

КЛЕТочный состав индуцированной мокроты у больных бронхиальной астмой как прогностический критерий эффективности лечения заболевания

Г. Г. Прозорова, В. Т. Бурлачук, Л. В. Трибунцева,
И. А. Олышева, М. В. Никонова*

ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н. Н. Бурденко»
Минздрава России, г. Воронеж, Россия

*ЛПУП Санаторий «Родник», г. Пятигорск, Россия

С целью оценки изменений маркеров хронического воспаления в мокроте больных бронхиальной астмой при применении различных методов терапии для возможности персонализации индивидуальных программ диспансерного ведения больных бронхиальной астмой были обследованы 312 больных, получавших на фоне стандартной базисной терапии в соответствии с тяжестью заболевания радонотерапию в виде сухо-воздушных ванн различной концентрации (20 и 40 нКи/л). Выявлено, что клеточный состав индуцированной мокроты может служить критерием эффективности лечения, а включение радонотерапии в программу реабилитации больных бронхиальной астмой в значительной степени улучшает течение и прогноз заболевания.

Ключевые слова: клеточный состав индуцированной мокроты, бронхиальная астма, радонотерапия.

© The authors, 2016

Voronezh N. N. Burdenko State Medical University, Voronezh, Russia

Sanatorium «Rodnik», Pyatigorsk, Russia

The Cellular Composition of Induced Sputum in Patients with Asthma as a Prognostic Criterion for Efficiency of the Disease's Treatment

In order to assess the changes of chronic inflammation markers in the sputum of patients with asthma in the application of various methods of therapy to allow creation of individual personalized programs of dispensary observation 312 patients with asthma were examined, who received standard basic therapy and dry air bath with radon different concentrations (20 and 40 nCi/l). It was revealed that the cellular composition of induced sputum may be used as a criterion of efficiency of treatment, and the inclusion of radontherapy in the program of rehabilitation of patients with asthma substantially improved current (control) and prognosis of the disease.

Keywords: the cellular composition of induced sputum, bronchial asthma, radon.

Введение

Бронхиальная астма (БА) представляет собой глобальную медико-социальную проблему в виду сохраняющегося роста заболеваемости, значимой фармакологической составляющей современных методов лечения, значительного негативного влияния на качество жизни пациентов при недостаточном контроле заболевания. В клинической практике контроль БА означает отсутствие или снижение выраженности симптомов БА, уменьшение влияния проявлений болезни на повседневную активность, минимизация применения короткодействующих симптоматических препаратов, низкую частоту обострений [3]. Вместе с тем оценивается и гиперреактивность бронхов, которая реализуется через увеличение количества клеток аллергического воспаления. При этом во многих исследованиях показано, что несмотря на очевидные успехи медикамен-

тозной терапии контроль астмы достигим не у всех больных, существующие лекарственные препараты обладают серьезными побочными эффектами, остается недостаточной приверженность лечению ингаляционными глюкокортикостероидами (ИГКС) в реальной клинической практике [2, 10]. В настоящее время выявлены новые данные о механизмах развития обструктивных болезней легких, реализуемые на уровне медиаторов и клеток [5, 7]. В связи с этим необходимость персонализированного лечения должна быть определена в соответствии с выявленными фенотипами заболевания. В последней редакции Глобальной стратегии лечения и профилактики бронхиальной астмы (Global Initiative for Asthma, GINA) приводятся фенотипы БА, которые довольно легко могут быть идентифицированы (аллергическая и неаллергическая БА, БА с поздним дебютом, БА с фиксированной обструкцией дыхательных путей, БА у больных с ожирением). При этом

наиболее тяжелое неконтролируемое течение астмы наблюдается у пациентов с эозинофильным фенотипом заболевания. Симптомы астмы появляются или усиливаются уже после того, как усиливается воспаление дыхательных путей и нарастает бронхиальная гиперреактивность, поэтому крайне важно выявить и оценить доклинические маркеры БА, к которым относится клеточная инфильтрация бронхиальной слизистой эозинофилами. Эозинофильная субэпителиальная инфильтрация является достаточно характерной чертой БА [5]. В биоптатах бронхов больных хронической БА обнаруживают повышенное количество активированных эозинофилов, наиболее часто локализованных под базальной мембраной [5].

