

Анализ межсистемного взаимодействия ряда нейроиммунных показателей при atopической бронхиальной астме у детей

Азербайджанский медицинский университет: 370072, Азербайджан, Баку, ул. К.Рагимова, 11

N.G.Sultanova

Analysis of intersystem interaction of some neuroimmune parameters in atopical asthma in children

Summary

When investigating 80 children with atopical asthma we revealed that marked disorders of cell-mediated immunity have been developed according to clinical severity of the disease. In patients with severe disease, the average level of VIP significantly dropped while plasma level of neurokinin A simultaneously raised. Serum cytokine measurement found that changes in cytokine concentration progressed while the disease worsening. So, the analysis of the intersystem interactions facilitates detection of inner interrelations of immune parameters, cytokine profile and neuropeptides which could be a specific process in atopical asthma.

Key words: bronchial asthma, children, neuropeptides, cytokines.

Резюме

При обследовании 80 детей с atopической бронхиальной астмой (БА) установлено, что в зависимости от клинической тяжести ее течения формируются выраженные изменения в клеточном звене иммунитета. При тяжелой форме заболевания достоверно снижался средний уровень вазоактивного интестинального пептида и одновременно повышался уровень нейрокина А в плазме крови. Анализ содержания цитокинов в сыворотке крови показал, что нарушения в цитокиновой системе прогрессируют по мере утяжеления патологического процесса. Анализ межсистемного взаимодействия позволяет выявить нарушения внутреннего взаимодействия среди показателей иммунной системы, цитокинового профиля и нейропептидов, которые могут являться специфическим критерием atopической БА.

Ключевые слова: бронхиальная астма, дети, нейропептиды, цитокины.

Современное определение бронхиальной астмы (БА), предложенное Глобальной инициативой по бронхиальной астме — GINA (2002, 2006), трактует ее как заболевание, основу которого составляют аллергическое воспаление дыхательных путей и связанная с ним гиперреактивность бронхов [1]. Гиперреактивность дыхательных путей — комплексное физиологическое нарушение, обусловленное гетерогенностью механизмов при БА. Одним из важных компонентов ее патогенеза являются нейрогенные механизмы [2, 3]. В формировании бронхиальной гиперреактивности участвует неадренергическая и нехолинергическая иннервация, и этот феномен возникает как результат воспалительного процесса в слизистой оболочке бронхов [4].

В настоящее время большое значение в патогенезе гиперреактивности бронхов при БА придается воспалительно-нейроиммунным процессам, опосредованным и регулируемым цитокинами и нейропептидами [2, 5, 6]. Вызывают интерес исследования роли нейропептидов в регуляции иммунного ответа.

Сложный патогенез БА не ограничивается только воспалением, развившимся в результате аллергических реакций, но включает в себя и механизмы нейрогенного воспаления с участием нейропептидов. Особый интерес представляет неадренергическая— нехолинергическая система иннервации (НАНХ-сис-

тема). Ее медиаторы — нейропептиды, образующиеся в эндокринно-активных клетках слизистой оболочки дыхательных путей, — представлены регуляторными пептидами с бронходилатирующим (вазоактивный интестинальный пептид — VIP) и бронхоконстрикторным (нейрокинин А) действием [7, 8].

Целью настоящего исследования явилось изучение взаимодействия некоторых нейроиммунных показателей при atopической БА у детей.

Материалы и методы

Обследование пациентов и клиничко-лабораторные исследования проводились на базе иммунологического отделения детской клинической больницы № 6 Баку и кафедры детских болезней № 2 Азербайджанского медицинского университета.

Изучение уровня нейропептидов и CD-маркеров лимфоцитов проводилось у 80 детей с БА в возрасте от 3 до 17 лет. Группу со среднетяжелой персистирующей БА составили 44 ребенка (55,0 %), с тяжелой персистирующей БА — 36 (45,0 %) детей. Содержание цитокинов в сыворотке крови определяли у 56 детей с atopической БА. Группу со среднетяжелым течением заболевания составили 33 ребенка (58,9 %), с тяжелым течением — 23 (41,1 %). В контрольную группу вошли 15 здоровых детей.

