

**Ю. І. Фещенко, О. М. Рекалова, О. Р. Панасюкова, Л. П. Кадан, К. Ф. Чернушенко,
В. М. Петішкіна, А. С. Фірсова, Ж. Б. Бегоулева**
**Е-СЕЛЕКТИН ЯК МАРКЕР АКТИВНОСТІ ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ
У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНЕ ОБСТРУКТИВНЕ ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЕГЕНЬ**

ДУ "Національний інститут фізіотерії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України"

Сучасна концепція патогенезу хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ) розглядає його як екологічно опосередковане хронічне запальне захворювання з переважним пошкодженням дистальних відділів дихальних шляхів, паренхіми легень та формуванням емфіземи, результатом якого є спочатку частково зворотна, а в кінцевому підсумку незворотна бронхіальна обструкція [9, 15]. Хвороба характеризується стійким і прогресивним запаленням дихальних шляхів з патологічними змінами в легенях і позалегеновими системними наслідками [11].

Протягом останніх років з'ясування проблем розвитку ХОЗЛ тісно пов'язане з уточненням ролі імунологічного дисбалансу на різних етапах патологічного процесу. Імунна відповідь включає багато ланок, однією з них є залучення імунокомпетентних клітин (ІК) у вогнище запалення, що визиває великий інтерес дослідників, оскільки є ключовим у патогенезі запалення, в тому числі в бронхо-легеневій системі. Реалізація цього процесу залежить від характеру взаємодії ІК з ендотелієм судинного русла, яка регулюється молекулами міжклітинної адгезії. Основна функція молекул адгезії полягає у підтримці міжклітинних взаємодій, міграції клітин у вогнище запалення, в ініціації імунної відповіді [10, 14].

Відомо, що наявність виразної експресії на поверхні ІК та ендотелію різноманітних молекул адгезії (ICAM-1, ICAM-3, Е-селектин, VCAM-1 та інші) відіграє важливу роль у патогенезі ХОЗЛ і сприяє міграції ІК до паренхіми легень з прогресуванням запальної відповіді, що призводить до формування емфіземи та легеневі недостатності [1]. Серед молекул адгезії особливу увагу дослідників привертає Е-селектин, який виробляється ендотеліальними клітинами при запальному ушкодженні тканини, наприклад, при інфікуванні, і сприяє рекрутуванню нейтрофілів з циркулюючої крові до міста ураження, опосередковує їх прикріплення до ендотелію [13]. В стані спокою він, як правило, знаходиться в незначній кількості на ендотеліальних клітинах судин. Молекули селективнів, які є глікопротеїнами, пронизують мембрану клітин і мають N-кінцевий домен з лектиноподібними властивостями, який здатен зв'язуватися із вуглеводними кінцевими групами лігандів. Стимуляція ендотеліальних клітин викликає експресію фосфоліпідів на їх поверхні, на якій з'являються адгезивні молекули, що сприяють адгезії та послідовному переходу лейкоцитів до вогнища запалення. При стимуляції ендотелію цитокинами TNF α , IL-1 або деякими продуктами бактеріального розпаду, які активують фактор транскрипції NF- κ B, Е-селектин виробляється

у великій кількості і експресується виключно на поверхні судинних клітин [7].

Отже, підвищення адгезивних властивостей ендотелію відіграє важливу роль у розвитку хронічного запального процесу, а вивчення вмісту розчинних форм ендотеліальних молекул адгезії може бути використане в якості маркера активності багатьох патологічних процесів [3].

Метою дослідження було дослідити вміст розчинної молекули адгезії Е-селектину у сироватці крові хворих із загостренням ХОЗЛ та визначити його зв'язок з клініко-імунологічними особливостями захворювання.

Матеріали і методи

Обстежено 97 хворих на ХОЗЛ в стадії загострення, які проходили стаціонарне лікування у відділеннях ДУ "Національний інститут фізіотерії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України". Середній вік хворих дорівнював ($59,4 \pm 1,3$) років (від 30 до 70 років), при цьому переважну більшість обстежених хворих (58,8 %) становили особи у віці більше 60 років.

