Н.Г.Демьяненко[1], В.В.Романов[1], М.М.Авербах[1], С.В.Лямина[2], И.Ю.Малышев[2] Е.И.Шмелев[1]

Динамическое исследование клинико-иммунологических показателей у больных с впервые выявленным саркоидозом

1 – ФГБУ "Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза" РАМН: 107564, Москва, Яузская аллея, 2;

2 – ГБОУ ВПО "Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова" Минздрава России: 127473, Москва, ул. Делегатская, 20 / 1

N.G.Dem'yanenko, V.V.Romanov, M.M.Averbakh, S.V.Lyamina, I.Yu.Malyshev, E.I.Shmelev

Prospective investigation of clinical and immunological status in patients with newly diagnosed sarcoidosis

Summary

Cytokine profile in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and blood serum was investigated in 80 patients with newly diagnosed sarcoidosis. Of them, 42 patients were treated with prednisolone and 38 patients were treated with fenspirid (Eurespal). BALF interleukin (IL) concentration was higher than serum IL concentration that could reflect a local immune response. To the 6th month of the therapy, significant blood levels of IL-2, IL-4 and IL-5 in prednisolone-treated patients were found compared to fenspirid-treated patients that could indicate an increased immune Tx-2 activity that, in turn, could facilitate development of prednisolone adverse effects. Treatment with fenspirid during 6 months has led to increased production of IL-10 that was 2.5-fold higher compared to IL-10 level in prednisolone-treated patients. The results suggest more effective inhibition of excessive immune inflammation in prednisolone-treated patients.

Key words: sarcoidosis, prednisolone, fenspirid, interleukin, cytokine profile.

Резюме

Выполнено исследование цитокинового профиля в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) и сыворотке крови у пациентов (n = 80) с впервые выявленным саркоидозом. Пациенты 1-й группы (n = 42) получали преднизолон, 2-й (n = 38) – фенспирид (эреспал). Отмечено, что содержание интерлейкинов (IL) в БАЛ выше, чем в сыворотке крови, что является отражением местного иммунного ответа. По сравнению с пациентами группы лечения эреспалом значительный уровень продукции в сыворотке крови IL-2, IL-4 и IL-5 к 6-му месяцу лечения преднизолоном указывает на повышенную активность иммунологического ответа по типу Тх-2, что может оказывать влияние на побочные реакции лечения преднизолоном. Лечение эреспалом в течение 6 мес. приводит к повышению продукции IL-10, что в 2,5 раза выше аналогичного показателя в группе преднизолона. Это свидетельствует о более эффективном подавлении избыточного иммунологического компонента воспаления в результате проводимой терапии.

Ключевые слова: саркоидоз, преднизолон, фенспирид, интерлейкины, цитокиновый профиль.

Основу иммунопатогенеза саркоидоза составляет реакция гиперчувствительности замедленного типа. Этот тип иммунного воспаления представляет собой эффекторную фазу специфического клеточного ответа. [1–2]. Саркоидоз является полиорганным заболеванием, характеризующимся формированием эпителиоидно-клеточных гранулем, Т-лимфоцитарно-моноцитарной инфильтрацией и нарушением микроархитектоники ткани. В саркоидозных гранулемах обнаружены антигенпрезентирующие клетки моноцитарно-макрофагального ряда, Т- и В-лимфоциты, осуществляющие иммунные реакции [3]. Иммунологические исследования клеток, полученных из промывных вод бронхов, проведенные в последние 20 лет и составившие основу иммунопатогенеза саркоидоза, позволили по-новому взглянуть на патогенетические аспекты данной болезни [4, 5]. Для оценки активности воспалительного процесса, а следовательно, и тяжести заболевания, были отобраны некоторые биологические вещества (маркеры) – цитокины, растворимые рецепторы цитокинов, энзимы и компоненты сыворотки – специфические эпителиальные белки [6]. Хотя этих маркеры тесно связаны с патогенезом заболевания [7, 8], информации о том, какой из них является наиболее ценным для оценки тяжести и прогноза заболевания, все еще недостаточно. Этиологически обусловленной терапии больных саркоидозом не существует, продолжается поиск новых препаратов и методик патогенетического воздействия на гранулематозный процесс.

Актуально изучение макрофагального и лимфоцитарного звеньев патогенеза у больных саркоидозом в процессе известной противовоспалительной терапии и при использовании других противовоспалительных препаратов.