Активация эозинофилов с последующей продукцией и высвобождением медиаторов может быть вызвана как иммунными, так и неиммунными механизмами. После Ig E-ассоциированной активации тучные клетки потенцируют воспалительный процесс, синтезируя провоспалительные факторы – интерлейкин-1, (IL-1), туморнекротический фактор- α (TNF- α) и эозинофил-активирующие факторы – интерлейкин-4 (IL-4) и интерлейкин-5 – (IL-5), индуцирующие хемокины, служащие аттрактантами для эозинофилов. Центральную роль в регуляции развития эозинофилов играют интерлейкины-3 и -5 (IL-3, IL-5). IL-5 обеспечивает дифференцировку эозинофилов и выход их из костного мозга в периферический кровоток.

Эозинофильный катионный белок (ЕСР) вызывает образование пор в мембране клеток-мишеней, что способствует проникновению в клетку других токсичных молекул. Главный основной белок непосредственно увеличивает реактивность гладкой мускулатуры дыхательных путей, вызывая дисфункцию М2-холинорецепторов. Он же потенцирует дегрануляцию тучных клеток и базофилов. Эозинофильная пероксидаза и катионный белок связывают гепарин и нейтрализуют его противосвертывающую активность. Пероксидаза в присутствии перекиси водорода и галогенов генерирует активные формы кислорода. С высокотоксичными субстанциями гранул эозинофилов и свободными радикалами связывают слушивание эпителия при БА.

Эозинофилы участвуют в процессе ремоделирования стенки бронхов и эластического остова легких, высвобождая эластазу, факторы роста, металлопротеиназы. Вещества, секретируемые эозинофилами, стимулируют пролиферативную активность фибробластов, содействуя тем самым процессу фиброобразования легочной паренхимы [6].

Учитывая высокое разнообразие клеточных и биохимических повреждений при БА, для реализации основных целей лечения, которые направлены на достижение хорошего контроля симптомов астмы, поддержания нормального уровня активности и минимизация риска будущих обострений БА, фиксированной обструкции дыхательных путей и нежелательных побочных эффектов терапии необходимо персонализировать индивидуальные программы диспансерного ведения больных БА с использованием радионотерапии на основании оценки клеточных маркеров воспаления. Целью нашего исследования является оценка изменений маркеров хронического воспаления в мокроте больных БА при применении различных методов терапии для персонализации индивидуальных программ диспансерного ведения больных БА.

Материал и методы исследования

Нами были обследованы 312 больных БА (137 мужчин и 175 женщин) в возрасте 18–66 лет. Кроме стандартного обследования в соответствии с рекомендациями GINA-2014 у больных исследовали клеточный и цитокиновый состав индуцированной мокроты (ИМ). Степень контроля БА оценивалась по критериям GINA (количеству приступов дневных и ночных, частоте использования средств экстренной помощи, уровню физической активности, степени функциональных нарушений) с помощью стандартизированного опросника АСТ-теста и по уровню оксида азота в выдыхаемом воздухе (NOex) [4, 7]. Для оценки клеточных маркеров БА использовали ИМ. Сбор ИМ и подсчет клеточного состава выполняли по общепринятой методике [1, 9]. В жидкой фазе образцов, полученных в ходе индукции, изучали содержание воспалительных медиаторов. Супернатант замораживали при температуре -80°C и хранили для дальнейшего определения в нем цитокинов. Изучали интерлейкины: IL-2,

Таблица 1.

Оценка контроля БА в различных группах

Исследуемые показатели	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа
АСТ-тест M±m, баллы	24.1±0.3	19.01±0.1*,**	20.2±0.4*	17.1±0.7*,**
NOex, ppb Me (25–75%)	35(18–71)	39 (19–66)*,**	67 (24–120) *	73 (35–124)*,**

Примечание: * – $p < 0.05$ при сравнении с 1-й группой; ** – $p < 0.05$ при сравнении между группами контролируемой и неконтролируемой астмы.