Клінічний діагноз ХОЗЛ встановлювався відповідно прийнятим класифікаційним рекомендаціям на підставі даних загального клінічного (огляд пацієнтів, анамнез), функціонального (спірографія з визначенням кривої потік-об'єм форсованого видиху на апараті "MicroLab" (Велика Британія), електрокардіографія) обстеження і був верифікований за стадіями захворювання відповідно до Наказу МОЗ України за № 128 від 19.03.2007 року [5]. Середня тривалість захворювання становила ($14,1 \pm 1,0$) років (від 2 до 30 років), тривалість загострення — ($1,4 \pm 0,1$) місяця (від 1 тижня до 3 місяців). У 10 хворих (10,3 %) спостерігався легкий перебіг ХОЗЛ, у 32 (32,9 %) хворих — перебіг помірної тяжкості, у 42 (43,3 %) — тяжкий і у 13 (13,5 %) — дуже тяжкий перебіг ХОЗЛ. Чоловіків було 60 (61,9 %), жінок — 37 (38,1 %).

Контрольну групу склали 20 практично здорових осіб — донорів крові без наявних ознак захворювань респіраторного тракту, серед яких було 9 чоловіків та 11 жінок віком від 19 до 67 років.

Всім хворим було проведено комплексне імунологічне дослідження стану імунокомпетентних клітин периферичної крові та вмісту гуморальних біологічних факторів, яке включало: оцінку Т-, В- і фагоцитуючої систем імунітету. За допомогою двокольорової проточної лазерної цитометрії (проточний цитометр "FACScan") з використанням моноклональних антитіл („Caltag laboratories", США) проводили фенотипування Т- та В-лімфоцитів (CD3⁺19⁻ — пан-Т-клітин, CD4⁺8⁻ — Т-хелперів/індукторів, CD4⁺8⁺ — Т-супресорів/цитотоксичних клітин, CD3⁺19⁺ лімфоцитів). [6]. Для оцінки активності попу-

ляції лімфоцитів використовували показник інтенсивності флюоресценції (IF). Для забезпечення стандартної реєстрації середньої інтенсивності світіння клітин проводили оптичне налаштування приладу за допомогою флюоресцируючих мікросфер Immunocheck ("Coulter") [2]. Бактерицидну спроможність фагоцитів визначали за рівнем кисеньзалежного метаболізму в НСТ-тесті [8]. Бронхоскопія з одержанням бронхоальвеолярного змиву (БАЗ) для імунологічних досліджень була проведена на 44 хворим під місцевою анестезією фіброскопом "Olimpus" з оцінкою запальних змін слизової оболонки бронхів по G.M. Lemoine [12]. Визначення вмісту у сироватці крові і в БАЗ фактору некрозу пухлин альфа (TNF α), інтерлейкіну-8 (IL-8) та системного рівню Е-селектину (методом імуоферментного аналізу з використанням комерційних тест-систем: TNF α — ТОВ "Протеиновый контур" (С.-Петербург, Росія), IL-8 ("Цитокин", Санкт-Петербург; Росія); Е-селектин — "Biomedica Gruppe", Відень, Австрія).

Статистична обробка отриманих даних дослідження проводилась методами параметричної (t-тест вірогідності Ст'юдента) та непараметричної (двовибірковий критерій Уїлкоксона) статистики за допомогою ліцензійних програмних продуктів, які входили до пакету Microsoft Office Professional 2000, ліцензія Russian Academic OPEN No Level № 17016297 [4]. Кореляційні зв'язки між вибірками обчислювались за допомогою методів параметричної кореляції Пірсона або непараметричної кореляції Спірмена. Перевірка наявності зв'язку між вибірками з якісними параметрами оцінювалась із застосуванням критерію χ^2 Пірсона. Обчислювання критеріальних значень та довірчих інтервалів (ДІ) проводилось при заданому рівні значимості $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