Целью исследования явилось изучение клинико-иммунологических особенностей течения впервые выявленного саркоидоза (на уровне синтеза интерлейкинов – IL) при различных режимах противовоспалительной терапии (преднизолоном и фенспиридом).

Материалы и методы

В исследование были включены пациенты (n = 80; 47 женщин и 33 мужчины; средний возраст – 48,8 ± 1,25 года) с впервые выявленным морфологически верифицированным саркоидозом, госпитализированные в ЦНИИТ РАМН с 2010 по 2013 гг. До верификации диагноза больные не получали лечения кортикостероидными и нестероидными противовоспалительными препаратами и не имели сопутствующих заболеваний. При поступлении в стационар всем больным проводилось стандартное обследование: сбор анамнеза, физикальные методы обследования, клинический анализ крови, компьютерная томография органов грудной клетки, спирометрия, бронхологическое исследование с бронхоальвеолярным лаважом (БАЛ), чрезбронхиальной биопсией легкого, цитологическое и морфологическое исследование материалов БАЛ, определение цитокинов (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, фактор некроза опухоли – TNF-α и β, интерферон – IFN-γ) в крови и БАЛ методом мультиплексного иммунофлюоресцентного анализа на выявление концентрации цитокинов в биологических жидкостях. Для определения использовался стандартный набор *FlowCytomix human* Th1 / Th2 11plex BMS810FF, кат. № BMS810FF (набор рассчитан на 96 тестов).

Анализ уровня цитокинов у человека методом проточной цитометрии выполнен в соответствии с инструкциями производителя с учетом данных о чувствительности данного набора в отношении исследуемых цитокинов. Порог чувствительности (пг / мл) для каждого из цитокинов был следующим:

- IL-1β – 5,2;
- IL-2 – 20,0;
- IL-4 – 15,7;
- IL-5 – 10,0;
- IL-6 – 0,8;
- IL-8 – 7,9;
- IL-10 – 1,5;
- IL-12p70 – 11,6;
- IFN-γ – 2,2;
- TNF-α – 17,54;
- TNF-β – 3,1.

Больные были разделены на 2 группы: 1-я (n = 42) получала преднизолон в максимальной суточной дозе 20 мг; 2-я (n = 38) – фенспирид (эреспал) 240 мг в сутки. Контроль указанных параметров проводился через 1, 3 и 6 мес. от начала терапии. Исследование БАЛ проводилось однократно при поступлении. Клинически значимых системных проявлений во всех группах не наблюдалось, у всех пациентов отмечено увеличение внутригрудных лимфатических узлов и диссеминация в легких.

Для статистического анализа полученных данных использовалась программа *Microsoft Excel* и метод описательной статистики. Статистический анализ данных цитокинового профиля проводился с помощью программного обеспечения *Statistica 8.0* с определением среднего значения выбранных параметров и их ошибки.

Результаты

У пациентов обеих групп отмечались следующие жалобы: в группе фенспирида – сухой кашель различной степени интенсивности – у 23 (60,5 %), одышка при умеренной физической нагрузке – у 17 (44,7 %), слабость – у 15 (39,4 %); в группе преднизолона – кашель – у 30 (71,4 %), одышка при умеренной физической нагрузке – у 21 (50 %), слабость – у 13 (30,9 %), артралгии – у 3 (7,1 %) больных.

В процессе противовоспалительной терапии через 1 мес. в группе эреспала редкий сухой кашель отмечен у 5 (13,1 %) пациентов, одышка – у 7 (18,4 %), слабость – у 8 (21 %), тогда как в группе преднизолона – у 11 (26,1 %), 9 (21,4 %) и 1 (2,3 %) соответственно. Через 3 мес. от начала терапии как в группе эреспала, так и в группе преднизолона пациенты жалоб не предъявляли. При исследовании уровня скорости оседания эритроцитов (СОЭ) к 6-му месяцу лечения в обеих группах наблюдалась положительная динамика: в группе преднизолона СОЭ снизилась с 21,2 ± 4,2 до 9,7 ± 1,7мм / ч, а в группе эреспала – с 30,7 ± 7,3 до 10,8 ± 0,9 мм / ч соответственно. Показатели спирометрии в обеих группах исходно и в процессе терапии сохранялись в пределах нормы (табл. 1).