Иммунный статус устанавливали, определяя показатели клеточного звена иммунитета ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ -лимфоциты) с использованием моноклональных антител (*Becton Dickinson*, США). Идентификацию мембранных маркеров иммуокомпетентных клеток периферической крови проводили методом проточной цитометрии на аппарате *Epics XL* (*Beckman Coulter*, Франция) с применением автоматического программного обеспечения. Для обработки результатов использовали программу *CellQuest* (*Becton Dickinson*, США), используя параметры прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния.

Методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) определяли концентрацию вазоактивного интестинального пептида, нейрокина А, интерлейкина-10 и -12 (IL-10 и IL-12) в плазме и сыворотке крови наблюдаемых больных с использованием тест-систем (*Biosource*, США). Учет результатов ИФА выполняли на планшетном фотометре *Multi-scan plus* (*Labsystems*, Финляндия).

Данные, полученные в ходе исследования, обрабатывались методом математической статистики при помощи пакета программ *Statistica 6.0* [9]. Результаты исследования представлены в виде среднего арифметического, средней ошибки среднего арифметического, пределов колебаний (*max* и *min*). Для оценки связей между признаками использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Достоверность изменений показателей по сравнению с нормой определяли при помощи парного критерия Вилкоксона [10]. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Было установлено участие нейропептидов в развитии приступа БА у детей, что подтверждалось статистически достоверными различиями показателей VIP и нейрокина А в плазме крови обследуемых больных (рисунок). При тяжелом течении БА средний

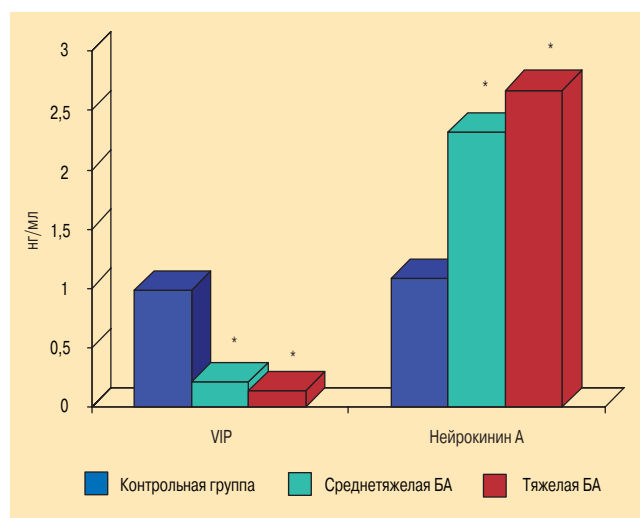


Рисунок. Содержание вазоактивного интестинального пептида и нейрокина А в плазме крови больных атопической БА. Примечание: * — достоверные различия у больных и лиц из контрольной группы; $p < 0,001$.

уровень VIP достоверно снижался ($0,13 \pm 0,01$ нг/мл vs $0,98 \pm 0,005$ нг/мл в группе контроля; $p < 0,001$). В группе со среднетяжелым течением заболевания значение VIP было в 1,6 раза выше и составило $0,21 \pm 0,03$ нг/мл ($p < 0,001$ по отношению к контрольной группе).

По-видимому, такое значительное понижение уровня VIP в плазме крови больных атопической БА, с одной стороны, может являться результатом повышенного разрушения данного нейротрансмиттера различными пептидазами, вырабатываемыми эозинофилами, нейтрофилами и тучными клетками [8], а с другой — обусловлено снижением его синтеза. Вероятно, в бронхах, подвергшихся воспалительному изменению, при обострении патологического процесса может ускоряться деградация VIP, что в свою очередь может привести к повышенной бронхоконстрикции. Вместе с тем известно, что при введении VIP больным БА он вызывает бронходилатацию и оказывает протективное действие на бронхоконстрикторные раздражители [3].