У групі хворих на ХОЗЛ в стадії загострення середні рівні у сироватці крові Е-селектину ($117,9 \pm 6,5$) нг/мл та прозапальних цитокінів: TNF α ($13,5 \pm 2,7$) пг/мл і IL-8 ($73,2 \pm 9,9$) нг/мл були статистично достовірно вищими, ніж у групі практично здорових осіб (відповідно ($53,7 \pm 5,4$) нг/мл, ($7,9 \pm 0,8$) пг/мл; ($45,0 \pm 3,4$), $p < 0,05$). Отже, гіперпродукція прозапальних цитокінів підтверджувала наявність у хворих активного системного запалення, а гіперпродукція Е-селектину свідчила про інтенсивну участь судинного ендотелію у цих процесах.

Було встановлено, що підвищений вміст Е-селектину у сироватці крові спостерігався у більшості обстежених — у 78,4 % (76 хворих), але у 21,6 % пацієнтів (у 21 хворого) він суттєво не різнився від контрольного показника. У зв'язку з цим, обстежені хвори були розподілені на 2 групи: I групу склали пацієнти з вмістом Е-селектину, який статистично не відрізнявся від контрольного (середній показник по групі ($48,9 \pm 2,2$) нг/мл при нормі ($53,7 \pm 5,4$) нг/мл, $p > 0,1$); в II групу увійшли хворі з підвищеною продукцією Е-селектину (середній його показник по групі склав ($138,5 \pm 6,7$) нг/мл, $p < 0,05$). Отримані результати, які були статистично підтверджені, представлені в таблицях 1, 2 і 3.

Аналіз даних проведеного бронхологічного обстеження хворих (табл. 1) виявив, що в групі хворих з висо-

кою продукцією Е-селектину відсоток хворих з 0-1 ступенем запалення слизової оболонки бронхів був вірогідно більш низький, ніж у пацієнтів з нормальним його рівнем. Відповідно, у 80,0 % хворих цієї групи спостерігався 2 та 3 ступень запалення, тоді як у пацієнтів I групи 3-го ступеню запалення не було діагностовано у жодного хворого, що свідчило про зв'язок Е-селектину з інтенсивністю бронхіального запалення.

Таблиця 1

Дані бронхологічного обстеження хворих на ХОЗЛ з різною продукцією Е-селектину ($M \pm m$)

Показники	Рівень Е-селектину в сироватці крові				
	нормальний (n=8)		підвищений (n=35)		
	n	%	n	%	
Ступінь запалення слизової оболонки бронхів	0-1	5	62,5 \pm 17,1	7	20,0 \pm 6,8 *
	2	3	37,5 \pm 17,1	24	68,6 \pm 6,8
	3	0	–	4	11,4 \pm 6,8

Примітка: * — різниця показника між групами статистично підтверджена ($p < 0,05$).

Одночасно з наростанням запалення слизових оболонок у хворих II групи відсотковий вміст нейтрофільних гранулоцитів був майже в 3 рази вищим, а вміст альвеолярних макрофагів в БАЗ відповідно в 2 рази нижчим, що супроводжувалось чотирикратним переважанням у хворих цієї групи вмісту прозапального цитокіну IL-8; $p < 0,05$ (табл. 2). Ці дані підтвердили результати кореляційного аналізу, який виявив прямий зв'язок сироваткової концентрації Е-селектину із ступенем тяжкості захворювання ($r = 0,21$, $n = 97$, $p < 0,05$), ступенем запалення слизової оболонки бронхів ($r = 0,53$, $n = 43$, $p < 0,05$), кількістю нейтрофільних гранулоцитів в БАЗ ($r = 0,45$, $n = 31$, $p < 0,05$) та вмістом IL-8 ($r = 0,34$, $n = 34$, $p < 0,05$), а також зворотній кореляційний зв'язок з кількістю альвеолярних макрофагів ($r = -0,43$, $n = 31$, $p < 0,05$). Всі означені показники є показниками активності запалення у дихальних шляхах та визначають тяжкість клінічного перебігу ХОЗЛ. У свою чергу, спостерігалась залежність останніх показників — концентрації IL-8 в БАЗ ($r_s = 0,43$, $n = 34$, $p < 0,05$), вмісту НГ в БАЗ ($r_s = 0,42$, $n = 30$, $p < 0,05$) і альвеолярних макрофагів ($r_s = -0,61$, $n = 31$, $p < 0,05$) — від стадії ХОЗЛ, що підтверджувало зв'язок Е-селектину та перелічених факторів з тяжкістю перебігу захворювання, що дає підставу вважати високий вміст Е-селектину у сироватці крові хворих маркером тяжкості та активності запального процесу в бронхолегеневій системі.