При исследовании цитокинового профиля в БАЛ и сыворотке крови в обеих группах было отмечено, что содержание IL в БАЛ выше содержания такового в сыворотке крови. Это обусловлено тем, что материал был взят непосредственно вблизи очага воспа-

Таблица 1
Динамика показателей спирометрии в процессе 6-месячной терапии

Показатели до и после терапии, $\%_{долж.}$	Группа преднизолона, n = 42	Группа эреспала, n = 38
ЖЕЛ:		
до	103,5 ± 4,4	101,6 ± 4,6
после	108,1 ± 3,6	107,5 ± 2,7
$ОФВ_1$:		
до	90,8 ± 4,1	99,8 ± 4,3
после	99,6 ± 3,3	105,0 ± 2,5
$МОС_{75}$:		
до	62,1 ± 6,8	81,7 ± 6,3
после	91,01 ± 6,9	89,5 ± 5,1
$МОС_{50}$:		
до	67,4 ± 6,0	85,5 ± 6,8
после	86,8 ± 6,0	93,5 ± 4,9
$МОС_{25}$:		
до	76,2 ± 6,6	87,4 ± 7,4
после	90,3 ± 6,0	94,0 ± 4,2
DL_{CO} / SB:		
до	76,2 ± 3,6	79,9 ± 3,1
после	86,5 ± 2,6	88,3 ± 1,7
DL_{CO} / VA:		
до	89,2 ± 4,6	91,9 ± 4,2
после	93,6 ± 3,8	92,1 ± 3,1

Примечание: ЖЕЛ – жизненная емкость легких; $ОФВ_1$ – объем форсированного выдоха за 1-ю секунду; $МОС_{25–75}$ – максимальная объемная скорость выдоха на уровне 25, 50 и 75 % форсированной ЖЕЛ; DL_{CO} / SB – диффузионная способность легких; DL_{CO} / VA – коэффициент диффузии.

Таблица 2

Сравнение уровней IL в сыворотке и БАЛ до лечения в группах преднизолона и эреспала, пг / мл

IL	Группа преднизолона		Группа фенспирида	
	БАЛ	сыворотка крови	БАЛ	сыворотка крови
IL-1β	425,1 ± 86,6	253,3 ± 99,5	423,5 ± 48,4	201,1 ± 61,7
IL-6	70,93 ± 8,8	152,2 ± 53,4	89,0 ± 26,8	123,8 ± 24,5
TNF-α	222,9 ± 9,8	251,3 ± 112,04	453,3 ± 245,5	148,7 ± 19,7
TNF-β	809,8 ± 36,7	224,0 ± 32,9	670,3 ± 39,6	169,3 ± 30,5
IL-12	774,3 ± 55,9	144,4 ± 23,3	734,6 ± 59,3	114,3 ± 21,5
IL-8	2 266,6 ± 506,9	856,2 ± 256,7	1 866,8 ± 401,2	1 510,6 ± 327,3
IFN-γ	1 007,6 ± 207,3	360,5 ± 52,6	744,3 ± 83,1	388,1 ± 52,87
IL-2	642,5 ± 68,86	436,4 ± 130,4	650,6 ± 29,4	302,2 ± 97,16
IL-4	725,6 ± 43,7	595,7 ± 111,8	829,1 ± 76,4	375,3 ± 56,3
IL-5	1 296,04 ± 580,7	1 148,1 ± 367,3	711,0 ± 55,3	267,5 ± 56,3
IL-10	171,9 ± 25,3	134,3 ± 15,93	136,5 ± 10,8	364,5 ± 153,01

