выше в 2 раза.

У некурящих пациентов с ХОБЛ статистически более высокой была концентрация IFN- γ в плазме крови по сравнению с некурящими здоровыми людьми. В то же время различия уровня IL-1 β и IL-6 отсутствовали как в группе курящих, так и в группе некурящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с соответствующими группами здоровых людей. А IL-10 в плазме крови больных и здоровых людей практически не определялся. У мужчин и женщин, страдающих ХОБЛ, концентрация цитокинов была одинаковой, независимо от того, курили они или нет.

Таблица 1 - Концентрация цитокинов в плазме крови курящих и некурящих пациентов с ХОБЛ

Цитокин	Некурящие		Курящие	
	ХОБЛ	Контроль	ХОБЛ	Контроль
IL-1 β , пг/мл	1,0 (0,7-2,0)	0,6 (0,0-1,85)	0,55 (0,0-1,8)	1,2 (0,7-2,3)
IL-6, пг/мл	7,0 (3,0-8,4)	3,6 (2,6-7,6)	5,7 (3,0-10,5)	6,0 (3,6-11,4)
IL-8, пг/мл	5,2*	2,7	6,2#	4,0

	(3,2-6,4)	(2,4-4,5)	(3,2-10,45)	(3,2-5,0)
IL-10, пг/мл	0,0 (0,0-0,4)	0,0 (0,0-0,4)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-4,8)
TNF- α , нг/мл	3,0* \dagger (2,2-4,0)	1,2# (0,0-2,1)	1,7 (0,7-3,1)	2,4 (1,2-3,2)
IFN- γ , пг/мл	2,0* (1,2-3,0)	1,2 (0,15-1,8)	1,2 (0,15-2,2)	1,2 (0,3-2,2)

Примечание: данные представлены как медиана (25% - 75%); * - $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми некурящими людьми; # - $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми курящими людьми; \dagger - $p < 0,05$ по сравнению с курящими пациентами с ХОБЛ.

У пациентов с ХОБЛ имеются умеренные корреляционные связи между концентрацией IL-6, IFN- γ в плазме крови и относительным количеством популяций Т-лимфоцитов (таблица 2).

Таблица 2 - Корреляционная связь между концентрацией цитокинов и относительным количеством иммунокомпетентных клеток в крови пациентов с ХОБЛ

Корреляция	Пациенты с ХОБЛ	Курящие пациенты	Некурящие пациенты
IL-6 и CCR5+ лимфоциты	- 0,360*	- 0,582*	0,105
IL-6 и CD3+CCR5+ лимфоциты	-0,469*	- 0,746*	- 0,099
IFN- γ и CD4+ лимфоциты	0,186	- 0,238	0,488*
IFN- γ и отношение CD4+/CD8+ клеток	0,040	- 0,367	0,438*

Примечание: Данные представлены в виде коэффициента Спирмена R; * - $p < 0,05$.

Полученные результаты демонстрируют значительно более высокую концентрацию TNF- α и IFN- γ в крови общей группы пациентов с ХОБЛ (без учета фактора курения) с выраженным и резко выраженным снижением КЖ, чем у пациентов с незначительным и умеренным снижением КЖ. Вместе с тем, при сравнении концентрации этих цитокинов в плазме крови отдельно, у курящих и некурящих пациентов с различной степенью снижения КЖ, статистически значимых отличий не было.

При проведении корреляционного анализа обнаруживается прямая корреляционная связь между результатом САТ и концентрацией TNF- α и IFN- γ в периферической крови больных ХОБЛ (независимо от статуса курения) ($R = 0,402$, $p < 0,05$ и $R = 0,410$, $p < 0,05$, соответственно).

Аналогичные результаты были получены при определении корреляционной связи между частотой обострений у пациентов с ХОБЛ за предшествующие забору крови 12 месяцев и концентрацией этих цитокинов ($R = 0,433$, $p < 0,05$ для TNF- α ; $R = 0,537$, $p < 0,05$ для IFN- γ).

При изучении корреляционных связей между показателями легочной функции и концентрацией цитокинов в плазме крови была обнаружена лишь обратная корреляционная связь средней силы между уровнем IL-6 и отношением ОФВ₁/ФЖЕЛ у курильщиков с ХОБЛ ($R = - 0,470$, $p < 0,05$).

У курящих пациентов с ХОБЛ обнаруживается умеренная обратная корреляционная связь результата САТ с ОФВ₁ (% от должного) ($R = -0,500$, $p < 0,05$). Кроме того, в общей группе пациентов имела место сильная корреляционная связь результата САТ с частотой обострений ХОБЛ ($R = 0,677$, $p < 0,05$).

Выводы: полученные данные свидетельствуют о патогенетическом значении IL-8, TNF- α и IFN- γ при ХОБЛ.

Литература

1. Кадушкин, А. Г. Роль хемокинов в патогенезе хронической обструктивной болезни легких / А. Г. Кадушкин, А. Д. Таганович // Медицинский журнал. – 2012. - № 2. – С. 139-144.
2. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2011.
3. Salvi, S. S. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers / S. S. Salvi, P. J. Barnes // Lancet. – 2009. – № 374. – P. 733-743.