Показники системного імунітету також були пов'язані з рівнем Е-селектину (табл. 3): менша його концентрація у крові (I група) реєструвалась при зростанні загального пулу Т-лімфоцитів (підвищення абсолютної кількості CD3+—лімфоцитів) переважно за рахунок субпопуляції цитотоксичних форм (CD8+—клітин), тоді як при високих рівнях Е-селектину (II група) абсолютна кількість цих клітин була також вищою за норму, але значно меншою, ніж у I групі ($p < 0,05$), що могло бути обумовлено міграцією цих клітин із крові до вог-

Таблиця 2

Вміст фагоцитарних клітин та IL-8 в бронхоальвеолярному змиві (M ± m)

Показники	Рівень E-селектину в сироватці крові	
	нормальний (n=8)	підвищений (n=35)
Альвеолярні макрофаги (%)	60,3 ± 3,9	33,9 ± 4,0*
Нейтрофільні гранулоцити (%)	14,0 ± 4,4	37,2 ± 6,7*
IL-8 нг/мл	160,8 ± 58,4	722,8 ± 143,7*

Примітка: * — різниця показника між групами статистично підтверджена (p < 0,05)

нища запалення у бронхолегеневій тканині. При цьому інтенсивність флуоресценції (IF) CD3+ і CD4+ клітин після прикріплення люмінісуючих моноклональних антитіл (що залежить від кількості специфічних рецепторів на їх поверхні і афінності клітин [2]) у хворих обох груп була зниженою відносно контролю, але у пацієнтів II групи зниження було значно менше виражене (p < 0,05). Це свідчить про більшу активність цих клітин при високих рівнях E-селектину (і активності запалення), незважаючи на зменшення при цьому в крові загальної кількості CD3+ лімфоцитів.

Інтенсивність метаболічних процесів у фагоцитуючих клітинах периферичної крові всіх хворих на ХОЗЛ була пригніченою відносно групи донорів (p < 0,05), що, ймовірно, було ознакою їх виснаження. Але низькі рівні E-селектину поєднувались з більш суттєвим згасанням їх активності: у пацієнтів I групи — НСТ-тест нейтрофілоцитів та моноцитів крові був нижчим, ніж у хворих II групи (p < 0,05) (табл. 3). Це підтверджувало більшу активність запальних процесів у хворих II групи.

Таблиця 3

Стан системного імунітету у хворих на ХОЗЛ з різною продукцією E-селектину (M ± m)

Показники	Групи обстежених		
	Здорові особи	I (n=21)	II (n=76)
Абсолютна кількість CD3+ лімфоцитів (Г/л)	1,4 ± 0,1	2,55 ± 0,33**	1,93 ± 0,1 *
IF CD3+ лімфоцитів (y.o.)	624,4 ± 4,5	485,7 ± 26,4**	562,4 ± 11,2*
IF CD4+ лімфоцитів (y.o.)	574,2 ± 4,3	501,1 ± 19,5*	559,3 ± 9,6
Абсолютна кількість CD8+ лімфоцитів (Г/л)	0,55 ± 0,04	1,43 ± 0,23**	0,85 ± 0,06*
НСТ нейтрофільних гранулоцитів (%)	64,2 ± 3,1	45,4 ± 3,2**	54,3 ± 1,7*
НСТ моноцитів (%)	32,6 ± 2,0	19,1 ± 1,3**	27,4 ± 1,4*

Примітки: * — різниця показника з групою здорових статистично підтверджена (p < 0,05); ** — різниця показника між I та II групами хворих статистично підтверджена (p < 0,05).