В группе с тяжелым течением заболевания также было установлено повышение концентрации другого нейропептида — нейрокина А в плазме крови ($2,67 \pm 0,09$ нг/мл vs $1,08 \pm 0,06$ нг/мл в контрольной группе; $p < 0,001$). При среднетяжелой БА его содержание несколько снижалось и составило $2,32 \pm 0,12$ нг/мл ($p < 0,001$ по отношению к группе контроля).

Столь выраженное повышение нейрокина А в плазме крови детей с атопической БА, по-видимому, свидетельствует о повышенной активности возбуждающих НАНХ-нервов. При этом НАНХ-бронхоконстрикция является следствием высвобождения нейропептидов, в данном случае нейрокина А, из сенсорных нервных окончаний, в результате чего может быть запущен аксоновый рефлекс [8]. Известно, что высвобождение сенсорных нейропептидов приводит к бронхоконстрикции, гиперемии, повышению сосудистой проницаемости и гиперсекреции слизи. Сенсорные нервы также передают сигнал в холинергические ганглии дыхательных путей, приводя к местной рефлекторной бронхоконстрикции [4]. Таким образом, нейрогенное воспаление может усиливать воспаление дыхательных путей при БА и провоцировать развитие гиперреактивности бронхов.

Хроническое аллергическое воспаление респираторного тракта с участием иммунокомпетентных клеток, лежащее в основе БА, способствует рефлекторному высвобождению периферических нейропептидов, которые могут вызывать такие эффекты, как вазодилатация, экссудация слизи, активация и дегрануляция воспалительных клеток и, в определенных условиях, сокращение гладкой мускулатуры.

При изучении лабораторных показателей периферической крови у детей с атопической БА была установлена также выраженная лимфопения, составившая 18,3 % (предел колебаний — 17,0–19,6 %) при среднетяжелом течении, 12,2 % (предел колебаний — 11,0–13,4 %) — при тяжелом течении vs 30,0 % (предел колебаний — 26,0–33,0 %) в группе контроля ($p < 0,01$), как показано в табл. 1.

Таблица 1

Показатели иммунной системы при БА различной степени тяжести

Показатели	Больные БА		Контрольная группа, n = 15
	среднетяжелая БА, n = 44	тяжелая БА, n = 36	
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	9,82 (9,42–10,22)*	10,68 (10,17–11,19)*	7,95 (7,34–8,56)
Лимфоциты, %	18,3 (17,0–19,6)*	12,2 (11,0–13,4)*	30,0 (26,0–33,0)
CD3 ⁺ , %	42,5 (40,9–44,1)*	36,4 (29,6–43,2)*	62,9 (54,6–71,2)
CD4 ⁺ , %	23,8 (21,9–25,7)*	17,7 (13,9–21,5)*	37,3 (29,6–45,0)
CD8 ⁺ , %	18,7 (11,2–26,2)*	16,3 (12,7–19,9)	25,5 (18,2–32,8)
ИРИ (CD4 ⁺ / CD8 ⁺)	1,27 (1,14–1,40)*	1,08 (0,92–1,16)*	1,46 (1,34–1,58)

Примечание: CD3⁺ – общие Т-лимфоциты; CD4⁺ – Т-хелперы; CD8⁺ – Т-супрессоры; ИРИ – иммунорегуляторный индекс; * – $p < 0,01$ по отношению к контрольной группе.

Анализ распределения субпопуляционного состава лимфоцитов крови выявил статистически значимое уменьшение количества CD3⁺-лимфоцитов в обеих группах наблюдения. При этом при среднетяжелой персистирующей БА данный показатель составил 42,5 % (предел колебаний – 40,9–44,1 %), а при тяжелой персистирующей БА – 36,4 % (29,6–43,2 %) vs 62,9 % (54,6–71,2 %) в контрольной группе ($p < 0,01$), что, возможно, свидетельствует о снижении суммарного содержания Т-лимфоцитов за счет миграции этих клеток в очаг повреждения и о наличии хронического воспаления.