Таблица 2.

Клеточный состав, содержание эозинофильного катионного белка и цитокинов в индуцированной мокроте больных БА

Исследуемые показатели	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа
Нейтрофилы, пг/мл	15.7±1.6	18.3± 2.36*	22.2±0.96*	38.3±4.36*,**
Макрофаги, пг/мл	78.7±1.4	67.01±1.36*	68.4±1.3*	67.12±3.1*,**
Лимфоциты, пг/мл	4.1±0.3	3.7±1.06	2.9±0.16*	1.7±2.06*,**
Эозинофилы, пг/мл	1.9±0.16	3.01±0.56*	6.2±0.23*	15.01±2.34*,**
ЕСР, пг/мл	187.3± 0.31	192±67.89	131.4±0.42*	232±47.88*,**
IL-2, пг/мл	16.7± 0.15	47.9±8.56*	23.2±0.23*	56.0±14.6*,**
IL-4, пг/мл	13.7±0.5	36.6±7.63*	18.3±0.41*	41.06±5.78*,**
IL-8, пг/мл	141.2±0.61	148.7±23.4	321.9±0.73*	748.7±33.6*,**
TNF-α, пг/мл	11.3±0.2	13.9±6.09*	38.3±0.64*	65.0±16.7*,**
ИНФ-γ, пг/мл	118.4±0.23	213.8±69.09	194.3±0.25*	313.8±29.09*,**

Примечание: * – $p < 0.05$ при сравнении с 1-й группой; ** – $p < 0.05$ при сравнении между группами контролируемой и неконтролируемой тяжелой астмы.

IL-4, IL-8, TNF-α с применением иммуноферментных тест систем фирмы «ProCon» (Санкт-Петербург, Россия). Полученные результаты выражались в абсолютных цифрах (количество клеток $\times 10^6$ /мл) и в относительных показателях (%) [2]. Определение содержания ЕСР в индуцированной мокроте и сыворотке крови производили иммунохемилюминесцентным методом на приборе «UniCAP 100 (Phadia, Швеция) с применением реагентов для определения ЕСР в сыворотке крови и секретах, согласно инструкции производителя (UniCap ЕСР, Pharmacia CAP System ЕСР FEIA, Швеция). Все пациенты получали медикаментозную терапию согласно рекомендациям GINA-2014 (ингаляционные глюкокортикостероиды, антилейкотриеновые препараты, длительно действующие бронхолитики).

Результаты и их обсуждение

После обследования все пациенты были разделены на группы по степени тяжести астмы (легкая и тяжелая персистирующая) и уровню контроля заболевания (контролируемая и неконтролируемая): 1-я группа – пациенты с легкой пер-

систирующей контролируемой БА (73 человека, из них 28 мужчин и 45 женщин); 2-я группа – 67 пациентов с легкой персистирующей неконтролируемой БА (29 мужчин и 38 женщин); 3-я группа – 83 больных с тяжелой контролируемой БА (42 мужчин, 41 женщин); 4-я группа – 89 больных с тяжелой неконтролируемой БА (38 мужчин, 51 женщина).

Оценка контроля БА в различных группах приведена в табл. 1.

Таким образом, группы пациентов с тяжелой и легкой БА достоверно различались как по степени выраженности текущих симптомов, по данным АСТ-теста, так и по степени воспаления на основании показателей оксида азота в выдыхаемом воздухе (NOex). Клеточный состав и содержание ЕСР и цитокинов в индуцированной мокроте больных БА представлены в табл. 2.

Клеточный состав ИМ у больных БА зависит от периода и степени тяжести заболевания. Наибольшие изменения в цитограмме претерпевает содержание эозинофилов. Уровень эозинофилии значительно колеблется в разных исследованиях от 3.8 до 39.4% [6]. В нашем исследовании показано, что количество эозино-

Таблица 3.