Отже, підвищений рівень E-селектину у крові обстежених пацієнтів супроводжувався зниженням загальної кількості Т-лімфоцитів та більш високою активністю Т-лімфоцитів, особливо Т-хелперів/індукторів, і фагоцитуючих клітин.

Висновки

Гіперпродукція молекул міжклітинної адгезії E-селектину супроводжується активацією запальних реакцій при загостренні ХОЗЛ: зростанням ступеню ендобронхіального запалення, відсотку нейтрофілоцитів та концентрації IL-8 у бронхоальвеолярному змиві, і прямо корелює зі ступенем тяжкості ХОЗЛ, що дозволяє використовувати вміст E-селектину у сироватці крові хворих у якості маркера активності запалення у дихальних шляхах та тяжкості перебігу ХОЗЛ.

Високий вміст E-селектину у сироватці крові хворих при загостренні ХОЗЛ супроводжується вираженим зниженням загальної кількості Т-лімфоцитів (CD3+ клітин) переважно за рахунок субпопуляції їх цитотоксичних форм (CD8+ клітин), що, ймовірно, обумовлено більш активним запаленням у дихальних шляхах з міграцією цих клітин із кров'яного русла до вогнища запалення.

У всіх хворих на ХОЗЛ зареєстровано зниження кисеньозалежного метаболізму фагоцитуючих клітин (нейтрофілоцитів та моноцитів) периферичної крові, але у пацієнтів з підвищеною продукцією E-селектину пригнічення продукції активних форм кисню є менш виразним, що віддзеркалює більшу напруженість запальних процесів у цих хворих.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дисфункция эндотелия сосудов у больных хронической обструктивной болезнью легких [Текст] / Н. А. Кароли [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезни легких. — 2004. — № 4. — С. 19–22.
2. Интенсивность иммунофлуоресценции как один из показателей при фенотипировании лимфоцитов периферической крови пациентов с различными нарушениями иммунитета [Текст] / А. В. Симонова [и др.] // Иммунология. — 1996. — № 1. — С. 42–45.
3. Кочемасова, Т. В. Состояние эндотелия и адгезия лейкоцитов при сахарном диабете (Обзор литературы) [Текст]. / Т. В. Кочемасова // Сахарный диабет. — 2000. — № 3. — С. 59–62.
4. Лапач, С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel [Текст] / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич — Киев : Морион, 2000. — 320 с. — ISBN 966–7632–16–4.
5. Наказ МОЗ України від 19.03.2007 р. № 128 “Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю “Пульмонологія” // Київ — 2007. — 146 с.
6. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека [Текст] : методические рекомендации / Институт иммунологии МОЗ Российской Федерации. — Москва, 2001. — 53 с.
7. Талаева, Т. В. Механизмы взаимодействия клеток крови и сосудистой стенки в реализации воспалительного и иммунного ответов [Текст] / Т. В. Талаева // Український ревматологічний журнал. — 2001. — № 3–4 (5–6). — С. 45–52.
8. Унифицированные иммунологические методы обследования больных на стационарном и амбулаторном этапах лечения: методические рекомендации [Текст] / Киевский НИИ фтизиатрии и пульмонологии им. Ф.Г. Яновского. — Киев, 1988. — 18 с.
9. Фещенко, Ю. І. Хронічне обструктивне захворювання легень — актуальна медико-соціальна проблема [Текст] / Ю. І. Фещенко // Укр. пульмонол. журн. — 2011. — № 2. — С. 6.
10. Biological function of CD40 on endothelial cells: costimulation with CD40 ligand and interleukin-4 selectively induces of vascular cell adhesion molecule-1 and P-selectin resulting in preferential adhesion of lymphocytes [Text] / K. Kotowicz [et al.] // Immunology. — 2000. — Vol. 100, № 4. — P. 441–448.
11. Brusselle, G. G. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease [Text] / G. G. Brusselle, G. F. Joos, K. R. Bracke // Lancet. — 2011. — Vol. 10, № 378 — P. 1015–1026.
12. Lemoine, G. M. Pathologie bronchique. Etudes cliniques et endoscopiques [Text] / G. M. Lemoine — Paris : Doin, 1956. — 216 p.
13. Nicotine-mediated induction of E-selectin in aortic endothelial cells requires Src kinase and E2F1 transcriptional activity [Text] / V.

