

**H.O. Скороходова****ЦИТОКІНОВА РЕГУЛЯЦІЯ У ХВОРИХ НА НЕГОСПІТАЛЬНУ ПНЕВМОНІЮ З ЗАТЯЖНИМ ПЕРЕБІГОМ****Запорізька медична академія післядипломної освіти****Ключові слова:** негоспітальна пневмонія, цитокіни TNF- α , IL-2, 4, 6 та IFN- γ .**Ключевые слова:** негоспитальная пневмония, цитокины TNF- α , IL-2, 4, 6 та IFN- γ .**Key words:** pneumonia, cytokines, TNF- α , IL-2, 4, 6 та IFN- γ .

У 20 хворих з негоспітальною пневмонією та у 10 практично здорових осіб за допомогою стандартних комерційних наборів для прямого імунно-ферментного аналізу визначали TNF- α , IL-2, 4, 6 та IFN- γ в крові та бронховоальвеолярному лаважі (BAL). У хворих на негоспітальну пневмонію з затяжним перебігом визначають підвищення спонтанного синтезу прозапальних цитокінів макрофагами периферичної крові та альвеолярними макрофагами, що проявляється значним підвищеннем рівня IL-6 в крові та BAL, помірним підвищеннем TNF- α , IL-2 в крові та BAL та помірним підвищеннем INF- γ в крові. Максимальне збільшення синтезу цитокінів макрофагами периферичної крові характерне для протизапального IL-4.

У 20 больных с негоспитальной пневмонией и у 10 практически здоровых добровольцев с помощью стандартных коммерческих наборов для прямого иммунно-ферментного анализа определяли TNF- α , IL-2, 4, 6 и IFN- γ в крови и бронховоальвеолярном лаваже (BAL). У больных с негоспитальной пневмонией определяют повышение спонтанного синтеза провоспалительных цитокинов макрофагами периферической крови и альвеолярными макрофагами, которое проявляется значительным повышением уровня IL-6 в крови и BAL, умеренным повышением TNF- α , IL-2 в крови и BAL и умеренным повышением INF- γ в крови. Максимальное увеличение синтеза цитокинов макрофагами периферической крови характерно для противовоспалительного IL-4.

In 20 patients with pneumonia and 10 healthy controls was determine TNF- α , IL-2, 4, 6 та IFN- γ in blood and bronchoalveolar lavage fluid (BAL) with standard commercial sets for direct immune-ferment analyze. Spontaneous synthesis of inflammation cytokines IL-6, TNF- α , IL-2, IFN- γ by macrophages of a peripheric blood and alveolar macrophages was considerable increased with high level this cytokines in a blood and BAL . It was determine the maximum increase of synthesis cytokines by macrophages of a peripheric blood for IL-4

Необхідність у проведенні диференційного діагнозу між пневмонією та туберкульозом виникає в більшості випадків при затяжному перебігу захворювання [1, 2]. Невзажаючи на великий перелік обстежень, у тому числі й пункцийну трансторакальну/трансбронхіальну біопсію, надійних методів диференційної діагностики цих захворювань немає [3, 5]. З метою діагностики легеневих захворювань, як правило використовують певний комплекс обстежень, серед яких особливу увагу привертає імунологічне дослідження, оскільки для онкологічних, запальних неспецифічних захворювань, туберкульозу притаманний особливий імунопатогенез [6, 7, 11]. На сьогодні добре вивчені особливості системного імунітету у хворих на туберкульоз та негоспітальну пневмонію, але питання регуляції цитокінів Т-лімфоцитами периферійної крові та бронховоальвеолярного зміву при цих захворюваннях висвітлені недостатньо [7, 11]. Досліджено, що цитокіни можуть бути маркерами тяжкості цих захворювань, але не відомо, чи можливо цитокіновий профіль враховувати при діагностиці негоспітальної пневмонії із затяжним перебігом [11]. Не вивчався і не порівнювався вміст прозапальних та антizапальних цитокінів у крові та альвеолярному лаважі, отриманому з місця ураження у хворих на пневмонію.

Метою даного дослідження було вивчення цитокінового профілю Т-лімфоцитів периферійної крові та бронховоальвеолярного лаважу у хворих на негоспітальну пневмонію із затяжним перебігом та визначення імунологічних критеріїв, які могли б використовуватись для діагностики захворювання.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В дослідження було включено 20 хворих з негоспітальною пневмонією із затяжним перебігом та 10 здорових волонтерів.