Иммунологические показатели и клеточный состав индуцированной мокроты у больных БА различной степени тяжести в зависимости от режима радонотерапии

Изучаемые показатели	Форма заболевания и режим радонотерапии					
	Легкая БА, до лечения	Легкая БА, СХВ-20	Легкая БА, СХВ-40	Тяжелая БА, до лечения	Тяжелая БА, СХВ-20	Тяжелая БА, СХВ-40
TNF- α , пг/мл	13.9 \pm 6.09	12.9 \pm 7.09	14.6 \pm 6.19	65.0 \pm 16.7	52.2 \pm 4.7*	50.1 \pm 1.2**
ИнФ- γ , нг/мл	213.8 \pm 69.09	123.9 \pm 46.09*	113.9 \pm 69.56**	313.8 \pm 29.09	253.9 \pm 56.09*	213.9 \pm 49.56**
IL-2, нг/мл	47.9 \pm 8.56	46.9 \pm 12.9	38.87 \pm 12.9**	56.0 \pm 14.6	53.12 \pm 9.34*	52.04 \pm 8.56
IL-4, нг/мл	36.6 \pm 7.63	31.7 \pm 2.18*	29.9 \pm 12.9**	41.06 \pm 5.78	39.6 \pm 8.67	36.7 \pm 4.13**
IL-8, нг/мл	148.7 \pm 23.4	158.7 \pm 13.85*	139.7 \pm 33.05	748.7 \pm 33.6	633.7 \pm 13.45*	559.3 \pm 8.3**
ЕСР, нг/мл	192 \pm 67.89	132.3 \pm 23.88*	92.6 \pm 27.89**	232 \pm 47.88	202 \pm 97.39*	102.1 \pm 57.59**
Нейтрофилы, %	18.3 \pm 2.36	14.35 \pm 3.26*	18.54 \pm 4.4	38.3 \pm 4.36	44.35 \pm 4.26*	51.54 \pm 5.4**
Макрофаги, %	67.01 \pm 1.36	77.12 \pm 2.01*	67.14 \pm 1.09	67.12 \pm 3.1	57.01 \pm 2.36*	47.14 \pm 2.09**
Лимфоциты, %	3.7 \pm 1.06	4.1 \pm 1.1	3.7 \pm 0.97	1.7 \pm 2.06	3.1 \pm 0.1*	4.7 \pm 1.97**
Эозинофилы, %	3.01 \pm 0.56	2.7 \pm 1.35	1.42 \pm 1.34**	15.01 \pm 1.34	12.01 \pm 0.35*	9.01 \pm 1.56**

Примечание: * – $p < 0.05$ при сравнении групп до лечения и после курса суховоздушных ванн с концентрацией радона 20 нКи/л (СХВ-20); ** – $p < 0.05$ при сравнении групп до лечения и после курса суховоздушных ванн с концентрацией радона 40 нКи/л (СХВ-40).

филов зависит от тяжести астмы и достигает максимальных значений при тяжелом течении болезни.

На 2-ом этапе исследования всем пациентам с неконтролируемой астмой был назначен курс радонотерапии в виде 10 суховоздушных радоновых ванн различной концентрации 20 и 40 нКи/л (СХВ-20, СХВ-40), после этого вновь повторили комплексное обследование текущих симптомов БА, степени воспаления в бронхах и анализировали показатели клеточного состава индуцированной мокроты (табл. 3). Данный метод лечения показал свою эффективность в лечении obstructивных заболеваний легких [4, 8].