Концентрация иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов была изменена неравномерно. Преимущественно снизилось относительное содержание лимфоцитов, обладающих хелперно-индукторными свойствами. Анализ относительного количества CD4⁺-лимфоцитов показал, что у больных происходит достоверное снижение данного показателя до 23,8 % (предел колебаний – 21,9–25,7 %) при среднетяжелой БА и до 17,7 % (13,9–21,5 %) – при тяжелой БА vs 37,3 % (29,6–45,0 %) в группе контроля ($p < 0,01$). Низкий уровень экспрессии рецепторов CD4⁺ свидетельствует о супрессии регуляторного звена иммунитета.

Уровень CD8⁺-лимфоцитов с цитотоксическими свойствами у детей с тяжелой и среднетяжелой atopической БА также были снижены. Среднее количество CD8⁺ составило 18,7 % (предел колебаний – 11,2–26,2 %) при среднетяжелой, 16,3 % (12,7–19,9 %) – при тяжелой БА и 25,5 % (18,2–32,8 %) – в контрольной группе ($p < 0,01$). Статистически значимое снижение относительной численности CD8⁺-популяции лимфоцитарных клеток у больных с тяжелым и среднетяжелым течением atopической БА свидетельствует о нарушенной регуляции иммунного ответа.

Выявленное нарушение регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов (CD4⁺/CD8⁺) привело к существенной инверсии иммунорегуляторного индекса. Самый низкий показатель ИРИ соответствовал тяжелому течению atopической БА.

Анализ иммунного гомеостаза детей с тяжелым и среднетяжелым персистирующим течением atopической БА выявил наличие иммунодепрессии, которая характеризовалась определенным набором измененных показателей иммунного статуса: относительной лимфопенией, сниженной экспрессией рецепторов CD3⁺-, CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов,

снижением показателей иммунорегуляторного индекса.

Таким образом, у детей с atopической БА наряду с изменениями в иммунной системе колеблется содержание нейропептидов в крови, что, в конечном итоге, ведет к нарушению нейроиммунных взаимоотношений у этих больных. Значение взаимосвязи этих нарушений в патогенезе atopической БА требует дальнейшего изучения.

На сегодняшний день известно, что продуцируемые иммунокомпетентными клетками интерлейкины выполняют не только иммунорегуляторную, но и определенную нейрорегуляторную функцию и обозначаются как мессенджеры нейроиммунного взаимодействия [6].

При изучении содержания IL-10 и IL-12 в сыворотке крови больных atopической БА различной тяжести было установлено значительное отличие от показателей контрольной группы, что указывает на имеющиеся нарушения в цитокиновом статусе обследованных детей. Статистически значимым было изменение уровня IL-10, который был выше контрольного значения в 3,1 раза при среднетяжелой БА ($7,45 \pm 0,39$ пг/мл vs $2,37 \pm 0,35$ пг/мл в контрольной группе; $p < 0,001$) и в 4,0 раза – при тяжелой БА ($9,570 \pm 0,64$ пг/мл vs $2,37 \pm 0,35$ пг/мл соответственно; $p < 0,001$). Заметно увеличилась концентрация IL-12. Среднее содержание этого цитокина в сыворотке крови при среднетяжелом течении заболевания составило $157,0 \pm 7,1$ пг/мл, при тяжелом – $228,5 \pm 12,5$ пг/мл, что превышало показатели средней популяционной нормы ($74,9 \pm 7,2$ пг/мл) в 2,1 и 3,0 раза соответственно ($p < 0,001$).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об изменении содержания как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови детей с БА в зависимости от тяжести течения. Выявленные отклонения в цитокиновом профиле, в формировании которого значительную роль играют нарушения клеточного иммунитета, являются одним из ведущих патогенетических звеньев, определяющих развитие заболевания.

В настоящее время существует настоятельная необходимость в применении методических подходов, позволяющих количественно оценить степень межсистемного взаимодействия различных клинико-лабораторных показателей – как в норме, так и при патологии [11]. В связи с этим при анализе полученных

результатов исследования использовался прием, основанный на изучении межсистемных соотношений. Особое внимание уделялось корреляционному анализу как методу оценки взаимосвязи между различными показателями. Чтобы установить силу и направленность взаимосвязи количественных признаков, был проведен парный корреляционный анализ с вычислением коэффициента корреляции. Функциональная связь при коэффициенте корреляции до 0,5 оценивалась как слабая, при 0,5–0,7 – как средняя, при 0,7–1,0 – как сильная. При анализе учитывались только связи с коэффициентом корреляции $r > 0,5$, отражающие среднюю и сильную зависимость между признаками.