Серед хворих – жінок було 12 (60,0 %), чоловіків – 8

(40,0 %), волонтерів – відповідно 7 (70 %) та 3 (30 %). Вік хворих становив $(38,2 \pm 4,2)$ років, здорових – $(35,7 \pm 4,2)$ років.

Визначали рівні наступних цитокінів: фактору некрозу пухлин (TNF- α), інтерлейкінів (IL-2, 4, 6) та інтерферону- γ (IFN- γ) в крові та бронховоальвеолярному лаважі, та їх рівні в надосадовій рідині (супернатанті) культур макрофагів із периферичної крові та альвеолярних макрофагів із BAL при спонтанному та індукованому синтезі. Індукцію синтезу TNF- α , IL-4, 6 та IFN- γ макрофагами периферичної крові та альвеолярними макрофагами проводили пірогеналом, IL-2 – фітогемагглютиніном. BAL у брали з ураженої ділянки легень. Вивчали цитологічний склад BAL з ураженої ділянки легень. Вміст цитокінів в БАК розраховували на одиницю білка BAL.

Визначення TNF- α , IL-2, 4, 6 та IFN- γ в крові, BAL та супернатанті культури макрофагів периферичної крові та альвеолярних макрофагів проводили за допомогою стандартних комерційних наборів для прямого імунно-ферментного аналізу компанії "ДРГ Біомедикал" (Санкт-Петербург). В якості стандарту для порівняння були TNF- α , IL-2, 4, 6 та IFN- γ відомої концентрації, які входили в набір реагентів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В BAL хворих на негоспітальну пневмонію визначали помірно підвищений вміст нейтрофілів $(22,3 \pm 3,7)\%$ порівняно зі здоровими $(11,6 \pm 2,1)\%$, $p < 0,05$. Вміст альвеолярних макрофагів в BAL у хворих на негоспітальну пневмонію пневмонію $(71,1 \pm 5,2)\%$ і здорових $(81,7 \pm 4,1)\%$ суттєво не відрізняється, $p > 0,05$. Рівень лімфоцитів в BAL також суттєво не відрізняється між хворими та здоровими, відповідно $(5,9 \pm 0,8)\%$, $(4,8 \pm 1,4)\%$, $p > 0,05$. Рівні цитокінів в периферійній крові та BAL у хворих на негоспітальну пневмонію та здорових волонтерів наведено в таблиці 1.



Таблиця 1

Рівні цитокінів в периферійній крові та БАЛ у хворих на негоспітальну пневмонію із затяжним перебігом та здорових волонтерів, пг/мл

	Хворі на пневмонію	Здорові	P
IFN- γ кров	4,4 ± 1,1	2,1 ± 0,4	<0,05
IFN- γ БАЗ	4,6 ± 1,4	4,2 ± 1,3	>0,05
TFN-α кров	43,4 ± 7,8	10,6 ± 1,9	<0,05
TFN-α БАЗ	130,8 ± 38,8*	28,5 ± 5,4*	<0,05
IL-6 кров	69,1 ± 12,7	0,8 ± 0,2	<0,05
IL-6 БАЗ	160,3 ± 38,3*	0,9 ± 0,3	<0,05
IL-4 кров	41,9 ± 6,4	0,1 ± 0,01	<0,05
IL-4 БАЗ	7,8 ± 1,9*	0,4 ± 0,01	<0,05
IL-2 кров	11,5 ± 1,5	1,3 ± 0,3	<0,05
IL-2 БАЗ	12,2 ± 3,4	1,6 ± 0,2	<0,05

Примітка. * Рівень показника БАЛ вірогідно відрізняється від такого в крові, $p < 0,05$.

Рівень IFN- γ в крові у хворих на негоспітальну пневмонію із затяжним перебігом помірно підвищений порівняно зі здоровими (в 2 рази, $p < 0,05$). Цей цитокін є пусковим фактором запальної реакції при попаданні інфекційного збудника в організм [6, 8]. Невисокі його рівні в крові та БАЛ свідчать про трансформацію запальної реакції, яка вже не обумовлена інфекційним агентом. В табл. 2 наведені рівні IFN- γ при його спонтанному та індукованому синтезі макрофагами периферичної крові та альвеолярними макрофагами у хворих на негоспітальну пневмонію та здорових волонтерів.