При сравнительном изучении концентрации цитокинов, ЕСР и клеток в ИМ у больных БА наиболее высокие значения выявлены для концентрации эозинофилов (при легком неконтролируемом течении – 3.01 \pm 0.56, при тяжелом – 15.01 \pm 1.34%), ЕСР – 232 \pm 47.88 нг/мл при тяжелом неконтролируемом течении и уровня провоспалительных цитокинов (IL-2 – 56.0 \pm 14.6 нг/мл; IL-4 – 41.06 \pm 5.78 пг/мл; IL-8 – 748.7 \pm 33.6 пг/мл, TNF- α – 65.0 \pm 16.7 пг/мл; ИНФ- γ – 313.8 \pm 29.09 пг/мл), что оказывает прямое цитотоксическое воздействие, поддерживает альтерацию в тканях бронхов и выраженность эозинофильной воспалительной реакции. Альвеолярные макрофаги помимо своей фагоцитарной активности способны секретировать широкий спектр протеиназ, разрушающих различные матриксные молекулы, в том числе эла-

стин базальных мембран. В нашем исследовании у больных БА легкого течения во всех клинических группах концентрация макрофагов в ИМ была в пределах нормы.

Нейтрофилы рассматриваются в настоящее время не только как клетки, выполняющие функцию фагоцитоза и продуцирующие цитотоксические вещества при воспалении [6]. Они секретируют несколько протеиназ, таких, как нейтрофильная протеиназа, эластаза, нейтрофильный катепсин G и др., которые вызывают деструкцию паренхимы и развитие эмфиземы. В нашем исследовании у больных БА концентрация нейтрофилов в ИМ до лечения оказалась сниженной (18.01 \pm 1.04%) в группе больных с легким течением астмы и нормальной – при тяжелом течении. Отклонения клеточного состава ИМ от нормы могут характеризовать как тип воспаления в бронхах, так и различные его причины. О характере воспаления судят по содержанию в мокроте эффекторных воспалительных клеток – эозинофилов, нейтрофилов, лимфоцитов. Их количество зависит от активности процесса, так как именно эффекторные клетки первыми реагируют на патогенный агент и запускают воспалительный процесс.

Нами проведена оценка влияния различных режимов радонотерапии на эффективность лечения БА (табл. 4).

Показано позитивное влияние радонотерапии на контроль заболевания пациентов как легкой, так и тяжелой астмой, при этом у больных с легким течени-

Таблица 4.

Оценка влияния различных режимов радонотерапии на эффективность лечения бронхиальной астмы

Изучаемые показатели	Больные БА легкого течения			Больные БА тяжелого течения		
	До лечения	СХВ-20	СХВ-40	До лечения	СХВ-20	СХВ-40
АСТ-тест, М±m, баллы	19.01±0.1	24.03±0.03*	24.9±0.01*	17.1±0.7	21.8±0.7*,*	24.07±0.3*,**
NOex, ppb, Me (25–75%)	39 (19–66)	24.9±0.12*	21.4±0.3*,**	73 (35–124)*	41.2±0.6*	26.2±0.4*,**

Примечание: * – $p < 0.05$ при сравнении до и после лечения; ** – $p < 0.05$ при сравнении различных режимов радонотерапии.

ем астмы уровень текущих симптомов по данным АСТ-теста достоверно возрастал под влиянием СХВ-20 и СХВ-40 без различия между группами, тогда как у пациентов с тяжелым течением заболевания достоверно возрастала эффективность контроля симптомов под влиянием СХВ-40, хотя СХВ-20 также приводили к возрастанию контроля. Уровень азота в выдыхаемом воздухе у больных с легкой астмой под влиянием обеих концентраций суховоздушных ванн приблизился к норме, при этом более выраженное влияние оказывали СХВ-40, у больных с тяжелым течением эффективными оказались СХВ-40, хотя и СХВ-20 оказали существенное влияние на уровень NOex.

Нами были изучены корреляционные связи между уровнем эозинофилов в ИМ и показателями контроля БА. Выявлено, что существует выраженная прямая зависимость между уровнем оксида азота в выдыхаемом воздухе и эозинофилией мокроты, между показателем суммарного АСТ-теста и эозинофилией мокроты зависимость менее значима.

Выводы

1. Клеточный состав индуцированной мокроты достоверно отличается у пациентов с различной степенью тяжести течения бронхиальной астмы.

2. Эозинофилия мокроты – наиболее значимый фенотипический признак тяжести заболевания.