В табл. 2 представлена структура корреляционных соотношений между изученными показателями у больных atopической БА.

При atopической БА VIP связан достоверной обратной корреляционной зависимостью с нейрокинином А ($r = -0,54$; $p < 0,05$) и IL-10 ($r = -0,60$; $p < 0,05$), а также прямой корреляционной зависимостью с CD4⁺-лимфоцитами ($r = +0,66$; $p < 0,05$). Нейрокинин А в группе больных atopической БА тесно положительно коррелирует с уровнем CD4⁺-лимфоцитов ($r = +0,54$; $p < 0,05$) и IL-12 ($r = +0,77$; $p < 0,05$). По результатам анализа, CD3⁺-лимфоциты обнаруживали достоверную корреляционную зависимость от CD4⁺-лимфоцитов ($r = -0,51$; $p < 0,05$) и IL-10 ($r = +0,66$; $p < 0,05$), в остальных случаях корреляционная зависимость была недостоверной. CD4⁺-лимфоциты находились в корреляционной связи с IL-10 ($r = +0,77$; $p < 0,05$) и IL-12 ($r = +0,83$; $p < 0,05$). Анализ представленных данных показал, что CD8⁺-лимфоциты имеют 2 достоверные корреляционные зависимости от IL-10 ($r = +0,60$; $p < 0,05$) и IL-12 ($r = +0,77$; $p < 0,05$). С IL-10 при atopической БА коррелировал IL-12 ($r = +0,71$; $p < 0,05$).

Для решения поставленной задачи использовали показатель межсистемных соотношений [11, 12] в организме, который учитывает выраженность взаимодействия отдельного параметра со всеми остальными, а его величина определяется как сумма коэффициентов корреляции (суммируются только коэффициенты со средней и сильной зависимостью между признаками, независимо от знака корреляции, по формуле:

$$y = \sum_{i=1}^n r_i$$

где y – суммарная взаимосвязь одного показателя со всеми остальными.

Суммируя полученные данные, можно отметить, что по количеству межсистемных взаимосвязей при atopической БА лидируют 2 показателя – IL-10 и CD4⁺-лимфоциты, у которых сумма значимых коэффициентов корреляции составила 3,34 и 3,31 соответственно. Затем следуют IL-12 (суммарная выраженность взаимодействия – 3,08), нейрокинин А, VIP, CD8⁺-лимфоциты и CD3⁺-лимфоциты (1,85; 1,8; 1,37 и 1,17 соответственно).

Таким образом, можно констатировать, что при atopической БА общая структура численных характеристик межсистемных взаимосвязей принимает следующий вид:

$$IL-10 > CD4^+ > IL-12 > \text{нейрокинин А} > VIP > CD8^+ > CD3^+$$

Описанный выше подход к анализу корреляционной зависимости использовали для оценки особенностей иммунного статуса в контрольной группе здоровых детей и получили следующую запись:

$$IL-12 > CD3^+ > \text{нейрокинин А} > VIP > IL-10 > CD8^+ > CD4^+$$

Затем сравнили интегральные характеристики взаимодействия изученных показателей при atopической БА и у здоровых детей. В контрольной группе по силе межсистемного взаимодействия с остальными показателями на 1-м месте находится IL-12, при atopической БА он смещается на 3-е место, а главную позицию занимает IL-10 (на 5-м месте в группе здоровых). CD4⁺-лимфоциты, занимающие 7-е место, в контрольной группе в группе больных перемещаются на 2-е, а CD3⁺-лимфоциты со 2-го места в группе здоровых детей – на последнее место в группе больных.