- Alamanda [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2012. — Vol. 418, № 1. — P. 56–61.
14. *Regulation de l'explosion oxydative des polynucleares neutrophiles humains par les cytokines pro- et anti-inflammatoires* [Text] / M. A. Gougeroi-Pacidallo [et al.] // J. Soc. Biol. — 2002. — № 1. — P. 37–46.
15. *Yoon, H. I. Biomarkers of therapeutic response in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a critical review of the literature* [Text] / H. I. Yoon, D. D. Sin // Drugs. — 2011. — Vol. 71, № 14. — P. 1821–1837.

Е-СЕЛЕКТИН КАК МАРКЕР АКТИВНОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ОБСТРУКТИВНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЕМ ЛЕГКИХ

**Ю. И. Фещенко, Е. М. Рекалова, О. Р. Панасюкова,
Л. П. Кадан, Е. Ф. Чернушенко, В. М. Петишкіна,
А. С. Фирсова, Ж. Б. Бегоулева**

Резюме

С целью определения зависимости содержания в сыворотке крови растворимой молекулы адгезии Е-селектина от клинико-иммунологических особенностей ХОЗЛ обследовано 97 больных в фазе обострения заболевания. Комплексное иммунологическое исследование включало оценку Т-, В- и фагоцитарного звеньев иммунитета. Методом иммуноферментного анализа исследовали содержание фактора некроза опухолей альфа (TNF α) и интерлейкина-8 (IL-8) в сыворотке крови и в бронхоальвеолярном смыве и системный уровень Е-селектина. Установлено, что гиперпродукция Е-селектина сопровождается активацией воспалительных реакций: ростом степени эндобронхиального воспаления, процента нейтрофилов и концентрации IL-8 в дыхательных путях, увеличением тяжести течения ХОЗЛ. Более интенсивное воспаление в бронхоальвеолярной системе на фоне повышенной продукции Е-селектина

сопровождается менее выраженным угнетением выработки активных форм кислорода фагоцитирующими клетками периферической крови. Полученные данные позволяют использовать уровень Е-селектина в сыворотке крови больных ХОЗЛ в качестве маркера активности воспаления в дыхательных путях и тяжести течения заболевания.

E-SELECTIN AS A MARKER INFLAMMATORY ACTIVITY IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

**Y. I. Feshchenko, E. M. Rekalova, O. R. Panasiukova,
L. P. Kadan, E. F. Chernushenko, V. N. Petishkina,
A. S. Firsova, J. B. Begouleva**

Summary

97 patients with acute exacerbation of COPD were examined to determine the correlation between concentration of soluble E-selectin adhesion serum molecules and clinical and immunological features of the disease. Immunological part of the study comprised an evaluation of T-, B- and phagocytosis links of immunity. The content of tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin-8 (IL-8) in blood serum and in bronchoalveolar lavage fluid, and systemic levels of E-selectin were measured using enzyme immunoassay analysis. It was established that the hyperproduction of E-selectin was accompanied by an activation of inflammatory responses: higher degree of bronchial inflammation, increased percent of neutrophils and higher concentration of IL-8 in the airways, leading to more severe course of COPD. More intensive inflammation in the airways on the background of increased production of E-selectin was associated with less inhibited production of reactive oxygen species by peripheral blood phagocytes. These data allow to use E-selectin as a marker of activity of inflammation in the airways and the severity of COPD.