3. Существует корреляция между показателями контроля бронхиальной астмы (уровнем оксида азота в выдыхаемом воздухе, показателями АСТ-теста) и количеством эозинофилов в индуцированной мокроте.

4. Радонотерапия оказывает существенное влияние на уровень контроля бронхиальной астмы и степень эозино-

филии мокроты, причем у больных с легким течением астмы достаточным является курс лечения суховоздушными ваннами с концентрацией 20 нКи/л, а для лечения больных с тяжелой астмой необходимы суховоздушные ванны с концентрацией 40 нКи/л.

5. Радонотерапию необходимо включать в индивидуальные программы диспансерного ведения и реабилитации больных бронхиальной астмой.

Список литературы

1. Авдеев С. И. Применение метода индуцированной мокроты для оценки интенсивности воспаления дыхательных путей / С.И. Авдеев, Э.Х. Анаев, А.Г. Чучалин // Пульмонология. 1998. № 2. С. 81–85.
2. Архипов В. В. Контроль над бронхиальной астмой в России: результаты многоцентрового наблюдательного исследования НИКА / В. В. Архипов, Е.В. Григорьева, Е.В. Гавришина // Пульмонология. 2011. № 6. С. 87–93.
3. Глобальная стратегия профилактики и лечения Бронхиальной астмы GINA. Global strategy for asthma management and prevention, 2014. Available at: http://www.ginasthma.org/uploads/users/files/GINA_Report_2014.pdf
4. Комплексная реабилитация больных хронической обструктивной болезнью легких / Г.Г. Прозорова, В.Т. Бурлачук, Л.В. Трибунцева, А.В. Гулин // Вестник Авиценны. 2015. № 2. С. 96–100.
5. Ненашева Н. М. Клинические фенотипы атопической бронхиальной астмы и дифференцированная тактика диагностики и лечения: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Н.М. Ненашева. Москва, 2008. 29 с.
6. Ненашева Н. М. Оксид азота в выдыхаемом воздухе, как маркер контроля бронхиальной астмы / Н.М. Ненашева, Д.С. Фомина, Б.Б. Буриев // Российский аллергологический журнал. 2010. № 2. С. 32–36.
7. Оценка изменений клеточного и цитокинового состава индуцированной мокроты

- у больных хронической обструктивной болезнью легких под воздействием сухо-воздушных радоновых ванн / Г.Г. Прозорова [и др.] // Журнал анатомии и гистопатологии. 2014. Т. 3, № 3. С. 58–62.
8. Санаторно-курортное лечение больных бронхиальной астмой как элемент профилактики хронических неинфекционных заболеваний / Г.Г. Прозорова, Л.В. Трибунцева, И.М. Черницын, М.В. Никонорова // Вестник Тамбовского университета. Серия: естественные и технические науки. 2015. Т. 20, вып. 6. С. 1720–1723.
 9. Kips J. C. Methods for sputum induction and analysis of induced sputum: a method for assessing airway inflammation in asthma / J. C. Kips, J.V. Fahy, F.E. Hargreave // Eur. Respir. J. 2008. Vol. 11. P. 9–12.
 10. Leukotriene antagonists as first-line or add-on asthma-controller therapy / D. Price [et al.] N Engl J Med. 2011; 364:1695–1707.

Информация об авторах

Прозорова Галина Гаральдовна – д-р мед. наук, профессор кафедры общей врачебной практики

(семейной медицины) ИДПО ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10.

Бурлачук Виктор Тимофеевич – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой общей врачебной практики (семейной медицины) ИДПО ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10.

Трибунцева Людмила Васильевна – канд. мед. наук, доцент кафедры общей врачебной практики (семейной медицины) ИДПО ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10.

Ольшева Ирина Александровна – канд. мед. наук, ассистент кафедры общей врачебной практики (семейной медицины) ИДПО ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России. 394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, 10.

Никонорова Марина Владимировна – канд. мед. наук, зав. отделением аллергологии и иммунологии ЛПУП Санаторий «Родник». 357500, г. Пятигорск, бульв. Гагарина, 2.

Поступила в редакцию 5.02.2016 г.