Спонтанний синтез IFN- γ макрофагами периферичної крові помірно підвищений (в 2,6 раза), що відповідає такому ж підвищенню рівня цього цитокіну в крові. Рівень синтезу IFN- γ альвеолярними макрофагами відповідає контрольному значенню здорових, про що свідчать низькі рівні цитокіну в БАЛ, які не відрізняються від контрольних значень. Проте, індуковані альвеолярні макрофаги у хворих на пневмонію збільшують синтез IFN- γ в 10 разів порівняно зі здоровими, що свідчить про сенсибілізацію цих клітин відносно синтезу прозапального цитокіну.

Таблиця 2

Спонтанний та індукований синтез IFN- γ макрофагами периферичної крові та альвеолярними макрофагами у хворих на негоспітальну пневмонію із затяжним перебігом та здорових волонтерів, пг/мл

Групи обстежених	Макрофаги периферичної крові		Альвеолярні макрофаги	
	Спонтанний синтез IFN- γ	Індукований синтез IFN- γ	Спонтанний синтез IFN- γ	Індукований синтез IFN- γ
Хворі на пневмонію	16,7 ± 1,1	1076,2 ± 148,4*	7,8 ± 2,3	262,7 ± 2,3*
Здорові	2,1 ± 0,6	1325,9 ± 127,4*	6,3 ± 1,5	26,7 ± 11,4*
P	< 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05

Примітка. * Рівень показника вірогідно відрізняється від такого при спонтанному синтезі, $p < 0,05$.

Як свідчать дані у табл. 1 у хворих на негоспітальну пневмонію з затяжним перебігом рівень TFN-α в крові в 4 рази перевищує рівень цього цитокіну у здорових волонтерів, $p < 0,05$. Ця закономірність зберігалася при дослідженні БАЛ, але рівень цього цитокіну в БАЛ у хворих на пневмонію, був у 3 рази вищим, ніж у крові, а у здорових волонтерів був вищим в БАЛ у 2 рази, ніж у крові. Така ж тенденція зі значним підвищенням рівня цитокіну в крові прослідовується й для IL-6 (відповідно в 86 разів та 178 разів порівняно зі здоровими), у здорових осіб підвищення рівня цього цитокіну у БАЛ порівняно з кров'ю не було. Спонтанний та індукований синтез TFN-α, IL-6 макрофагами периферичної крові та альвеолярними макрофагами у хворих на негоспітальну пневмонію та здорових волонтерів наведено в таблицях 3, 4.

Таблиця 3

Спонтанний та індукований синтез TFN-α макрофагами периферичної крові та альвеолярними макрофагами у хворих на негоспітальну пневмонію із затяжним перебігом та здорових волонтерів, пг/мл

Групи обстежених	Макрофаги периферичної крові		Альвеолярні макрофаги	
	Спонтанний синтез TFN-α	Індукований синтез TFN-α	Спонтанний синтез TFN-α	Індукований синтез TFN-α
Хворі на пневмонію	192,8 ± 51,3	755,2 ± 104,7*	72,9 ± 3,5	77,5 ± 1,9
Здорові	83,0 ± 7,8	633,8 ± 98,4*	16,9 ± 3,4	100,7 ± 11,4*
P	< 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,05

Примітка. * Рівень показника вірогідно відрізняється від такого при спонтанному синтезі, $p < 0,05$.

Спонтанний синтез TFN-α периферичними та альвеолярними макрофагами помірно підвищений, $p < 0,05$. Індуковані макрофаги периферичної крові у хворих на пневмонію та у здорових осіб значно збільшують синтез TFN-α (відповідно в 4 рази та 7,4 раза, проте, індуковані альвеолярні макрофаги не збільшують синтез цього цитокіну у хворих на негоспітальну пневмонію на відміну від здорових, що свідчить про виснаження резервних можливостей цих клітин відносно синтезу TFN-α.

Таблиця 4

Спонтанний та індукований синтез IL-6 макрофагами периферичної крові та альвеолярними макрофагами у хворих на негоспітальну пневмонію із затяжним перебігом та здорових волонтерів, пг/мл

Групи обстежених	Макрофаги периферичної крові		Альвеолярні макрофаги	
	Спонтанний синтез IL-6	Індукований синтез IL-6	Спонтанний синтез IL-6	Індукований синтез IL-6
Хворі на пневмонію	1156,2 ± 142,2	2573,5 ± 100,7*	5,2 ± 1,7	9,0 ± 3,1
Здорові	330,8 ± 13,2	2485,6 ± 168,6*	6,7 ± 2,0	22,6 ± 2,7*
P	< 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05

Примітка. * Рівень показника вірогідно відрізняється від такого при спонтанному синтезі, $p < 0,05$.