Таблица 3

Сравнение содержания IL в сыворотке крови в группе преднизолона, пг / мл

IL	При поступлении	Через 1 мес.	Через 3 мес.	Через 6 мес.
IL-6	152,2 ± 53,4	157,5 ± 37,7	142,9 ± 4,1	63,9 ± 9,8
TNF-α	251,3 ± 112,04	193,3 ± 44,6	13 618,9 ± 7 053,9	236,9 ± 56,8
TNF-β	224,0 ± 32,9	1 028,3 ± 497,9	1 366,6 ± 642,7	127,7 ± 3,2
IL-8	856,2 ± 256,7	724,5 ± 217,1	407,9 ± 100,9	368,5 ± 124,9
IFN-γ	360,5 ± 52,6	417,9 ± 53,9	538,6 ± 142,7	307,9 ± 39,2
IL-2	436,4 ± 130,4	570,5 ± 227,5	550,9 ± 177,1	840,6 ± 252,3
IL-4	595,7 ± 111,8	1 122,3 ± 164,3	1 552,5 ± 382,2	3 511,9 ± 701,2
IL-5	1 148,1 ± 367,3	1 438,5 ± 361,2	3 051,9 ± 760,5	5 106,9 ± 796,1
IL-10	134,3 ± 15,93	133,8 ± 19,2	1 040,8 ± 379,8	630,9 ± 191,9

ления (табл. 2). При динамическом исследовании цитокинового профиля в группе преднизолона было выявлено, что к 6-му месяцу лечения достоверно снизился синтез IL-6, IL-8 и IL-12, возросли показатели IL-2, IL-4, IL-5, IL-10. Значения TNF-α и β возросли к 3-му месяцу лечения, а к 6-му месяцу отмечено их снижение. Это может указывать на способность преднизолона снижать синтез цитокинов (табл. 3, рис. 1).

При динамическом сравнении показателей содержания IL в сыворотке крови в группе фенспирида в процессе терапии выявлено снижение уровня IL-1β, TNF-α, IFN-γ, IL-8, IL-2 и повышение уровня IL-4, IL-5, IL-10 (табл. 4, рис. 2).

При динамическом исследовании синтеза противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-5, IL-10 выявлена значительная продукция IL-4 и IL-5 в группе преднизолона, что свидетельствует о сдвиге иммунного ответа в сторону Т2-хелперов, тогда как в группе фенспирида продукция IL-4 и IL-5 невысока. В группе лечения фенспиридом к 6-му месяцу наблюдалась

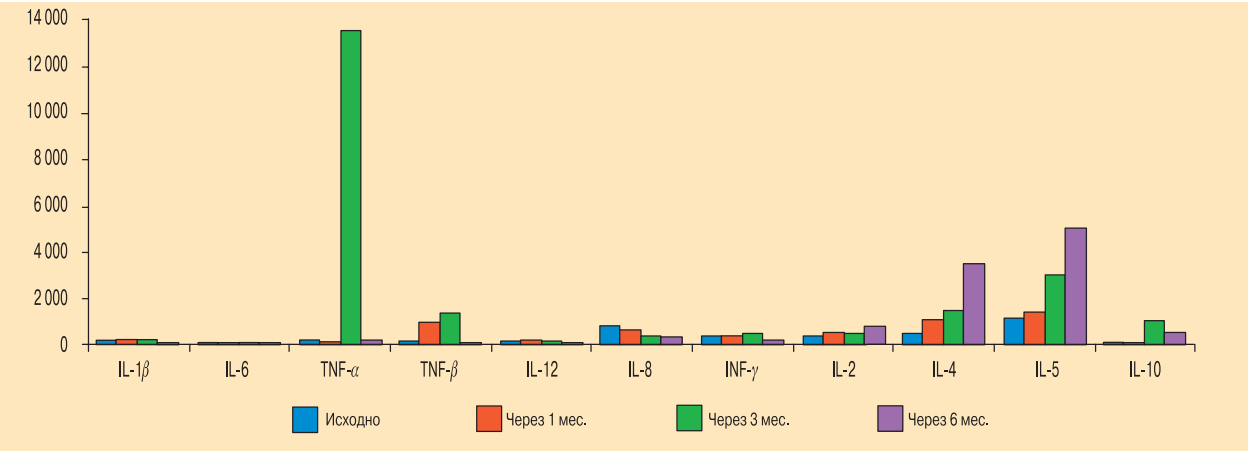

Рис. 1. Сравнение показателей содержания IL в сыворотке крови у пациентов группы преднизолона в процессе терапии