Выявленные изменения в структуре межсистемных взаимодействий можно, по-видимому, объяснить следующим образом. Учитывая, что IL-12 способствует переходу Т-хелперных клеток из Th0 в Th1, т. е. имеет большое значение в развитии иммунного ответа Th1-типа, у здоровых лиц он в меньшей степени находится под регулирующим влиянием IL-10, чем при atopической БА. Перемещение IL-12 на 3-е место по степени регулирующего влияния указывает на то, что при БА начинает преобладать иммунный ответ Th2-типа, что подтверждается перемещением IL-10, влияющего на переход Th0 в Th2, с 5-го места в контрольной группе на 1-е место при БА.

С другой стороны, изучаемые нейропептиды как у здоровых лиц, так и у больных БА находятся в середине представленных рядов, что может быть

Таблица 2

Структура корреляционных соотношений изученных показателей у больных atopической БА

Показатели	Нейрокинин А	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	IL-10	IL-12
VIP	-0,54*	-0,22	+0,66*	+0,31	-0,60*	-0,10
Нейрокинин А		-0,37	+0,54*	+0,34	+0,43	+0,77*
CD3 ⁺			-0,51*	+0,20	+0,66*	+0,10
CD4 ⁺				+0,10	+0,77*	+0,83*
CD8 ⁺					+0,60*	+0,77*
IL-10						+0,71*

Примечание: знак “-” свидетельствует об обратной зависимости между сопоставляемыми показателями; * – средняя и сильная зависимость при $p < 0,05$.

обусловлено их взаимным влиянием на остальные показатели.

Заключение

Таким образом, изучив изменения в системе взаимосвязей исследованных показателей по данным корреляционного анализа, можно отметить, что при atopической БА система внутреннего взаимовлияния параметров иммунной системы, цитокинового профиля и нейропептидов нарушается.

Литература

1. Григорьев К.И., Хан М.А., Григорьева О.К. Бронхиальная астма: GINA, новые инициативы и детская пульмонологическая практика. Мед. помощь 2007; 3: 3–8.
2. Лев Н.С. Клинико-патогенетическое значение нейропептидов при бронхиальной астме у детей: Автореф. дис.... канд. мед. наук. М.; 1994.
3. Casale T.B. Neuropeptides and the lung. J. Allergy Clin. Immunol. 1991; 88 (1): 1–14.
4. Wallengren J., Hakanson R. Effects of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in human skin and their involvement in sensory nerve-mediator responses. Eur. J. Pharmacol. 1987; 143 (2): 267–273.
5. Пелецкий А.М., Романюк Л.И., Кузнецова Л.В. Цитокиновый профиль в сыворотке крови при лечении больных бронхиальной астмой с использованием Эриуса. Астма 2003; 1: 9–12.
6. Цитокины, интерлейкины, монокины и лимфокины. Значение в регуляции иммунного ответа и межсистемных взаимодействий: метод. рекомендации / Сост.: Коростелев А.А., Лисаченко Г.В., Кострова Т.О. и др. Кемерово; 2005.
7. Barnes P.J., Baraniuk J.N., Belyvis M.G. Neuropeptides in the respiratory tract. Am. Rev. Respir. Dis. 1991; 144 (5): 1391–1399.
8. Cheung D. Neutral endopeptidase activity and airway hyperresponsiveness to neurokinin A in asthmatic subjects in vivo. Am. Rev. Respir. Dis. 1993; 148: 1467–1479.
9. Боровиков В.П. Популярное введение в программу STATISTICA. М.: Компьютер Пресс; 1998.
10. Айвазян С.А. Статистическое исследование зависимостей. М.; 1968.
11. Баяевский Р.М. Прогнозирование состояний на грани нормы и патологии. М.: Медицина; 1979.
12. Udut V.V., Naumov S.A., Karpov A.B., Volovodenco V.A., Dygai A.M. Structural organisation of life support system at pathologic process development. Pathophysiology 1995; 2: 123–127.

Информация об авторе

Султанова Наиля Гасановна – к. м. н., доцент кафедры детских болезней № 2 Азербайджанского медицинского университета; тел.: +9 (9450) 222-36-46; e-mail: naila_sultanova@hotmail.com

Поступила 04.02.10
© Султанова Н.Г., 2010
УДК 616.248-053.2-092