Таблиця 6

Спонтанний та індукований синтез IL-2 макрофагами периферійної крові та альвеолярними макрофагами у хворих на негоспітальну пневмонію із затяжним перебігом та здорових волонтерів, пг/мл

Групи обстежених	Макрофаги периферичної крові		Альвеолярні макрофаги	
	Спонтанний синтез IL-2	Індукований синтез IL-2	Спонтанний синтез IL-2	Індукований синтез IL-2
Хворі на пневмонію	972,9 ± 122,3	963,1 ± 84,6	170,3 ± 3,7	127,5 ± 4,9*
Здорові	393,2 ± 54,9	1091,7 ± 122,3*	68,8 ± 7,9	97,6 ± 7,4*
P	< 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,05

Примітка. * Рівень показника вірогідно відрізняється від такого при спонтанному синтезі, $p < 0,05$.

Спонтанний синтез IL-6 макрофагами периферійної крові значно підвищений порівняно зі здоровими, проте, рівень синтезу цього цитокіну альвеолярними макрофагами не перевищує контрольні значення здорових, що відповідає його невисоким рівням в БАЛ, які не відрізняються від контрольних значень. Індуковані макрофаги периферійної крові у хворих на негоспітальну пневмонію вірогідно підвищують синтез цього цитокіну, проте резервні можливості альвеолярних макрофагів відносно синтезу IL-6 знижені, оскільки рівень синтезу цього цитокіну не збільшується та вірогідно нижчі, ніж у здорових волонтерів. Деякі ефекти IL-6, аналогічні спостережуваним при дії TNF. Однак основна дія IL-6 пов'язана з його участю в якості кофактора при дифференціюванні В-лімфоцитів, їх дозріванні й перетворенні в плазматичні клітки, які секретують імуноглобулін [11]. Крім цього, IL-6 сприяє експресії рецептора IL-2 на активованих імуноцитах, а також індукує синтез IL-2 Т-клітками [5, 9].

Як свідчать дані табл. 1 у хворих на пневмонію рівень IL-2 в крові та БАЛ підвищений в 10 разів порівняно зі здоровими. Проте, рівень протизапального IL-4 в крові у хворих на негоспітальну пневмонію підвищений в 400 разів порівняно зі здоровими, в а БАЛ – майже в 20 разів. Спонтанний та індукований синтез IL-4, IL-2 макрофагами периферійної крові та альвеолярними макрофагами у хворих на негоспітальну пневмонію та здорових волонтерів наведено в таблицях 5, 6.

Таблиця 5

Спонтанний та індукований синтез IL-4 макрофагами периферійної крові та альвеолярними макрофагами у хворих на негоспітальну пневмонію із затяжним перебігом та здорових волонтерів, пг/мл

Групи обстежених	Макрофаги периферичної крові		Альвеолярні макрофаги	
	Спонтанний синтез IL-4	Індукований синтез IL-4	Спонтанний синтез IL-4	Індукований синтез IL-4
Хворі на пневмонію	33,3 ± 3,2	16,7 ± 1,0 *	24,8 ± 0,9	21,9 ± 0,9 *
Здорові	1,8 ± 0,6	18,3 ± 5,8 *	15,2 ± 1,1	25,5 ± 0,7 *
P	< 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05

Примітка. * Рівень показника вірогідно відрізняється від такого при спонтанному синтезі, $p < 0,05$.

Спонтанний синтез IL-4 макрофагами периферійної крові та альвеолярними макрофагами у хворих із негоспітальною пневмонією підвищений порівняно зі здоровими, особливо в крові (в 18,5 раза). Індуковані макрофаги у хворих на негоспітальну пневмонію на відміну від здорових осіб знижають синтез IL-4, що свідчить про виснаження їх резервних можливостей. Джерело IL-4 – макрофаги, гладкі клітки й базофіли, які активуються при контакті з деякими бактеріями й алергенами. IL-4 інгібує генерацію запальних Th1 реакцій і продукцію INF- γ [6, 7]. Виснаження резервних можливостей макрофагів периферичної крові та альвеолярних макрофагів щодо синтезу IL-4, підтверджує затяжний перебіг запального процесу у хворих.