Таблица 4

Сравнение содержания IL в сыворотке крови в группе фенспирида, пг / мл

IL	При поступлении	Через 1 мес.	Через 3 мес.	Через 6 мес.
IL-1β	358,01 ± 140,30	255,6 ± 88,2	194,6 ± 44,3	131,9 ± 9,2
TNF-α	211,8 ± 5,4	174,7 ± 12,2	151,3 ± 32,2	76,01 ± 1,07
IL-8	3 098,05 ± 102,40	2 367,03 ± 244,80	1 318,9 ± 169,8	657,1 ± 62,9
IFN-γ	588,3 ± 10,3	491,3 ± 79,4	306,7 ± 89,3	308,5 ± 41,2
IL-2	534,9 ± 223,7	335,80 ± 181,02	399,4 ± 222,9	130,595 ± 1,5
IL-4	356,7 ± 129,6	582,02 ± 228,70	567,3 ± 208,8	1 230,70 ± 277,16
IL-5	281,4 ± 123,9	430,9 ± 174,4	263,8 ± 61,8	926,5 ± 270,9
IL-10	507,8 ± 307,2	726,5 ± 481,4	930,5 ± 621,6	1 680,300 ± 822,002

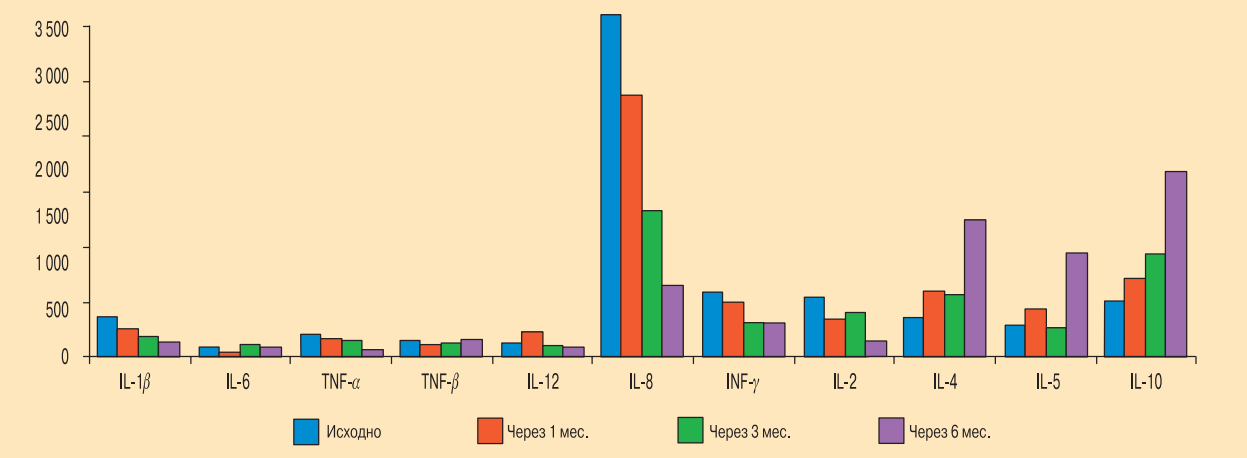

Рис. 2. Динамическое сравнение показателей содержания IL в сыворотке крови у пациентов группы фенспирида в процессе терапии

выраженная продукция IL-10, что может свидетельствовать о том, что в результате лечения наблюдаются процессы подавления избыточной активности иммунной системы (рис. 3).

Заключение

При 6-месячной терапии изменений показателей спирометрии не отмечено, однако к 3-му месяцу лечения наблюдались снижение уровня СОЭ и регресс клинической симптоматики. Применение в течение 6 мес. преднизолона приводит к снижению выработки провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6, IL-8 и IL-12 и возрастанию продукции IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, а терапия фенспиридом способствует снижению выработки группы провоспалительных цитокинов IL-1β, TNF-α, IFN-γ, IL-8 и IL-2 и повышению уровня продукции IL-4, IL-5 и IL-10. Значительный уровень продукции IL-2, IL-4 и IL-5 к 6-му месяцу лечения преднизолоном по сравнению с группой фенспирида указывает на повышенную активность иммунологического ответа по типу Tx-2, что может оказывать влияние на побочные реакции лечения преднизолоном. Лечение больных в течение 6 мес. фенспиридом приводит к повышению уровня продукции IL-10, который в 2,5 раза выше аналогичного показателя в группе преднизолона. Это свидетельствует о более эффективном подавлении избыточного иммунологического компонента воспаления в результате проводимой терапии.

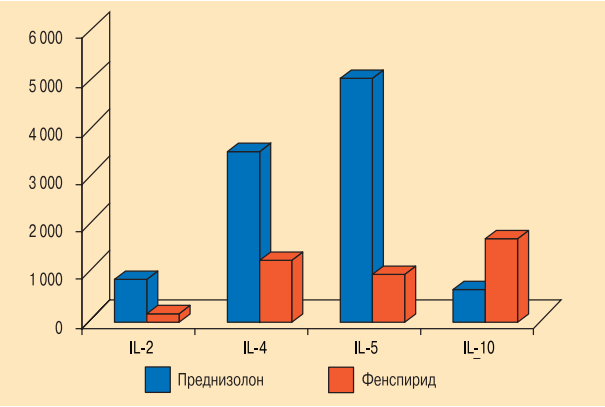

Рис. 3. Сравнение противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-5 и IL-10 в обеих группах к 6-му месяцу терапии

Литература

1. *Чучалин А.Г.* (ред.). Саркоидоз. М.: Атмосфера; 2010. 80–86.
2. *Фрейдлин И.С., Тотолян А.А.* Иммунопатологические механизмы воспаления бронхов и легких. В кн.: Федосеев Г.Б. (ред.). Механизмы воспаления бронхов и легких и противовоспалительная терапия. СПб: Нормед-Издат; 1998. 195–298.

3. *Маянский Д.Н.* Хроническое воспаление. М.: Медицина; 1991.
4. *Hunninghake G.W., Crystal R.G.* Pulmonary sarcoidosis: a disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of disease activity. N. Engl. J. Med. 1981; 305: 429–434.
5. *Newman L.S., Rose G.S., Maler L.A.* Sarcoidosis. N. Engl. J. Med. 1997, 336: 1224–1234.
6. *Muller-Quernheim J.* Serum markers for the staging of disease activity of sarcoidosis and other interstitial lung diseases of unknown etiology. Sarcoidos. Vasc. Diffuse Lung Dis. 1998; 15: 22–37.
7. *Keicho N., Kitamura K., Takaku F., Yotsumoto H.L.* Serum concentration of soluble interleukin-2 receptor as a sensitive parameter of disease activity in sarcoidosis. Chest 1990; 98: 1125–1129.
8. *Lawrence E.C., Brousseau K.P., Berger M.B. et al.* Elevated concentrations of soluble interleukin-2 receptors in serum samples and bronchoalveolar lavage fluids in active sarcoidosis. Am. Rev. Respir. Dis. 1988, 137: 759–764.

Информация об авторах

Демьяненко Наталья Геннадьевна – мл. научный сотрудник отдела дифференциальной диагностики туберкулеза легких и экстракорпоральных методов лечения ФГБУ ЦНИИТ РАМН; тел.: (499) 785-91-56; e-mail: timofei2006@yandex.ru

Романов Владимир Викторович – д. м. н., профессор, ведущий научный сотрудник отдела дифференциальной диагностики туберкулеза легких и экстракорпоральных методов лечения, зав. 2-м терапевтическим отделением ФГБУ ЦНИИТ РАМН; тел.: (499) 785-91-56; e-mail: romanov@internets.ru

Авербах Михаил Михайлович – д. м. н., профессор, гл. научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУ ЦНИИТ РАМН; тел.: (499) 785-85-90; e-mail: amm50@mail.ru

Лямина Светлана Владимировна – д. м. н., профессор кафедры патологической физиологии лечебного факультета, доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии ГБОУ ВПО "МГМСУ им. А.И.Евдокимова" Минздрава России; тел.: (985) 177-90-70; e-mail: svlvs@mail.ru

Малышев Игорь Юрьевич – д. м. н., профессор, зав. кафедрой патологической физиологии лечебного факультета ГБОУ ВПО "МГМСУ им. А.И.Евдокимова" Минздрава России, зав. лабораторией клеточных биотехнологий НИМСИ ГБОУ ВПО "МГМСУ им. А.И.Евдокимова" Минздрава России; тел.: (985) 177-90-70; e-mail: iymalyshev1@gmail.com

Шмелев Евгений Иванович – д. м. н., профессор, руководитель отдела дифференциальной диагностики туберкулеза легких и экстракорпоральных методов лечения ФГБУ ЦНИИТ РАМН; тел.: (499) 785-90-31; e-mail: shmelev@mgts.ru

Поступила 10.12.13
© Коллектив авторов, 2014
УДК 616.24-002.28-092:612.017.1