© Н.О. Скороходова, 2008

У хворих на негоспітальну пневмонію з затяжним перебігом спонтанний та індукований синтез IL-2 макрофагами периферійної крові та альвеолярними макрофагами підвищений порівняно зі здоровими. Індуковані макрофаги периферійної крові у хворих на негоспітальну пневмонію на відміну від здорових осіб не збільшують синтез IL-4, а альвеолярні макрофаги – знижують, що свідчить про виснаження їх резервних можливостей при затяжному перебігу запального процесу.

Отже, у хворих на негоспітальну пневмонію із затяжним перебігом в крові визначають найбільше підвищення порівняно зі здоровими антизапального IL-4, спрямованого на активацію Th2 гуморальних запальних реакцій, а в БАЛ – прозапального IL-6, який має подібну дію.

ВИСНОВКИ

У хворих на негоспітальну пневмонію з затяжним перебігом визначають підвищення спонтанного синтезу прозапальних цитокінів макрофагами периферичної крові та альвеолярними макрофагами, що проявляється значним підвищеннем рівня IL-6 в крові та БАЛ (перевищує контрольний рівень у здорових відповідно у 86,7 раза та 178,1 раза), помірним підвищеннем TNF- α , IL-2, (в 2-10 разів) в крові та БАЛ та помірним підвищеннем INF- γ в крові.

Вміст прозапальних цитокінів TNF- α IL-6 в БАЛ, узятого з ураженої сторони, вищий, ніж в крові у хворих на негоспітальну пневмонію з затяжним перебігом.

Максимальне збільшення синтезу цитокінів макрофагами периферійної крові характерне для прозапального IL-4 із підвищеннем його рівня в крові понад 400 разів порівняно зі здоровими та для, альвеолярними макрофагами – прозапального цитокіну IL-6 із підвищеннем його рівня в БАЛ в 178,1 раза. При цьому відбувається виснаження резервних можливостей макрофагів периферійної крові та альвеолярних макрофагів щодо синтезу цього цитокіну при індукції цих клітин пірогенелом.

ЛІТЕРАТУРА

- Дитятков А.Е., Митина Л.М., Григорьев Ю.Г. Пневмония у больных противотуберкулезного диспансера. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2003. – № 9. – С.23-26.



2. Синопальников А.И. Внебольничная пневмония: диагностика и дифференциальная диагностика // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. – 2003. – № 3. – С.7-10.
3. Эндобронхиальная и чрезбронхиальная биопсия в дифференциальной диагностике туберкулеза легких / И.А. Табанакова, Н.И. Александрова, Д.С. Судомоин и др. // Материалы VIII Российского съезда фтизиатров: тезисы докладов. – Москва, 2007. – С. 205
4. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors / E.A. Carswell, L.J. Old, R.L. Kassel et all. // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1975/ – V. 72. – P. 3666-3670.
5. Kishimoto T., Akira S., Narasaki M. Interleukin-6 family of cytokines and gp130 // Blood. – 1995. – V. 86. – P. 1243-1254.
6. Kaufmann SH. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages // Ann. Rheum. Dis. – 2002. – V. 61. – Suppl. 2. – P. 54-58.
7. Kuznetsov V.P., Markelova E.V., Silich E.V. et all. Dynamics of cytokines and role of immunocorrection in nosocomial pneumonia // Russ. J. Immunol. – 2002. – V. 7. – N. 2. – P. 151-160.
8. Schroder R. Interferon- γ an overview of signals, mechanisms and functions // J. Leukocyte Biology. – 2004. – V. 75. – P. 163–189.
9. Smith K.A. Interleukin-2: inception, impact, and implications // Science. – 1988. – V. 240. – P. 1169-1176.
10. Unver E., Yilmaz A., Aksoy F. et all. Does needle size affect diagnostic yield of transthoracic needle biopsy in pulmonary lesions?: Comparison of 18-, 22- and 25-gauge needles in surgical specimens // Respirology. – 2006. – V. 11. – P. 648–651.
11. van der Poll T., Keogh C.V., Guirao X. Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia // J. Infect Dis. – 1997. – V. 176, N 2. – P. 439-44.

Відомості про авторів: Скороходова Наталія Олегівна, к.мед.н., асистент кафедри фтизіатрії і пульмонології ЗМАПО, зав. 1-м легеневим відділенням КУ “Запорізький обласний протитуберкульозний клінічний диспансер”.

Адреса для листування: 69009, м.Запоріжжя, вул. Перспективна, 2, ЗОПТКД, 1 легеневе відділення. Тел. (061) 236-64-72.